



**Centro De Investigación y De Estudios Avanzados Del Instituto
Politécnico Nacional**

Unidad Irapuato

“Rutas de síntesis completas de aminoácidos en aislados de *B. cereus* de una comunidad microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila con fenotipo de auxotrofías”

Tesis que presenta

Biol. Diana Barceló Antemate

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Directora de Tesis

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

Irapuato, Guanajuato, México

Marzo de 2016



**Centro De Investigación y De Estudios Avanzados Del Instituto
Politécnico Nacional**

Unidad Irapuato

“Rutas de síntesis completas de aminoácidos en aislados de *B. cereus* de una comunidad microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila con fenotipo de auxotrofías”

Tesis que presenta

Biol. Diana Barceló Antemate

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Directora de Tesis

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

Irapuato, Guanajuato, México

Marzo de 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato, a cargo de la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez directora del CINVESTAV-Irapuato, con la asesoría del Dr. Luis Delaye Arredondo (investigador titular del CINVESTAV) y el Dr. Francisco Barona Gómez (investigador titular de la UGA), y con el apoyo económico de la beca con número de CVU: 563693 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

A la Dra. Olmedo, por ser la mejor guía que haya podido tener en el inicio y finalización de mi tesis, motivarme en la investigación, por su paciencia, ánimos, por brindarme parte de su tiempo aún con agenda llena y porque es un admirable y digno ejemplo a seguir.

Al Dr. Barona, por sus importantes y atinados comentarios y observaciones, por su valiosa asesoría y por ser parte fundamental en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Delaye por su amable dedicación y tiempo, por sus importantes aportaciones y explicaciones en cada tutorial las cuales fueron de grandísima ayuda para el proceso de mi tesis.

Al Dr. Pablo Cruz quién se encargó de la secuenciación del genoma de las cepas y por sus excelentes asesorías.

A la M. C. África Islas, por brindarme su apoyo técnico en la extracción de ADN bacteriano, por conseguirme los materiales necesarios en el transcurso de mis experimentos y por las buenas sugerencias experimentales en el proyecto.

A la maestra Berenice Cueva, por su tiempo y paciencia, por su disponibilidad de trabajo, por estar al pendiente en cada tutorial y por el apoyo técnico de laboratorio en el análisis de muestras de HPLC.

Al matemático Fernando Fontove, hombre con cualidades intelectuales interesantes, por ayudarme en la realización del mapa metabólico de las cepas, por sus convenientes interrogantes en mi trabajo, por ser mi amigo y estar conmigo.

A mis hermanitos del laboratorio 2: Itzel Vargas, Antonio González, Mayra Cobaxin, Julio Cruz, Conchita García, Chrystabel López, Ismael Hernández, Diana Díaz, Enrique Biocrom, Bernardo Aguilar, Román Zápien, Diana Gpe García, Vianney Razo y Jaime Ortega porque he pasado alegres momentos a su lado y por darme ánimos en mi tiempo de estancia en el lab.

A mis amigos de generación: Cristal López y Omar Hernández, por su apoyo incondicional y por brindarme una bonita y sincera amistad.

A mi amiga de antes y de siempre: Annely Ramírez que a pesar de la distancia siempre me da ánimos de seguir adelante y por la cálida amistad que aún me brinda.

Al personal del CINVESTAV-Irapuato, especialmente a las secretarías Dora Elia Anguiano, Diana Barbosa, Lety Chong, Laura Camacho y Paloma Roa por la cálida atención con la que siempre me trataron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico a través de la beca con número de CVU: 563693

Dedicatoria

A mis padres: Lorenzo Barceló y Josefa Antemate, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento hacia ustedes, porque siempre que los he necesitado están conmigo y nunca me han fallado, porque sé que nunca me dejarán sola, si los tengo a los dos siento que puedo lograr todo y aunque no se los diga muy seguido los extraño... Con todo mi amor, la más pequeña de sus hijas...Diana.

A mis hermanas: Yoshio y Mayari que siempre están al pendiente de mí, por su cariño y apoyo, por realizar muy bien su papel de hermanas mayores...las amo.

Índice General

Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Índice General	6
Índice de Tablas	9
Índice de Gráficas	9
Índice de Figuras	10
Resumen	11
Abstract	12
I. Introducción	13
1.1. Características del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila	13
1.1.1. Propiedades del agua y suelo	13
1.2. Comunidad microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila	14
1.2.1. Composición microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila	15
1.2.2. Generalidades del género <i>Bacillus</i>	15
1.3. Tipos de interacciones microbianas	15
1.4. Características generales de los aminoácidos	16
1.4.1. Familia de síntesis de aminoácidos.....	17
1.5. Metabolismo bacteriano	18
II. Antecedentes	19
2.1. Perspectiva histórica: de mutantes a modelos	19
2.1.1. Fenotipos bacterianos y su nomenclatura.....	19
2.1.2. Sistemas selectivos	20
2.1.3 Experimentos de Beadle y Tatum	22
2.1.4. El concepto actual de Auxotrofia	24
2.2. Regulación de la biosíntesis de aminoácidos	24
2.2.1. Regulación por feedback	24
2.2.2. Atenuación en operones bacterianos.	25
2.2.3. Regulación de genes por riboswitch	27
2.2.4. Regulación de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA)	28
2.3. Transportadores bacterianos	31
2.4. Obtención de cepas bacterianas del género <i>Bacillus</i>	32

2.5 <i>Bacillus coahuilensis</i> como antecedentes de pérdida de genes de rutas de síntesis de aminoácidos	32
III. Preguntas de investigación	33
IV. Hipótesis	34
V. Objetivos.....	35
5.1. Objetivo General	35
5.2. Objetivos específicos	35
VI. Materiales y Métodos.....	36
6.1. Cepas seleccionadas	36
6.2. Caracterización fenotípica	36
6.2.1. Confirmación de auxotrofías	36
6.2.2. Recuperación del fenotipo de auxotrofia	36
6.3. Detección de aminoácidos libres por HPLC	37
6.3.1. Detección de aminoácidos libres en medio DM	37
6.3.2. Detección de aminoácidos libres en co-cultivos.....	37
6.4. Caracterización genotípica	38
6.5. Análisis genotípico de las rutas biosintéticas de aminoácidos	38
6.6. Modelos de explicación a auxotrofías de aminoácidos.....	38
VII. Resultados	39
7.1. Cepas seleccionadas	39
7.2. Caracterización fenotípica	42
7.2.1. Confirmación de auxotrofías	42
7.2.2. Recuperación del fenotipo de auxotrofia	44
7.3. Detección de aminoácidos libres por HPLC	46
7.3.1. Detección de aminoácidos libres en medio DM	46
7.3.2. Detección de aa libres en co-cultivos	47
7.4. Caracterización genotípica	48
7.5. Análisis genotípico de las rutas biosintéticas de aminoácidos	49
7.6. Modelo explicativo de auxotrofías de aminoácidos en <i>B. cereus</i>	53
VIII. Discusión.....	56
IX. Conclusión.....	61
X. Perspectivas	62
XI. Bibliografía	63

<i>XII. Glosario de términos.....</i>	<i>70</i>
<i>XIII. Material Suplementario.....</i>	<i>71</i>

Índice de Tablas

Tabla 1. Algunos símbolos genotípicos usados en genética bacteriana.....	20
Tabla 2. Crecimiento de mutantes de arg en respuesta a suplementos.....	22
Tabla 3. Lista de cepas de Bacillus utilizadas al comienzo del estudio.....	36
Tabla 4. Iniciadores universales Forward y Reverse empleados para la amplificación del gen 16S ribosomal	38
Tabla 5. Resumen del fenotipo individual de auxotrofías después de someter a las cepas a la adaptación del medio mínimo suplementado con 20 aminoácidos.....	44
Tabla 6. Características de 3 cepas de Bacillus spp con ajustes nutrimentales de aminoácidos.....	45
Tabla 7. Reporte del Genoma ensamblado por el Dr. Cruz-Morales.....	49
Tabla 8. Rutas metabólicas a nivel genoma presentes (+) o ausentes (-) en cepas de B. cereus secuenciadas y fenotipo de auxotrofías a valina y/o leucina.....	49
Tabla 9. Tamaño (en nucleótidos y en aminoácidos) de los genes involucrados en la ruta de síntesis de valina en cepas de Bacillus cereus aisladas a partir del sedimento del sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.....	50
Tabla 10. Tamaño (en nucleótidos y en aminoácidos) de los genes involucrados en la ruta de síntesis de leucina en cepas de Bacillus cereus aisladas a partir del sedimento del sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.....	51
Tabla 11. Transportadores involucrados con los aminoácidos de cadena ramificada y número de copias por cada una de las cepas en estudio.....	54
Tabla S1 Reactivos utilizados para la preparación del medio marino.....	73
Tabla S2. Reactivos utilizados para la preparación del medio DM.....	74
Tabla S3. Cantidad de aminoácidos por litro de medio DM.....	74

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Contenido (en μM) de aa libres en medio sólido DM con y sin aminoácidos detectados por HPCL	47
Gráfica 2. Contenido (en μM) de aa libres en cultivos individuales y un co-cultivo de cepas de B. cereus.....	48

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución taxonómica de secuencias a partir del gen 16S ARNr obtenidas a partir de librerías de clonas de dos sitios de estudios dentro del sistema Churince en el Valle de Cuatrociénegas, México.	15
Figura 2. Modelo de interacciones entre especies.....	16
Figura 3. Estructura general de un aminoácido	17
Figura 4. Principales rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos.	17
Figura 5. Modelo de transporte de un sustrato.....	18
Figura 6. Sistema selectivo para la búsqueda de bacterias auxótrofas.....	21
Figura 7. Prueba de auxotrofia en <i>Neurospora crassa</i>	22
Figura 8. Modelo bioquímico de genes, enzimas y metabolitos intermediarios en la biosíntesis de arginina .	23
Figura 9. Regulación alostérica por la biosíntesis de Isoleucina.....	24
Figura 10. Representación esquemática de las regiones regulatorias de los operones biosintéticos de aminoácidos y el modelo de atenuación.	26
Figura 11. Regulones de los riboswitches de <i>B. subtilis</i> y su posición en el cromosoma bacteriano.	28
Figura 12. Activación del operón <i>ilv-leu</i> de <i>B. subtilis</i> por CcpA y su regulación negativa por CodY o TnrA bajo condiciones de crecimiento rico en aminoácidos o limitantes de nitrógeno.	29
Figura 14. Sistema de transporte LIV-I/LS para aminoácidos de cadena ramificada donde muestra los componentes y la localización subcelular en una bacteria Gram negativa.....	32
Figura 15. Representación gráfica de la estrategia experimental usada para observar crecimiento colonial en co-cultivos.....	37
Figura 16. Cepas de <i>B. cereus</i> cultivadas en medio marino, 20hrs de incubación a 37°C.	39
Figura 17. Filogenia de aislados bacterianos basada en el gen 16S rDNA, usando el algoritmo de Máxima verosimilitud.	41
Figura 18. Adaptación de cepas de <i>B. cereus</i> al medio mínimo más 20 aminoácidos, 24 h de incubación a 37°C.	42
Figura 19. Fenotipo de auxotrofías en algunas de las cepas de <i>B. cereus</i> seleccionadas.....	43
Figura 20. Veintidós cepas de <i>Bacillus cereus</i> crecidas juntas en medio DM sin la adición de un aminoácido	44
Figura 22. Tipo de crecimiento de dos cepas de <i>B. cereus</i> , por separado y juntas.....	47
Figura 23. Reconstrucción filogenética usando el método de Minimum Evolution, basada en el gen <i>ilvE</i> BCAA aminotransferase de cepas de <i>B. cereus</i>	52
Figura 24. Reconstrucción filogenética usando el método de Minimum Evolution, basada en el gen <i>ldh</i> leucine dehydrogenase de cepas de <i>B. cereus</i>	52
Figura 24. Organización del operón <i>ilv-leu</i>	53
Figura S1. Filogenia basada en el gen <i>gltX</i> de los aislados de Cuatrociénegas, Coahuila.	71
Figura S2. Principales intermediarios metabólicos involucrados en las rutas de biosíntesis de aminoácidos en <i>B. cereus</i>	72

Resumen

A partir de un muestreo en el 2007 del sedimento en el Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, realizado por el Lab. de Biología Molecular y Ecología Microbiana (CINVESTAV, Unidad Irapuato), se obtuvieron aislados pertenecientes a 7 grupos taxonómicos de *Bacillus*: *Bacillus subtilis*, *Bacillus marisflavii*, *Bacillus aquimaris*, *Bacillus spp*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*. Adicionalmente *B. cereus* mostró ser un grupo dominante cuyos miembros presentaban, según estudios preliminares, desde 1 hasta 12 auxotrofías a aminoácidos, determinado por crecimiento en cajas de microtítulo. Por otra parte, el análisis de aislados de *B. coahuilensis*, también del sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, reveló pérdidas de genes involucrados en rutas biosintéticas de diversos aminoácidos.

Con el fin de conocer que pasaba a nivel genotipo en los aislados de *B. cereus* se decidió confirmar el fenotipo de auxotrofia y analizar si correspondían a la pérdida de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos como ocurría con las cepas de *B. coahuilensis*. Para confirmar las auxotrofías antes vistas, recurrimos a la observación de fenotipo de forma individual en medio sólido, con un primer paso de adecuación al medio para evitar estrés en las cepas de estudio y en base a la incapacidad de crecimiento colonial para sugerir que tales cepas presentaban auxotrofia a aminoácidos. Se encontraron únicamente de 1 a 2 auxotrofías correspondientes a valina y leucina, aminoácidos de cadena ramificada.

El genoma completo de 18 cepas de *B. cereus* se utilizó para hacer la búsqueda de genes involucrados en las vías biosintéticas de aminoácidos para ver la relación entre lo expresado por el fenotipo de auxotrofia y el genoma. El resultado del análisis del genoma indicó que todas las rutas de biosíntesis de aminoácidos están completas en las cepas de *B. cereus* estudiadas. La explicación entre la incongruencia entre el genotipo y fenotipo observado podría estar en los sistemas regulatorios de transcripción de los genes de la vía biosintética y de transporte de aminoácidos/péptidos, en especial los involucrados con los aminoácidos leucina y valina. Para ello se sugiere abordar teóricamente la participación de los sistemas de transporte BCAA, Lrp, azlCD, LIV-I/LS y Opp, ya que más de un transportador es requerido para asegurar el consumo de esos péptidos. Cada sistema de transporte conlleva una regulación en específico que tiene que ver con la cantidad de aminoácidos por el cual es dirigido, llevándonos a la conclusión de que las estrategias regulatorias usadas por el grupo de aislados pertenecientes al grupo de *B. cereus* pudiera depender de un sistema de transporte, el cual necesitaría consumir aminoácidos de cadena ramificada en compañía de otros péptidos para asegurar su supervivencia dado que el ambiente en el que se encuentran es escaso en nutrientes.

Este estudio revela que aún en comunidades microbianas, la aparente pérdida de algún fenotipo no siempre obedece a pérdidas en genes de rutas biosintéticas y que es posible que se favorezca, en cambio, una fuerte regulación de la expresión genética.

Abstract

From sampling conducted in 2007 in the Churince Cuatrociénegas System, Coahuila by Laboratory of Molecular Biology and Microbial Ecology, CINVESTAV, Irapuato, which came from sediment, different isolates belonging to 7 groups of *Bacillus* were found: *B. subtilis*, *B. marisflavii*, *B. aquimaris*, *B. spp.*, *B. horikoshii*, *B. pumilus* and *B. cereus*. Moreover, *B. cereus* was found to be a dominant group whose members had, according to preliminary studies from 1-12 auxotrophies to amino acids, determined by growth in microtiter boxes. *B. coahuilensis* isolated, also isolated from Churince Cuatrociénegas System, Coahuila, revealed loss of genes involved in biosynthetic pathways of various amino acids.

In order to know what happened to genotype level in isolates of *B. cereus*, it was decided to confirm the phenotypes of auxotrophy and analyze whether corresponded to the loss of genes involved in amino acid biosynthesis as with strains of *B. coahuilensis*. It was found only 1-2 auxotrophies corresponding to valine and leucine, Branched-chain Amino Acids (BCAA).

The complete genome of 18 strains of *B. cereus* was used to search for genes involved in amino acid biosynthetic pathways for the relationship between the phenotype expressed by auxotrophy and its genome. The result of genome analysis indicated that all paths are complete amino acid biosynthesis in *B. cereus* strains studied. The explanation in the incongruity between genotype and phenotype could be observed in the transport system regulatory amino acids /peptides, particularly those involved with the leucine and valine amino acids. For this theoretical approach suggested the participation of BCAA transport systems, Lrp, aziCD, LIV-I / LS and Opp, since more than one carrier is required to ensure consumption of these peptides.

Each transport system involves a specific regulation that has to do with the amount of amino acids which is managed, leading to the conclusion that regulatory strategies used by the group of isolates belonging to the group of *B. cereus* could rely on a transportation system, which needs to consume BCAA in the company of other peptides to ensure their survival because the environment in which they find it is lacking in nutrients.

This study reveals that even in microbial communities, the apparent loss of a phenotype is not always due to loss of biosynthetic pathways and genes that may be favored, instead, a strong regulation of gene expression.

I. Introducción

A partir de un muestro realizado en el 2007, en Cuatrociénegas, Coahuila, en el sistema de agua Churince, se aislaron aproximadamente 500 cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*. Dentro de esta colección, *Bacillus cereus* resulta ser un grupo dominante de las comunidades de sedimento y su evaluación fenotípica, en medio líquido, reveló auxotrofías a diferentes aminoácidos. Dado que en las comunidades microbianas los microorganismos interactúan estrechamente y pueden compartir diferentes sustratos, surge el interés de conocer qué pasa a nivel fenotipo y genotipo, identificar si el fenotipo de auxotrofia deriva de pérdida de genes involucrados en la síntesis de aminoácidos o se trata de estrategias regulatorias del metabolismo de la célula microbiana dado su ambiente. Se esperaba así llegar al entendimiento de cómo el metabolismo celular opera en los aislados de *B. cereus*, abordado a partir de las propiedades individuales de las cepas en cultivos puros.

Para conocer qué mecanismos metabólicos nutrimentales crean, mantienen y determinan los rasgos de las bacterias dado un ambiente con baja disponibilidad de Carbono:Nitrógeno:Fósforo (C:N:P), tal como lo es Cuatrociénegas, Coahuila, es necesario entender y considerar todos los factores que, de manera directa o indirecta, influyen en el fenotipo de auxotrofia expresado en las cepas de estudio. Esta investigación describe una interesante forma de regulación metabólica que llevan a cabo un grupo especial de bacterias, *B. cereus*, dentro de un ambiente con limitaciones nutrimentales.

1.1. Características del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila

Cuatrociénegas, situado en el desierto de Coahuila, México, es un valle que presenta una extensión de aproximadamente 1,200 km². Su altitud promedio es de 735 mts, pero está encerrado entre altas serranías formadas principalmente por rocas calizas que alcanzan hasta 3 km de altura (López-Lozano *et al.*, 2012; Tapia-torres *et al.*, 2015). Su clima es muy seco, semicálido, con pocas lluvias en verano (promedio anual de precipitación <150 mm) y ocasionalmente algunas en invierno (Tapia-torres *et al.*, 2015). Se caracteriza por su gran diversidad de ambientes acuáticos, en los que incluye también complejos sistemas de corrientes subterráneas, manantiales, canales, ríos, lagos y estanques temporales (Minckley 1969; Souza *et al.*, 2006; Souza *et al.* 2004; López-Lozano *et al.*, 2012).

1.1.1. Propiedades del agua y suelo

1.1.1.1. Características del sistema de agua Churince

En un estudio realizado en el 2005 por Elser *et al.* se muestra el análisis químico del agua en el sistema de agua Churince en el Valle de Cuatrociénegas, Coahuila, el cual refleja la proporción total de Nitrógeno (N): 62 µM/L y Fosforo (P): <6µM, indicando una deficiente cantidad de P para el crecimiento microbiano. Los sistemas de agua son ultraoligotróficos (Souza *et al.*, 2012; Tapia-torres *et al.*, 2015) y, como consecuencia, sufre una incapacidad de sostener el crecimiento algal, haciendo de los tapetes microbianos la base de la red alimenticia (Elser *et al.*, 2005). Algunos reportes encuentran, en ambientes de agua oligotróficos, bajas concentraciones de aminoácidos libres

disueltos, caso contrario en ambientes marinos los cuales presentan altas concentraciones de los mismos. Los aminoácidos libres disueltos y los carbohidratos componen la principal fracción de materia orgánica en un cuerpo de agua escaso de carbono orgánico, aunque también existen ácidos grasos de cadena corta y larga (Münster, 1993), los cuales provienen de estructuras complejas de polisacáridos, lignocelulosa y otros componentes orgánicos complejos (Holmer *et al.*, 2001).

Las aguas de Cuatrociénegas en general son duras, ya que contienen gran cantidad de sales de las cuales hay poca cantidad de NaCl y carbonatos pero es rico en sulfatos, Mg y Ca (Alcaraz *et al.*, 2008). La dureza de las aguas se incrementa a partir de los manantiales hasta los ríos y las lagunas de desecación donde la salinidad es de nivel de saturación. El pH cambia de manera paralela, y varía de neutro (7.0-7.2) en los manantiales hasta bastante básico (8.0-9.7) en lagos terminales en fase de desecación (Souza *et al.*, 2004). Algunos de los manantiales son termales (30-35°C) y su temperatura disminuye corriente abajo (Souza *et al.*, 2004; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012).

1.1.1.2. Suelo: Parámetros físico-químicos

En desiertos, la principal entrada de materia orgánica, N y P del suelo, proviene de biomasa subterránea más que de biomasa aérea; los ecosistemas áridos son usualmente caracterizados por condiciones de estrés debido a la baja disponibilidad de nutrientes y energía para los microorganismos del suelo, así mismo la disponibilidad de N y P frecuentemente limitan la actividad microbiana (Tapia-torres *et al.*, 2015; López-Lozano *et al.*, 2012).

La proporción encontrada por López-Lozano *et al.* (2012) de C:N:P en muestras de suelo seco y húmedo, a partir de Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, fue de 104:5:1 y 296:16:1, respectivamente. Estos datos indican que el N es un nutriente limitante en sitios secos más que en sitios húmedos y que el C es más abundante en sitios húmedos.

1.2. Comunidad microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila

La comunidad microbiana está definida como un ensamblaje de varias especies, en el cual los organismos viven juntos en un ambiente e interactúan unos con otros (Konopka, 2009). En palabras más simples, la comunidad es una red compleja de interacciones (Hansen *et al.*, 2007); otra característica es que son genética y metabólicamente diversas (Maharjan & Ferenci, 2005 *in* Pande *et al.*, 2014).

En la naturaleza los microorganismos son afectados por su ambiente físico y químico, así como otras especies que pueden también influenciar su comportamiento (Zhang & Reed, 2014). Las interacciones metabólicas pueden alterar el fenotipo bioquímico de los individuos participantes dentro de una comunidad. Tal comunidad microbiana ofrece la posibilidad de degradar toxinas, promover síntesis de productos naturales y la capacidad de crecer en diversos ambientes (Wintermute & Silver, 2010).

Las propiedades que componen la estructura de una comunidad bacteriana son: competencia por recursos, interacciones metabólicas, alelopatía, señalización, estructura, interacciones a nivel trófico y la transferencia horizontal de genes (Konopka, 2009). Diversos autores se han enfocado al estudio del rol metabólico de los microorganismos en diversos ambientes para entender los

mecanismos que controlan la dinámica de la estructura y estabilidad dentro de una comunidad microbiana (Kato *et al.*, 2008; Ives & Carpenter, 2007).

1.2.1. Composición microbiana de Cuatrociénegas, Coahuila

El Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, pese a ser un desierto ultraoligotrófico constituido por un sistema de cuerpos de agua (Souza *et al.*, 2012; López-Lozano *et al.*, 2012), mantiene una gran diversidad biológica (Souza *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2004). Souza *et al.*, en el 2006, registró en el Valle de Cuatrociénegas al menos diez principales linajes de Bacterias: γ , β , α -Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomicetes, Nitrospira, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deinococcus y uno de Arquea. Así mismo, López-Lozano *et al.* (2012) encontró linajes similares a partir de muestras de suelo seco y húmedo, tal como se observa en la figura 1; dentro del Phylum Firmicutes, *Bacillus* es un importante género de bacterias cultivables Gram positivas (Souza *et al.*, 2006; Cerritos *et al.*, 2008).

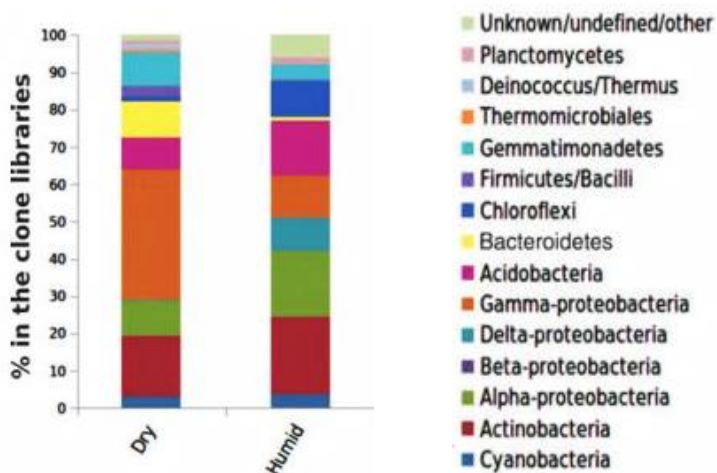


Figura 1. Distribución taxonómica de secuencias a partir del gen 16S ARNr obtenidas a partir de librerías de clonas de dos sitios de estudios dentro del sistema Churince en el Valle de Cuatrociénegas, México. Tomado y editado de López-Lozano *et al.*, 2012.

1.2.2. Generalidades del género *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* son aerobias o anaerobias facultativas, formadoras de esporas, lo cual les confiere resistencia al calor, a agentes químicos agresivos y a la radiación, ya que funcionan como estructuras de supervivencia capacitando al organismo a resistir condiciones adversas como temperaturas extremas, desecación, limitación de nutrientes, entre otros (Brock 2009). Viven tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Brock 2009; Cerritos *et al.*, 2008) y un gran número de ellos han sido aislados a partir de ambientes marinos (Cerritos *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2006).

1.3. Tipos de interacciones microbianas

Los microorganismos responden constantemente a las variaciones de las condiciones internas y externas, y tratan de adaptarse al ambiente para sobrevivir (Ye *et al.*, 2009), es decir, interactúan con su ambiente (Souza *et al.*, 2012). El espectro de interacciones es muy grande (ver figura 2), e incluye, además de la competencia por recursos limitados (Foster & Bell, 2012) o liberación de

productos tóxicos, interacciones en las cuales un organismo se beneficia a partir de la actividad bioquímica de otro (Pande *et al.*, 2014).

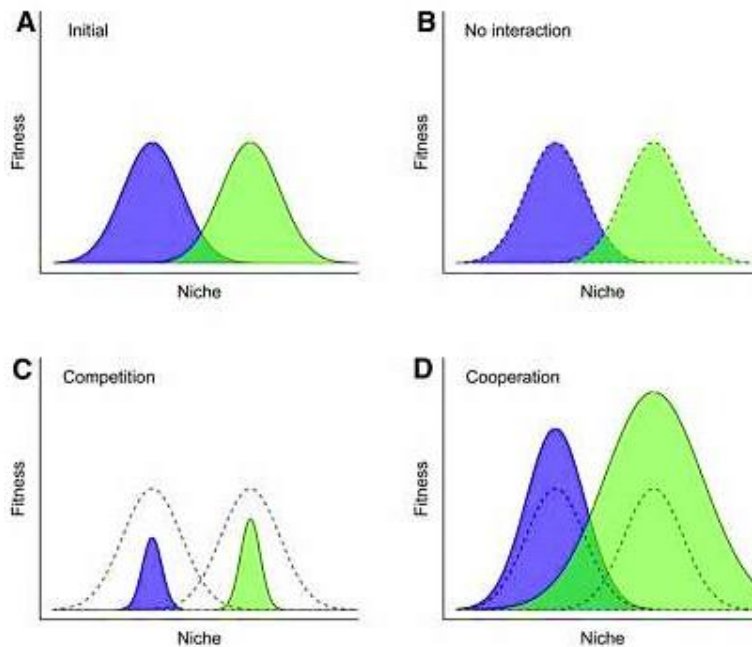


Figura 2. Modelo de interacciones entre especies. La productividad (fitness) de dos especies es mostrada a través de un nicho en el eje de las X. A) Espacio del nicho inicial ocupado por dos especies. B) Si no hay interacciones, la productividad de especies no se ve afectada por la presencia de otras especies. C) Si existen interacciones negativas netas, como la interferencia por competencia, los nichos de algunas especies pueden ser alterados y la productividad global de la comunidad disminuye. D) Si existen interacciones positivas netas, como la facilitación, las especies se benefician por la presencia de otras especies y la productividad global de la comunidad aumenta. Tomado de Foster & Bell 2012.

Un factor clave al momento de querer elucidar el comportamiento microbiano es la diferencia entre la diversidad de ecosistemas microbianos naturales, la cual es muy superior a la de sistemas experimentales (Foster & Bell, 2012); además hay que tomar en cuenta que un consorcio bacteriano ofrece alternativas cooperacionales (Kim *et al.*, 2008; Weibel 2008), aunque también antagónicas (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2014; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012), y que, por separado, cada bacteria nos proporciona información acerca de las propiedades que afectan a tal comunidad (Wintermute & Silver, 2010).

1.4. Características generales de los aminoácidos

Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas. Los 20 aminoácidos, excepto glicina, tienen un carbono α , el cual se une a cuatro diferentes grupos: un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo R, ver figura 3. Debido a las propiedades químicas de la cadena lateral de un aminoácido y a las diferentes combinaciones que pueden formar los 20 aminoácidos, los organismos pueden crear una gran cantidad de productos como enzimas, hormonas y transportadores (Lehninger, 2005). En especial, los aminoácidos, son intermediarios claves tanto en el metabolismo del carbono como en el del nitrógeno.

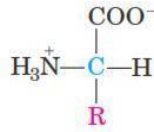


Figura 3. Estructura general de un aminoácido. La estructura es común para todos los α aminoácidos (excepto Prolina, un aminoácido cíclico). El grupo R o cadena lateral (rojo) unida al carbono α (azul) es diferente en cada aminoácido. Tomado de Lehninger 2005.

1.4.1. Familia de síntesis de aminoácidos

Todos los aminoácidos (aa) son derivados a partir de intermediarios de las rutas metabólicas centrales de la Glicólisis, del Ciclo del ácido cítrico o de la ruta de las Pentosas Fosfato (D'Souza *et al.*, 2014), como se muestra en la figura 4. La biosíntesis de aminoácidos involucra la acción de múltiples enzimas que son codificadas por diferentes genes (Craig & Weber, 1998; Lehninger, 2005). Algunas rutas son simples (de un paso) y otras no (involucran varios pasos) (Craig & Weber 1998; Lehninger 2005), sin embargo su grado de simpleza o complejidad también es dado por el costo que lleva cada ruta de síntesis por la cual el aminoácido es producido (Akashi & Gojobori, 2002; Craig & Weber, 1998; Heizer et al., 2006).

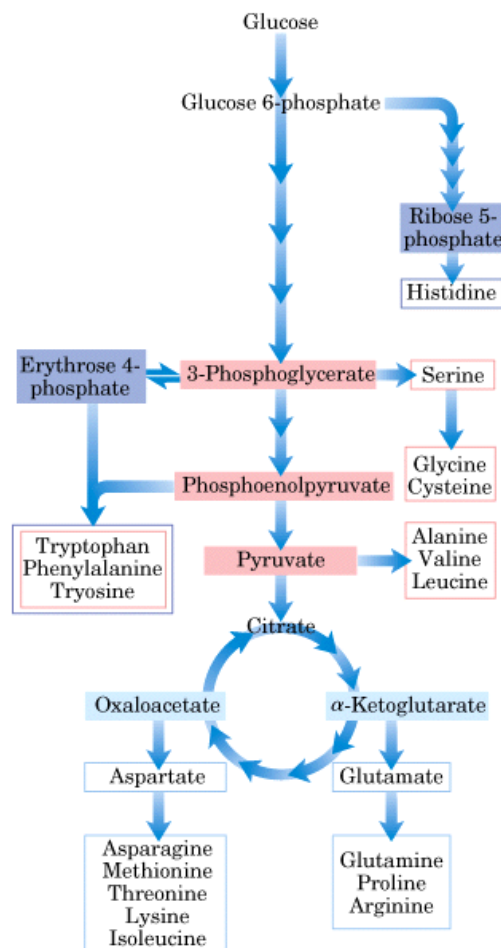


Figura 4. Principales rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos. Abarca seis principales familias agrupadas por sus precursores metabólicos: Ribosa 5-P, Eritrosa 4-P + PEP, 3-Fosfoglicerato, Piruvato, α -Cetoglutarato y Oxalacetato. Tomado de Lehninger 2005.

1.5. Metabolismo bacteriano

El grado de participación de los genes en el control del metabolismo celular es fascinante. Las rutas metabólicas pueden ser cíclicas, ramificadas e interconectadas unas con otras, a lo largo del cual los intermediarios químicos celulares son desviados como partes sobre una línea de ensamblado. La clave de éxito en cada paso, representada por una flecha en modelos de rutas metabólicas, es controlada por una enzima, y cada una de esas enzimas es dirigida bajo la dirección de un gen que especifica su función. Los genes controlan las enzimas y las enzimas controlan las reacciones químicas que abarca al metabolismo (Susuki *et al.*, 1989).

Las comunidades microbianas del suelo en un sistema de desierto oligotrófico, como lo es Cuatrociénegas, son limitadas por C, N y P. En sistemas acuáticos, los nutrientes son usualmente absorbidos hasta que las concentraciones disminuyen a niveles que son suficientes para el crecimiento de sólo aquellos organismos con buenos sistemas de transporte, o los que pueden crecer muy lentamente (Button, 1985).

En sistemas limitados de nutrientes, la velocidad del crecimiento microbiano se establece tanto por la capacidad del transporte del nutriente de mayor necesidad como por la velocidad de uso de reservas almacenadas previamente (Button, 1985). Las propiedades cinéticas de los sistemas de transporte determinan la habilidad del organismo de unir el sustrato capturado a la superficie celular y translocarlo dentro de la célula, ver figura 5.

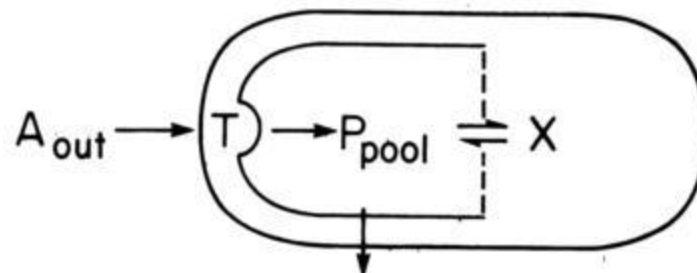


Figura 5. Modelo de transporte de un sustrato. Concentración de sustrato fuera de la célula (A_{out}), entra dentro de la célula por medio de un transportador de membrana (T), así que el producto (P) del sustrato tomado va directo al pool reservorio y una parte es utilizada para hacer biomasa (X). Tomado de Button 1985.

II. Antecedentes

2.1. Perspectiva histórica: de mutantes a modelos

Para estudiar fenotipos bacterianos, ha resultado muy útil que las bacterias se agrupen en una masa de células llamadas colonias bacterianas (Griffiths *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 1989), es decir, mientras que las células en una colonia sea genéticamente idénticas, es válido usar el fenotipo de la colonia como una manifestación del genotipo de las células bacterianas individuales (Griffiths *et al.*, 2002).

Los análisis genéticos no serían posibles sin variantes, organismos que difieren en una característica en particular. Los organismos tienen una tendencia inherente a sufrir modificaciones a partir de un estado hereditario a otro. Este proceso es llamado mutación. La consecuencia fenotípica de la mutación puede ser tan sutil como para requerir técnicas bioquímicas refinadas para detectar una diferencia a partir del gen de la cepa silvestre, y tan grave como para producir defectos morfológicos grandes o morir. La siguiente clasificación está basada solamente en el sentido en el cual las mutaciones son reconocidas fenotípicamente (Suzuki *et al.*, 1989): (1) Las mutaciones morfológicas afectan las propiedades externas visibles de un organismo, tal como la forma, color o tamaño. (2) Las mutaciones condicionales suceden cuando un alelo mutante expresa el fenotipo mutante bajo una cierta condición llamada "condición restrictiva", pero expresa un fenotipo normal bajo otras condiciones llamada "condición permisiva". (3) Las mutaciones bioquímicas son identificadas por la pérdida o un cambio en algunas funciones bioquímicas de la célula. Estos cambios resultan típicamente en una inhabilidad para crecer y proliferar. En muchos casos el crecimiento de una mutante puede ser reestablecida por complementación al medio de crecimiento con un nutriente específico. Los mutantes bioquímicos han sido extensamente analizados en los microorganismos, de aquí que se desprenda el término protótrofo, organismos nutricionalmente autosuficientes, y auxótrofo, los cuales requieren ser complementados con nutrientes complejos-específicos para crecer.

2.1.1. Fenotipos bacterianos y su nomenclatura

Para abordar los temas relacionados a las propiedades de una bacteria es preciso conocer su habilidad para sintetizar componentes bioquímicos esenciales. De aquí el término de protótrofo ("que se autoalimenta"), que se refiere a las bacterias que pueden producir colonias sobre medio mínimo. A partir de esas sustancias simples, la bacteria sintetiza todas las moléculas de las cuales están compuestos. Algunas clonas mutantes pueden ser identificadas por que son auxótrofos ("de alimentación externa"). Estas se reconocen tradicionalmente porque no crecerán a menos que tenga uno a más nutrientes específicos como nucleótidos, aminoácidos y vitaminas, por ejemplo, adenina, treonina o biotina, que deben ser adicionados al medio mínimo. Tal fenotipo es indicativo de la pérdida de la habilidad celular de sintetizar tal componente específico usando los componentes del medio mínimo (Griffiths *et al.*, 2002).

La nomenclatura utilizada para señalar fenotipos de prototrofia y auxotrofia e indicar el uso de nutrientes en específico, así como las variantes fenotípicas en eucariontes, y las alternativas de fenotipos bacterianos, se denominan por un par de alelos. Por ejemplo, *ad^r* se utiliza para un alelo

que codifica para la habilidad de sintetizar adenina, indicando que la cepa es protótrofa; *ad⁻* indica la inhabilidad para sintetizar adenina, apuntando que la cepa es auxótrofa.

Una segunda condición usada por genetistas bacterianos también concierne a la nutrición pero en un sentido fundamentalmente diferente. Las bacterias necesitan ser oportunistas en el uso de fuentes de energía en ambientes naturales. Por ejemplo, una bacteria silvestre puede utilizar varios diferentes azúcares como fuente de energía, incluyendo al azúcar galactosa. Sin embargo, algunas mutaciones permiten la inactivación de la habilidad del uso de galactosa, así otras fuentes de energía deben ser usadas. Aquí los alelos determinantes son *gal⁺* (utiliza galactosa) y *gal⁻* (no utiliza galactosa). Otro fenotipo útil concierne a la resistencia. Cuando las cepas silvestres son susceptibles a uno o varios inhibidores, tal como la estreptomina, las mutantes resistentes difieren en que pueden formar colonias en presencia del inhibidor. Por lo tanto, en este caso, las dos alternativas de fenotipo que pueden ser genéticamente estudiados son resistencia y sensibilidad al inhibidor, determinado en éste ejemplo por los alelos *str^r* y *str^s*, respectivamente. La tabla 1 enlista algunos ejemplos de fenotipos bacterianos y sus símbolos genéticos (Griffiths *et al.*, 2002).

Tabla 1. Algunos símbolos genotípicos usados en genética bacteriana

Símbolo	Característica o fenotipo asociado con símbolo
<i>bio⁻</i>	Requiere biotina adicionada como un suplemento al medio mínimo
<i>arg⁻</i>	Requiere arginina adicionada como un suplemento al medio mínimo
<i>met⁻</i>	Requiere metionina adicionada como un suplemento al medio mínimo
<i>lac⁻</i>	No puede utilizar lactosa como fuente de carbono
<i>gal⁻</i>	No puede utilizar galactosa como fuente de carbono
<i>str^r</i>	Resistente al antibiótico estreptomina
<i>str^s</i>	Sensible al antibiótico estreptomina

Tomado de Griffiths *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 1989.

2.1.2. Sistemas selectivos

Los análisis genéticos en procariontes están basados en mutaciones. Los sistemas selectivos, son protocolos experimentales diseñados para permitir que el tipo mutante deseado sobreviva y se propague, pero no la cepa silvestre. En este sentido pocas mutantes pueden ser encontradas en una población que consiste principalmente de cepas silvestres. Algunas veces se obtienen mutaciones que causan un cambio reversible a partir de mutantes a silvestres; tales mutaciones son llamadas “revertantes”. El cambio de una auxotrofia de regreso a prototrofia proporciona un simple sistema selectivo llamado “reversión de auxótrofos” para la obtención de revertantes (Griffiths *et al.*, 2002). Un ejemplo es mostrado en la figura 6.

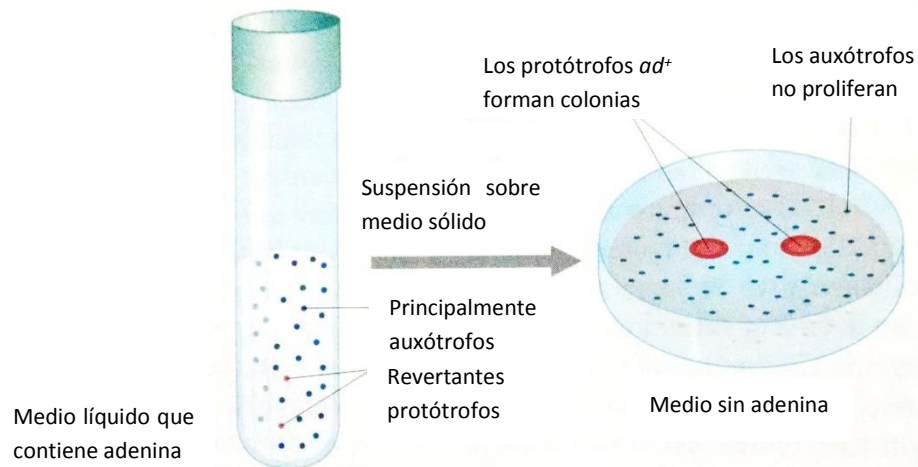


Figura 6. Sistema selectivo para la búsqueda de bacterias auxótrofas. Tomado de Griffiths *et al.*, 2002.

La figura anterior muestra a un auxótrofo que requiere adenina, así que para obtener células y trabajar con ellas, la cepa crece en un medio que contiene adenina. Después, un gran número de esas células son plaqueadas sobre un medio sólido nutritivo que no contiene adenina (medio mínimo). Las células que pueden crecer, dividir, y por lo tanto formar colonias sobre el medio son protótrofos a adenina, las cuales debieron haber surgido por mutación reversible en el cultivo original, simbólicamente $ad^- \rightarrow ad^+$.

El método comúnmente utilizado para pruebas de auxotrofías se remonta a la década de los 40's cuando se utilizó como modelo, en un principio, al hongo *Neurospora crassa*. (Hopwood, 1970). El método, como se observa en la figura 7, consistía en la prueba de genotipos, en este caso de 20 cultivos haploides obtenidas a partir de un cruce entre mutantes auxótrofos que requieren adenina y mutantes auxótrofos que requieren leucina (además, la cruce fue $ad^- leu^+ \times ad^+ leu^-$). Los cultivos fueron probados sumergiendo un asa estéril dentro de un tubo de cultivo y después pasando el asa sobre la superficie de cada uno de los cuatro diferentes medios de cultivo, donde unas pocas células se adherirán. Si las células crecen y dividen, una colonia se formará, las colonias aparecen como círculos blancos en la imagen de la figura 7. Las cuatro placas contienen diferentes combinaciones de adenina y leucina sobre los cuales diferentes genotipos producen resultados diferentes. Por ejemplo, la cepa 1 requiere leucina pero no adenina, entonces su genotipo es $ad^+ leu^-$; así cuatro diferentes genotipos están presentes en los 20 cultivos: $ad^+ leu^+$, $ad^+ leu^-$, $ad^- leu^-$ y $ad^- leu^+$ (Suzuki *et al.*, 1989).

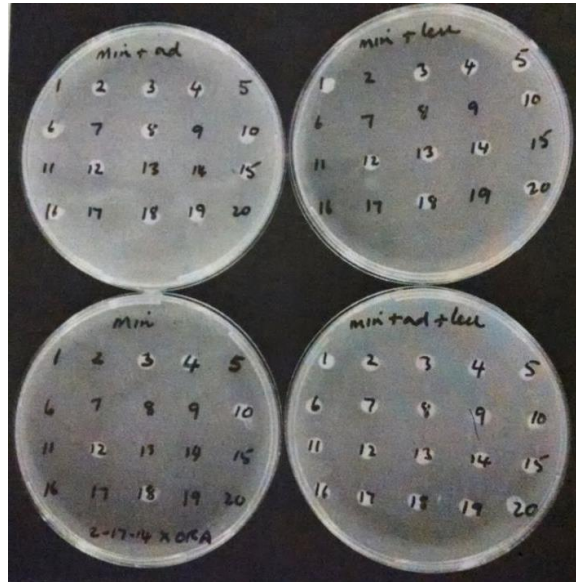


Figura 7. Prueba de auxotrofia en *Neurospora crassa*. Tomado de Susuki *et al.*, 1989.

Por otro lado, diversos trabajos de organismos auxótrofos prueban diferentes nutrimentos como requerimiento de la célula bacteriana; algunos trabajos agregan el nutriente específico en cantidades pequeñas directo al medio de cultivo, o lo aplican como una solución sobre un disco de papel filtro o bien como cristales de sustancia pura sobre el medio de cultivo sólido. Después de la incubación, si las colonias protótrofas revertantes crecen en una zona centrada cerca al punto de adición de la sustancia se considera prueba de mutagénesis (Hopwood, 1970).

2.1.3 Experimentos de Beadle y Tatum

En la década de 1940's George Beadle y Edward Tatum analizaron mutantes de *Neurospora*, la cual al ser irradiada presentaba fenotipos mutantes interesantes (Jenkins 1986). Ellos detectaron numerosas auxotrofías, cepas que no podían crecer en medio mínimo a menos que fueran suplementados con nutrientes en específico; en este caso la mutación que generaba el requerimiento de auxotrofia caía en el aminoácido arginina, es decir, las mutantes de *Neurospora* requerían arginina para crecer sobre medio mínimo. Primero, encontraron que las mutaciones se encontraban dentro de tres ubicaciones diferentes, los cuales llamaron gen *arg-1*, *arg-2* y *arg-3*, en cromosomas separados, aunque la misma arginina satisfacía el crecimiento para cada mutante auxótrofo. Beadle y Tatum descubrieron que los auxótrofos para cada uno de los tres genes diferían en su respuesta a los componentes químicos ornitina y citrulina, los cuales están relacionados a arginina (Suzuki *et al.*, 1989). En la tabla 2 se muestra el tipo de crecimiento en respuesta a los suplementos.

Tabla 2. Crecimiento de mutantes de *arg* en respuesta a suplementos.

Mutante auxótrofo	Suplemento		
	Ornitina	Citrulina	Arginina
<i>arg-1</i>	+	+	+
<i>arg-2</i>	-	+	+
<i>arg-3</i>	-	-	+

+ = crecimiento; - = sin crecimiento. Tomado de Suzuki *et al.*, 1989.

A partir de tales experimentos basados en las propiedades de los auxótrofos *arg*, Beadle y Tatum propusieron un modelo bioquímico para las conversiones bioquímicas en *Neurospora*, ver figura 8, en el cual explicaban los defectos o carencias en las enzimas responsables de la catálisis entre un metabolito y otro. Además, se asume que una mutación en un gen particular interfiere con la producción de una sola enzima, después la enzima defectuosa crea un bloqueo en la síntesis en alguna ruta biosintética. Tal bloqueo puede ser evitado por la complementación a la célula por algún componente que normalmente viene después del bloqueo en la ruta (Susuki *et al.*, 1989).

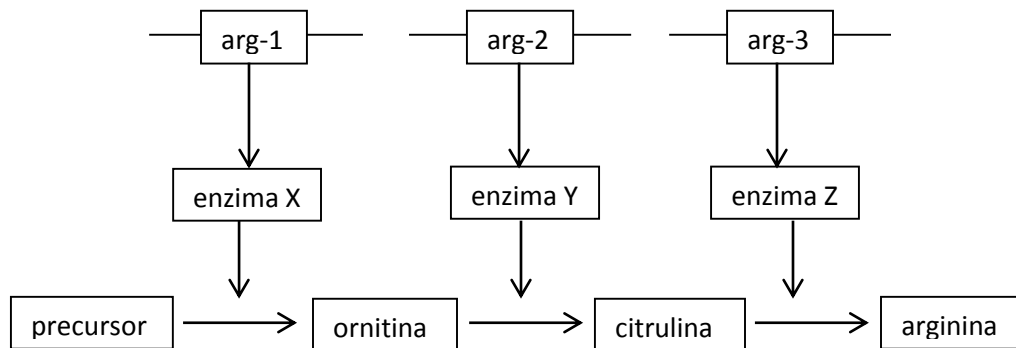


Figura 8. Modelo bioquímico de genes, enzimas y metabolitos intermediarios en la biosíntesis de arginina.

El modelo fue inferido a partir de las propiedades fenotípicas de las mutantes auxótrofas detectadas y a través del análisis genético. Este modelo, conocido como “la hipótesis de un gen, una enzima” sugiere que los genes, de alguna manera, son los responsables de la función de las enzimas, y cada gen, aparentemente controla una enzima específica. Otros investigadores han obtenido resultados similares al estudiar las rutas bioquímicas de otros aminoácidos, sin embargo ésta hipótesis es limitada actualmente, un ejemplo sobresaliente son los trabajos de Yanofsky, quien realizó estudios sobre el sistema de la triptófano sintasa en *Escherichia coli*. Tales estudios mostraron que la enzima estaba compuesta por dos cadenas polipéptidicas diferentes, cada una producida por un gen diferente. En este caso, dos genes producen una enzima (Jenkins, 1986).

La bacteria *E. coli* silvestre sintetiza el aminoácido triptófano a partir de los compuestos nutrimentales encontrados en un medio mínimo. Un mutante para triptófano (*trp*) es incapaz de completar la síntesis por lo que el aminoácido debe ser suministrado en el medio de cultivo para que viva la bacteria. Este tipo de mutación puede ser deficiente en un cierto número de lugares que abarca la ruta de síntesis. El punto está en determinar en qué paso está interrumpido el proceso. Yanofsky estudió varias mutantes de *trp* en *E. coli*, y encontró que se podía pasar por alto el bloqueo metabólico añadiendo al medio compuestos precursores de síntesis de triptófano. Por ejemplo, la mutante *trpE* probablemente tenía una mutación en la antranilato sintasa, *trpD* era probablemente deficiente en la fosforribosil antranilato transferasa y *trpC* implicaba a la indol glicerol fosfato sintasa. Estas conclusiones se basaban no sólo en los compuestos que eliminaban el bloqueo, sino también los que se eliminaban en la célula, es decir, cuando se detiene una reacción en una secuencia los productos que preceden al bloqueo son acumulados o son desviados hacia otras rutas (Jenkins, 1986).

2.1.4. El concepto actual de Auxotrofia

La definición más aceptada de auxótrofo es cuando un organismo pierde la capacidad de crecer en medios que carecen de un nutriente (Brock, 2009). En contraste, un organismo protótrofo tiene la capacidad de crecer en medios mínimos, sintetizando autónomamente todas las macromoléculas esenciales. Se asume, generalmente, que las auxotrofías se relacionan con la pérdida de una función en alguna enzima involucrada en la síntesis del metabolito. Las más comúnmente referidas como auxotrofías son las de aminoácidos y vitaminas dado que existen vías sintéticas para estas altamente conservadas en muchos microorganismos, mientras que la capacidad de utilizar diferentes tipos de carbohidratos puede estar asociada simplemente a transportadores que pueden haber sido adquiridos por transferencia horizontal y también pueden perderse rápidamente.

Desde 1960 se han realizados estudios de auxotrofías con diferentes especies de *Bacillus* usando técnicas variadas (Goldberg *et al.*, 1965), aunque la mayoría de los estudios se basan en la mutación de un gen (o genes) involucrado en la ruta biosintética de los aminoácidos (Bertels *et al.*, 2012). Bott y Lundgren (1962) fueron los primeros en reportar auxótrofos a aminoácidos que contenían azufre en aislados de *B. cereus* (Goldberg *et al.*, 1965).

2.2. Regulación de la biosíntesis de aminoácidos

En la sección anterior se describió cómo la selección de mutantes auxotróficos fue dirigida por estudios en los cuales la adición de un aminoácido al medio permitía el crecimiento de la mutante en cuestión. Claramente, si la mutante auxótrofa no cumplía con esta característica no era estudiada. Los estudios que se describen a continuación, muestran la complejidad de la regulación en la síntesis de aminoácidos, tanto a nivel enzimático como transcripcional/traduccional. La regulación de la biosíntesis de aminoácidos ocurre en dos niveles: la regulación de la actividad enzimática o flujo del metabolito y la regulación de la formación del enzima o la expresión del gen (Umbarger, 1978).

2.2.1. Regulación por feedback

La principal repuesta de regulación en la biosíntesis de aminoácidos toma lugar mediante la inhibición por *feedback* de la primera reacción en una secuencia por el producto final de la ruta, como lo muestra el ejemplo de la figura 9:

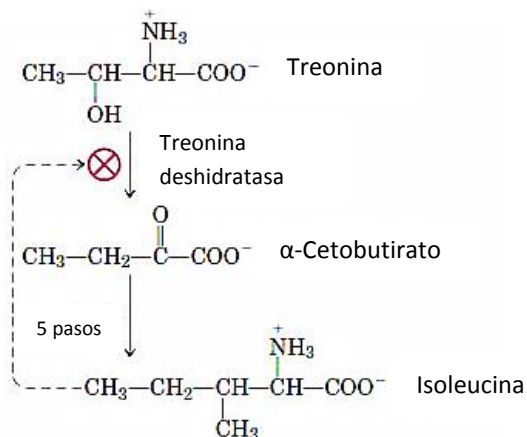


Figura 9. Regulación alostérica por la biosíntesis de Isoleucina. La primera reacción en la ruta a partir de treonina a isoleucina es inhibida por el producto final (isoleucina). Tomado de Lehninger 2005.

El mismo caso de inhibición por *feedback* es la γ -glutamil kinasa, el cual fue reconocido por ser el principal mecanismo de control para la biosíntesis de prolina en *E. coli*. Durante 1950's y 1960's se estudió la sensibilidad de la primer enzima en la vía de síntesis de prolina, γ -glutamil kinasa, con extractos crudos. Estudios con la γ -glutamil kinasa sugieren que la actividad de esta enzima es modulada no solamente por prolina sino también por glutamato y ADP. La cinética de saturación sigmoideal de la γ -glutamil kinasa con respecto al glutamato conduce a su insensibilidad relativa a pequeños cambios en la concentración de su sustrato, además de asegurar la velocidad constante en la biosíntesis de prolina a las variaciones de las concentraciones intracelulares del glutamato. El ADP, un inhibidor competitivo con respecto a ATP, inhibe a la enzima bajo condiciones de reducción de energía y además puede conducir de vuelta a la biosíntesis de prolina con la carga energética de la propia célula bacteriana. La prolina disminuye la afinidad de la enzima por glutamato a concentraciones bajas o intermedias de este metabolito. Así el producto final de la ruta de biosíntesis de prolina es el más importante efector de la ruta (Neidhard 1996).

2.2.2. Atenuación en operones bacterianos.

La atenuación fue descubierta durante las investigaciones sobre la regulación del operón de histidina (*his*) de *Salmonella typhimurium* y el operón de triptófano (*trp*) de *E. coli*. Kasai (1974) demostró que la región regulatoria del operón *his* contiene una barrera transcripcional que él describe como un sitio del atenuador. Además encontró que una pequeña delección entre el promotor y el primer gen permitía en gran medida la transcripción de genes estructurales *in vitro* comparado con la cepa silvestre (Beckwith *et al.*, 1983).

La regulación de genes por el terminador-antiterminador de la transcripción, frecuentemente llamado atenuación de la transcripción, es una estrategia comúnmente utilizada por bacterias para percibir una señal metabólica específica y permite una respuesta que dirige a la ARN polimerasa tanto al término de la transcripción o a transcribir los genes río abajo de un operón (Merino & Yanofsky 2005; Gollnick & Babitzke 2002).

La expresión de genes y operones bacterianos es frecuentemente controlada por eventos moleculares que regulan la frecuencia del inicio, al promotor, y término de la transcripción en el sitio de terminación. Los represores y activadores transcripcionales son moléculas regulatorias que determinan la frecuencia del inicio de la transcripción. Los represores reducen la iniciación previniendo la unión de la ARN polimerasa al promotor, desde donde, en cambio, el activador estimula la transcripción por interacción con el ADN, ARN polimerasa, o ambos. La antiterminación involucra interacciones entre la ARN polimerasa y factores accesorios que conducen a modificar el complejo de transcripción y ya no reconoce las señales del término de la transcripción. En contraste, la atenuación, es el regulador del término de la transcripción por interacciones moleculares que modulan la formación de la propia señal de terminación de la transcripción. El término "atenuación" es generalmente usado para describir un sitio donde la regulación del término de la transcripción ocurre dentro de un operón (Beckwith *et al.*, 1983).

2.2.2.1. Atenuación como control en la biosíntesis de aminoácidos

El modelo de atenuación está presente en varios operones biosintéticos de aminoácidos como *trp*, *phe*, *leu*, *his*, entre otros, donde estrategias de atenuación similares gobiernan como mecanismos regulatorios, basándose en la cantidad del suministro del aminoácido (Lehninger 2005; Beckwith *et al.*, 1983).

La figura 10 representa que si la célula está limitada por el aminoácido correspondiente, el ribosoma se estanca en el tramo de los codones regulatorios resultando la formación de la horquilla 2:3 y la transcripción en los genes estructurales. El inicio de la traducción de los genes estructurales sucede en una secuencia de reconocimiento del ribosoma inmediatamente precedida del primer gen. Bajo condiciones donde la traducción del péptido líder no ocurre, el emparejamiento de bases 1:2 y 3:4 conduce al término de la transcripción (Lehninger 2005; Beckwith *et al.*, 1983).

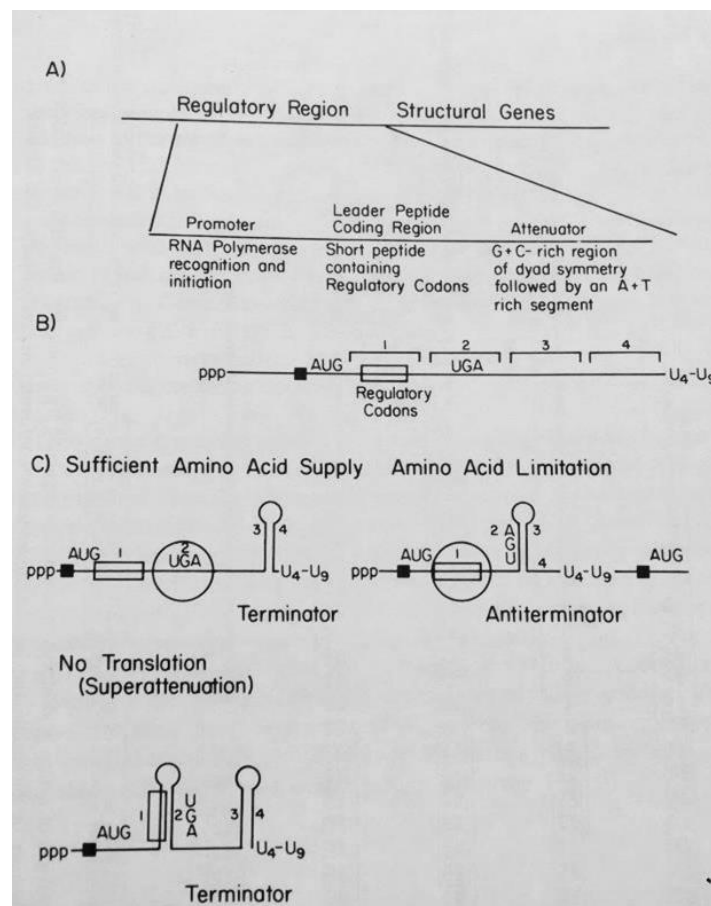


Figura 10. Representación esquemática de las regiones regulatorias de los operones biosintéticos de aminoácidos y el modelo de atenuación. La figura muestra en el panel A): la región reguladora que contiene un promotor, la región codificante al péptido líder y el sitio del atenuador; B) el transcrito líder contiene un sitio de reconocimiento al ribosoma (□) seguido por un codón de metionina (AUG), los codones regulatorios (■) y un codón de término de la traducción (UGA). Regiones potenciales de estructuras secundarias (1, 2, 3 y 4) son mostradas en paréntesis. La región terminal 3' del transcrito contiene residuos de uridina de longitud variable. C) el modelo de regulación por atenuación bajo varias condiciones fisiológicas es mostrado: si un suministro suficiente de aminoácidos está presente, la traducción completa del péptido líder resulta en la formación de la horquilla 3:4 y el término de la transcripción. Tomado de Gen funtion in prokaryotes, Beckwith *et al.*, 1983.

Las bacterias Gram positivas como *Bacillus*, también utilizan la atenuación de la transcripción para regular determinados operones biosintéticos de aminoácidos. Al igual que en las bacterias Gram negativas, el mecanismo de las Gram positivas se basa en las estructuras secundarias alternativas del ARNm, que en una configuración provocan la terminación. En el operón *trp* de *Bacillus subtilis*, sin embargo, interviene una proteína de unión llamada proteína de atenuación de Trp. En presencia de una cantidad suficiente del aminoácido triptófano, esta proteína reguladora se une al ARNm líder y provoca la terminación de la traducción. Por otra parte, si el aminoácido Trp es limitante, la proteína no se une al ARNm. Esto permite la formación de la estructura secundaria favorable y la transcripción sigue adelante (Button, 1985).

2.2.3. Regulación de genes por riboswitch

Los organismos usan al ARN en un amplio rango de mecanismos regulatorios para el control de la expresión de genes. Los ejemplos clásicos de tal regulación son la atenuación de la transcripción y la traducción (Nudler & Mironov 2004). Los riboswitches son elementos genéticos robustos que están involucrados en la regulación fundamental de procesos metabólicos en muchos organismos (Mandal & Breaker, 2004); son dominios complejos de ARN plegados que necesitan el mismo principio de formación de la estructura alternativa para el control de la elongación de la transcripción e inicio de la traducción dependiente del estatus metabólico de la célula (Nudler & Mironov, 2004). Esos dominios son encontrados en partes no codificantes de varios ARNm donde controlan la expresión de genes mediante el aprovechamiento de cambios estructurales alostéricos que son provocados por la unión del metabolito (Mandal & Breaker, 2004). La peculiaridad de esos sistemas de ARN es que no requieren ningún metabolito sensorial intermediario (ejemplos, factores de proteínas o ARNt) que rijan el proceso de atenuación (Nudler & Mironov, 2004).

La primera evidencia de la existencia de riboswitches proviene de estudios genéticos y bioquímicos sobre la regulación por *feedback* de operones biosintéticos de vitaminas en *B. subtilis*, *E. coli* y *Rhizobium etli*. El segundo grupo de riboswitches que ha sido caracterizado parece regular rutas metabólicas de al menos tres aminoácidos: metionina (Met), cisteína (Cys) y lisina (Lys) (Nudler & Mironov 2004) La siguiente imagen muestra el mapa genético de los regulones de riboswitches de *B. subtilis* y su posición en el cromosoma bacteriano.

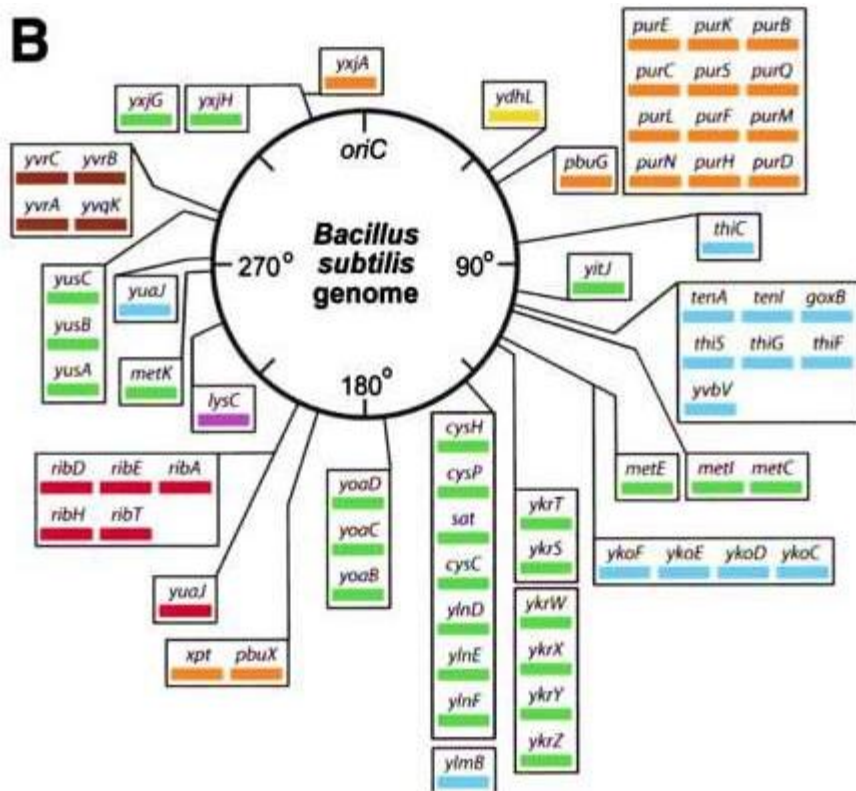


Figura 31. Regulones de los riboswitches de *B. subtilis* y su posición en el cromosoma bacteriano. Las barras de color muestran los genes que son controlados por riboswitches. Tomado de Mandal et al., 2003.

2.2.4. Regulación de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA)

Los BCAA (BCAA, por sus siglas en inglés Branched-chain amino acids: Ile, Val y Leu) son los aminoácidos más abundantes en proteínas y forman el núcleo hidrofóbico de proteínas. Adicionalmente, esos aminoácidos son los precursores para la biosíntesis de iso- y anteiso- ácidos grasos ramificados, los cuales presentan las principales especies de ácidos grasos de los lípidos de membrana en especies de *Bacillus* (De Mendora et al., 2002 in Tojo et al., 2004; Sonenshein 2007).

2.2.4.1. Operón *ilv-leu*

En *B. subtilis*, 7 genes son requeridos para codificar enzimas para la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada, valina, isoleucina y leucina, formando un único operón llamado operón *ilv-leu* (Ward et al., 1973 in Grandoni et al., 1992), ver figura 12. La transcripción de este operón es reprimido por leucina pero no por isoleucina o valina (Grandoni et al. 1993). Lo reportado por Grandoni et al., (1992) demuestra que la transcripción es iniciada a 482 pb río arriba del codón de inicio por *ilvB*, el primer gen en el operón; también el análisis *in vivo* en niveles de ARNm sugieren que la represión por leucina ocurre por atenuación de la transcripción dentro de las 482 pb de la región líder y que el terminador de la transcripción, dentro de la región líder *ilv-leu*, está involucrado en el mecanismo de control de leucina.

Los resultados presentados en 1993 por Grandoni et al. muestran la selección de mutantes con un aumento en la transcripción del operón *ilv-leu* durante el crecimiento con exceso de leucina. La estrategia de selección se basó en el hecho de que una inserción de Tn917 en el *ilvN* resulta en la

inhibición del crecimiento por leucina cuando isoleucina y valina no son añadidos al medio de cultivo. El fenotipo, definido como sensible a leucina, puede surgir debido a la inserción de Tn917 en *ilvN* resultando en la disminución de la actividad de acetohidroxilasa, producto de genes *ilvB* e *ilvN*. El solo gen *ilvB* puede llevar a cabo la catálisis sin la subunidad *ilvN*, pero su actividad es probablemente disminuida en gran medida. La represión del operón *ilv-leu* por leucina reduce la cantidad de IlvB, provocando inanición por isoleucina y valina. Sin la adición de leucina, el operón es desreprimido y las células producen suficiente IlvB para sintetizar isoleucina y valina. Las mutaciones que conducen a disminuir la represión por Leu le permite a las células crecer sin Ile y Val cuando Leu está presente. El trabajo concluyó que la mayor parte de la regulación por leucina se explica por el control de la atenuación de la transcripción y una pequeña fracción de la represión por leucina ocurre por algún otro mecanismo, probablemente uno involucrado en el inicio de la transcripción por el promotor *ilv-leu*.

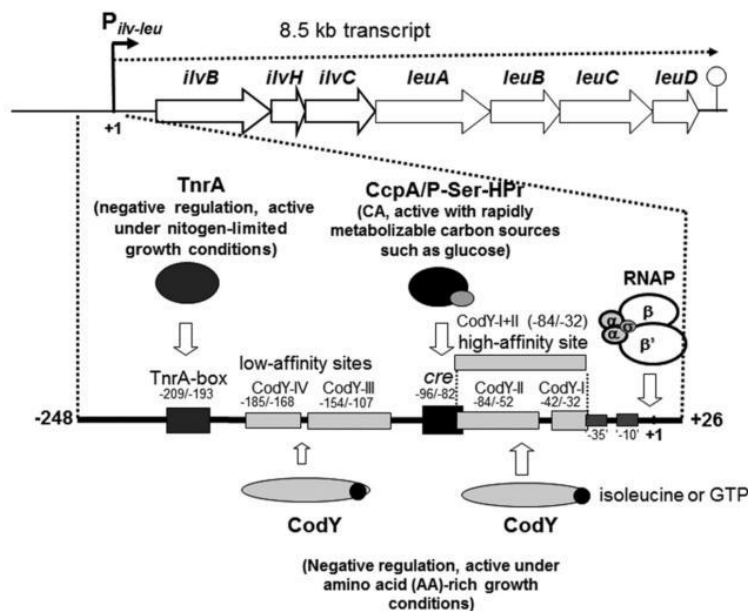


Figura 12. Activación del operón *ilv-leu* de *B. subtilis* por CcpA y su regulación negativa por CodY o TnrA bajo condiciones de crecimiento rico en aminoácidos o limitantes de nitrógeno. El operón *ilv-leu* involucrado en la biosíntesis de BCAA consiste en los genes *ilvBHC* y *leuABCD* y es transcrito a partir del nt +1 del promotor ($P_{ilv-leu}$) al terminador para producir una transcripción de 8.5 kb. La activación del catabolito (CA) del operón *ilv-leu* es retenido por la unión del complejo CcpA y P-SER-HPr, el cual es formado sobre un incremento en la concentración *in vivo* de fructosa bisfosfato durante el crecimiento sobre una fuente de carbono rápidamente metabolizable, tal como la glucosa, al sitio *cre* (nt -96/-82). CodY asociado con el corepresor de BCAA y la unión del GTP a CodY-I (nt -42/-32) y CodY II (-84/-52) [CodY- I+II (-84/-32)], sitios de alta afinidad, y al CodY III (-154/-107) y CodY IV (-185/-168) sitios de baja afinidad bajo condiciones de crecimiento rico en AA (fuente de nitrógeno, glutamina más 16 AA). La unión de CodY a CodY- I+II anula efectivamente CA regulada por CcpA de *ilv-leu*. Este CA también es anulada por la unión de TnrA a su caja (nt -209/-193) que proviene libre a partir de la glutamina sintasa bajo condiciones de crecimiento limitadas de nitrógeno (fuente de nitrógeno, únicamente glutamato). Tomado de Fujita *et al.* 2014.

AA=aminoácidos; *cre*= elemento responsable del catabolito.

Tojo et al., (2004) encontraron, en adición a la represión del operón *ilv-leu* a través de CodY, la regulación transcripcional negativa del operón *ilv-leu* a través de otro regulador global del

metabolismo del nitrógeno: TnrA y Cody son reguladores negativos y CcpA es un regulador positivo (Tojo *et al.*, 2004; Tojo *et al.*, 2005). La mutación a *ccpA* causa auxotrofia parcial a los aminoácidos de cadena ramificada, tal auxotrofia es suprimida por una mutación en *codY* (Sonenshein 2007).

2.2.4.2 Regulación de la expresión de genes *ilv* y *leu*

Para la mayoría de las bacterias Gram positivas, la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, valina y leucina) se lleva a cabo por medio de la misma ruta usada por bacterias Gram negativas, donde a partir del metabolito inicial, treonina o piruvato, las células sintetizan isoleucina o valina, respectivamente. Un intermediario en la síntesis de valina, α -cetoisovalerato, es el material de inicio para la síntesis de leucina. La ruta de síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) se representa en la figura 13, la cual muestra las enzimas y metabolitos involucrados en esa ruta.

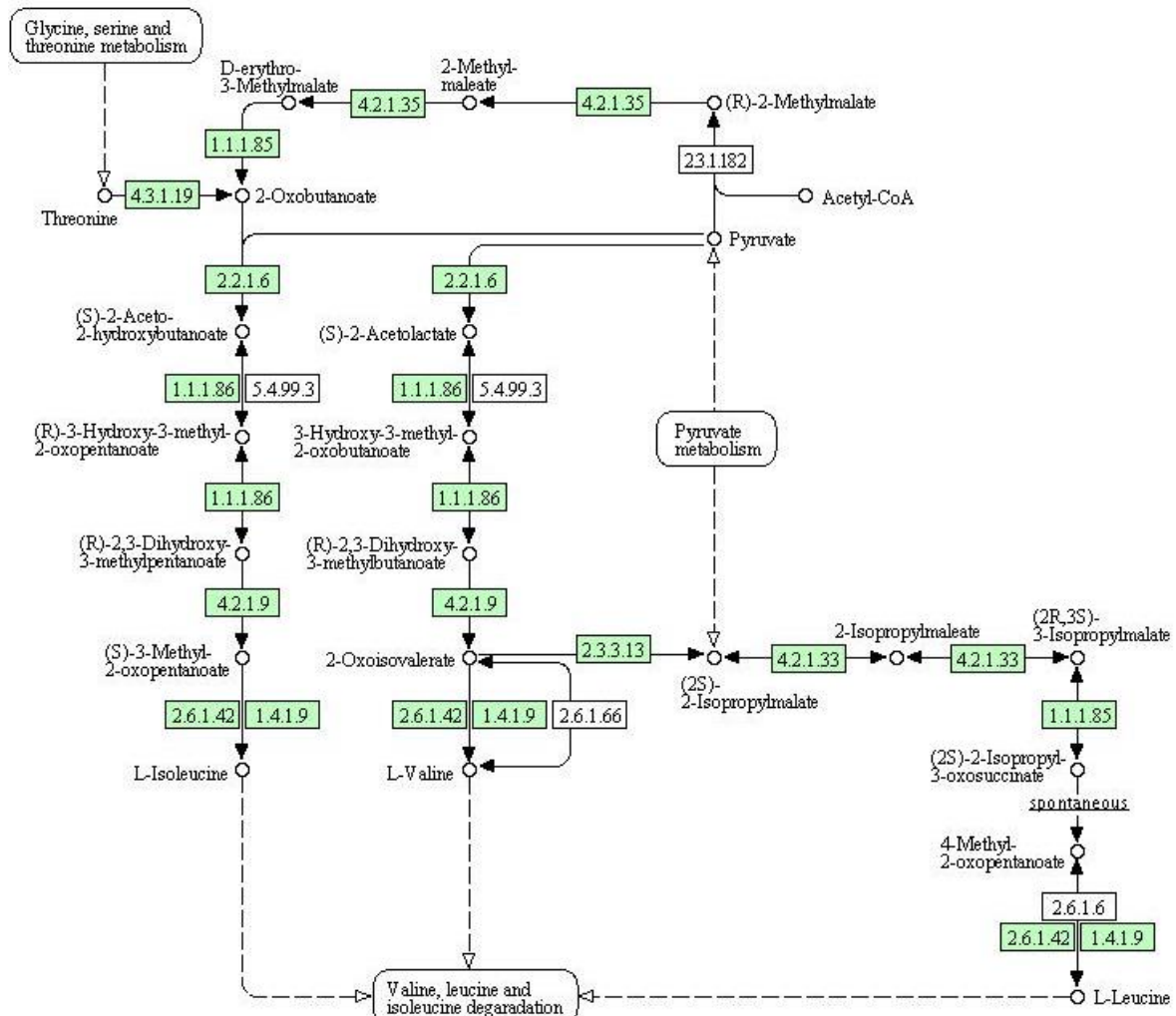


Figura 13. Ruta de síntesis de isoleucina, valina y leucina de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los rectángulos implican el producto de los genes que codifican para proteínas y el color verde claro significa que tales genes están presentes en el organismo. (KEGG Pathways DataBase, 1998).

La regulación genética de los genes *ilv* y *leu* en bacterias Gram positivas no ha sido tan bien caracterizada como la regulación de esos genes en bacterias Gram negativas. En la década de 1970's, Ward & Zahler encontraron que los genes *ilvB*, *ilvC* y *leu* están estrechamente ligados en el cromosoma de *B. subtilis* y que niveles limitantes de leucina causan una desrepresión coordinada de las enzimas codificadas por esos genes. También se encontró que una mutación río arriba del gen *ilvB*, llamada *azIA*, causa una producción incrementada de todos los productos de los genes en el operón.

El mecanismo de control ha sido recientemente caracterizado, y parece estar involucrado un atenuador similar a otros que han sido descritos en *B. subtilis* (Zalkin & Ebbole 1988 in Nudler & Mironov 2004). Esto es, su función no parece depender de la traducción del péptido líder. La región río arriba del gen *ilvB*, fue clonada y su secuencia nucleotídica fue determinada; la transcripción del clúster *ilvBC-leu* comienza alrededor de 480 pb río arriba del codón de inicio para el gen *ilvB*, la secuencia TTGACA y TAATAT, las cuales están separadas por 17 pb, representa la región -35 y -10 del promotor (Boris R. Belitsky & Sonenshein, 2008). Estudios con inserciones con el transposón Tn917, sugieren que este promotor funciona en la expresión de todos los genes del clúster. Tn917, el cual contiene señales del término de la transcripción, puede generar cepas auxótrofas que requieren los tres aminoácidos de cadena ramificada, las llamadas "mutantes liv".

Por otra parte, la sola presencia de leucina reprime la síntesis de todo el operón de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Cuando la leucina está limitada en la célula hay un incremento de cuatro veces en los niveles de transcripción de los genes. Indicando que los niveles intracelulares de leucina controlan la expresión del operón (Horn & Zahler, 1992).

2.3. Transportadores bacterianos

Una forma de regular la entrada y salida de aminoácidos es a través de transportadores, los cuales están presentes en cantidades variables en los microorganismos al igual que las permeases (Button 1985). Mientras que la cadena lateral de un aminoácido difiere ampliamente en sus propiedades químicas, no es de extrañar que un número diverso de sistemas de transporte estén involucrados para regular su consumo. Como referencia de transportadores en el género *Bacillus* encontramos los de superfamilia ABC (Cassette de unión a ATP), clasificados como TC 3.A.1.-, que en su mayoría son específicos para aminoácidos (Milton Saier DataBase, 2005). Estos transportadores ayudan a la célula bacteriana al traslado y consumo de metabolitos tan importantes como los aminoácidos; como ejemplo se muestra en la siguiente figura los transportadores LIV-I de aminoácidos de cadena ramificada:

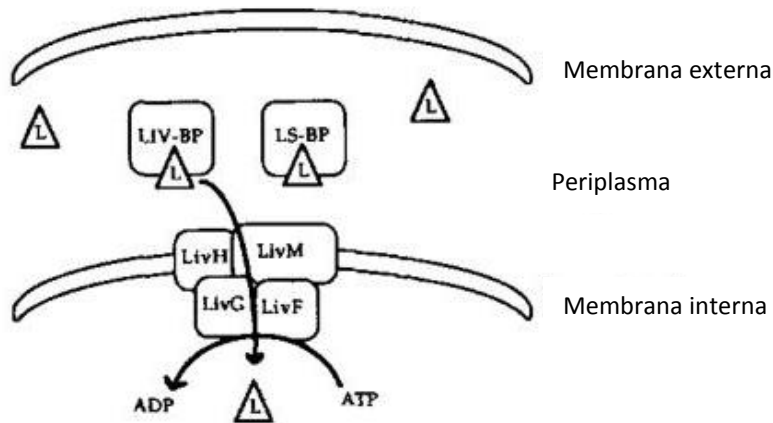


Figura 14. Sistema de transporte LIV-I/LS para aminoácidos de cadena ramificada donde muestra los componentes y la localización subcelular en una bacteria Gram negativa. LIV-BP y LS-BP son proteínas periplásmicas de unión a aminoácidos. LivH y LivM son proteínas hidrofóbicas de membrana interna. LivF y LivG son proteínas hidrofílicas pero ligeramente asociadas a la membrana. De manera similar es el acomodo de tales proteínas de transporte en bacterias Gram positivas, teniendo en cuenta la conformación de su membrana. Tomado de Adams *et al.*, 1990.

2.4. Obtención de cepas bacterianas del género *Bacillus*

En el 2007 se obtuvo una muestra de sedimento del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, de aproximadamente 100 µl la cual se trabajó en el Laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana del CINVESTAV. Se realizó un proceso de calentamiento y sembrado en caja a fin de obtener bacterias termorresistentes, característica del género *Bacillus*.

Dentro de los aislamientos obtenidos (datos no publicados) destacan 7 grupos taxonómicos de *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. aquimaris*, *B. spp*, *B. marisflavii*, *B. horikoshii* y *B. cereus*, siendo éste último un grupo que en su mayoría presentaba auxotrofia a diferentes aminoácidos que van de 1 a 12 aa, así como también se observó poco o nulo antagonismo entre una cepa y otra (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012).

2.5 *Bacillus coahuilensis* como antecedentes de pérdida de genes de rutas de síntesis de aminoácidos

En el Valle de Cuatrociénegas, Coahuila existe el endemismo microbiano, tal es el caso de *Bacillus coahuilensis*, la cual muestra reducción significativa del genoma (Alcaraz *et al.*, 2008). Entre los genes que ha perdido se encuentran los que participan en la biosíntesis de distintos aminoácidos, en particular, en los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) (Gómez-Lunar, *et al.*, 2016).

III. Preguntas de investigación

Dado los antecedentes el trabajo se plantea en base a las siguientes preguntas:

3.1 ¿Qué auxotrofías exhiben los aislados de *Bacillus cereus*? ¿pueden darse casos de complementación entre cepas auxótrofas?

3.2 ¿Existe pérdida de genes en las rutas de biosíntesis de aminoácidos?

3.3 ¿Será un mecanismo genético o metabólico el responsable del fenotipo de auxotrofia?

3.4 ¿Las auxotrofías corresponden a aminoácidos de mayor costo energético o en aminoácidos de mayor demanda con respecto a la composición de proteínas?

IV. Hipótesis

Las auxotrofías que se han observado en aislados de *Bacillus cereus* del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, se deben a la pérdida de genes involucrados en las vías biosintéticas de aminoácidos, y se explica por la facilidad de adquirir los intermediarios metabólicos dentro de una comunidad bacteriana.

V. Objetivos

5.1. Objetivo General

Analizar las auxotrofías en 18 aislados de *Bacillus cereus* del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila y estudiar a nivel genómico las rutas metabólicas relacionados a síntesis de aminoácidos para determinar si la pérdida de elementos genéticos explica el fenotipo.

5.2. Objetivos específicos

- a) Comprobar fenotípicamente auxotrofías en 18 cepas de *Bacillus cereus*.
- b) Realizar ensayos de co-cultivos de cepas auxótrofas seleccionadas para ver si hay complementación bacteriana entre cepas de *B. cereus*.
- c) Detección de metabolitos (aminoácidos) en sobrenadantes de cultivos de cepas seleccionadas de *B. cereus*.
- d) Identificar *in silico* las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos a partir del genoma de las cepas de estudio.
- e) Proponer un modelo que explique las auxotrofías.

VI. Materiales y Métodos

6.1. Cepas seleccionadas

A partir de bacterias preservadas en glicerol a -80 °C en el laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana del Cinvestav-Irapuato, se eligieron diferentes cepas de *Bacillus cereus* y *Bacillus spp.* Tales cepas (enlistadas en la tabla 3), se evaluaron en un estudio anterior, y se sugirió que presentaban diversas auxotrofías a aminoácidos. Como cepa protótrofa control se usó la de laboratorio, *Bacillus subtilis* PY79.

Tabla 3. Lista de cepas de *Bacillus* utilizadas al comienzo del estudio.

95b	102	124a	140a	316	372	417	438c
98b	111	126	155b	370a	416a	426a	460b
101a	111b	139b	311b	370b	416b	436b	PY79

6.2. Caracterización fenotípica

6.2.1. Confirmación de auxotrofías

A partir de las cepas seleccionadas de *B. cereus* se procedió a lo siguiente:

Por separado, las cepas fueron recuperadas en 5 ml de medio marino (mm) (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012), ver Material complementario (Tabla S1), e incubadas por 20 h a 37°C en agitación a 180 rpm. Después, en el espectrofotómetro Beckman DU® 640 se midió la Densidad Óptica (D. O.) a λ 600 nm de cada uno de los cultivos bacterianos. Cada cultivo bacteriano se llevó a una concentración de 1.0 de D. O. a λ 600 con buffer PBS 1%.

Para el crecimiento bacteriano en medio sólido, primero se adaptaron a un medio mínimo (DM), ver Material complementario (Tabla S2 y S3), al cual se añadieron los 20 aminoácidos convencionales. En una placa Petri de medio sólido DM con los 20 aminoácidos se adicionó 10 μ l de la suspensión bacteriana que anteriormente se había concentrado y se estrió con un asa bacteriológica. Se incubó por 24 h a 37°C. Teniendo cultivos frescos adaptados al medio mínimo, se tomó una colonia y se estrió separadamente por duplicado en cada una de las 20 cajas Petri con todos los aminoácidos menos uno, para el cual se determinaba la auxotrofia. Como control, se incluyeron medio con los 20 aminoácidos y medio carente de aminoácidos. A continuación se incubó a 28°C y, finalmente, se observó y registró el crecimiento colonial bacteriano a las 48 h. Para corroborar la auxotrofia, se realizó un segundo pase por separado de las cepas de la misma manera, tomando en consideración la misma temperatura y horas de incubación anterior.

6.2.2. Recuperación del fenotipo de auxotrofia

Este experimento consistió en realizar pruebas en algunas cepas de *B. cereus*, donde la fase de recuperación, en medio marino sólido, fue de 24 h a 37°C de incubación para tener cultivos frescos. Después, en la fase de adaptación, por separado, se tomó una colonia de cada cepa y se estrió en medio DM más 20 aminoácidos, para inmediatamente incubar por 48 h a 37°C. Cabe resaltar que

para la fase de comprobación de auxotrofia y recuperación, se tomó una colonia de cada cepa y estrió (por separado) bajo los escenarios de crecimiento condicionado en añadir el o los aminoácidos al cual resultaran ser auxótrofas las cepas seleccionadas.

6.3. Detección de aminoácidos libres por HPLC

Para conocer si las cepas promovían algún tipo de exportación de metabolitos (aminoácidos) al medio, se realizaron pruebas cromatográficas y, de tal forma, poder realizar ensayos de complementación metabólica entre cepas auxótrofas. Primero, se analizaron muestras de medio DM sólido, con y sin aminoácidos; segundo, de igual manera, se sometieron muestras provenientes de co-cultivos bacterianos seleccionados, usando el protocolo para composición de aminoácidos libres, modificado a partir de Bidlingmeyer et al., 1984, para HPLC (por sus siglas en inglés: High-Performance Liquid Chromatography), donde cada muestra se analizó por triplicado.

6.3.1. Detección de aminoácidos libres en medio DM

La estrategia bioquímica utilizada para la detección de aminoácidos, por HPLC, fue el protocolo para composición de aminoácidos libres, el cual está basado en una etapa de derivatización por precolumna, ver Pasos S1 del método en Material suplementario. Únicamente para el análisis del medio DM, con y sin aminoácidos, se usaron 10 ml más un agente solidificante (agar noble).

6.3.2. Detección de aminoácidos libres en co-cultivos

Algunas cepas seleccionadas de *Bacillus cereus*, se incubaron en 5 ml de medio DM líquido, aproximadamente 96 h a 37°C y agitación a 180rpm. Después de medir la D. O. a $\lambda 600\text{nm}$ de cada cultivo, se concentró la muestra a 0.08; posteriormente se procedió a realizar co-cultivos bacterianos, los cuales consistían en añadir en una caja Petri con medio sólido, una alícuota de 10 μl de cada cepa de lado a lado, a una distancia de 8mm entre cada estriado, tal como se muestra en la figura 15, de tal forma que se pudiera observar algún indicio de crecimiento colonial el cual nos sugeriría una complementación entre cepas intra- o interespecífica (misma cepa o diferente cepa, respectivamente).

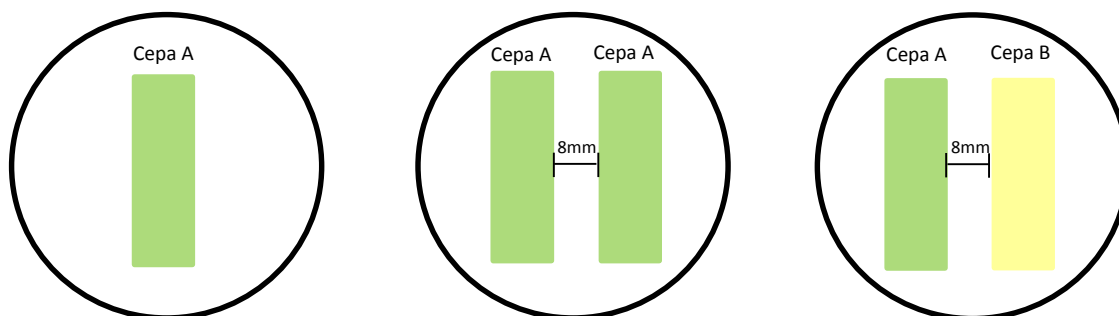


Figura 15. Representación gráfica de la estrategia experimental usada para observar crecimiento colonial en co-cultivos.

Obteniendo resultados interesantes de la anterior estrategia experimental, se procedió a llevar algunas muestras para su análisis en HPLC, usando el mismo método de detección de aminoácidos libres. Cabe mencionar que la parte usada, para tal análisis, fue la zona entre cepa y cepa de un co-cultivo o el borde de un estriado (en el caso de ser una sola cepa), es decir, para recuperar el medio

se realiza un corte con *Bst* I, con el debido cuidado de no llevarse colonias bacterianas que pudieran interferir con los resultados arrojados en HPLC.

6.4. Caracterización genotípica

La extracción de ADN genómico bacteriano se obtuvo a partir de cultivos puros de 20 h de incubación a 37°C en medio marino líquido. Para ello se utilizó el método fenol-cloroformo descrito en el *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* por Green & Sambrook, 2001.

Para corroborar que las cepas seleccionadas pertenecían al grupo de *B. cereus* se amplificó el gen 16S rDNA usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrita por Lane *et al.*, 1985), con los oligonucleótidos referidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Iniciadores universales Forward y Reverse empleados para la amplificación del gen 16S ribosomal.

Oligonucleótidos	Secuencia
Iniciador Univ Bact 27 Fw	5' AGAGTTTGATCM*TGGCTCAG 3'
Iniciador Univ Bact 1492 Rv	5' TACGGY*TACCTTGTTACGACTT 3'

* Y = C ó T; M = A ó G.

Para la purificación de productos de PCR se utilizó el método comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Healthcare, 2007), posteriormente se enviaron a secuenciar en el área de Secuenciación de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA). Las secuencias del gen 16S rDNA se analizaron con el software BLAST en la base de datos de 16S de NCBI (National Center for Biotechnology Information, 1990).

Una vez confirmado que las cepas en estudio pertenecían al grupo de *B. cereus*, el ADN genómico de cada una se envió a secuenciar en el área de Secuenciación de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA). Esto se realizó en colaboración con el Dr. Cruz-Morales quien definió la estrategia y realizó el ensamblado una vez obtenidos los reads. Cada secuencia del genoma se subió en la plataforma RAST (RAST, 2008) para su posterior análisis.

6.5. Análisis genotípico de las rutas biosintéticas de aminoácidos

Teniendo el genoma completo de las cepas en estudio, se procedió a analizar las rutas biosintéticas de aminoácidos con ayuda de bases de datos como RAST (RAST, 2008) KEGG Pathways (KEGG Pathways DataBase, 1998; Bono *et al.*, 1998) y UniProt (UniProt, 2002), con el fin de conocer si las rutas de biosíntesis de aminoácidos estaban completas o no.

6.6. Modelos de explicación a auxotrofías de aminoácidos

Para establecer una relación entre el fenotipo y genotipo presentes en las cepas de *B. cereus* se realizó una búsqueda bibliográfica de genes regulatorios y de genes del sistema de transporte que pudieran estar involucrados en la síntesis de aminoácidos, en especial los genes relacionados a los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA).

VII. Resultados

7.1. Cepas seleccionadas

Se seleccionaron para el estudio 21 cepas del laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana que habían sido clasificadas como *Bacillus cereus* y otras cepas que se usarían como controles, *B. subtilis* (protótrofa), y dos más *Bacillus spp* 416a y 416b, las cuales se había visto en el laboratorio que se complementaban metabólicamente. En la figura 16 se aprecia que todas estas cepas son capaces de crecer en medio marino.

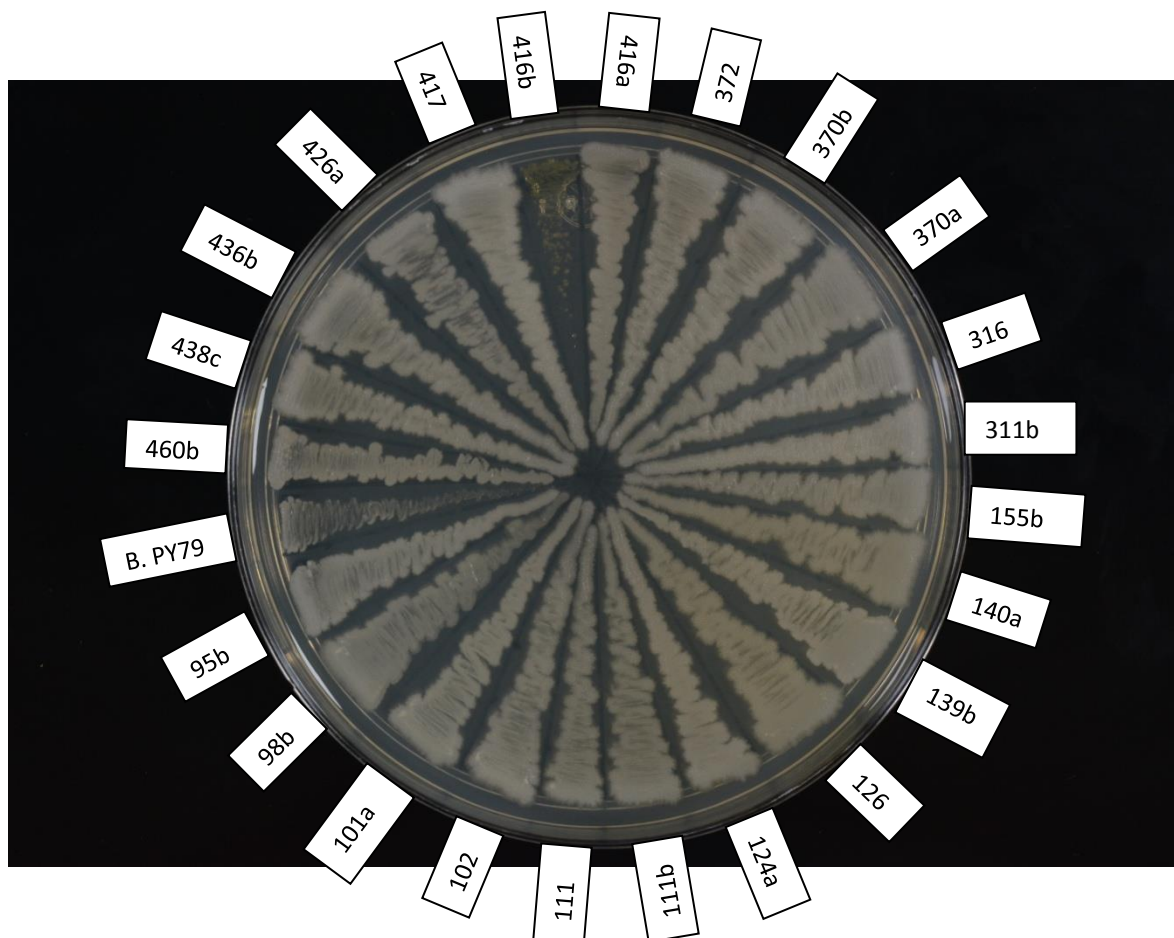


Figura 16. Cepas de *B. cereus* cultivadas en medio marino, 20hrs de incubación a 37°C.

En general las cepas en estudio presentan un amplio espectro de temperatura para un buen crecimiento a 28° y 37°C en medios de cultivo rico (Medio Marino) y medio sintético (DM). Todas las cepas de *B. cereus* presentaron fenotipo colonial color blanco o crema claro, opacas, forma irregular, de superficie convexa y borde redondeado. La cepa *B. subtilis* PY79 fue utilizada por ser una cepa protótrofa (cepa control), formó pequeñas colonias color crema, opacas, puntiforme, borde redondo y superficie menos convexa que *B. cereus*. Las cepas 416a y 416b habían sido seleccionadas por el antecedente de ser auxótrofas a aminoácidos y tener algún tipo de complementación entre ellas. La cepa 416a presentó características fenotípicas similares al grupo

de *B. cereus*, sin embargo 416b presentó formación de colonias pequeñas y puntiformes, color amarillo claro, de borde redondeado y superficie convexa.

Se confirmó la pureza de los cultivos de las cepas seleccionadas. Para corroborar que las cepas seleccionadas pertenecían al grupo de *B. cereus*, se amplificó el gen 16S rDNA con los oligonucleótidos 27 Fw y 1492 Rv. Los productos amplificados se enviaron a secuenciar en el área de Secuenciación de la Unidad de genómica Avanzada (UGA). Las secuencias se analizaron por BLAST en la base de datos de 16S de NCBI para así determinar si las cepas pertenecían a *B. cereus*. Una vez comprobadas el género taxonómico al cual pertenecían, se procedió a realizar las pruebas de caracterización fenotípica para confirmar a qué aminoácido eran auxótrofas estas cepas del grupo de *B. cereus*.

Posterior a las pruebas fenotípicas, la filogenia en la figura 17 muestra las cepas aisladas por la estudiante Rodríguez-Torres en 2007 a partir de sedimento del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, (datos no publicados). En esta ocasión se usó como marcador molecular el gen 16S rDNA (Brock, 2009) y mostró que 2 de las 21 cepas seleccionadas en este estudio no pertenecían al grupo de las *B. cereus*, ver la figura 17. La filogenia muestra 7 ramas principales que clasifican al género *Bacillus* que pertenecen a: *B. subtilis*, *B. marisflavii*, *B. aquimaris*, *B. spp.*, *B. horikoshii*, *B. pumilus* y *B. cereus*, este último el grupo de interés en este trabajo. Las cepas marcadas en la figura 17 con punto verde fueron las utilizadas al inicio de este estudio. Debido a que las cepas 438c y 417 quedan fuera del clado de *B. cereus* se descartaron para los siguientes estudios al igual que las cepas 98b, 416a y 416b. La filogenia fue elaborada por el Dr. Delaye, quien se encargó del análisis de las secuencias del gen 16S rDNA y también de la construcción de otra filogenia basada en el gen *glx*, Material suplementario (Figura S1).

7.2. Caracterización fenotípica

7.2.1. Confirmación de auxotrofías

En la figura 18 se muestran algunas cepas de *B. cereus*, las cuales pasaron por un proceso de adaptación al medio (DM con los 20 aminoácidos). Esto para que al pasarlas a medio con carencia de los diferentes aminoácidos pudiera descartarse un fenotipo de falta de crecimiento causado por estrés, debido a la limitación de nutrientes (Kriel *et al.*, 2014). Para éste fin, se estrió cada cepa por duplicado en una caja Petri con cuatro divisiones físicas. Se observa que todas las cepas presentan un crecimiento favorable tal y como sucede en el medio marino.

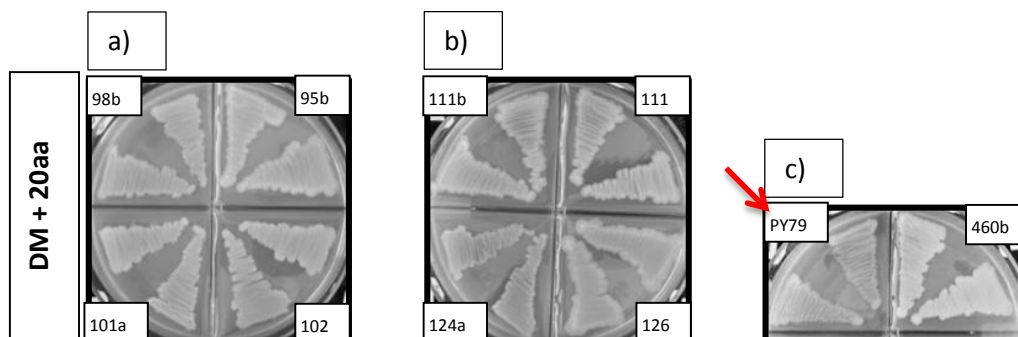
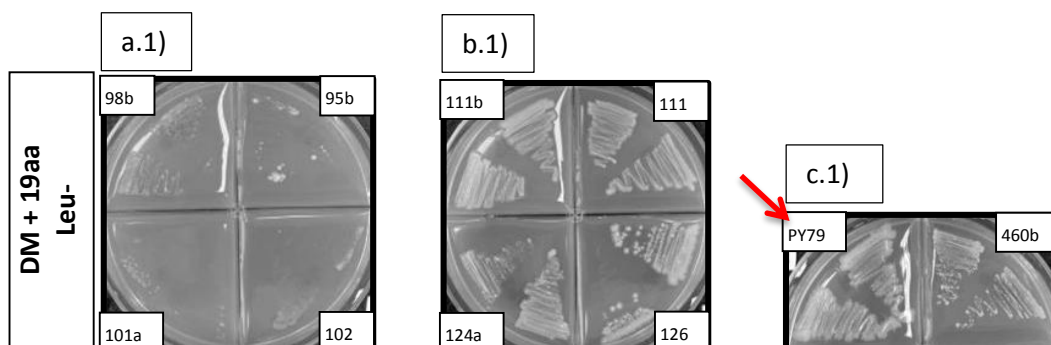


Figura 18. Adaptación de cepas de *B. cereus* al medio mínimo más 20 aminoácidos, se incubaron 24 h a 37°C. La flecha roja indica la posición de la cepa *B. subtilis* PY79.

Posterior al proceso de adaptación, se realizaron las pruebas de auxotrofías, la cual consistía en incubar una cepa bacteriana (por duplicado), en una caja Petri con medio sólido DM más 20-1 aminoácidos. El aminoácido faltante era el que determinaba la auxotrofia. La figura 19 indica el tipo de crecimiento de algunas de las cepas en estudio, por ejemplo, en las placas sin leucina (a.1, b.1, c.1) es claro el poco o nulo crecimiento de las cepas *leu*⁻ 95b, 101a y 102; caso contrario en las cepas *leu*⁺ 111, 111b, 124a, 126 y 460b las cuales presenta buen crecimiento y no necesitan el aminoácido Leu para poder vivir. En las placas sin valina (figura 19 d.1, e.1, g.1), ninguna de las cepas, excepto la cepa control PY79, presentan crecimiento o se observa un pobre crecimiento colonial al inicio del estriado, lo que indica que las cepas de *B. cereus* son *val*⁻. En lo que concierne a las cepas en medio DM sin aminoácidos, los aislados de este estudio no presentan crecimiento, lo que es congruente con la conclusión que son auxótrofas.



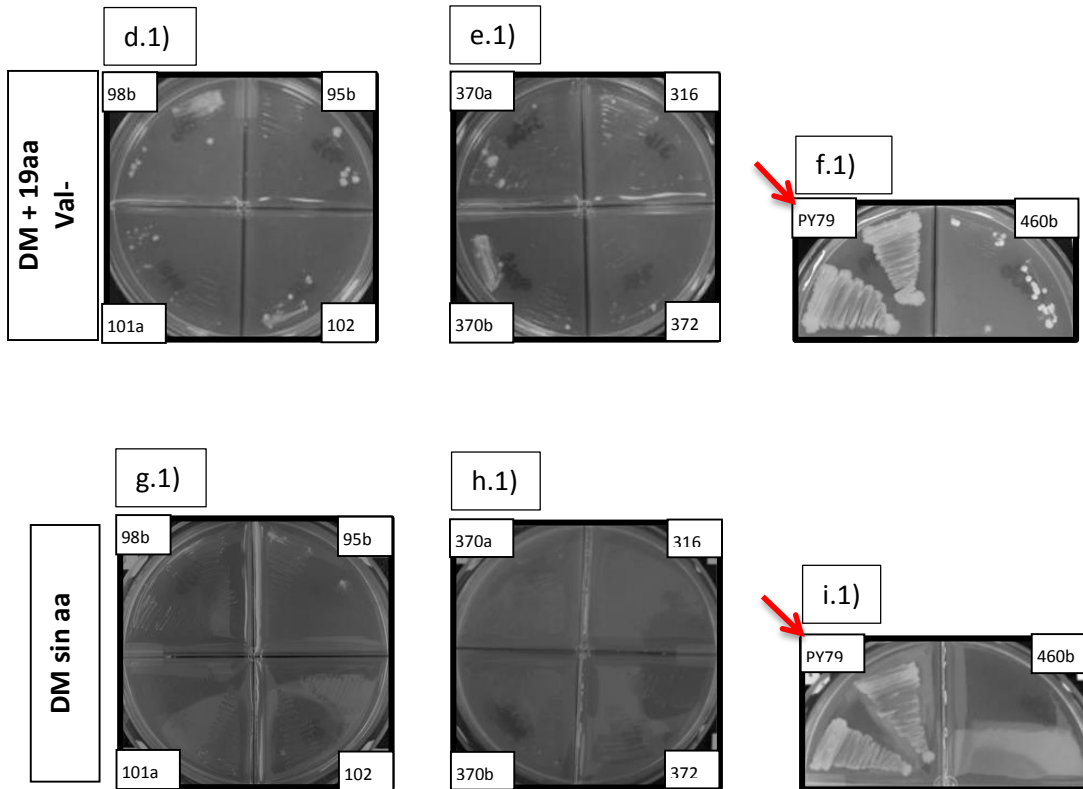


Figura 19. Fenotipo de auxotrofías en algunas de las cepas de *B. cereus* seleccionadas. (a.1, b.1, c.1) Cepas de *B. cereus* sembradas en medio DM en ausencia de leucina. (d.1, e.1, f.1) Cepas de *B. cereus* sembradas en medio DM en ausencia de valina. (g.1, h.1, i.1) Cepas de *B. cereus* sembradas en medio DM sin adición de aminoácidos. La flecha roja indica la cepa control PY79.

Es clara la diferencia entre el buen grado de crecimiento de las cepas en un medio mínimo con los 20 aminoácidos adicionados (Fig. 18, a, b y c) y el poco a nulo crecimiento en un medio al cual el único aminoácido que le falta es leucina o valina (Fig. 19, a.1, b.1, c.1 y d.1, e.1, f.1, respectivamente). Esto indicó que las cepas de *B. cereus* presentan auxotrofia a los aminoácidos leucina y valina.

Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron en dos formas distintas. En una de ellas se utilizaron cajas en donde se colocaban pequeñas estrías de las cepas, hasta de 24 colonias diferentes en la misma caja Petri, lo que resultó en problemas de ambigüedad sobre si algunas cepas eran o no auxótrofas, puesto que cabía la posibilidad de que existiera complementación y/o represión entre ellas dentro de la caja compartida, tal y como se observa en la figura 20. Por ello, fue necesario realizar la comprobación para todos los aminoácidos de manera individual utilizando cajas Petri con división física. Valina y leucina fueron las auxotrofías observadas de manera recurrente.

Como muestra la figura 20, algunos ejemplos de cuando las cepas de *B. cereus* crecen una cerca de la otra se crea un ambiente que pudiera sugerir fenotipos de complementación en el cual algunas cepas presentan buen crecimiento tal y como se observa la caja Petri DM sin leucina, y en algunos casos represión como se aprecia en algunas cepas con muy poco crecimiento en medio DM sin alanina.

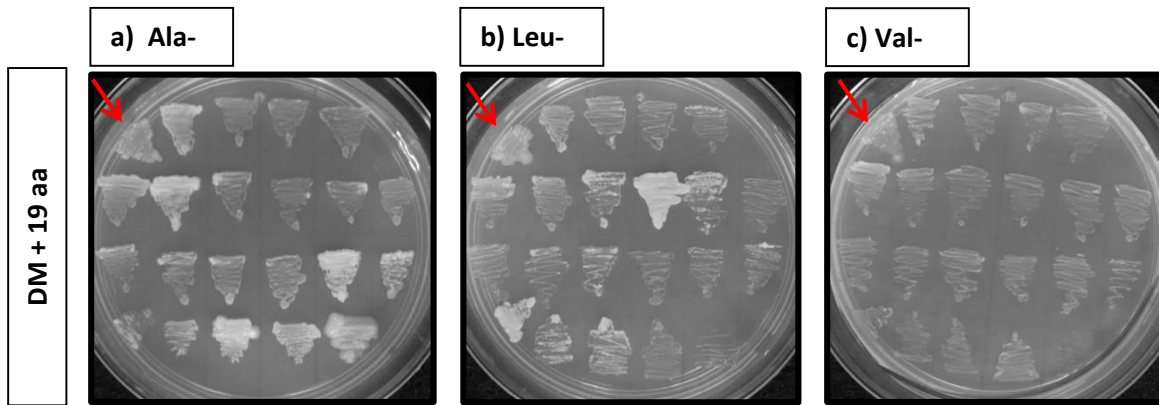


Figura 20. Veintidós cepas de *Bacillus cereus* crecidas juntas en medio DM sin la adición de un aminoácido: (a) sin alanina, (b) sin leucina, (c) sin valina. Cepa control *B. subtilis* PY79 indicada con la flecha roja.

En la siguiente tabla 5 se muestra el resumen de las 19 cepas con su respectiva auxotrofia individual, donde todas son auxótrofas a valina (fondo verde y amarillo) y la mitad de ellas son auxótrofas además a leucina (fondo amarillo). En fondo rojo vemos la cepa protótrofa ctl PY79.

Tabla 5. Resumen del fenotipo individual de auxotrofías después de someter a las cepas a la adaptación del medio mínimo suplementado con 20 aminoácidos.

Cepa	Auxotrofia
95b	L, V
101a	
102	
311b	
316	
370a	
370b	
426a	
436b	
460b	
111	
111b	
124a	
126	
139b	
140a	
155b	
372	
<i>B. subtilis</i> PY79	Protótrofa

7.2.2 Recuperación del fenotipo de auxotrofia

Esta fase experimental se llevó a cabo con el principal propósito de recuperar el fenotipo al cual eran auxótrofas el grupo de *B. cereus* en estudio, además de conocer el comportamiento de algunas cepas acorde a cantidades y ajustes nutrimentales, ver tabla 6; cada cepa se estió por duplicado.

Tabla 6. Características de 3 cepas de *Bacillus spp* con ajustes nutrimentales de aminoácidos. aa= aminoácidos; Thr= Treonina; Ile= Isoleucina, Leu= leucina; Val= valina; ↑= exceso.

Columna 1	Columna 2 Protótrofa (duplicado)		Columna 3 Leu ⁻ Val ⁻ (duplicado)		Columna 4 Val ⁻ (duplicado)	
Cont. del medio de cultivo	2 pase PY79	2 pase PY79	2 pase 316	2 pase 316	2 pase 140a	2 pase 140a
1. DM s/aa	+	+	-	-	-	-
2. DM + 20aa	+	+	+	+	+	+
3. DM + 20aa + ↑Thr	+	+	+	+	+	+
4. DM + 20-1aa (Ile ⁻)	+	+	+	+	+	+
5. DM + 20-1aa (Leu ⁻)	+	+	-	-	+	+
6. DM + 20-1aa (Val ⁻)	+	+	-	-	-	-
7. DM + 20-2aa (Val ⁻ , Leu ⁻)	+	+	-	-	-	-
8. DM + Val	+	+	-	-	-	-
9. DM + Val + Leu	+	+	-	-	-	-
10. DM + Val + Leu + Ile	+	+	-	-	+	+
11. DM + Val + Leu + Ile + ↑Thr	+	+	-	-	+	+
12. DM + Val + ↑Thr	+	+	-	-	-	-
13. DM + Val + Leu + ↑Thr	+	+	-	-	-	-

+ = buen crecimiento; - = sin crecimiento.

La explicación de lo expuesto en la tabla 6 se resume en lo siguiente: se seleccionó una cepa protótrofa control: *B. subtilis* PY79 (fondo rojo), una cepa auxótrofa a leucina y valina: *B. cereus* 316 (fondo amarillo) y una cepa auxótrofa a valina: *B. cereus* 140a (fondo verde). La cepa control protótrofa, *B. subtilis* PY79, en todos los casos presenta crecimiento, aún sin tener aa en el medio de cultivo, esto último se condiciona a que siempre tenga a su disponibilidad una fuente de carbohidrato, en este caso la glucosa y una fuente de nitrógeno, como nitrato de amonio.

En cuanto a *B. cereus* cepa 316 (en la misma tabla 6), se observa que no hay crecimiento colonial si no están presentes los aminoácidos (columna 3, fila 1). Se corroboró la auxotrofia de *B. cereus* cepa 316 a leucina y valina (fila 5, 6 respectivamente, 3ra. columna, fondo amarillo), y, se destaca que no se recupera el fenotipo de crecimiento en tal cepa si se añade al medio los aminoácidos al cual es auxótrofa (ver fila 9, 3ra. columna, fondo amarillo) mucho menos al adicionar al medio de cultivo los tres aminoácidos de cadena ramificada: Val, Leu e Ile (fila 10, 3ra. columna, fondo amarillo). Asimismo, el aminoácido Treonina no parece implicar algún tipo de respuesta positiva en cuanto al crecimiento de la cepa, ver fila 11, 12 y 13, columna 3. Todo lo anterior sugiere pensar que las auxotrofías a Val y Leu de la cepa 316 es un problema a nivel genético más que de regulación metabólica.

Por último y siguiendo en la tabla 6, *B. cereus* cepa 140a, columna 4, manifiesta la carencia de crecimiento por la falta de aminoácidos al medio de cultivo tal y como se observa en la fila 1, sin embargo podemos ver puntos interesantes, el primero es la confirmación de la auxotrofia a valina (fila 6, fondo verde), lo segundo es que no se recupera el fenotipo de crecimiento con la adición al medio del aminoácido al cual es auxótrofa (fila 8, fondo verde), tercero, y de manera interesante, se puede observar el restablecimiento del crecimiento colonial al añadir los tres aminoácidos de

cadena ramificada: Val, Leu e Ile (fila 10, fondo verde); por último, el aminoácido Thr no indica estar implicado en la recuperación del fenotipo de la cepa 140a tal y como se observa en las filas 12 y 13. Lo anterior pudiera apuntar que la auxotrofia a Val de *B. cereus* 140a es un problema de regulación metabólica, más que genético.

En la siguiente figura 21 se aprecian los fenotipos más sobresalientes de las cepas seleccionadas.

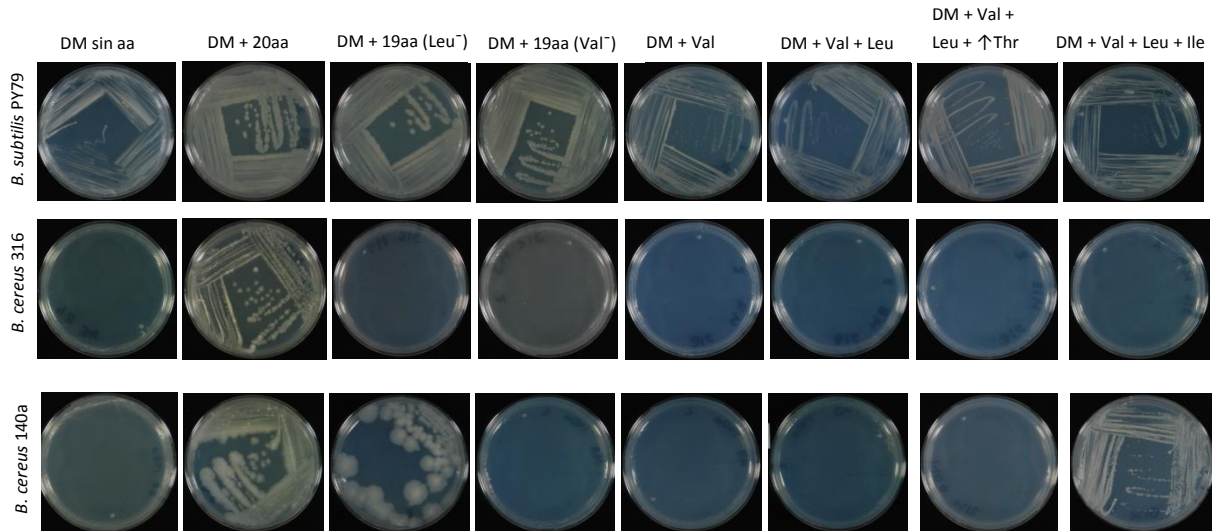
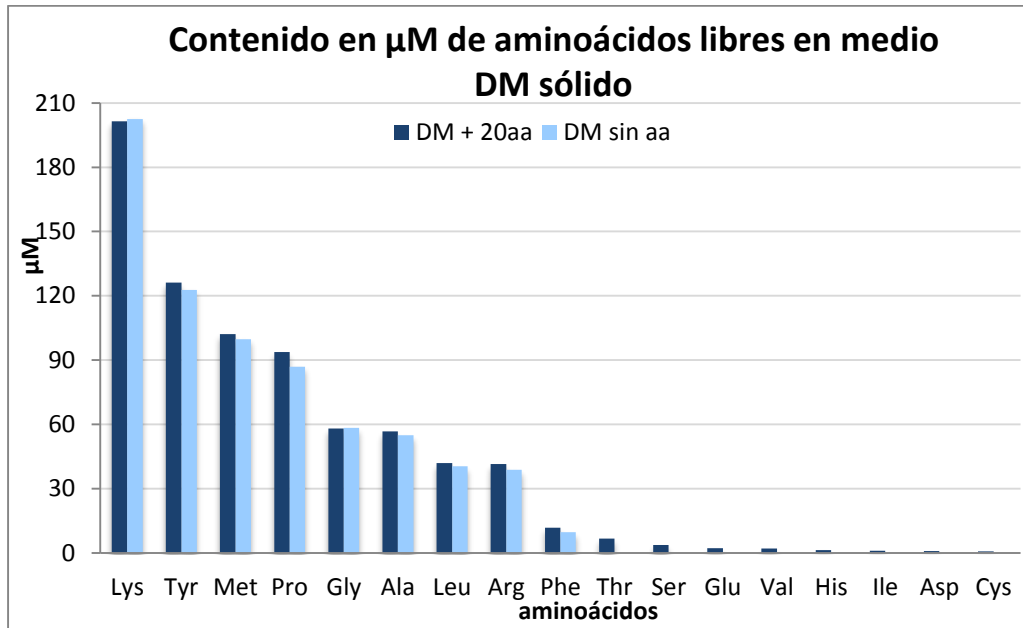


Figura 21. Fenotipo de auxotrofia de 3 cepas de *B. cereus*. La primera hilera corresponde al fenotipo de la cepa control *B. subtilis* PY79; la segunda hilera pertenece al fenotipo expresado por *B. cereus* cepa 316 (auxótrofa a Val + Leu); por último *B. cereus* cepa 140a (auxótrofa a Val) y su fenotipo manifestado. Las condiciones nutrimentales, de izquierda a derecha son: medio DM sin aminoácidos, DM + 20 aminoácidos, DM + 19 aminoácidos (sin leucina), DM + 19 aminoácidos (sin valina), DM + valina, DM + valina + leucina, DM + valina + leucina + exceso de treonina, DM + valina + leucina + isoleucina.

7.3. Detección de aminoácidos libres por HPLC

7.3.1. Detección de aminoácidos libres en medio DM

El primer paso fue conocer el contenido de aminoácidos libres en el medio sólido DM, con y sin aminoácidos, para después proceder con los ensayos de co-cultivos. Con la intención de descartar cualquier inconveniente (refiriéndome con esto al grado de impurezas que el medio pudiera tener), se observa que, el medio DM sin aa, aún teniendo aminoácidos detectados por HPLC, no son lo suficiente para que una célula bacteriana pudiera captar tales aa libres, tal afirmación se explica por su incapacidad de crecimiento en el medio. Los resultados arrojados, usando el protocolo de Detección de aminoácidos libres, fueron los de la siguiente gráfica 1:



Gráfica 1. Contenido (en μM) de aa libres en medio sólido DM con y sin aminoácidos detectados por HPLC.

En la gráfica anterior, también observamos que en el medio DM sin aminoácidos, no son detectables ciertos aminoácidos como: Thr, Ser, Glu, Val, His, Ile, Asp y Cys; el aminoácido que en mayor proporción es encontrado es Lys, seguido de Tyr, Met y Pro, al igual que en el medio DM suplementado con los 20 aa. En éste último medio se detectaron todos los aminoácidos suplementados, aún en cantidades muy bajas. Cabe señalar que los aminoácidos aspartato y asparagina se detectan por igual, mismo caso con glutámico y glutamina.

7.3.2. Detección de aa libres en co-cultivos

Una vez teniendo los datos del medio de cultivo DM, como control para los ensayos de co-cultivos, se procedió a realizar una serie de combinaciones entre cepas, las cuales, por simple observación visual, pudiera sugerir alguna complementación entre ellas. Como se ha probado anteriormente, las cepas de *B. cereus*, al estar en medio mínimo DM sin aminoácidos son incapaces de crecer. La figura 22 nos muestra un ejemplo de como las cepas 316 y 140a no son capaces de crecer por sí solas en un medio carente de aminoácidos ; sin embargo cuando se someten a crecer juntas en el mismo medio, a poca distancia la una de la otra, se observa un crecimiento moderado.

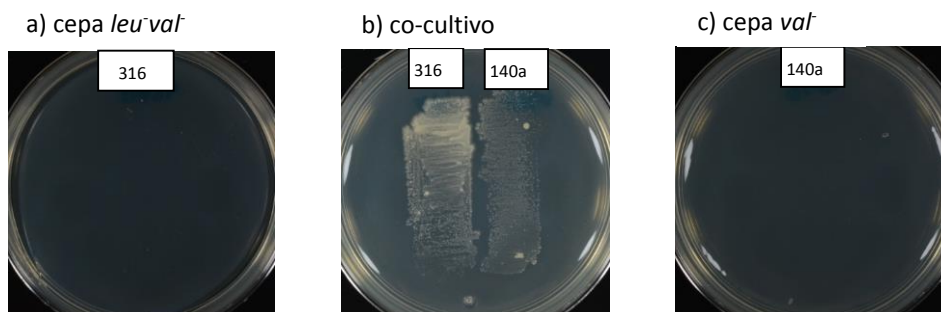
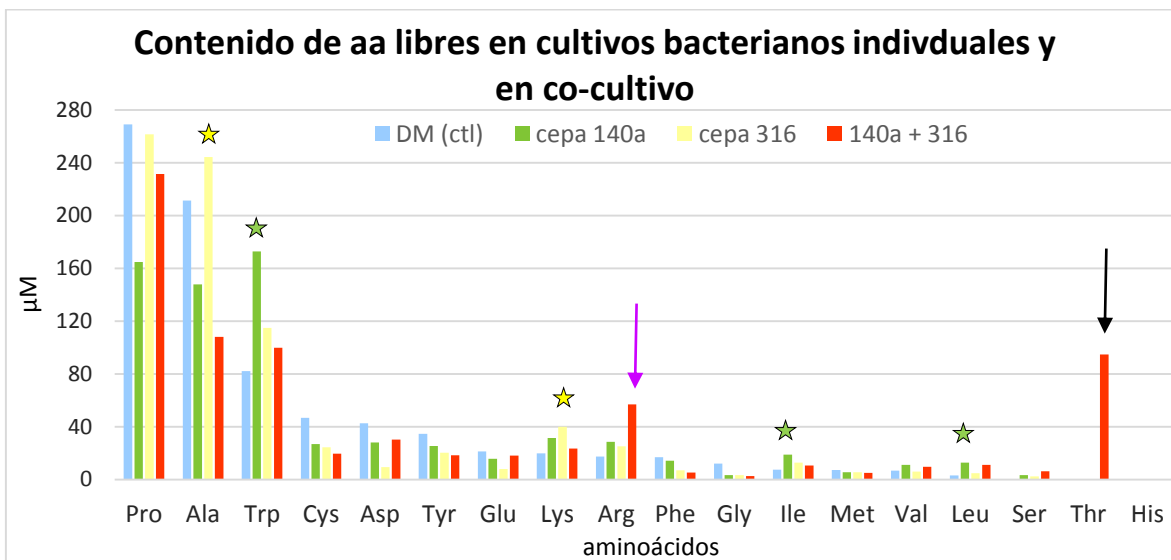


Figura 22. Tipo de crecimiento de dos cepas de *B. cereus*, por separado y juntas. a) La cepa 316 no es capaz de crecer sola, al igual que la cepa 140a (c); b) el co-cultivo de la cepa 316 y 140a nos muestra crecimiento colonial moderado de las dos cepas de *B. cereus*.

Los aminoácidos libres detectados en un ejemplo de co-cultivo (indicado en barras rojas), ver gráfica 2, con muestras por triplicado en HPLC, nos dirige a ver que el aminoácido treonina (señalado con flecha negra) se está produciendo por tales cepas. Esta última afirmación se apoya con el hecho de que en el control (medio DM sin aa), el aminoácido Thr no es detectado, ni siquiera en los cromatogramas de las cepas por separado y, precisamente cuando las cepas 316 (*leu-val*) y 140a (*val*) se juntan, tal aminoácido es detectado en niveles muy altos. Este último resultado es interesante pues la Thr es uno de los precursores en la vía de los aminoácidos de cadena ramificada. Otro aminoácido detectado, y no menos interesante, es arginina, indicado con una flecha morada. Éste último metabolito parece ser promovido individualmente por las cepas, ya que duplica la cantidad observada en las cepas por separado.



Gráfica 2. Contenido (en μM) de aminoácidos (aa) libres en cultivos individuales y un co-cultivo de cepas de *B. cereus*: 316 y 140a. Las barras azul claro muestran la cantidad, en micromoles (μM), de los aa detectados por HPLC en el medio DM (ctl); barras verdes y amarillas pertenecen a los aa de las cepas crecidas individualmente 140a y 316 (respectivamente) y las barras rojas dan referencia a la cantidad en micromol de los aa detectados en un co-cultivo bacteriano (316 + 140a).

Otro punto que vale la pena señalar en los resultados de la gráfica anterior es que la cepa 316 pudiera sugerir ser productora de alanina y en menor grado de lisina (indicado con estrellas amarillas). Por otro lado, la cepa 140a apunta ser productora de triptófano, en menor proporción de isoleucina y leucina (señalado con estrellas verde).

7.4. Caracterización genotípica

La secuenciación del genoma se hizo utilizando Illumina (pair-end 2 X300); la evaluación de la calidad de los *reads* se hizo con FastQC; los *reads* fueron recortados usando Trimmomatic (TRAILING: 39, LEADING:30 MINLEN:230); los *reads* recortados fueron ensamblados con Velvet h/g en un intervalo de k-mers. Las características principales de los genomas son los que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Reporte del Genoma ensamblado por el Dr. Cruz-Morales.

Strain	Best K-mer	Assembly length (nt)	GC content (%)	total N's	Total contigs	Coverage (x)	Used Reads (%)
95b	160	5,730,733	34.87	1669	25	90.96	90.9
101a	200	5,959,691	34.96	9512	82	90.02	83.2
102	90	5,888,654	34.81	10395	23	80.73	84.26
111	140	5,962,845	34.76	4218	66	103.09	93.61
111b	150	5,964,269	34.75	3202	61	87.7	91.54
124a	160	5,698,912	34.9	3502	42	87.07	88.03
126	120	5,373,724	35.26	4579	26	143.19	92.21
139b	100	5,695,744	34.95	3047	35	118.54	95.63
140a	100	5,376,841	35.27	3995	24	189.12	93.75
155b	110	5,562,970	35.26	15640	34	99.5	95.57
311b	100	5,999,183	34.76	8451	34	83.79	80.65
316	140	6,143,615	34.68	8845	28	161.75	91.45
370a	90	6,009,990	34.78	7389	37	161	95.78
370b	80	6,002,386	34.75	13988	43	85.48	84.6
372	100	5,941,958	34.92	7156	53	142.2	96.43
426a	100	6,037,202	34.79	6668	46	88	79.95
436b	110	5,959,804	34.78	6168	33	91	94.71
460b	160	5,929,192	34.83	6004	45	79.44	85.87

7.5. Análisis genotípico de las rutas biosintéticas de aminoácidos

Después, teniendo secuenciado el genoma de 18 cepas de *B. cereus* (col. con el Dr. Cruz-Morales) se procedió a la búsqueda de genes involucrados en las rutas de síntesis de cada uno de los 20 aminoácidos, encontrándose todas las rutas completas, ver tabla 8.

Tabla 8. Rutas metabólicas a nivel genoma presentes (+) o ausentes (-) en cepas de *B. cereus* secuenciadas y fenotipo de auxotrofías a valina (fondo verde) y/o leucina (fondo amarillo).

Familia	3-PG			E4P + PEP			R5P	Pyr			αKG				Oaa					
	S	G	C	W	F	Y	H	A	V	L	E	Q	P	R	D	N	M	T	I	K
95b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
311b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
316	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
370a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
370b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
426a	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
436b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
460b	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
124a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
139b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
140a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
155b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
372	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cada aa es presentado en su abreviación de una letra y son agrupados de acuerdo a su familia de síntesis: 3-PG= 3-fosfoglicerato; E4P + PEP= Eritrosa-4fosfato + Fosfoenolpiruvato; R5P= Ribosa 5fosfato; αkg= α Cetoglutarato; Oaa= Oxalacetato.

++ =caso especial de rutas redundantes de síntesis de corismato.

Como se observa en la Tabla 8, el análisis de cada una de las cepas en estudio revela que ninguna ruta está ausente. Cepas en color rojo indican la presencia de dos vías distintas para la síntesis de corismato, intermediario importante en la producción de aminoácidos aromáticos. Para tener un análisis más robusto, se decidió examinar el marco abierto de lectura de cada uno de los genes involucrados en la ruta de síntesis de aminoácidos de valina y leucina, eligiendo sólo esta ruta debido al fenotipo de auxotrofia presentados por las cepas de *B. cereus* bajo este estudio, ver tabla 9 y 10.

En la tabla 9 se observa la lista de las cepas usadas en el alineamiento de genes involucrados en la ruta de síntesis de valina, para ello se utilizó la secuencia de dos *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* PY79 y *B. subtilis* 168, y dos secuencias de *Bacillus. cereus*, *B. cereus* 14579 y *B. cereus* 10987, las cuales se encuentran en la base de datos del NCBI. Del mismo modo que la tabla 9, la tabla 10 muestra las mismas cepas utilizadas en el alineamiento, en este caso, de genes involucrados en la síntesis de leucina.

Tabla 9. Tamaño (en nucleótidos= nt y en aminoácidos= aa) de los genes involucrados en la ruta de síntesis de valina en cepas de *Bacillus cereus* aisladas a partir del sedimento del sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.

Ruta de síntesis														
VALINA														
Gen*	ilvG		ilvM		ilvC				ilvD		ilvE		ldH	
Nombre	1. Acetolactate synthase large subunit Gaps= 9; C= 368; V= 207		2. Acetolactate synthase small subunit Gaps= 3; C= 110; V=62		3. Ketol-acid reductoisomerase 1 * Gaps= 8; C= 189; V=153		4. Ketol-acid reductoisomerase 2 Gaps= 9; C= 189; V=153		5. Dihydroxy acid dehydratase Gaps= 9; C= 389; V= 173		6.1 BCAA aminotransferase Gaps= 67; C=126; V=239		6.2 Leucine dehydrogenase Gaps= 0; C=301; V= 65	
Cepa	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)
<i>B. subtilis</i> PY79	1725	574	519	172	1029	342			1677	558	1092	363	1095	364
<i>B. subtilis</i> 168	1725	574	519	172	1029	342			1677	558	1092	363	1095	364
<i>B. cereus</i> 14579	1689	562	510	169	1017	338	1008	335	1662	553	897	298	1101	366
<i>B. cereus</i> 10987	1698	571	444	147	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 95b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 101a	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 102	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 111	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 111b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 124a	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 126	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 139b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 140a	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 155b	1701	566	510	169	1011	336			1662	553	897	298	1101	366
<i>B. cereus</i> 311b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 316	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 370a	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 370b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 372	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 426a	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 436b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366
<i>B. cereus</i> 460b	1701	566	510	169	1011	336	1008	335	1674	557	900	299	1101	366

Gaps= total de gaps encontrados por aminoácido con respecto al alineamiento de las cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*;

C= sitios conservados; V= sitios variables.

*= Genes involucrados en la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada de acuerdo a Rast, 2008.

Tabla 10. Tamaño (en nucleótidos= nt y en aminoácidos= aa) de los genes involucrados en la ruta de síntesis de leucina en cepas de *Bacillus cereus* aisladas a partir del sedimento del sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.

Ruta de síntesis		LEUCINA							
Gen*	<i>leuA</i>		<i>leuC</i>		<i>leuD</i>		<i>leuB</i>		
Nombre	7. 2-isopropylmalato synthase Gaps= 12; C= 297; V= 221		8. 3-isopropylmalate dehydratase large subunit Gaps= 10; C= 293; V= 181		9. 3-isopropylmalate dehydratase small subunit Gaps= 6; C= 111; V=88		10. 3-isopropylmalate dehydrogenase Gaps= 12; C= 203; V= 163		
Cepa	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	Tam (nt)	Tam (aa)	
<i>B. subtilis</i> PY79	1494	497	1419	472	600	199	1098	365	
<i>B. subtilis</i> 168	1557	518	1419	472	600	199	1098	365	
<i>B. cereus</i> 14579	1509	502	1395	464	585	194	1065	354	
<i>B. cereus</i> 10987	1521	506	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 95b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 101a	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 102	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 111	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 111b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 124a	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 126	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 139b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 140a	1521	506	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 155b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 311b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 316	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 370a	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 370b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 372	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 426a	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 436b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	
<i>B. cereus</i> 460b	1503	500	1395	464	582	193	1065	354	

Gaps= total de gaps encontrados por aminoácido con respecto al alineamiento de las cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*;

C= sitios conservados; V= sitios variables.

*= Genes involucrados en la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada de acuerdo a Rast, 2008.

En general, podemos ver en la tabla 9 que la diferencia de tamaños, reflejada en el número de gaps por aminoácidos, van de 3 a 9; sin embargo se destaca la diferencia del tamaño del gen que codifica a la proteína Branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase es de 67 gaps, repartidos al inicio, parte media y final de la secuencia proteínica, en comparación con el tamaño del mismo gen de las cepas control *B. subtilis*, esta gen es muy importante debido a que es la última enzima que transfiere el grupo amino para que el metabolito sea convertido ya sea en valina o leucina. El caso contrario sucede con el gen que codifica a la proteína Leucina deshydrogenase, la cual sugiere ser una proteína muy conservada pues tiene cero gaps con 301 sitios conservados y 65 sitios variables entre cepas de *Bacillus* spp. En la tabla 10 se muestran las mismas cepas utilizadas en el alineamiento anterior, en este caso, sólo los genes faltantes involucrados en la síntesis de leucina; aquí observamos que los gaps van de 6 a 12 aminoácidos. Entre cepas de *B. cereus* se observan el mismo tamaño de secuencia nucleotídica y aminoacídica (tanto en la tabla 9 como en la tabla 10), con la excepción de la cepa 140a la cual tiene 6 aminoácidos más en el gen que codifica a la proteína 2-isopropylmalate synthase, en comparación con las demás cepas de *B. cereus* bajo este estudio.

Lo anterior ayudó a la realización del alineamiento entre cepas de *B. cereus* y *B. subtilis*, el siguiente paso fue la realización de la reconstrucción filogenética usando el método algorítmico de Minimum Evolution, con la secuencia de los dos últimos genes que codifican para la enzima responsable del

último paso en valina y leucina. Tal reconstrucción filogenética, ver Fig. 23 y Fig. 24, no sugiere un patrón acorde al fenotipo de auxotrofías de cada una de las cepas. El círculo en verde significa la auxotrofia a valina, y el círculo amarillo la auxotrofia a valina + leucina.

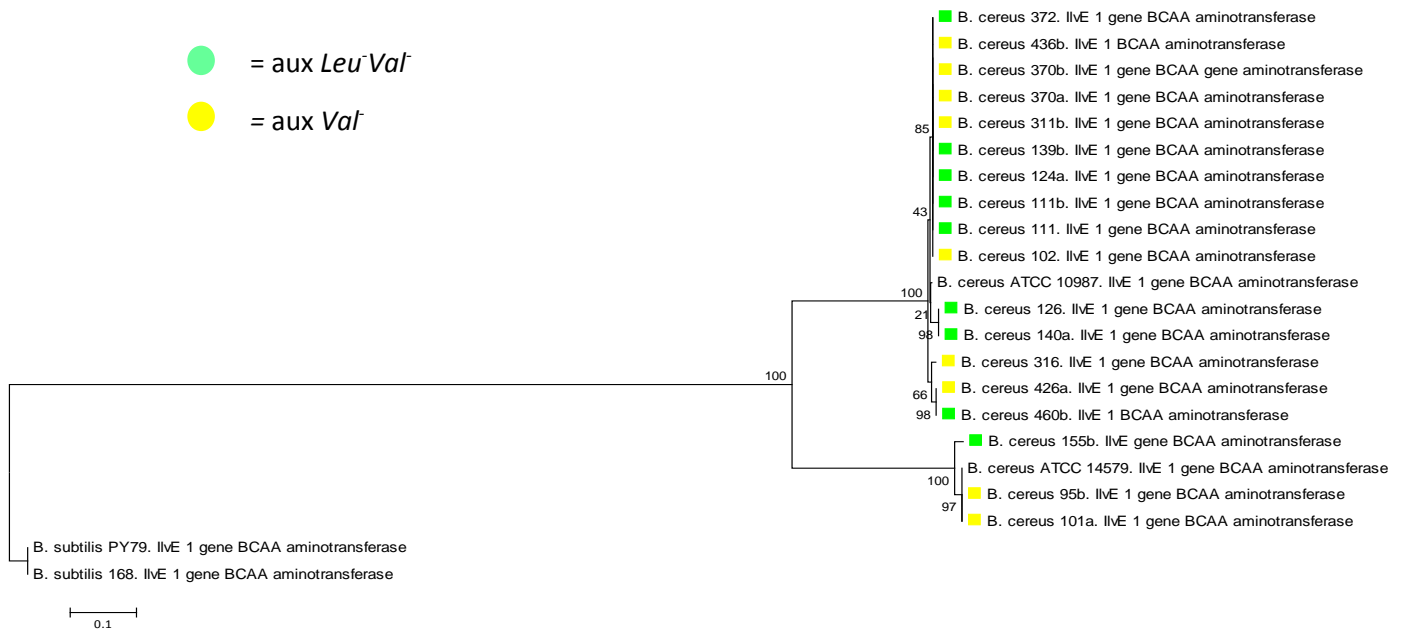


Figura 23. Reconstrucción filogenética usando el método de Minimum Evolution, basada en el gen *ilvE* BCAA aminotransferase de cepas de *B. cereus*. Como outgroup se tiene a *B. subtilis* PY79 y *B. subtilis* 168.

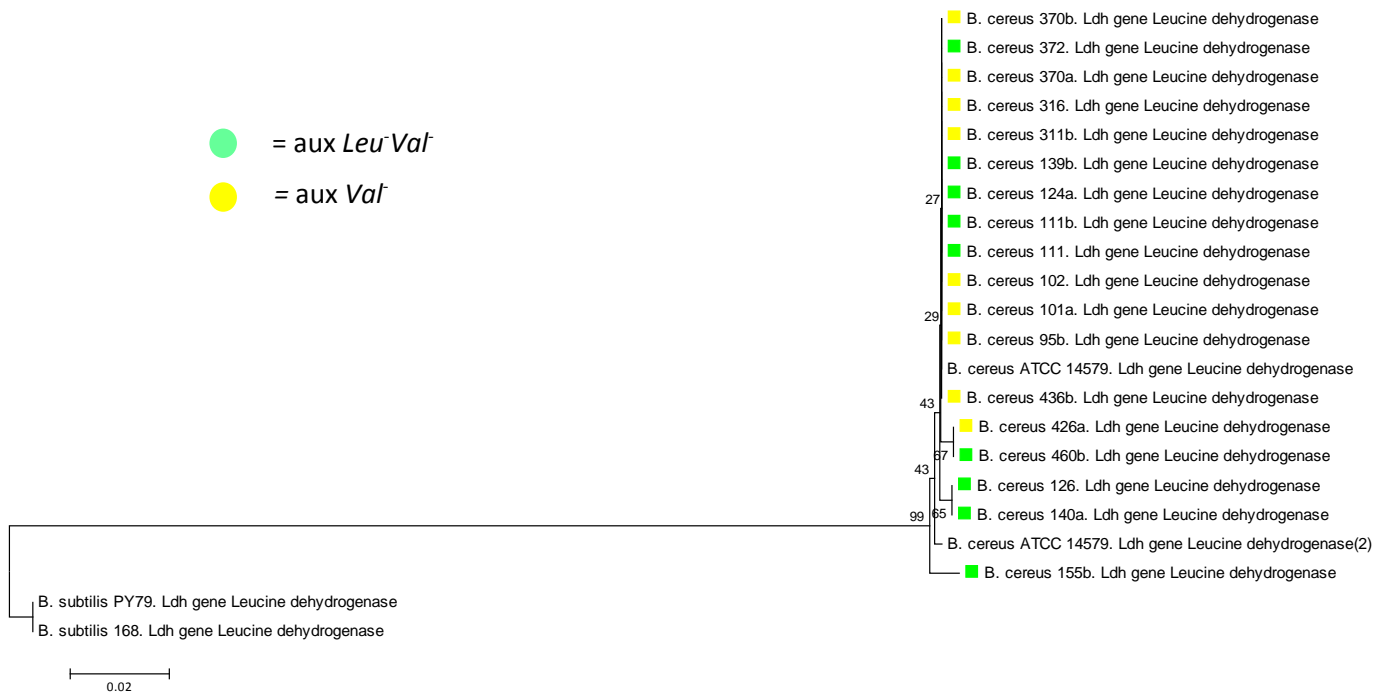


Figura 24. Reconstrucción filogenética usando el método de Minimum Evolution, basada en el gen *ldh* leucine dehydrogenase de cepas de *B. cereus*. Como outgroup se tiene a *B. subtilis* PY79 y *B. subtilis* 168.

Ligado a los genes que codifican las enzimas necesarias para la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, se presenta la siguiente figura donde se muestra el operón *ilv-leu*, donde *ilvB*= Acetolactate sintasa subunidad grande; *ilvH*= Acetolactate sintasa subunidad pequeña; *ilvC*= Ketolacid reductoisomerasa; *leuA*= 2-isopropilmalate sintasa; *leuB*= 3-isopropylmalate dehidrogenasa, *leuC*= 3-isopropilmalato dehidratasa subunidad grande; *leuD*= 3-isopropilmalato dehidratasa subunidad pequeña.

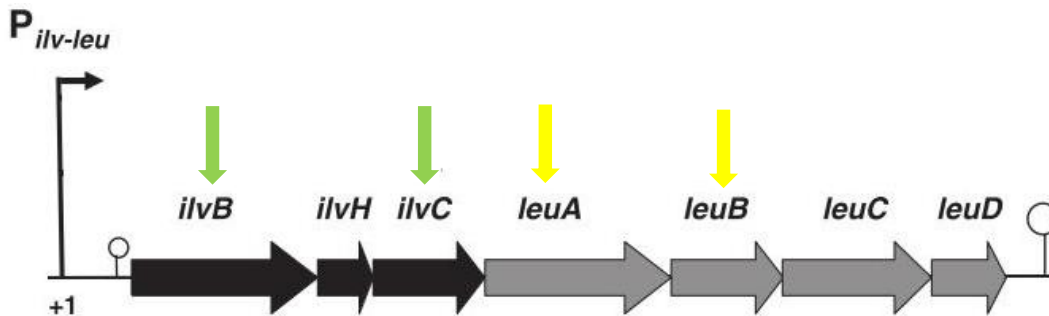


Figura 24. Organización del operón *ilv-leu*. La organización de los genes *ilv-leu* fue determinado previamente por Grandoni *et al.*, 1992. Tomado y editado de Tojo *et al.*, 2005.

Acorde con los datos presentados en la Tabla 9 y 10, el gen que sufre más cambios es una aminotransferasa, la BCAA aminotransferase involucrada en el paso final para la síntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada: isoleucina, valina y leucina; después los genes que sufren medianos cambios dentro del operón *ilv-leu*, específicamente para valina son *ilvBC* (flechas verdes) y, específicamente para leucina son *leuAB* (amarillas).

7.6. Modelo explicativo de auxotrofías de aminoácidos en *B. cereus*

A fin de explicar por qué se observan auxotrofías a Leu y Val, dado que las rutas parecen estar completas, y entender por qué la adición de los aminoácidos no restauraba la auxotrofía, se realizó la búsqueda de genes candidatos involucrados en la utilización de aminoácidos de cadena ramificada (esto para explicar el fenotipo de auxotrofía a Val y Leu), se encontraron la siguiente lista de Transportadores en la base de datos de Milton Saier (2005) referidos en la Tabla 11:

Tabla 11. Transportadores involucrados con los aminoácidos de cadena ramificada y número de copias por cada una de las cepas en estudio. Cada cepa es referida con su respectiva auxotrofia y el num. de copias que tiene por cada tipo de transportador.

Cepa	Auxotrofia	Transportadores													
		azlC	azlD	LivM	LivH	LivF	LivG	LivJ	lrp	System carrier of BCAA	OppD	OppF	OppC	OppB	OppA
95b		0	1	1	1	1	1	1	6	6	5	5	8	8	15
101a		0	1	1	1	1	1	1	4	6	4	4	7	7	15
102		1	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	14
311b		1	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	16
316	L, V	0	1	1	1	1	1	1	6	6	5	5	8	8	16
370a		1	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	16
370b		1	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	16
426a		0	1	1	1	1	1	1	2	7	3	3	5	5	13
436b		1	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	16
111		0	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	15
111b		0	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	15
124a		0	1	1	1	1	1	1	4	6	5	4	7	7	15
126		0	1	1	1	1	1	1	2	6	2	4	7	9	15
139b	V	0	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	15
140a		0	1	1	1	1	1	1	2	6	2	4	7	9	15
155b		0	1	1	1	1	1	1	3	6	5	5	7	10	22
372		0	1	1	1	1	1	1	3	6	4	4	6	6	15
460b		0	1	1	1	1	1	1	2	7	3	3	5	5	13

1= núm. de copias del gen *azlC* presente solo en cepas auxótrofas a Leu + Val.

La tabla anterior muestra los transportadores que operan de manera semidependiente dentro de una célula bacteriana, algunos son específicos para un aminoácido, por ejemplo Lrp (Leucine-responsive regulatory protein); otros de alta especificidad como el Sistema de transporte LIV-I (Leu, Ile, Val) que lo conforman LivMHFGJ. En general la mayoría forman parte de operones responsables del transporte, biosíntesis y degradación de aminoácidos. Todos los genes presentados son regulados por la presencia o ausencia, cantidad y homólogos de aminoácidos de cadena ramificada. También se resalta que en más de la mitad de las cepas auxótrofas a Leu-Val presentan la presencia del gen *azlC*, al contrario de las cepas que solo son auxótrofas a Val, que carecen del gen *azlC*. Esto es muy interesante pues ya se ha visto que este gen está río arriba del operón *ilv* y que una mutación en este gen hace que se expresen todos los genes del operón y, en consecuencia podría ser deficiente en el transporte de BCAA (Barbieri *et al.*, 2015; Belitsky *et al.* 1997). Este es el primer reporte de la ausencia de este gen en aislados de un ambiente natural.

Cabe mencionar que el sistema de transporte tipo Opp (permeasa de Oligopéptidos) traslada oligopéptidos de 4 – 35 residuos de aminoácidos La regulación de Opp es compleja, incluye varios niveles de control por la proteína reguladora de respuesta a leucina (Lrp). Este transportador pudiera estar operando junto con proteasas, de manera que los aislados de *B. cereus* tomen del medio ambiente péptidos complejos, y con ayuda de las proteasas, logren hacer más fácil la entrada de pequeños péptidos a la membrana y así captar los aminoácidos necesarios para su crecimiento.

La búsqueda de transportadores de aminoácidos se realizó con la finalidad de relacionar una posible explicación dado el fenotipo de auxotrofías diferente al genotipo, donde todas las rutas de síntesis de aminoácidos están presentes.

Otros transportadores, que no aparecen en la tabla 11, son los identificados en *Lactobacillus lactis*, BrnQ (1 y 2), BcaP (también conocido como CtrA) (Den Hengst, Groeneveld, Kuipers, & Kok, 2006). En *B. subtilis* BraB, BrnQ y BcpA están involucrados en el transporte de aminoácidos ramificados (Boris R. Belitsky & Sonenshein, 2011; Boris R. Belitsky, 2015; Brinsmade et al., 2014). Realizando una búsqueda bibliográfica se encontró que los genes de transportadores BraB, BrnQ y BcpA son un grupo de permeasas de los BCAA (UniProt, 2002) al igual que los genes LivH y LivM del sistema de transporte LIV-I, ambos grupos cumplen la función de transporte transmembranal de los aminoácidos ramificados isoleucina, leucina y valina (Basavanna et al., 2009).

VIII. Discusión

De acuerdo a lo reportado por D'Souza *et al.*, (2014) la mayoría de las Eubacterias presentan una a tres auxotrofías (donde el valor de la mediana es 2) por 25 metabolitos estudiados: 20 aminoácidos, 3 vitaminas y 2 nucleótidos; también encontró el mismo patrón en organismos de vida libre, lo cual difiere del patrón presentado en endosimbiontes, los cuales presentan mayor número de auxotrofías, siendo 21 el valor de la mediana. Este último punto podría ser explicado por la Hipótesis de Black Queen (Morris *et al.*, 2012). En general, las mutaciones causantes de auxotrofías son benéficas cuando el metabolito principal está presente en el ambiente (Ponce-Soto *et al.*, 2015).

Lo observado por D'Souza *et al.*, (2014) coincide con el estilo de vida y el número de auxotrofías presentes en cepas de *B. cereus* aisladas del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila.

De modo comparativo, en un estudio realizado en el 2008 por Gómez-Lunar *et al.* (2016), *B. coahuilensis* mostró requerir ciertos aminoácidos para su crecimiento: Pro, Ser, Thr, Phe, Trp, Tyr, His y Val; considerando que *B. coahuilensis* tiene un genoma pequeño de aproximadamente 3.36 Mbp y las cepas de *B. cereus* utilizadas en este estudio tienen un tamaño de genoma aproximadamente de 5.8 Mbp a 6.3 y aún así estas manifiestan ser auxótrofas a 1 o 2 aminoácidos de cadena ramificada: leucina y valina.

B. cereus es una de las especies del género de *Bacillus* que tienen mayor tamaño de genoma, a comparación con *B. subtilis*, *B. coahuilensis*, entre otros, y cuenta con varios transportadores para diferentes aminoácidos, como HAA (Hydrophobic amino acids and amides) y PAO (Polar amino acid and opinas), MET (Metals), OSP (Oligosaccharides and polyols), MOI (Mineral and Organic), PHN (Phosphonates and phosphites), entre otros importadores (Alcaraz *et al.*, 2008), y, a pesar de ellos, *B. cereus* necesita de 1 – 2 aminoácidos para poder crecer.

Por otro lado, en un estudio realizado por Chopin (1993) reporta los requerimientos nutrimentales que un microorganismo precisa; encontró que una célula bacteriana necesita varios aminoácidos, vitaminas, bases de ácidos nucleicos y otros sustratos para su crecimiento. Además, en los requerimientos de aminoácidos y capacidad biosintética de bacterias se ve involucrado la capacidad de importar nutrientes a la célula, dependiendo del origen que tal metabolito tenga en la naturaleza, es decir, si viene solo (aminoácidos libres) o como compuesto (oligopéptidos) (Münster 1993). Varias discrepancias pueden ser atribuidas al uso de diferentes medios químicamente definidos, así como se conoce que la concentración relativa de aminoácidos puede afectar la velocidad de crecimiento. Esto también dificulta algunas veces para distinguir el crecimiento escaso (Adams *et al.*, 1990). Por ejemplo Belitsky & Sonenshein (2008) observaron que arginina y metionina estimulaba altamente el crecimiento de 36 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mientras que su omisión todavía permite su crecimiento a baja velocidad, indicando que *L. lactis* subsp. *lactis* posee los genes para la biosíntesis de esos aminoácidos.

La ruta de biosíntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada es mejor considerada en conjunto, no por el hecho de su carácter alifático en común, sino porque sus rutas están muy

interrelacionadas, sin embargo la síntesis de valina y leucina es mucho más cercana, ya que a partir del último metabolito para formar valina, 2-oxoisovalerato, es también intermediario para la biosíntesis de leucina (Boris R. Belitsky, 2015). De aquí que se intente explicar por qué las únicas auxotrofías presentes en cepas de *B. cereus* sean a valina y leucina.

La Isoleucina es un inhibidor alostérico (efector negativo) de la treonine desaminase, enzima involucrada en el primer paso para la biosíntesis de isoleucina a partir de treonina (Guardiola & Iaccarino, 1971), mientras que valina es un efector positivo que antagoniza la inhibición de isoleucina (J. A. Grandoni et al., 1993; Quay & Oxender, 1976), esto puede explicar por qué las cepas en estudio no presentan auxotrofia a isoleucina.

Por consiguiente, la incapacidad de las cepas de *B. cereus* para crecer en ausencia de valina es una consecuencia de la inhibición de la ruta de biosíntesis de valina por leucina o isoleucina, dado que si una bacteria no requiere isoleucina y leucina pero si valina, no puede ser explicado por un defecto en un gen estructural ya que todos los genes requeridos para la síntesis de valina son también requeridos para la síntesis de leucina e isoleucina, y frecuentemente sugiere una expresión coordinada de esos genes (Umbarger 1978; Leavitt & Umbarger 1961) . Así por ejemplo, al hacer pruebas de auxotrofia con la cepa 140a (*Val*) en medio con todos los aminoácidos excepto valina, la presencia de isoleucina y leucina inhibiría la vía hacia biosíntesis de valina, y la cepa se comportaría como una auxótrofa a valina. Al añadir en conjunto valina, leucina e isoleucina sí puede crecer la cepa, pues se proveen todos los aminoácidos de la ruta.

Este escenario aplicable a la cepa 140a, donde Val provee un feedback negativo a toda la ruta, por lo que en su ausencia inhibe la síntesis de Leu e Ileu, y por lo que al añadir los tres aminoácidos ya puede crecer la cepa. ¿Qué ocurre con la cepa 316, que requiere tanto Leu como Val? Lo esperado es que se comportara como la cepa Val, y que en presencia de todos los aminoácidos de la ruta creciera. El hecho de que no lo haga sugiere que es incapaz de tomar estos aminoácidos del medio. Valle *et al.*, 2008 reporta que la inhibición de crecimiento por valina, en una cepa de *E. coli*, se debe a la acumulación del α -Cetobutirato (sustrato del enzima acetohidroxy ácido sintasa, producto perteneciente al gen *ilvGM* dentro del operón *ilv-leu*), causado por una mutación en el desplazamiento del marco de lectura del gen *ilvG*.

El requerimiento para un aminoácido dado puede resultar a partir tanto de la ausencia funcional de genes biosintéticos específicos o a partir de mecanismo regulatorios específicos como los de transporte. Los valores del transporte de aminoácidos son en rangos micromolares; la velocidad máxima de crecimiento específico frecuentemente ha sido demostrada que es afectada por cambios en la concentración de aminoácidos en proporciones milimolares. Esos efectos pueden ser debido a cambios en el flujo relativo de aminoácidos, el cual es formado por el mismo sistema de transporte, como un resultado de cambios en la cantidad relativa de aminoácidos (Poolman & Konings, 1988). La cantidad en μMol de cada uno de los 20 aminoácidos que requiere una célula bacteriana fue obtenida a partir de la composición reportada para *B. subtilis* (Harwood & Cutting, 1998) y modificada por la propuesta por Neidhardy, 1996. Las cantidades varían poco, sin embargo, podrían estar actuando como algún tipo de represión, como limitante en el crecimiento o bien

dando como resultado la “braditrofia” en las cepas de *B. cereus*, aunque cabe mencionar también que los requerimientos nutricionales varían de célula a célula o dependen de la fase de crecimiento en la que se encuentran.

Por otro lado, se ha reportado que cuando las bacterias entran en condiciones de estrés forman D-aminoácidos lo cual les impide formar biofilms, es decir, entran en fase estacionaria (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010) lo que podría explicar el escaso o nulo crecimiento de las cepas de *B. cereus* cuando se intentan crecer en medios mínimos, debido a que esto representaría un estrés nutricional (Kriel *et al.*, 2014).

En la naturaleza las bacterias tienen más probabilidades de encontrarse con aminoácidos a partir de la hidrólisis de proteínas que con aminoácidos individuales (libres) y por lo tanto se debe implicar el manejo de mezclas de aminoácidos y oligopéptidos. Un estudio realizado por Prüb *et al.*, 1994 observaron el orden en el cual los aminoácidos van desapareciendo (consumiéndose) a partir de cultivos de *E. coli* y encontró que sus cepas primero consumían serina muy rápidamente, después utilizaban aspartato de forma lenta, seguido de triptófano, glutamato, alanina y treonina fueron usados rápidamente y por último se usó glicina lentamente. Estudios adicionales de este tipo usan mezclas de aminoácidos en proporciones variadas y el control celular basados en mecanismos de transporte y de enzimas degradativas, lo cual nos da una idea de lo que la célula bacteriana hace en la naturaleza (Neidhardt, 1996).

Es interesante cómo permitió el crecimiento el co-cultivo de las cepas 140a y 316 en el medio mínimo, teniendo como evidencia que ninguna de las dos crecen de manera independiente. No sabemos qué metabolito comparten pero llama la atención el encontrar treonina en el sobrenadante, producida al crecer juntas a las cepas.

Adicionalmente, para tratar de explicar el fenotipo de auxotrofías en cepas de *B. cereus*, podría considerarse la participación de los transportadores bacterianos, por lo que se hizo un análisis *in silico* para determinar su presencia. Comenzando por el análisis de los transportadores tipo ABC, que son una clase importante de transportadores transmembranales, están involucrados en la importación y exportación de una amplia variedad de sustratos, incluyendo azúcares, aminoácidos, péptidos, poliaminas y cationes (Basavanna *et al.*, 2009); son conocidos por influir en muchos procesos celulares, incluyendo la adquisición de nutrientes, percepción ambiental, crecimiento bajo condiciones de estrés, etc. Los sistemas de transporte implicados en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada son el sistema de transporte de BCAA, Lrp, LIV-I, LIV-E y Opp.

El sistema de transporte de BCAA (Branched Chain Amino Acids) es específico para aminoácidos de cadena ramificada. En general este sistema es regulado por las concentraciones exógenas de leucina o cualquier intermediario involucrado en su ruta de biosíntesis, lo cual puede regular negativamente y no permitir el crecimiento a la célula bacteriana (Guardiola & Iaccarino, 1971).

Calvo & Matthews (1994) reportan que el gen *lrp* (leucine-responsive regulatory protein) regula positivamente varios genes involucrados en la síntesis de aminoácidos, como glicina, y regula negativamente otros genes, entre ellos isoleucina, leucina y valina (Neidhardt, 1996). Lrp tiene la

elevada capacidad de transportar leucina, esta elevada capacidad de transporte específica de Leu regula negativamente al sistema LIV-I/LS. Este patrón de regulación reprime el crecimiento en medios mínimos cuando leucina está presente.

Los transportadores de aminoácidos de cadena ramificada, LIV-I y LS, son una clase de transportadores sensibles al choque osmótico, es decir que son proteínas de unión periplásmica para el reconocimiento del sustrato y requieren ATP como fuente de energía primaria. Análisis genéticos recientes indican que al menos cuatro genes participan en el transporte de alta afinidad para leucina: *livJ*, *livK*, *livH* y *livG*. (Adams *et al.*, 1990).

La familia LIV-E consiste en un par de proteínas integrales de membrana codificados por los genes *azIC* y *azID*, para *B. subtilis*, los cuales forman una bomba de salida para aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile y Val). El gen *azIE*, presente dentro del operón *azBCDEF*, codifica a un homólogo de la proteína BrnQ (Boris R. Belitsky & Sonenshein, 2008) de *Lactobacillus delbrueckii* y *Corynebacterium glutamicum* la cual es una permeasa importadora de aminoácidos de cadena ramificada (Milton Saier, 2005). Pese a ello se ha reportado que es improbable que los genes *azICD* contribuyan significativamente al mantenimiento del pool celular de ILV (isoleucina, leucina y valina) (Boris R. Belitsky, 2015).

Las oligopéptido de permeasas (Opp) se codifican en un operón que comprende 5 genes *oppABCDF*, tal y como se muestra en la Tabla 11. El mecanismo completo de transporte del sustrato por Opp involucra el reconocimiento de sustrato y unión por OppA, translocación vía OppBC con hidrólisis acoplado de ATP por OppDF, Wikelmann, 2001. El transporte y la utilización de péptidos es importante para que las bacterias aprovechen los nutrientes que se encuentren en su ambiente (Winkelmann, 2001). Cabe destacar que todos los sistemas de transporte mencionados estuvieron presentes en la mayor parte de los aislados estudiados, por lo que no podemos considerar que su ausencia explique las auxotrofías observadas.

Las estrategias metabólicas que un microorganismo posee para la captación de nutrientes, dado las características del ambiente en el cual se desenvuelve, incluyen transportadores de diferentes metabolitos, necesarios para su óptimo crecimiento. Si buscamos otra posible explicación, la relacionada a transportadores de péptidos, las proteasas es indicada, ya que como se mostró y discutió, los genes *livH* y *livM* son permeasas de aminoácidos de cadena ramificada, estas permeasas colocándolas bajo un contexto natural, pueden estar actuando con la ayuda de proteasas para ir rompiendo fuentes de péptidos presenten en el medio donde viven, y así facilitar su consumo, además la muerte celular podría explicar la habilidad de crecimiento a través de la liberación de varios metabolitos diferentes (Zhang & Reed, 2014).

Por último, en el experimento en el cual no se obtuvo crecimiento colonial de las cepas en estudio bajos los tratamientos en medio DM suplementado sólo con dos aminoácido (DM + Val + Leu), se pudiera explicar debido a que la valina exógena no puede ingresar al pool de valina de una célula bacteriana, es decir, tiene que entrar acompañada de otros aminoácidos, como dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos (Guardiola & Iaccarino, 1971). Esto puede ser estudiado al analizar la presencia de proteasas o añadir dipéptidos u oligopéptidos específicos y analizar así mismo las rutas

metabólicas de los 20 aminoácidos específicas para *B. cereus*, la cual arroja información de metabolitos centrales entre una ruta y otra (ver Material suplementario, Figura S 2).

IX. Conclusión

Los aislados, a partir del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila, presentan características fenotípicas similares entre ellos, como el color colonial blanco, el tipo de crecimiento favorable a un amplio espectro de temperatura, entre otras características. La filogenia basada en el gen 16S rDNA, trabajo realizado por el Dr. Delaye, reveló que algunas cepas no se ubicaban en el clado de *B. cereus*, así que, para el estudio del fenotipo a auxotrofías, sólo se trabajó con aquellas cepas que se agrupaban en este clado, esto último para mostrar mayor robustez con el grupo de estudio.

La incapacidad de crecimiento que las diferentes cepas de *B. cereus* presentan en un medio sintético tanto si no se les añade aminoácidos (sólo medio DM) y en un medio al cual le falta 1 de 20 aminoácidos (DM Val⁻ ó DM Leu⁻) es similar, confirmando la auxotrofia a valina y leucina.

Los datos experimentales de co-cultivos mostraron que cierto juego de cepas pueden ayudarse a crecer aún sin tener el aminoácido indispensable para poder vivir, revelando que si algunas cepas se encuentran una cercana a la otra pueden promover crecimiento entre ellas. Con la detección por HPLC de aminoácidos libres en co-cultivos, se observó que uno de los metabolitos detectados en el sobrenadante fue el aminoácido treonina, el cual es el principal intermediario en la ruta de síntesis de un aminoácido de cadena ramificada: isoleucina.

La calidad de los ensamblados de los genomas de los aislados de *B. cereus* fue buena, al igual que la cobertura. El número de contigs usados permitió que la información perdida fuera muy baja. Por lo tanto los datos tomados para realizar el análisis de secuencias y ver las rutas de aminoácidos fueron muy confiables.

Se concluye que los 18 aislados pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus*, presentan fenotipo de auxotrofías a valina y la mitad son auxótrofos a leucina. Se descarta la idea de que tales auxotrofías sean por pérdida de genes involucrados en rutas biosintéticas de aminoácidos. Se sugiere que este fenotipo pudiera ser debido a estrategias regulatorias metabólicas, en conjunto con los sistemas de transporte, relacionadas al estilo de vida en comunidades microbianas, lo que debe explorarse de manera experimental.

X. Perspectivas

De este estudio se desprende otras líneas que podrían ser abordadas en el futuro:

Sería importante realizarse pruebas de auxotrofia en presencia de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, es decir probar el mismo medio DM suplementado con una fuente diferente a la glucosa, como acetato, sorbitol o glicerol, así como utilizar una fuente de nitrógeno diferente, para ver la respuesta en crecimiento que estas cepas pudieran tener. Este último punto justificado por el hecho de que el genoma de las cepas de *B. cereus* presentan los genes involucrados en la ruta de síntesis de aminoácidos que pudieran estar siendo regulados por represión catabólica o por nitrógeno.

Cabe destacar en el punto anterior, que ya se realizó un primer acercamiento experimental con 10 diferentes fuentes de carbono al 1% de concentración y, de primer instancia no arrojó datos significativos que pudieran acercarnos a la idea de que el crecimiento de los aislados del Sistema Churince de Cuatrociénegas, Coahuila dependan de la fuente de carbono que tomen del medio.

Otro tema interesante sería el análisis del tipo de proteasas que tiene *B. cereus* ya que éstas nos abrirían un panorama relacionado al sistema de transporte de aminoácidos del cual es la propuesta explicativa en el presente estudio. También sería interesante la detección de algún metabolito intermediario en la ruta de síntesis que pudiera estarse acumulando, tal como ocurre en la inhibición por valina en cepas de *E. coli*. al acumularse α -cetobutirato, y así darnos la idea en qué punto de la ruta es dónde se encuentra la falla dado la incapacidad de crecimiento que presentan los aislados de *Bacillus cereus* bajo este estudio.

Podría utilizarse diferentes péptidos sintéticos para ver si puede de esta manera restaurarse la prototrofia de las cepas.

Sería importante entender la manera en que las cepas 140a y 316 cooperan para crecer en medio mínimo. Sería interesante añadir medio de cultivo de manera recíproca y ver si esto sólo permite el crecimiento y medir así mismo si es un inductor de síntesis y exportación de treonina.

Dado que en las comunidades microbianas muchas cepas existen formando biopelículas, sería interesante determinar si las películas formadas son multiespecies y esto es lo que facilita el compartir metabolitos.

Por último, dado los fenotipos de auxotrofías en estudios preliminares en otro grupo de *Bacillus*, como *B. horikoshii*, convendría realizar la confirmación de tales fenotipos para un grupo diferente a *B. cereus* y ver si hay diferencias en su genotipo que pudieran estar expresándose en su metabolismo.

XI. Bibliografía

- Adams, M. D., Wagner, L. M., Gibson, A. L., & Oxenderll, D. L. (1990). Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *E. coli*, *265*(20), 11436–11443.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L. E., Ponce-Soto, G. Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., & Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environmental Microbiology*, *16*(5), 1366–1377. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12305>
- Akashi, H., & Gojobori, T. (2002). Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3695–3700. <http://doi.org/10.1073/pnas.062526999>
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., ... Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(15), 5803–5808. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800981105>
- Barbieri, G., Voigt, B., Albrecht, D., Hecker, M., Albertini, A. M., Sonenshein, A. L., ... Belitsky, B. R. (2015). CodY Regulates Expression of the *Bacillus subtilis* Extracellular Proteases Vpr and Mpr. *Journal of Bacteriology*, *197*(8), 1423–1432. <http://doi.org/10.1128/JB.02588-14>
- Basavanna, S., Khandavilli, S., Yuste, J., Cohen, J. M., Hosie, A. H. F., Webb, A. J., ... Brown, J. S. (2009). Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis. *Infection and Immunity*, *77*(8), 3412–23. <http://doi.org/10.1128/IAI.01543-08>
- Beckwith J., Davies J, Gallant J. A. (1983). Attenuation in bacterial operons in Gene function in prokaryotes. ISBN: 0-87969-164-6. 328 pgs.
- Belitsky, B. R. (2015). Role of branched-chain amino acid transport in *Bacillus subtilis* CodY activity. *Journal of Bacteriology*, *197*(February), 1330–1338. <http://doi.org/10.1128/JB.02563-14>
- Belitsky, B. R., Gustafsson, M. C., Sonenshein, a L., & Von Wachenfeldt, C. (1997). An Irp-like gene of *Bacillus subtilis* involved in branched-chain amino acid transport. *Journal of Bacteriology*, *179*(17), 5448–5457.
- Belitsky, B. R., & Sonenshein, A. L. (2008). Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *190*(4), 1224–1236. <http://doi.org/10.1128/JB.01780-07>
- Belitsky, B. R., & Sonenshein, A. L. (2011). CodY-mediated regulation of guanosine uptake in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *193*(22), 6276–6287. <http://doi.org/10.1128/JB.05899-11>
- Bertels, F., Merker, H., & Kost, C. (2012). Design and characterization of auxotrophy-based amino acid biosensors. *PLoS ONE*, *7*(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041349>
- Bidlingmeyer, B. a B. a., Cohen, S. a. S. a, & Tarvin, T. L. (1984). Rapid analysis of amino acids using

pre-column derivatization. *J Chromatogr*, 336(1), 93–104. [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)85133-6](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85133-6)

BLAST (Basic Local Alignment Tool) in NCBI (National Center for Biotechnology Informatics). 1990
Fecha de consulta: Febrero, 2015. << <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>>.

Bono, H., Ogata, H., Goto, S., & Kanehisa, M. (1998). Reconstruction of amino acid biosynthesis pathways from the complete genome sequence. *Genome Research*, 8(3), 203–210. <http://doi.org/10.1101/gr.8.3.203>

Brinsmade, S. R., Alexander, E. L., Livny, J., Stettner, A. I., Segrè, D., Rhee, K. Y., & Sonenshein, A. L. (2014). Hierarchical expression of genes controlled by the *Bacillus subtilis* global regulatory protein CodY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 2–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1321308111>

Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P. (2009). Brock: Biología de los microorganismos. 12ª edición. ISBN-13: 978-8478290970. 1296 págs.

Button, D. K. (1985). Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. *Microbiological Reviews*, 49(3), 270–297.

Calvo, J. M., & Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 58(3), 466–490.

Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. L., Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 919–923. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64959-0>

Chopin, a. (1993). Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 21–37.

Craig, C. L., & Weber, R. S. (1998). Selection costs of amino acid substitutions in ColE1 and Colla gene clusters harbored by *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 15(6), 774–776. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025981>

D'Souza, G., Waschina, S., Pande, S., Bohl, K., Kaleta, C., & Kost, C. (2014). Less is more: Selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. *Evolution*, 1–12. <http://doi.org/10.1111/evo.12468>

Den Hengst, C. D., Groeneveld, M., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2006). Identification and Functional Characterization of the *Lactococcus lactis* Acid Permease BcaP (CtrA). *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3280–3289. <http://doi.org/10.1128/JB.188.9.3280>

Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., Farmer, J. D. (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808–1825. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01451.x>

Foster, K. R., & Bell, T. (2012). Competition, not cooperation, dominates interactions among

- culturable microbial species. *Current Biology*, 22(19), 1845–1850. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>
- Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. (2009). Bastian M., Heymann S., Jacomy M.. International AAAI Conference on Weblogs and Social Media. <<<http://gephi.github.io/users/publications/>>>
- Fujita, Y., Satomura, T., Tojo, S., & Hirooka, K. (2014). CcpA-Mediated Catabolite Activation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* Operon and Its Negation by Either CodY- or TnrA-Mediated Negative Regulation. *Journal of Bacteriology*, 196(21), 3793–3806. <http://doi.org/10.1128/JB.02055-14>
- Goldberg, I. D., Keng, J. G., & Thorne, C. B. (1965). Isolation of Auxotrophs of *Bacillus Cereus*. *Journal of Bacteriology*, 89(5), 1441.
- Gollnick, P., & Babitzke, P. (2002). Transcription attenuation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1577(2), 240–250. [http://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00455-4](http://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00455-4)
- Gómez-Lunar Z., Hernández-González I., Rodríguez-Torres M-D., Valeria-Souza V. and Olmedo-Álvares G. (2016). Microevolution Analysis of *Bacillus coahuilensis* Unveils Differences in Phosphorus Acquisition and This Regulation. *Front. Microbiol.* 7:58. doi: 10.3389/fmicb.2016.00058
- Grandoni, J. a, Zahler, S. a, & Calvo, J. M. (1992). Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174(10), 3212–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=205988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Grandoni, J. A., Fulmer, S. B., Brizzio, V., Zahler, S. A., & Calvo, J. M. (1993). Regions of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in regulation by leucine. *J Bacteriol*, 175(23), 7581–7593. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8244927
- Green M. R. & Sambrook J. (2012). Molecular cloning : a laboratory manual. Fourth edition. Cold Spring Harbor Protocols. 1890 pgs.
- Griffiths Anthony J. F., William M. Gelbart, Richard C. Lewontin, Jeffrey H. Miller. 2002. Modern genetics analysis: Integrating genes and genomes. 2nd ed. ISBN: 0-7167-4382-5.
- Guardiola, J., & Iaccarino, M. (1971). *Escherichia coli* K-12 Mutants Altered in the Transport of Branched-Chain Amino Acids. *Journal of Bacteriology*, 108(3), 1034–1044.
- Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagenen, J. a J., & Molin, S. (2007). Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*, 445(7127), 533–536. <http://doi.org/10.1038/nature05514>
- Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (1998). Medio supplements: amino acids, purines and pyrimidines. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. ISBN-13: 978-0471923930.
- Healthcare, G. (2007). illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, 1–4. Retrieved from www.gelifesciences.com/illustra

- Heizer, E. M., Raiford, D. W., Raymer, M. L., Doom, T. E., Miller, R. V., & Krane, D. E. (2006). Amino acid cost and codon-usage biases in 6 prokaryotic genomes: A whole-genome analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1670–1680. <http://doi.org/10.1093/molbev/msl029>
- Holmer M. and Storkholm P. (2001). Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review.
- Hopwood, D. a. (1970). Chapter VI The Isolation of Mutants. *Methods in Microbiology*, 3(PART A), 363–433. [http://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70544-0](http://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70544-0)
- Horn, P. B., & Zahler, S. A. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the Leucyl-tRNA gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 3928–3935.
- Ives A.R., Carpenter S.R. (2007). Stability and diversity of ecosystems. *Science* 317:58–62.
- Jenkins., 1986. Genética. 2nd ed. Editorial Reverté. ISBN: 84-291-5543-0. 775 pags.
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2008). Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microbial Ecology*, 56(3), 403–411. <http://doi.org/10.1007/s00248-007-9357-4>
- KEGG Pathways DataBase. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. (1998). (fecha de consulta: Febrero, 2015). <<<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>>>.
- Kim, H. J., Boedicker, J. Q., Choi, J. W., & Ismagilov, R. F. (2008). Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), 18188–18193. <http://doi.org/10.1073/pnas.0807935105>
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., & Losick, R. (2010). D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5978), 627–629. <http://doi.org/10.1126/science.1188628>
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME Journal*, 3(11), 1223–1230. <http://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>
- Kriel, A., Brinsmade, S. R., Tse, J. L., Tehranchi, A. K., Bittner, A. N., Sonenshein, A. L., & Wang, J. D. (2014). GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 189–201. <http://doi.org/10.1128/JB.00918-13>
- Lane, J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), 6955–6969. <http://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Leavitt, E. a, & Umbarger, H. E. (1961). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. V. alpha-Ketoisovaleric acid accumulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 205(1), 475–482.
- Lehninger (2005). Principios de Bioquímica de Lehninger, 5ta edición, 1119 pgs.

- López-Lozano, N. E., Eguiarte, L. E., 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. <http://doi.org/10.1089/ast.2012.0840>
- Mandal, M., & Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(6), 451–463. <http://doi.org/10.1038/nrm1403>
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, *113*(5), 577–586. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00391-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00391-X)
- Merino, E., Jensen, R. A. and Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol*, *11*(2), 78–86. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Minckley, W. (1969). Environments of the Bolson of Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico, 1–65. Retrieved from <http://www.nativefishlab.net/library/textpdf/13676.pdf>
- Morris, J. J., Lenski, R. E., & Zinser, E. R. (2012). The black queen hypothesis: Evolution of dependencies through adaptive gene loss. *mBio*, *3*(2). <http://doi.org/10.1128/mBio.00036-12>
- Münster, U. (1993). Concentrations and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *63*(3-4), 243–274. <http://doi.org/10.1007/BF00871222>
- NCBI. National Center for Biotechnology Information, 1990. Fecha de consulta: febrero del 2015. <<www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.
- Neidhard 1996. Composition of an average E. coli B/r cell. *Escheriquia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Second edition. ISBN-13: 978-1555810849.
- Nudler, E., & Mironov, A. S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(1), 11–17. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.004>
- Pande, S., Merker, H., Bohl, K., Reichelt, M., Schuster, S., de Figueiredo, L. F., Kost, C. (2014). Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *The ISME Journal*, *8*(5), 953–62. <http://doi.org/10.1038/ismej.2013.211>
- Pérez-Gutiérrez, R.-A., López-Ramírez, V., Islas, Á., Alcaraz, L. D., Hernández-González, I., Olivera, B. C. L., Olmedo-Alvarez, G. (2012). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *The ISME Journal*, 1–11. <http://doi.org/10.1038/ismej.2012.119>
- Ponce-Soto, G. Y., Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L. E., Elser, J. J., Lee, Z. M.-P., & Souza, V. (2015). Enrichment experiment changes microbial interactions in an ultra-oligotrophic environment. *Frontiers in Microbiology*, *6*(April), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00246>
- Poolman, B., & Konings, W. N. (1988). Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *Journal of Bacteriology*, *170*(2), 700–707.

- Prüb, B. M., Nelms, J. M., Park, C., & Wolfe, A. J. (1994). Mutations in NADH:Ubiquinone Oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2143–2150.
- Quay, S. C., & Oxender, D. L. (1976). Regulation of branched-chain amino acid transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1225–1238.
- RAST. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. *BMC Genomics*, 2008 << <http://rast.nmpdr.org/>>>
- Rodríguez-Torres M. D. 2007, unpublished data.
- Saier, Milton. (2005). Transporter Classification Database. (Fecha de consulta: mayo, 2015). << <http://www.tcdb.org/>>>.
- Sonenshein, A. L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(12), 917–927. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1772>
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Travisano, M., Elser, J. J., Rooks, C., & Siefert, J. L. (2012). Travel, Sex, and Food: What's Speciation Got to Do with It? *Astrobiology*, 12(7), 634–640. <http://doi.org/10.1089/ast.2011.0768>
- Souza, V., Escalante, A., Espinoza, L., & Valera, A. (2004). Cuatro ciénegas: un Laboratorio Natural de Astrobiología. *Ciencias* 75.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6565–6570. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Suzuki David T., Anthony J. F. Griffiths, Jeffrey Miller, Richard C. Lewontin. 1989. An introduction to Genetic analysis. 4ta ed. ISBN: 0-7167-1996-8. 768 pags.
- Tapia-torres, Y., Elser, J. J., Souza, V., & García-oliva, F. (2015). Soil Biology & Biochemistry Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes : How microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 87, 34–42.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., & Fujita, Y. (2005). Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Molecular Microbiology*, 56(6), 1560–1573. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04635.x>
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., & Yoshida, K. (2004). Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through the *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7971–7979. <http://doi.org/10.1128/JB.186.23.7971>
- Umbarger, H. E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 533–

606. Retrieved from <http://www.lavoisier.fr/notice/fr419144.html>

UniProt. The Universal Protein Resource. (2002). (Fecha de consulta: Junio, 2015). <<uniprot.org>>

Valle, J., Da Re, S., Schmid, S., Skurnik, D., D'Ari, R., & Ghigo, J.-M. (2008). The Amino Acid Valine Is Secreted in Continuous-Flow Bacterial Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *190*(1), 264–274. <http://doi.org/10.1128/JB.01405-07>

Ward, J. B., & Zahler, S. a. (1973). Genetic studies of leucine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *116*(2), 719–726.

Weibel, D. B. (2008). Building communities one bacterium at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(47), 18075–18076. <http://doi.org/10.1073/pnas.0810201106>

Winkelmann G. (2001). Peptide Transport. Microbial Transport System. Germany. ISBN: 3-527-30304-9.

Wintermute, E. H., & Silver, P. a. (2010). Emergent cooperation in microbial metabolism. *Molecular Systems Biology*, *6*(407), 407. <http://doi.org/10.1038/msb.2010.66>

Yanofsky, C., Konan, K. V., & Sarsero, J. P. (1996). Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria. *Biochimie*, *78*(11-12), 1017–1024. [http://doi.org/10.1016/S0300-9084\(97\)86725-9](http://doi.org/10.1016/S0300-9084(97)86725-9)

Ye, B. C., Zhang, Y., Yu, H., Yu, W. B., Liu, B. H., Yin, B. C., ... Zhang, S. L. (2009). Time-resolved transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* responding to valine, glutamate, and glutamine. *PLoS ONE*, *4*(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007073>

Zhang, X., & Reed, J. L. (2014). Adaptive Evolution of Synthetic Cooperating Communities Improves Growth Performance. *PLoS ONE*, *9*(10), e108297. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108297>

XII. Glosario de términos

Braditrofia: lentitud causada por la nutrición. Un organismo braditrofico es aquel que exhibe crecimiento lento en ausencia de un metabolito en particular a partir de una fuente externa.

Desrepresión: elevación de los niveles de una enzima por encima de los normales. Inhibición de la sustancia represora producida por los genes regulatorios con el resultado de que el gen operador es libre para iniciar el proceso de formación del polipéptido.

Medio mínimo: es un sustrato que contiene solamente sales inorgánicas, un azúcar como fuente de energía y agua.

Protótrofo: un organismo que tiene la capacidad de crecer en medios mínimos, es decir que no requiere otros elementos nutritivos ya que puede sintetizarlos por sí mismo.

Wild-type: cepa, gen o característica que prevalece entre individuos en condiciones naturales, diferente a un tipo mutante atípico.

XIII. Material Suplementario

Filogenia basada en el gen *gltX*

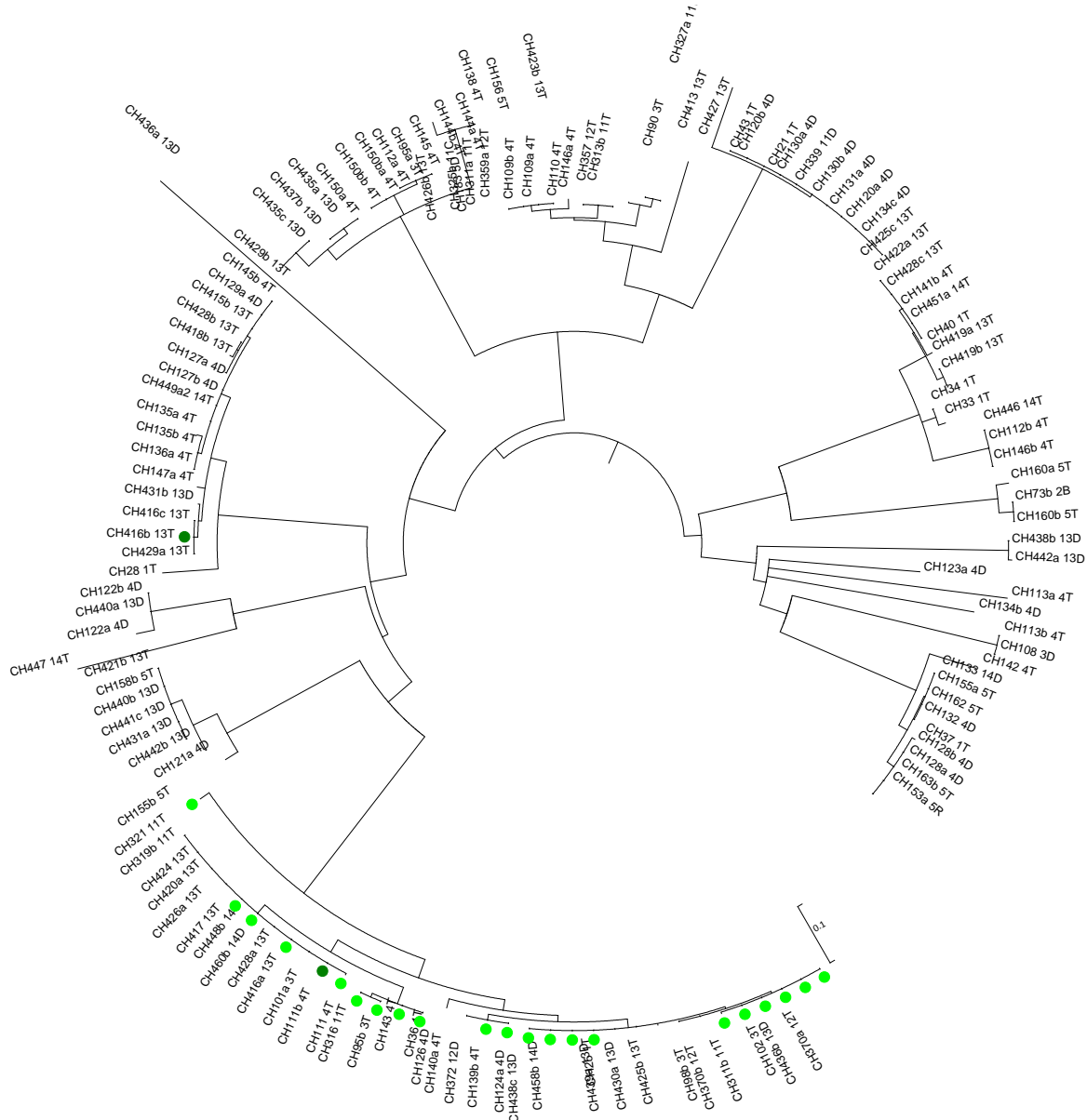


Figura S1. Filogenia basada en el gen *gltX* de los aislados de Cuatrociénegas, Coahuila. ● = *B. cereus*. ● = cepas de *Bacillus* spp.

En esta filogenia, basada en el gen *gltX*, observamos las cepas elegidas al inicio de este estudio, es decir, vemos que 22 aislados de *B. cereus* se encuentran agrupados en un clado más definido a diferencia de la filogenia basada en el gen 16S rDNA, el cual sólo muestra a 18 aislados pertenecientes al grupo de *B. cereus*.

Rutas de biosíntesis de aminoácidos en *B. cereus*

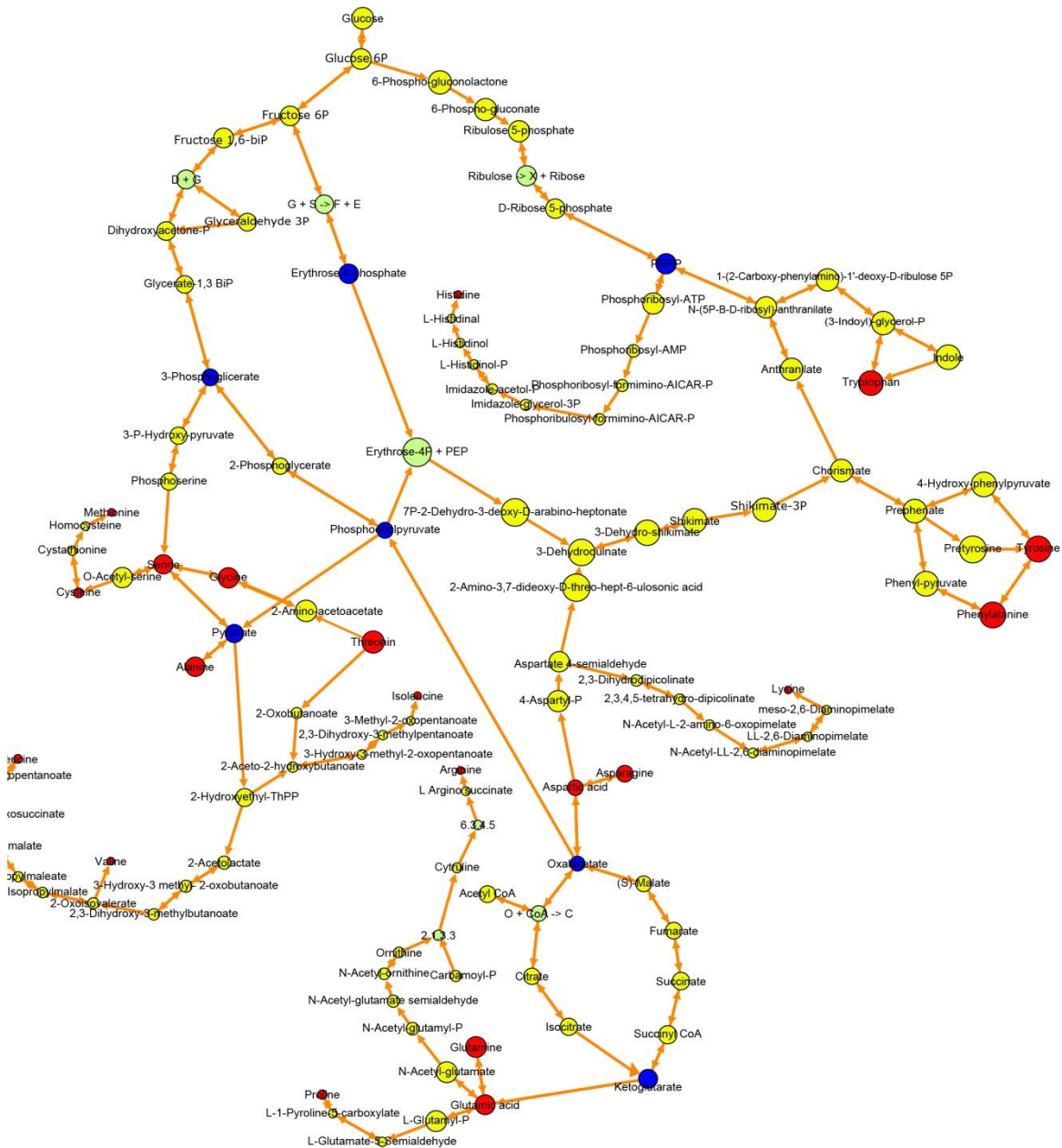


Figura S2. Principales intermediarios metabólicos involucrados en las rutas de biosíntesis de aminoácidos en *B. cereus*. Realizado con programa Gephi (2009).

El mapa metabólico anterior, realizado en colaboración con el M. C. Fontove-Herrera, muestra el metabolito representante de cada familia de biosíntesis de aminoácidos (círculo azul), los metabolitos involucrados en cada una de la ruta de biosíntesis de aminoácidos (círculos amarillos), a metabolitos que, juntos, forman un metabolito importante en la ruta (círculos verde claro) y a los 20 aminoácidos (en círculos rojos).

Medio Marino (mm)

Tabla S1 Reactivos utilizados para la preparación del medio marino.

Reactivo	g/L
1. Cloruro de Sodio	5.0 g
2. Sulfato de Sodio	1.0 g
3. Cloruro de Calcio	0.4 g
4. Cloruro de Potasio	0.2 g
5. Carbonato de Sodio	0.1 g
6. Citrato Férrico*	0.1 g
7. Sulfato de Magnesio 2M	20 ml
Preparar la mezcla de los siguientes reactivos en 1 L de agua	
8. Bromuro de Potasio	0.08 g
9. Ácido Bórico	0.022 g
10. Fluoruro de Sodio	0.024 g
11. Nitrato de Amonio	0.016 g
12. Fosfato de Sodio dibásico	0.08 g
Agregar por separado:	
13. Peptona	5.0 g
14. Extracto de Levadura	1.0

*=Calentar antes de adicionar al medio

Preparación del medio marino:

Por separado preparar los reactivos del 1 al 7. Cada uno en 1 L de agua desionizada

Mezclar los reactivos del 8 al 12. Diluirlos todos en 1 L de agua desionizada.

Agregar 30 ml de cada reactivo del 1 al 6.

Añadir 20 ml del reactivo 7.

Adicionar 5 ml del stock que contiene los reactivos del 8 al 12.

Agregar el reactivo 8 y 9

Aforar a 1 L y esterilizar en autoclave.

En caso de requerir medio sólido, añadir 18 g por litro de agar bacteriológico como agente solidificante.

Medio Mínimo Definido (DM)

Tabla S2. Reactivos utilizados para la preparación del medio DM

Reactivo	Concentración	g/L
Tris-Base	50 mM	6.057 g
Ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado		
NH ₄ NO ₃	3.3.mM	0.26 g
K ₂ HPO ₄	1.44 mM	0.19 g
MgSO ₄	40 mM	0.48 g
Citrato de Sodio dihidratado	6.8 mM	1.99 g
ZnCl ₂	0.01 mM	0.000136 g ó 10 µL sol. a 1 M
NaCl	0.17 mM	5 g
FeCl ₃	49.9 µM	0.27 g
KCl	0.67 mM	0.1 g
MnCl ₂		0.2 g
CaCl ₂		0.4 g
Glucosa		9.0 g
Esterilizar		
Mezcla de 20 aminoácidos*		
Complejo B**		100 µl

*= ver concentraciones por litro en tabla S3

**= Se debe de agregar al medio después de haber esterilizado y en campana

Preparación de medio DM:

Colocar 800 ml de agua desionizada en un matraz de 1 L.

Adicionar el Tris-base y ajustar pH a 7.5 con HCl concentrado.

Una vez ajustado el pH se pueden adicionar los reactivos faltantes.

Esterilizar en autoclave.

Adicionar los 20 aminoácidos, con las concentraciones correspondientes establecidas en la Tabla S3.

Agregar el complejo B en campana de flujo laminar.

En caso de requerir medio sólido, añadir 15 g por litro de agar noble como agente solidificante.

Tabla S3. Cantidad de aminoácido por litro de medio DM.

Aminoácido	g / 1 L ^a	Concentración µM ^a	Concentración µM ^b
D- Alanina	0.05	560	488
L-Arginina	0.05	280	281
L-Asparagina	0.05	330	229
L-Ácido Aspártico	0.05	370	229
L-Cisteína-HCl	0.04	330	87
L-Ácido Glutámico	0.05	330	250
L-Glutamina	0.05	340	250
Glicina	0.05	660	582
L-Histidina	0.05	320	90
L-Isoleucina	0.05	380	276

L-Leucina	0.05	380	428
L-Lisina	0.05	340	326
L-Metionina	0.05	330	146
L Fenilalanina	0.05	300	176
L-Prolina	0.05	430	210
L-Serina	0.05	470	205
L-Treonina	0.05	420	241
L-Tirosina	0.02	110	131
L-Valina	0.05	420	402
L-Triptófano	0.02	90	54

^a= Tomado de (Medio supplements: amino acids, purines and pyrimidines). **Molecular Biological Methods for *Bacillus***. Harwood & Cutting, 1998. pag 43.

^b= tomado de Tabla 1 (Composition of an average *E. coli* B/r cell). ***E. coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology**. Neidhardy & Umbarger, 1996. pag. 15

Todos los aminoácidos presentados en la tabla anterior, deben ser filtrados y adicionados en una campana de flujo laminar.

Pasos S1. Protocolo para composición de aminoácidos libres (modificado de Bidlingmeyer, Cohen, & Tarvin, 1984)

- 1.) En 10 ml de medio agregar 10 ml de acetonitrilo (acn) 100% (proporción 1:1), agitar a 4°C y dejar precipitando 12 h a 4°C.
- 2.) Centrifugar y separar el sobrenadante.
- 3.) Secar el sobrenadante en la liofilizadora.
- 4.) Pasar los tubos al vial de muestras y hacer vacío en la estación de pico-tag hasta 50 ml.
- 5.) Agregar 100 µL del reactivo de basificación a las muestras y 20 µL a los estándares, agitar y secar en el concentrador de muestras.
- 6.) Agregar 20 µl de reactivo de derivatización a las muestras y 10 µl a los estándares.
- 7.) Agitar y secar en el concentrador de muestras.
- 8.) Lavar 3 veces con metanol y agitar en vórtex. Secar en el concentrador de muestras.
- 9.) Resuspender las muestras y estándares con buffer de muestra. Colocarlas en el carrusel del HPLC.
- 10.) Calibrar e integrar estándares para cuantificar las muestras.

Las condiciones de la columna son:

- a.) Filtrar las fases móviles previamente preparadas con una membrana de nylon de 47mm de diámetro y de 0.2 µm de poro.
- b.) Sonificar las fases durante 3 min.
- c.) Colocar las fases móviles A y B.
- d.) Encender todos los módulos del cromatógrafo y enseguida la computadora.
- e.) Seleccionar el Instrument 2 On line.en la computadora.

- f.) Colocar la Columna Pico-Tag 150X 3.9mm. 4 μ m de tamaño de partícula.
- g.) Encender las bombas.
- h.) Se purga la bomba dando un flujo de 5mL durante 3-5min, asegurándose de eliminar las burbujas que puedan estar atrapadas. En seguida se purga la línea B con la fase B de igual manera.
- i.) Cerrar la llave de purga y dar un flujo de 0.5mL con la fase A 96%.
- j.) Aumentar el flujo a 1.0mL/min y dejar 20min para equilibrar la columna.
- k.) Encender el termostato e indicar la temp. a 37.5°C.
- l.) En el detector, seleccionar la longitud de onda de 254nm.
- m.) En el inyector fijamos el vol. de inyección de 4 μ L.
- n.) Se inyectan 4 μ L de cada estándar de 500 pmoles para ver tiempo de retención, el cual es una característica cualitativa y el área, una característica cuantitativa.