



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA
LAB. EVOLUCIÓN MOLECULAR Y EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DEL CONCEPTO COHESIVO, BIOLÓGICO,
ECOLÓGICO Y FILOGENÉTICO DE ESPECIE EN
BACTERIAS HALÓFILAS DEL VALLE DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA

RENÉ CERRITOS FLORES

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR

MÉXICO D. F.

ABRIL 2008



INSTITUTO
DE ECOLOGÍA
U H A M



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Después de casi 20 años dando un sinnúmero de problemas agradezco a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por tolerarme como estudiante, profesor y de paso como atleta. Desgraciadamente para la máxima casa de estudios este pequeño lapso de tiempo, espero, sea tan solo el preámbulo para una relación que dure hasta que la muerte nos separe.

Agradezco a las instituciones que cooperaron económicamente para que este proyecto se pudiera llevar a cabo, entre ellas la beca de CONACYT, de DEGEP y a los proyectos de investigación SEMARNAT-CONACyT C01-0237/A-1 y CONACyT- SEP CO2-44673/A1.

Gratitud máxima a mi directora de tesis, la Dra. Valeria Souza Saldivar, no solo porque es una excelente investigadora, sino también por preocuparse por la vida de sus estudiantes fuera del plano académico. Me acuerdo cuando llegue a comentarle sobre el proyecto doctoral y sobre mi gran problema para culminarlo. Ella tenía razón, ya termine el proyecto y el “problema” sigue creciendo, gracias. De esa misma magnitud, agradezco al Dr. Luis E. Eguiarte, sobre todo por dos cosas: por comprometerse a que los estudiantes hagan un trabajo académico de calidad y por su frase celebre “ponte a hacer tu tesis”. Sin duda han sido dos de los tres maestros más influyentes en mi formación académica. Eso no sé si es bueno o malo.

En este orden de importancia tendré que decir que fue placentero trabajar con el Dr. Pablo Vinuesa, el cuál fue parte importante en el desarrollo de este proyecto doctoral. Siempre que voy a Cuernavaca me acuerdo de las excelentes clases y de las buenas comidas en donde comentábamos junto con Claudia Silva los conceptos de especie en bacterias. Que pérdida de tiempo.

Al Dr. Daniel Piñero le debo de agradecer el haber leído mi tesis y años antes revisado los avances de mi proyecto en el examen de candidatura. Tome en cuenta casi todos los comentarios, solo aquellos que no entendí (por la letra). También le agradezco por no correrme de su laboratorio. Había veces que ya

no sabía si mi lugar de trabajo era en el pasillo del primer piso o en la planta baja. Creo que pasaba más tiempo en el primero.

Al Dr. Jesús Caballero mi gratitud no solo por revisar la tesis doctoral, sino también por sus comentarios en los temas de descripción de especies bacterianas. Espero que en un tiempo muy corto podamos hacer las descripciones de todas las especies de *Bacillus* de Cuatro Ciénegas.

Al Dr. Mark Olson un amistoso agradecimiento por destrozar mi tesis, sin duda sus comentarios serán de gran importancia al momento de tratar de publicar, sobre todo el capítulo III. Solo espero que en lo sucesivo pueda entender todas sus preguntas. También espero que no lea este último comentario antes o durante mi examen doctoral.

A la Dra. Yolanda López Vidal por todos los comentarios, sobre todo del capítulo I. Es una buena idea analizar el concepto ecológico de especie usando los genes involucrados en *quorum sensing*.

Agradezco el apoyo en el laboratorio de Laura Espinosa y Erika Aguirre, sobre todo en ayudarme a montar algunas técnicas moleculares y a usar adecuadamente los equipos de laboratorio.

Agradezco de manera casi forzada a todos mis compañeros de laboratorio. A Morena, Eria, Miguel, Sandra, Alejandra, Julia, Esmeralda, Ana Noguez, Celeste, Enrique, Toño, Andrea, Nuri. Gracias por estar siempre ahí cuando necesite que me hicieran alguna pregunta. Más que un agradecimiento, espero que Germán no me odie por decirle lo bueno que era el laboratorio (la famosa plática del camino verde) y también por hacerle la novatada de participar en la comisión de los seminarios.

A mi casi hermana académica, la ya casi también doctora Ana Escalante. Es bueno saber que hay alguien más que padece los mismos sufrimientos académicos (el examen de candidatura, la publicación de los artículos, los trámites burocráticos y las horribles fiestas después del examen).

A Morena y Eria quienes son las personas ideales para continuar con el proyecto de los *Bacillus* y los *Exiguobacterium* spp. de Cuatro Ciénegas.

A la doctora Luisa falcon, por los muchos proyectos tan buenos que no hemos hecho pero que en algún momento de la vida haremos.

Por supuesto a Nuri y a Andrea por su ganas tan grandes que tienen para quitarme el tiempo. Siempre es un placer platicar con ustedes siempre y cuando no sea sobre sus proyectos (matrimoniales).

A todo el grupo que compartidamente y sin resentimiento siempre nos quitamos tiempo cuando estamos en el cuarto de las computadoras. Por orden de importancia seria Ale, Nuri, Andrea, Enrique (en tu mundo utópico, un día reinara Linux), Richard, Rodrigo (Un día haremos el tour al ajusco en zancos, solo no te caigas) Ana Noguez, Sandra, Esmeralda, Jaime, Celeste, Chango leon, Miguel Angel, Alexander, Marcos, Manuel, Robert y Yislem.

También tengo que mencionar en esta sección a todos los individuos fundadores del laboratorio, la primera generación de biólogos, maestros y doctores egresados del lab. A Martha Rocha (hasta ahora puedo confesar que si me fusile su tesis de licenciatura). A Claudia Silva por regañarme siempre que hacia algo malo, que desgraciadamente era casi a diario. A Aldo Valera por su ayuda en el laboratorio y fuera de él. Al Arthur por esos momentos tan agradables en la computadora. A Lulu Carral (aún me acuerdo de la cena que organizo en honor a su titulación). A Meli y Jordan por los buenos consejos (también por los malos). Por supuesto a mi gran amiga Marcia Tambruti por hacerme perder treinta mil pesos en el concurso de fotografía y por las mil y una marciaaventuras (cuando se lastimo el tobillo, cuando no le puso el freno de mano a su coche, cuando no le puso el rollo a su cámara, cuando...).

Finalmente, dentro del laboratorio he de agradecer a Alecita tantos
que juntos. inundación del departamento y
ilesos. Tlayacapan comíamos y después

horas . Incluso, esos muy donde duda
dos cómplices. , por casi famosos en la cineteca. .

Fuera del laboratorio he de agradecer sin duda, al grupo de discusión que funciona sin fines de lucro y es un espacio autónomo y centralizado en el Sanborns. Gracias al los integrantes de lunes en la ciencia, tanto a los fundadores como a los invitados. (Rodolfo, Leon y Brian, Andrea, Ale Vázquez, Ana W, entre otros). Un lugar donde el alcohol se mezcla con las ideas y donde el resultado de esto es un grupo de borrachos confundidos.

A la gran Selección Natural, que para ser sincero, nunca pensé que fueran a ganar un partido, pero sucedió. Innumerables anécdotas: Ale V. tirando a lupita; lupis tratando de alargar el tiempo por medio de su carrera; Ana W, parando los goles con la cara; Ana W. con el gol de tiro libre (buenísimo); Lis y sus manos tan pegadas a su cuerpo, Margarita y sus grandes zafarranchos con las jugadoras contrarias; Denise y sus grandes atajadas y sus grandes errores; Lau y su gran ánimo para seguir jugando a pesar de las golizas; Adriana que se peleaba hasta con el pinche pasto sintético; Eunice y sus muchos goles. En fin, me tardaría mucho en mencionar a todas, espero que entiendan.

A Rodolfo Salas por las casi diarias discusiones, desde las más elementales hasta las más superficiales, ósea, desde el concepto de especie, hasta la demografía histórica de los hongos epifitos. Espero muy pronto se pueda hacer una fiesta en honor a tu titulación.

Aquí voy a hacer un grupo artificial mencionando en este párrafo a cuatro exhuelguistas con los que tengo muy buena relación. A León Martínez, creador del concepto “.....” , tan difundido ahora entre la juventud; a Ale V. la verdadera popochas; A Gina y todas sus preocupaciones y a Miguel Gutiérrez Ladron de Guevara, que espero también y este año podamos tener una fiesta más de titulación.

Al grupo de baquetones, vagos, indolentes, gandules, haraganes holgazanes y zánganos de la facultad de Ciencias. Al Dr. Rata alias Emilio Cordova por

hacerme ver que siempre hay personas más desgraciadas que uno. A Marcia (Aún me acuerdo la anécdota del maestro gay). A la Chavo que espero prospere su negocio de condones en el camino verde.

A todos mis amigos del Atletismo con lo que aún convivo y que nos seguimos llevando como hace casi 20 años. A la Ibe, Aidee, Angeles, Fere, Daniel, y Pepe.

A todos los demás amigos que no entran en ninguna categoría. Julieta ya tantos años y nunca hemos seguido las enseñanzas de la caperuzita (la vida con resistol 5000 se vive mejor). Rocio Ponce y su gran afición a llamarme en la madrugada cuando estoy todo dormido. Zenón Cano Santana, mi tercer maestro, por enseñarme tantas cosas inútiles y también por hacer enojar a los del equipo contrario y después ellos desquitarse conmigo. A Yuriana por ayudarme en la traducción de los artículos y por compartir problemas. A la estudiante de maestría Angela Arango que seguro muy pronto será de doctorado. A Valeria Zermeño un gran abrazo y recordándole que me debe mi regalo de cumpleaños. A Angélica Cervantes y las tantas películas que hemos comentado juntos (deberíamos ser críticos de cine). Finalmente, a Ale Serrato por tantos años conviviendo e interesándonos por nuestros problemas.

A Angélica Daza por el apoyo que me brinda durante muchos años. Esperando que algún día podamos llevar una relación cordial. También he de agradecer a su familia por las atenciones sobre todo las relacionadas con Bernardo.

Y claro a mi chamaquito llamado Bernicua. Creo que de los momentos más divertidos que tengo en el día es precisamente molestando a mi hijo. Hay momentos en que no se define quien es el padre y quien es el hijo, sobre todo cuando me dice sus frases celebres “ya cálmate papa” o “ya no juego contigo porque solo me molestas” o “no seas cochino papa” o..... En fin, gracias Bernardo por aguantar a tu papa.

Finalmente un agradecimiento muy grande a mi familia, en especial a mi mamá, la señora Agustina Flores y a mi papá, el señor Honorio Cerritos. Me gustaría que algún día entendieran que es lo que hago y que es un doctorado.

Dedicatoria:

Lo mejor que me pudo pasar aquí y ahora se llama Bernardo

INDICE

Capítulo I

Nueva aproximación teórica y práctica para delimitar especies procariontes: el caso del género <i>Bacillus</i> en Cuatro Ciénegas, Coahuila	1
---	---

Capítulo II

<i>Bacillus coahuilensis</i> sp. nov. a new moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, México	40
---	----

Capítulo III

Diversity of culturable thermo-resistant bacterial species along an environmental gradient in an aquatic system in the valley of Cuatro Cienegas, Coahuila, México	57
--	----

Apendice I

La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos	101
--	-----

CAPÍTULO I

NUEVA APROXIMACIÓN TEÓRICA Y PRÁCTICA PARA DELIMITAR ESPECIES PROCARIONTES: EL CASO DEL GÉNERO *Bacillus* EN CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

RESUMEN

El uso del gen 16S rRNA, la hibridación DNA-DNA, así como otros caracteres fenéticos han resuelto de una manera práctica y relativamente sencilla la descripción de especies procariontes. Sin embargo, bajo este tipo de metodologías muy difícilmente se puede reconocer a una especie como el resultado de procesos evolutivos que suceden dentro de las poblaciones. El objetivo de este trabajo es proponer una serie de metodologías que nos permitan reconocer y delimitar a las especies como unidades evolutivas. Se realizó un análisis matricial usando los datos de genética de poblaciones, de tipo ecofisiológico, filogenéticos mediante el uso de varios marcadores moleculares y caracteres fenéticos con la finalidad de correlacionarlos entre si y por medio de un análisis de ordenación de datos se generó un sistema de diagnosis completo. Al mismo tiempo, un análisis de correlación múltiple se aplicó a esta serie de matrices para determinar congruencias entre ellas. Esta metodología se puso a prueba analizando 55 individuos del género *Bacillus* filogenéticamente cercanos, con una diferencia entre ellos que va del 99.8% al 95% en la secuencia del gen 16S rRNA. Todas estas cepas fueron aisladas dentro del valle de Cuatro Ciénegas, el cual se caracteriza por su marcada heterogeneidad ambiental. Los resultados que se obtienen mediante este sistema de análisis permiten el reconocimiento de la especie biológica, filogenética, ecológica y fenética y con ello acercarse un poco más a obtener un sistema de clasificación natural al menos a este nivel.

INTRODUCCIÓN

Uno de los temas más controvertidos dentro de la biología es el que se relaciona con los criterios y las metodologías para definir una especie. Este problema se intensifica más cuando nos enfocamos a los microorganismos, específicamente a los procariontes. Por un lado, los pocos caracteres de tipo morfológico que pueden indicar la pertenencia a un determinado grupo, aunado, en algunos casos a la dificultad de poder cultivar y aislar a este grupo de organismos y por otro lado la biología compleja de estos organismos como el frecuente intercambio de información genética, la forma de dispersión, y de reproducción dificultan la posibilidad de tener un concepto que pueda ser universal y natural (Ward, 1998)

En los últimos 30 años el criterio que más se utiliza para delimitar especies procariontes es el que se conoce como concepto genético de especie (Ravin 1963), el cual, es definido como un grupo de individuos con capacidad de intercambiar información genética por medio de la conjugación, transducción o transformación. Desde el punto de vista práctico se utilizan dos métodos para reconocer especies bajo este criterio, la hibridación DNA-DNA (Ravin, 1963; Friedman y De Ley, 1985), así como el uso de las secuencias del gen 16S rRNA. Si al realizar una hibridación entre dos distintos genomas hay un porcentaje de hibridación mayor al 70% se establece que estos dos individuos pertenecen a la misma especie. Asimismo, cuando se compara la secuencia del gen 16S rRNA de dos individuos y hay un porcentaje de similitud mayor al 97% se plantea que estos individuos pertenecen a la misma entidad biológica (Wayne *et al.*, 1987; Aman *et al.*, 1992; Stackebrandt y Goebel, 1994). Estas metodología combinadas con el porcentaje de G+C, el uso de pruebas bioquímicas y la caracterización morfológica de las células se conoce como el método polifásico para definir especies (Jonson, 1973). Sin duda, este sistema polifásico que se usa actualmente en todas las descripciones de especies bacterianas resuelve de una manera práctica el problema de tener muy pocos caracteres morfofisiológicos que sirvan como un buen diagnóstico para reconocer y delimitar especie. Asimismo, para describir una especie solo es necesario aplicar este metodo polifasico a un solo aislado. Sin embargo, aunque este tipo de diagnostico es muy práctico y

relativamente sencillo, muy difícilmente podría reflejar un sistema de clasificación natural (Gevers *et al.*, 2005).

La sistemática bacteriana ha planteado su metodología con un enfoque práctico para reconocer y delimitar especies (Stackebrandt, 2002). Las pruebas basadas en la diferenciación de la secuencia del 16S rRNA y la hibridación DNA-DNA permiten delimitar de manera clara, sencilla y rápida al taxón a nivel de especie. Hasta el año del 2007, con este tipo de metodologías aunadas las pruebas bioquímicas se habían descrito 8000 especies de procariontes (Cerritos *et al.*, datos no publicados). Sin duda esta cifra se puede elevar en varios órdenes de magnitud si asumimos que el número de especies procariontes en el planeta es muy grande, superando incluso al taxa de los animales y de las plantas (Fulthorpe *et al.*, 1988; Curtis *et al.*, 2002; Whitaker *et al.*, 2003; Curtis *et al.*, 2006). Si este supuesto fuera válido, entonces tendríamos que proponer un sistema de clasificación que no solo enlistara a las especies sino que además nos ayudara a entender los procesos de diversificación. Un sistema de clasificación natural en bacterias a este nivel se tiene que enfocar básicamente en entender los procesos genéticos, fenotípicos, ecológicos y filogenéticos de los individuos. En otras palabras, hay que conocer a las especies para después poder describirlas. Conocer las presiones ambientales a las cuales están sometidas las especies, conocer los procesos de diversificación y cladogénesis, conocer la dinámica evolutiva y sobre todo el grado de flujo génico de los individuos, así como descubrir la relación entre el fenotipo, genotipo y ambiente debería ser quehacer cotidiano de la sistemática bacteriana.

En un sistema de clasificación natural a este nivel y siguiendo los planteamientos de Darwin (1859) una especie se tendría que definir como aquella unidad que evoluciona separadamente con respecto a otras y que tiene una dinámica evolutiva propia. (Simpson 1961; Wiley 1978). Bajo esta idea central se tendrían que desarrollar las metodologías para describir y delimitar a tales unidades evolutivas. El concepto biológico de especie (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942) el cual supone el cruzamiento entre individuos de la misma entidad evolutiva se podría aplicar en el grupo de los procariontes si se usan algunos parámetros de genética de poblaciones. Los parámetros como diferenciación genética, flujo de genes, recombinación y

desequilibrio de ligamiento podrían describir el grado de entrecruzamiento entre los individuos (Templeton 1989, 1998). El concepto filogenético de especie que basa sus principios en el grado de parentesco entre los individuos (Cracraft, 1983; Nixon y Wheeler, 1990) se puede resolver mediante el uso de varios marcadores moleculares, sobre todo con genes homólogos (Stackebrandt *et al.*, 2002; Zeigler, 2003). En el caso de los procariontes el uso de la secuencia de gen 16S rRNA junto con otros genes podrían resolver la filogenia de la especie y delimitar a las unidades evolutivas. El concepto ecológico de especie (Van Valen, 1978) que se basa en la relación que tienen los individuos con las condiciones y recursos de su ambiente se podría aplicar si se conocen algunos parámetros ambientales que a priori se consideren relevantes en la dinámica evolutiva de estas unidades (Templeton 1989). En términos prácticos la correlación entre los caracteres fenotípicos y el ambiente podrían delimitar especies. Existen algunos trabajos donde de manera teórica se aborda la idea de conocer estas tres distintas propiedades de los organismos (Templeton 1989, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002) sin embargo desde el punto de vista práctico no se han reportado análisis, sobre todo en procariontes para solucionar el problema del reconocimiento y delimitación de las unidades evolutivas.

En este trabajo se analiza el concepto biológico, filogenético, ecológico y fenético de especie en un grupo de 55 individuos del género *Bacillus*, filogenéticamente relacionados. La mayoría de estos individuos fueron colectados en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, el cual se ha reportado como un sitio con una diversidad bacteriana única, además de ser un ambiente muy heterogéneo. El objetivo de este trabajo fue comparar estos distintos criterios de descripción para poder encontrar congruencias entre ellos y que finalmente permita determinar la cohesión que existe entre los individuos de una misma entidad evolutiva. Asimismo en este trabajo se propone a la genética de poblaciones, la ecofisiología y las reconstrucciones filogenéticas como herramientas útiles en la sistemática bacteriana. Sin duda este tipo de herramientas, aunadas a las nuevas técnicas de la biología como son la genómica, la metagenómica (Konstantinidis *et al.*, 2006) y su correlación con el ambiente nos pueden ayudar a entender como esta estructurada la diversidad de procariontes.

METODOS

Pruebas Bioquímicas, marcadores moleculares y análisis de fingerprint

Cada uno de los 55 aislados se sometieron a 17 pruebas de degradación y asimilación de distintas fuentes de carbono a partir de un medio marino modificado (4g^{-1}), en donde se substituyo el extracto de levadura y la peptona (la fuentes únicas de carbono) por cada una de las distintas fuentes de carbono. De igual forma, como lo describe Leifson (1963) se determinó la producción de ácido a partir de una serie de 9 distintos carbohidratos usando el mismo medio marino modificado, Finalmente, a partir del medio marino se determino el crecimiento a diferentes temperaturas (30, 35, 40 y 45 50°C) y a distinto pH (4.5 y 9.0).

El gen 16S rRNA se amplificó usando los primers 27F y 1492R de acuerdo a las condiciones previamente descritas por Lane (1991). Los productos de PCR se purificaron mediante el uso de un kit de extracción (Qiagen). Para la secuenciación del gen 16S rRNA de aproximadamente 1400pb se usaron una serie de primers internos, los cuales, aparecen reportados previamente (Sacchi *et al.*, 2002). La reacción de secuenciación se realizo en un volumen total de $15\mu\text{l}$, el cual contenía $2\mu\text{l}$ de "Big Dye Terminator Sequencing kit" (Applied BioSystems), $1.6\mu\text{M}$ de primers y $5\mu\text{l}$ del producto amplificado. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5min a 95°C , 45 ciclos de 10s a 95°C , 10 a 50°C y 4min a 60°C . La secuenciación se hizo en un secuenciador de capilar (ABI-Avant 100). Con las secuencias obtenidas por individuo de aproximadamente 1400 pb se hizo una comparación del porcentaje de similitud para proponer especies a partir de la regla del 97%.

Adicionalmente se diseñaron primers para amplificar dos fragmentos de dos genes que codifican para el producto de Recombinasa (recA) y para Glicin sintetasa (gltX). Para el diseño de estos primers se usó la información de genomas completos secuenciados del genero *Bacillus* reportados en el GenBank. Para el caso del gen RecA estos primers se extienden del sitio 28 al 48 (5'-GATCGTCARGCAGSCYTWGAT-3') y del 583 al 602 (5'-TTWCCRACCATAACSCCRAC-3'), produciendo un producto de 574pb. La reacción de PCR se preparó con 1U de *Taq* polimerasa (Roche), 2.5mM de

MgCl₂, 1mM de dNTP's, 2μM de cada primer y 1μl de DNA 25-100ng/μl. El programa de PCR que se uso fue 1 ciclo a 95°C para la desnaturalización inicial, 30 ciclos de desnaturalización alineamiento y extensión de 95°C por 30s, 45°C por 30s y 72°C por 60s respectivamente y finalmente, una extensión final de 72°C por 5min. Con respecto al gen *gltX* el primer *forward* se extienden del sitio 79 al 98 (5'-CGYGGBGADGAYCAYATYT-3') y el *reverse* de 547 al 567 (5'-CRATTTTCMGCDCCRWARCT-3'), produciendo un producto de 469pb. La reacción de PCR se preparo con 1U de *Taq* polimerasa (Roche), 2.5mM de MgCl₂, 1mM de dNTP's, 2μM de cada primer y 1μl de DNA 25-100ng/μl. El programa de PCR que se usó fue 1 ciclo a 95°C para la desnaturalización inicial, 30 ciclos de desnaturalización alineamiento y extensión de 95°C por 30s, 45°C por 30s y 72°C por 60s respectivamente y finalmente, una extensión final de 72°C por 5min. Los productos de PCR se purificaron mediante el uso de un kit de extracción (Qiagen)

En cuanto al análisis de REP-PCR fingerprint, el cual se llevó a cabo para identificar los patrones de bandeo por especie y por cepa, se realizó un PCR en un volumen total de 25μl tal y como lo describe Rademaker y Brujin (1988). Las condiciones de PCR fueron tomadas del trabajo de Vinuesa *et al.*, (1998). Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1% usando buffer TAE.

Análisis filogenéticos y determinación del porcentaje de similitud del gen 16S rRNA

Las secuencias de los tres distintos marcadores moleculares se editaron manualmente mediante el programa BioEdit (Hall, 1999) y posteriormente se alinearon usando ClustalX (Thompson, 1994) junto con secuencias previamente registradas en el GenBank, que presentaron la mayor similitud. Para el caso del Gen 16S rRNA, las identidades y ubicación taxonómica de las secuencias se establecieron mediante una comparación en dos bases de datos, el "Ribosomal Database Project" y el "NCBI data bases". Finalmente, la reconstrucción filogenética para el gen 16S rRNA, *recA* y *gltX* se llevo a cabo mediante el método de neighbor joining, en el programa de computo MEGA versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Usando el programa de Model Test se establecieron los modelos de sustitución para cada uno de los marcadores.

Para el caso del gen 16S rRNA se aplicó el modelo GTR+I+G, distribución gamma =0.612, mientras, para el gen recA el modelo fue k80+I+G, con distribución gamma y finalmente para el gen gltX el modelo fue K81uf+I+G.

Análisis bioquímicos y reconocimiento de nicho

Con las pruebas bioquímicas efectuadas a cada uno de los 55 aislados se elaboró una matriz con datos discretos. Cuando el aislado presentaba crecimiento en determinada prueba bioquímica se le asignaba el valor de "1", mientras que cuando no se observaba actividad en esa prueba bioquímica se le asignaba el valor de "0". Esta matriz fue sometida a un análisis de agrupamiento de datos mediante el método de UPGMA (significado) usando el programa estadístico "Jmp". Posteriormente, para definir el nicho de cada uno de los aislados se hizo una relación de la ubicación de los aislados dentro del dendrograma con sitio donde se aisló.

Análisis de genética de poblaciones

Usando las secuencias de los tres distintos marcadores moleculares se analizaron los diversos parámetros de genética de poblaciones. La diversidad nucleotídica promedio por sitio (π), la variación esperada por sitio bajo el supuesto de una evolución neutral (θ), el número de sitios polimórficos (P), el número de haplotipos por especie (H) y la diferenciación genética (F_{st}) entre poblaciones se obtuvo a partir del programa DnaSP v.4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Adicionalmente, usando este mismo programa se determinó el tipo de selección a la cual podrían estar sometidos los tres distintos marcadores o en su defecto son selectivamente neutros. Con la prueba de Tajima (D) se estima la diferencia entre la diversidad observada (π) y la diversidad esperada en cada sitio (θ). Cuando D es igual a 0 significa que las secuencias no están sometidas a ninguna presión selectiva y evolucionan de manera neutra, cuando es mayor que 0 se puede inferir que está actuando la selección positiva o diversificadora, mientras, que si es menor que 0 se puede inferir que las secuencias están bajo selección negativa o purificadora (Li, 1997; Nei y Kumar, 2000).

Para determinar el grado de recombinación dentro de las poblaciones y entre ellas se usó el método de split decomposition. Este método se basa en

detectar incongruencias filogenéticas entre los sitios informativos de las secuencias analizadas. Mientras mayor sea el número de sitios informativos que produzcan señales filogenéticas incompatibles, mayor será el grado de recombinación entre las secuencias analizadas (Brown, *et al.*, 2002). La gran ventaja que tiene este método es que se puede distinguir de manera gráfica la existencia y grado de recombinación homóloga. Cuando una muestra de secuencia no presenta conflicto filogenético alguno, la gráfica resultante es un árbol filogenético sin reticulaciones, mientras que cuando se puede detectar este tipo de incongruencias el resultado gráfico será un árbol en forma de red (Huson, 1998; Brown, *et al.*, 2002). Este análisis se llevó a cabo usando el programa Splits Tree v. 4.9 (Huson y Wetzell, 1995).

Correlación de métodos a través de matrices y descripción de especies

A partir de los resultados obtenidos de los análisis filogenéticos, genotípicos y fenotípicos se elaboraron las matrices pareadas correspondientes. Estas matrices se elaboran al comparar las diferencias y similitudes entre cada uno de los 55 individuos en forma matricial. Así por ejemplo, dos individuos que presenten el mismo perfil fenotípico tendrán una similitud máxima y el valor asignado en esa celda de la matriz será de 1 (o de 0 en caso de tomar la expresión de disimilitud) y de la misma manera para las matrices filogenéticas; aquellas que tengan el mismo haplotipo tendrán un valor de similitud de 1. De forma más específica y sencilla estas matrices se construyen transformando un árbol de distancias independientemente del método que se use para hacer este agrupamiento. La matriz de fenotipos y genotipos se construyó a partir del método de UPGMA, mientras que para el caso de los tres distintos marcadores estas matrices se construyeron a partir de los árboles de neighbor joining.

Para cada una de las matrices se hizo una transformación de los datos de tal manera que las diferencias entre los distintos individuos en cada una de las matrices tuvieran la misma magnitud numérica. En este caso se eligió uniformizar cada una de las matrices aplicando la fórmula $A_i = (1 - Y_i) / X_i$, donde A_i es el valor uniformizado de cada comparación pareada; Y_i es el valor no uniformizado de la comparación pareada y X_i es el valor de la que tiene la diferencia máxima dentro de todas las comparaciones pareadas

dentro de la matriz. De esta manera los valores dentro de las distintas matrices tendrán un valor máximo de 1 y un valor mínimo de 0 (para el caso de disimilitud), y todas las demás comparaciones pareadas estarán dentro de este rango (Ludwig y Reynolds, 1988).

A partir de las distintas matrices se generó una matriz promedio, a la cual se le aplicó un análisis de ordenamiento de datos basado en componentes principales llamado análisis multidimensional. Este tipo de tratamiento de datos consiste en ubicar en dos o tres planos espaciales a cada uno de los individuos analizados de acuerdo a la similitud entre ellos. En este caso particular se eligió usar dos dimensiones. Este método permite visualizar de manera clara la existencia de similitud entre los individuos de la misma especie y en tal caso: individuos que sean de la misma especie tendrán un valor semejante tanto de el eje X como de Y . Asimismo, se llevo a cabo un análisis pareado para correlacionar matrices basado en el estadístico de Pearson. Este estadístico compara cada una de las casillas dentro de la matriz produciendo una medida de dispersión que se puede representar en forma de porcentaje. Dos matrices que sean idénticas tendrán una correlación del 100% mientras que si son demasiado distintas tendrán valores cercanos a 0%. El estadístico de Pesaron permite conocer que tipo de datos descriptivos de la especie se dispersan de la media matricial. Si todas las matrices correlacionan entre si entonces hay una cohesión entre las distintas formas de describir a las especies y en caso contrario, cuando esta cohesión no existe hay que formular hipótesis que expliquen estas diferencias.

Finalmente, con el análisis matricial de datos y con los distintos métodos para describir especies, se hace un diagnóstico del estatus de los grupos analizados. Este tipo de análisis es de suma importancia porque nos permite reconocer y delimitar a las especies usando para ello distintos atributos cuantificables y comparables entre los individuos. Este método se puede visualizar de una manera general en la figura 1. En esta figura se observan básicamente 5 distintos pasos: 1) generación de las distintas informaciones biológicas; 2) transformación de los datos en forma de matrices; 3) ordenamiento de los individuos mediante un sistema de coordenadas; 4) correlación de las distintas informaciones biológicas y 5) diagnóstico en la delimitación y reconocimiento de las especies.

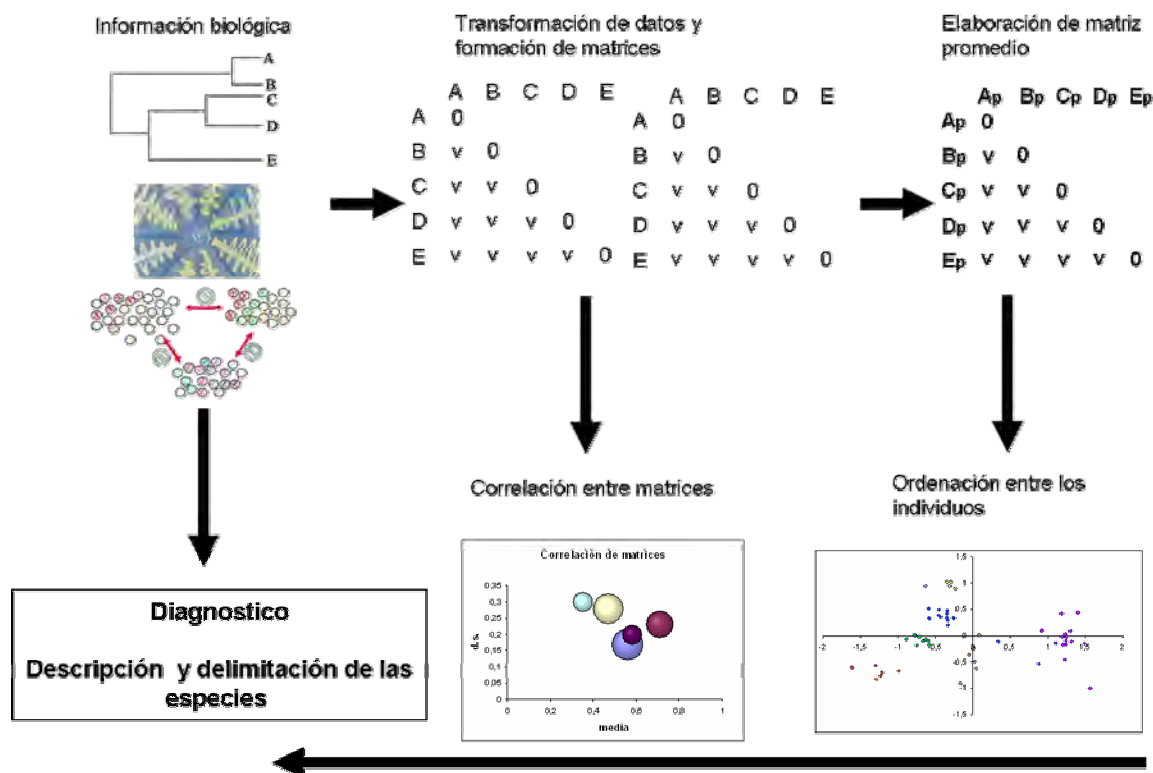


Figura 1. Se muestra de manera general los pasos para describir y delimitar especies procariontes usando varias fuentes de información biológica. Basado en herramientas de genética de poblaciones, filogenia, ecofisiología y morfofisiología de los individuos se pueden generar agrupaciones entre los individuos

RESULTADOS

Descripción clásica de especies bacterianas

A partir de los análisis filogenéticos basados en el gen 16S rRNA y las diferentes pruebas bioquímicas de los individuos se lograron reconocer 6 distintas especies bacterianas. Estos 6 distintos grupos tienen una diferencia en la secuencia mayor al 97% y por tanto, desde el punto de vista clásico automáticamente se consideran como una especie nueva. En la figura 2 se observan los distintos grupos perfectamente delimitados y presentando valores de bootstraps cercanos al 100%. Los grupos denominados como Lgm, Mez, Lgn, y Coa, están muy relacionados filogenéticamente a especies de *Bacillus* aislados en el mar de Corea, tales como *B. marisflavi*, *B. aquimaris* y *B. vietnamensis* (Viet). El grupo VI denominado como Hor, es muy distante de los anteriores y tiene gran cercanía con la especie de *B. horikoshi*, aislada en ambientes marinos cercanos a las costas de Japón. Con respecto al análisis

morfofisiológico basado en 32 pruebas bioquímicas se encontró que los individuos de un mismo grupo filogenético presentaban una variación muy grande. En la figura 3 aparecen los 39 distintos biotipos. Este tipo de análisis no concuerda con la filogenia obtenida con base en el gen 16S rRNA. Por ejemplo el individuo m4-4 que pertenece al grupo Coa tiene un perfil bioquímico muy diferente con respecto a los otros 5 individuos del grupo. Esta cepa solo degradó 2 azúcares, mientras que los otros miembros del grupo tienen la capacidad de degradar la mayoría de los azúcares probados. Por otro lado los individuos del grupo Lgm presentaron solo tres distintos fenotipos, siendo uno de ellos repetido para 10 individuos. Dentro de estos 55 individuos se observaron fenotipos que tienen la capacidad para degradar la mayoría de las fuentes de carbono probadas y fenotipos que carecen de esta función.

Siguiendo la descripción clásica para definir especies bacterianas, cuando dos aislados presentan perfiles fenotipos distintos pueden ser consideradas como especies distintas, incluso omitiendo las relaciones filogenéticas y las diferencias en la secuencia del gen 16S rRNA (Wayne *et al.*, 1987). En este sentido los 5 distintos aislados dentro del grupo Coa presentan perfiles fenotípicos distintos, sin embargo presentan diferencias menores al 1% en la secuencia del gen ribosomal. Por otro lado, los individuos del grupo Lgm presentan el mismo perfil fenotípico y sin embargo son distintos en la secuencia del gen 16S rRNA.

Respecto al análisis genotípico basado en los patrones de bandeo de la técnica de rep-PCR se observaron 29 genotipos distintos. Este método agrupa a los individuos de manera muy similar al que se observa en la filogenia del gen 16S rRNA. Los miembros del grupo Lgm son muy cercanos entre si, y la mayoría de ellos pertenecen a un mismo genotipo. Contrariamente, la cepa m2-6 perteneciente al grupo Coa presenta un patrón de bandeo muy diferente con respecto a los otros individuos. Asimismo, dentro del grupo Mez, el individuo 2-1m4 presenta un patrón muy distinto al resto de los individuos. De manera amplia la técnica rep-PCR se ha utilizado para discriminar aislados que sean idénticos es decir, que pertenezcan a la misma clona. Sin embargo, usando distintas técnicas de discriminación como lo es el 16S rRNA se encontró que cepas con el mismo perfil genotípico

pueden pertenecer a distintos individuos. Casos específicos se puede observar en el grupo Lgm en donde solo hay 3 distintos perfiles genotipicos por Repts, mientras que usando la secuencia completa del gen 16S rRNA se encuentran 7 distintos genotipos de 12 posibles. En general se encontró un mayor número de genotipos por secuencia (33) que por la técnica de rep-PCR (29). En tanto la técnica que mayor número de variantes detectó fueron las pruebas bioquímicas, donde se encontraron 39 fenotipos.

Estos análisis realizados a toda la muestra de individuos resultaron ser eficientes para reconocer las distintas variantes dentro de las poblaciones bacterianas y así poder sugerir hipótesis acerca de la dinámica evolutiva de estos individuos. Con los resultados obtenidos a partir de estas tres distintas técnicas de reconocimiento de especies muy difícilmente se podría resolver de manera clara su delimitación y sobre todo el reconocimiento de unidades evolutivas. Para ello es necesario usar otras herramientas como ecofisiología, la genética de poblaciones y en particular los parámetros referentes a recombinación y flujo de genes y también el uso de distintos marcadores moleculares para resolver la filogenia de las especies.

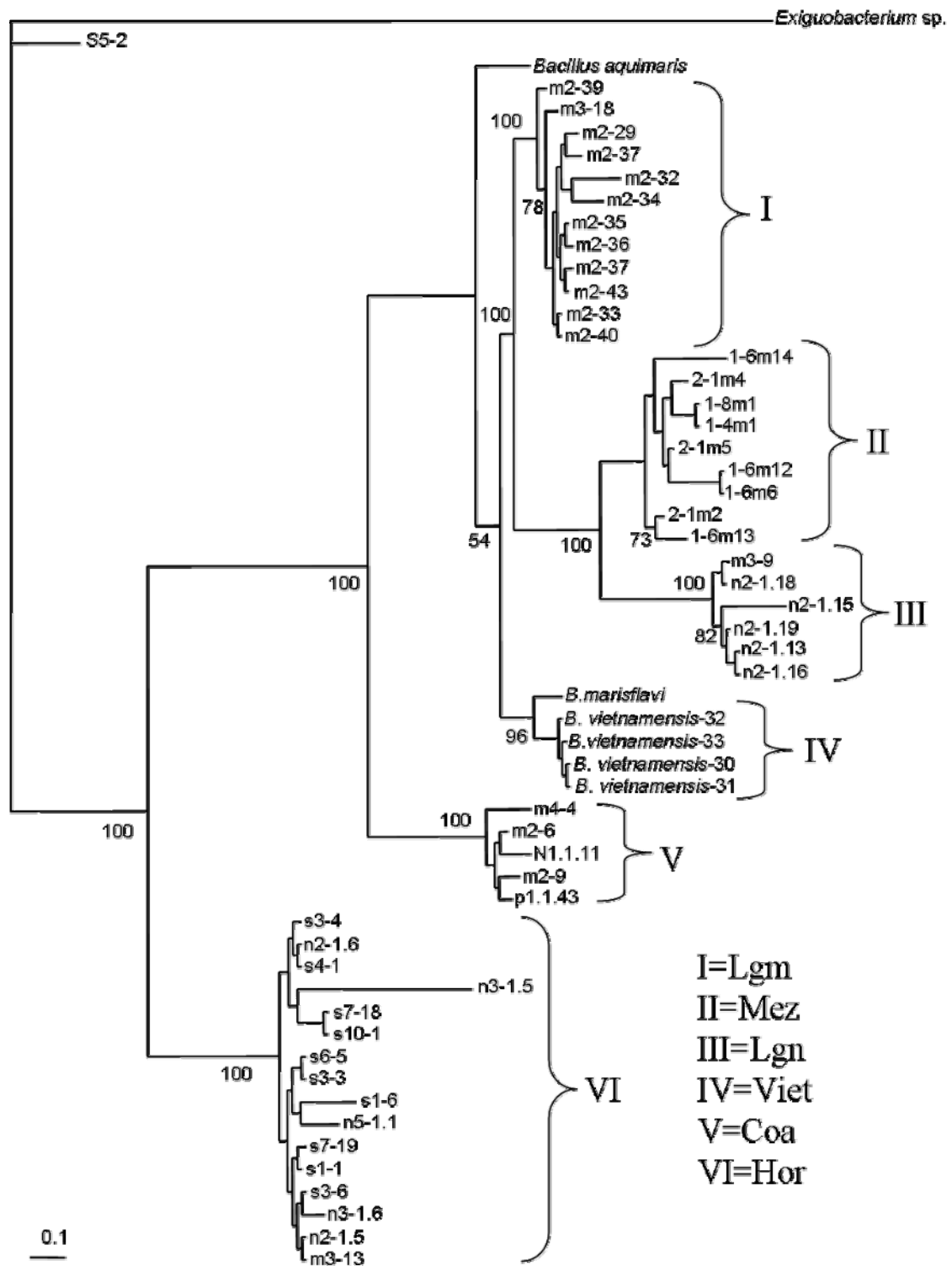


Figura 2. Filogenia de 55 individuos pertenecientes al genero *Bacillus* a partir del gen 16S rRNA usando el método de Neighbor-joining. Se observan 5 distintos grupos, los cuales pueden ser considerados como especies.

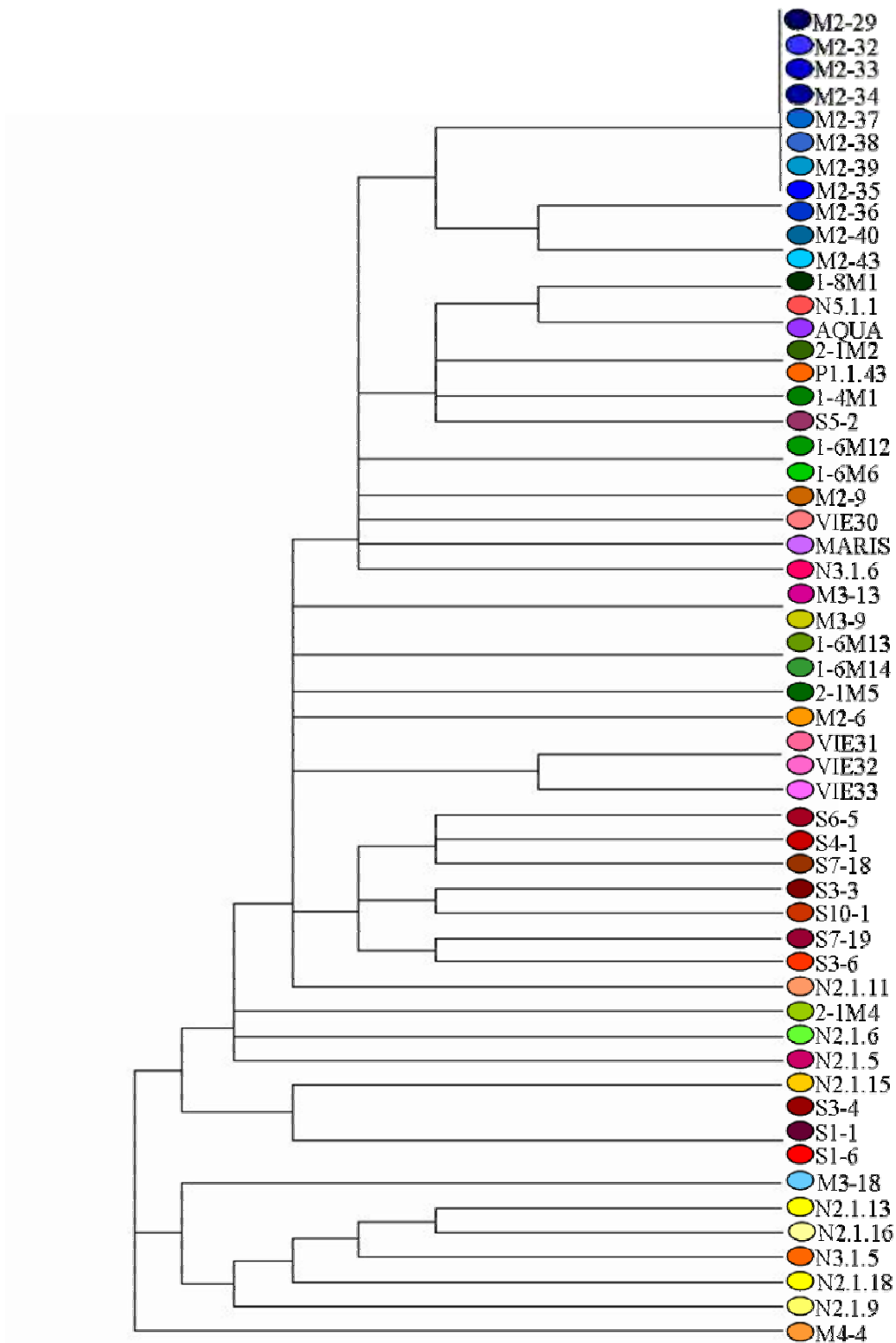


Figura 3. Agrupamiento mediante el análisis de UPGMA de 55 individuos del género *Bacillus* a partir de 32 Pruebas bioquímicas. Se observan 39 biotipos. De manera general, los aislados designados como grupo Lgm (tono azul) tienen un perfil bioquímica idéntico.

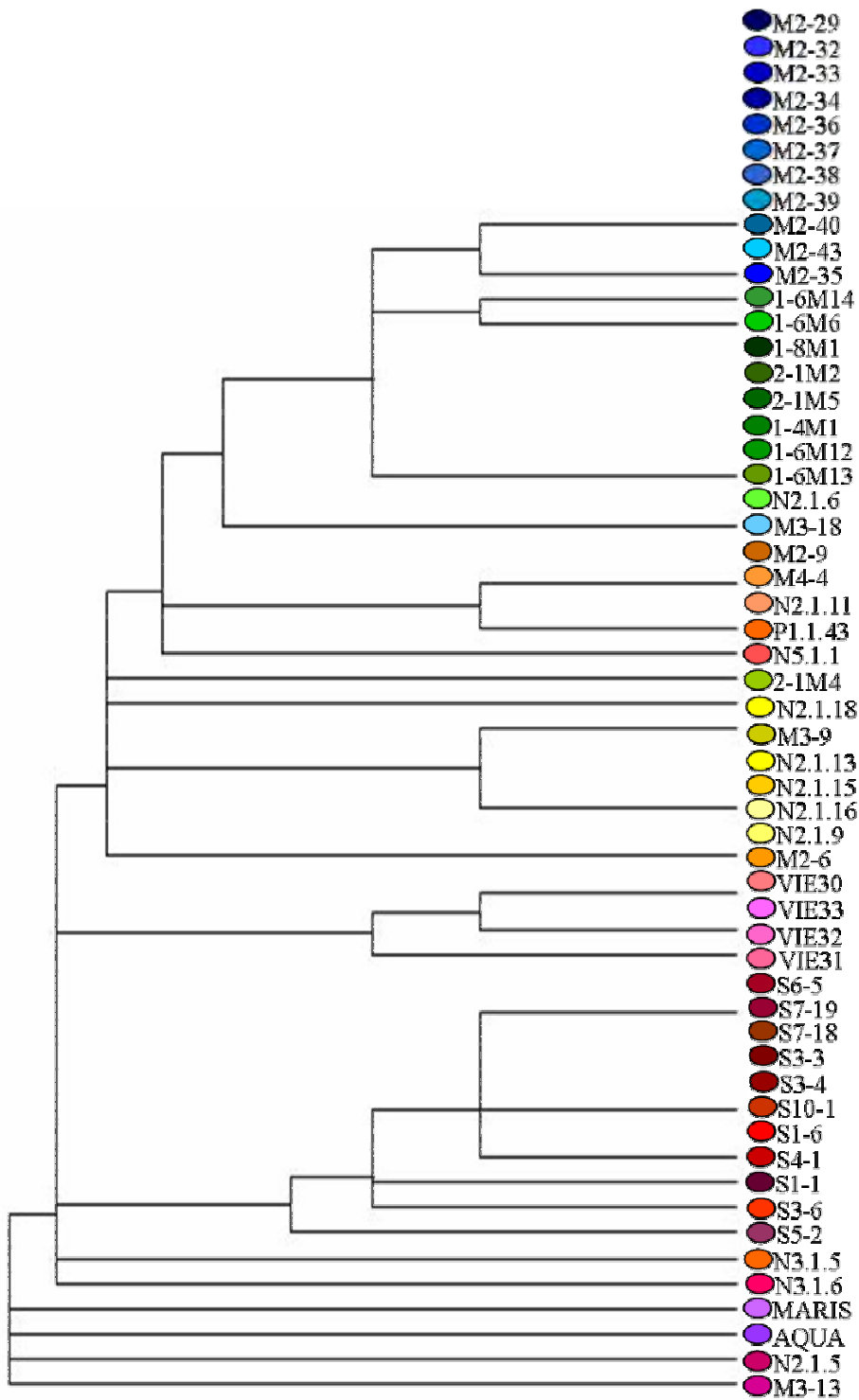


Figura 4. Análisis de Repts de 55 individuos del género *Bacillus*. Se observan 29 distintos genotipos. Nuevamente los individuos pertenecientes al grupo Lgm (tono azul) presentan el mismo patrón genotípico. Los individuos del grupo Coa son muy semejantes, excepto por el aislado m2-6.

Relación entre las distintas filogenias

Usando el programa model test (Posada y Crandall, 1998), se eligió el mejor modelo de sustitución para cada una de las filogenias. Los modelos que se aplicaron fueron GTR+I+G, K81uf+I+G y K80+I+G para los genes 16S rRNA, recA y gltX respectivamente. Posteriormente se eligió usar el método de reconstrucción de Neighbor-joining para los tres marcadores. En las tres distintas reconstrucciones se observa una congruencia entre las ramas externas, sin embargo en las ramas internas hay algunos grupos que no concuerdan entre los distintos marcadores. Es interesante remarcar que en las tres distintas filogenias se forman de manera clara los 6 distintos grupos de *Bacillus*. Con el marcador 16S rRNA se observan dos grandes grupos (Fig. 2), el primero de ellos agrupa a todas las especies de Cuatro Ciénegas aisladas de ambientes acuáticos, las cuales tienen afinidad con especies aisladas del mar de Corea (*B. marisflavi*, *B. aquimaris* y *B. vietnamensis*); mientras, en el segundo grupo se observa al grupo VI, llamado Hor el cual, la mayoría de los individuos se aislaron del suelo.

Considerando al marcador recA se observan al igual que con el gen ribosomal los seis distintos grupos. Sin embargo la distribución de estos grupos dentro del árbol es distinta (Fig. 5). El grupo Coa forma un grupo separado al de los demás grupos, incluso está mayormente relacionado con la especie que se consideró como grupo externo (*Exiguobacterium* sp.). Asimismo los individuos m3-9 y n3-1.6 que en el árbol del gen ribosomal forman parte de la especie Lgn, con este marcador aparecen como un grupo aparte y muy distante. Respecto al marcador gltX la topología general se conserva y es muy semejante al del gen 16S rRNA, los miembros del grupo Hor forman un grupo muy distante con respecto a los otros cinco grupos. Tanto el marcador recA como gltX presentaron muy poca variación cuando se compara con el 16S rRNA; para los dos marcadores solo se encontraron 15 haplotipos, siendo el grupo Hor el que mayor número de haplotipos presentó. Por otro lado, para el caso del gen gltX los grupos Coa, Lgm, Lgn y Mez resultaron ser monomórficas mientras que para recA solo la población Lgm presentó un solo haplotipo.

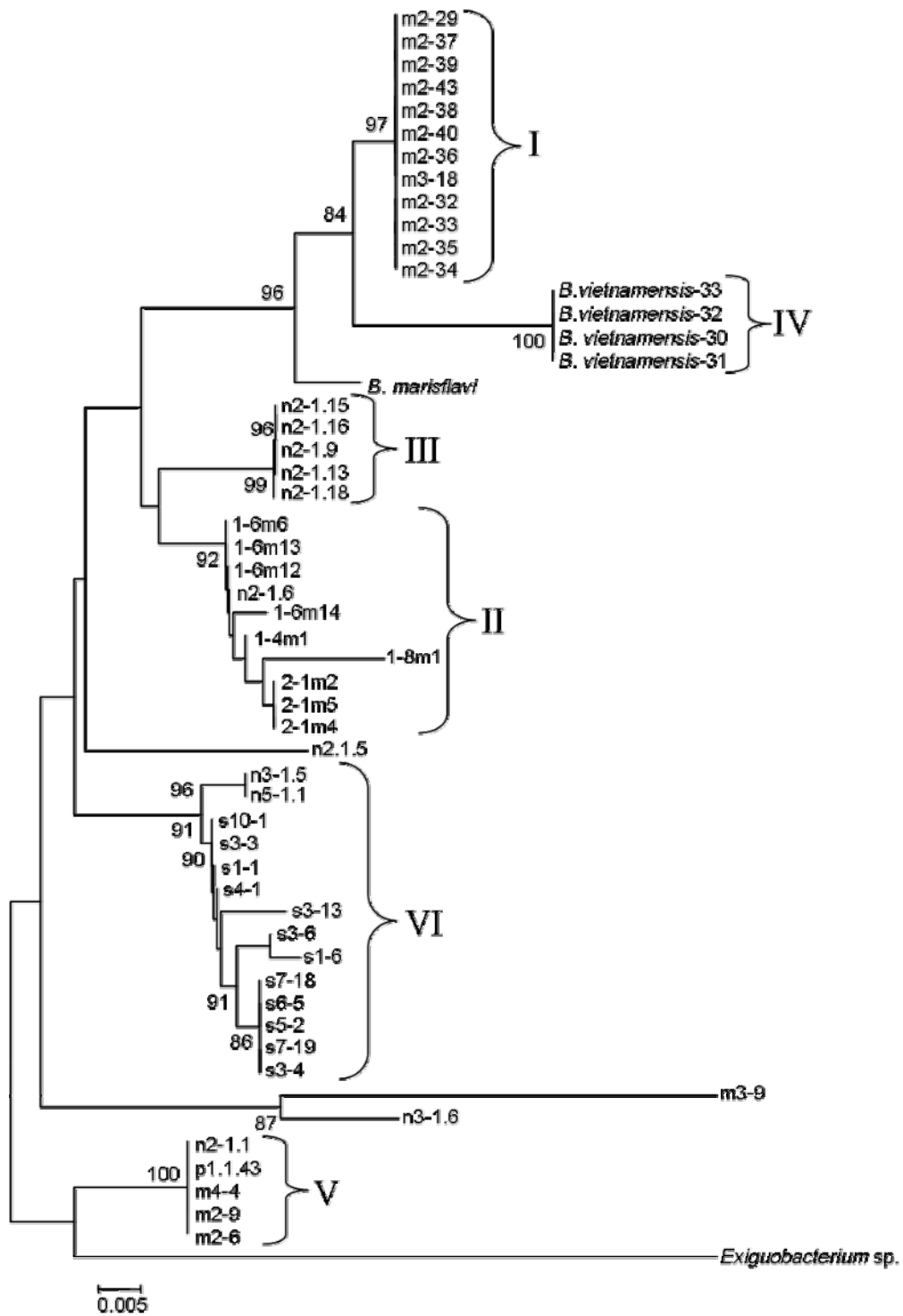


Figura 5. Reconstrucción filogenética mediante el método de Neighbor-joining a partir de las secuencias del gen *recA* de las cepas del género *Bacillus*. Los números cercanos a los nodos indican los valores de bootstrap con una replicación de 2500. La barra (0.01) presenta las sustituciones de nucleótidos en cada posición.

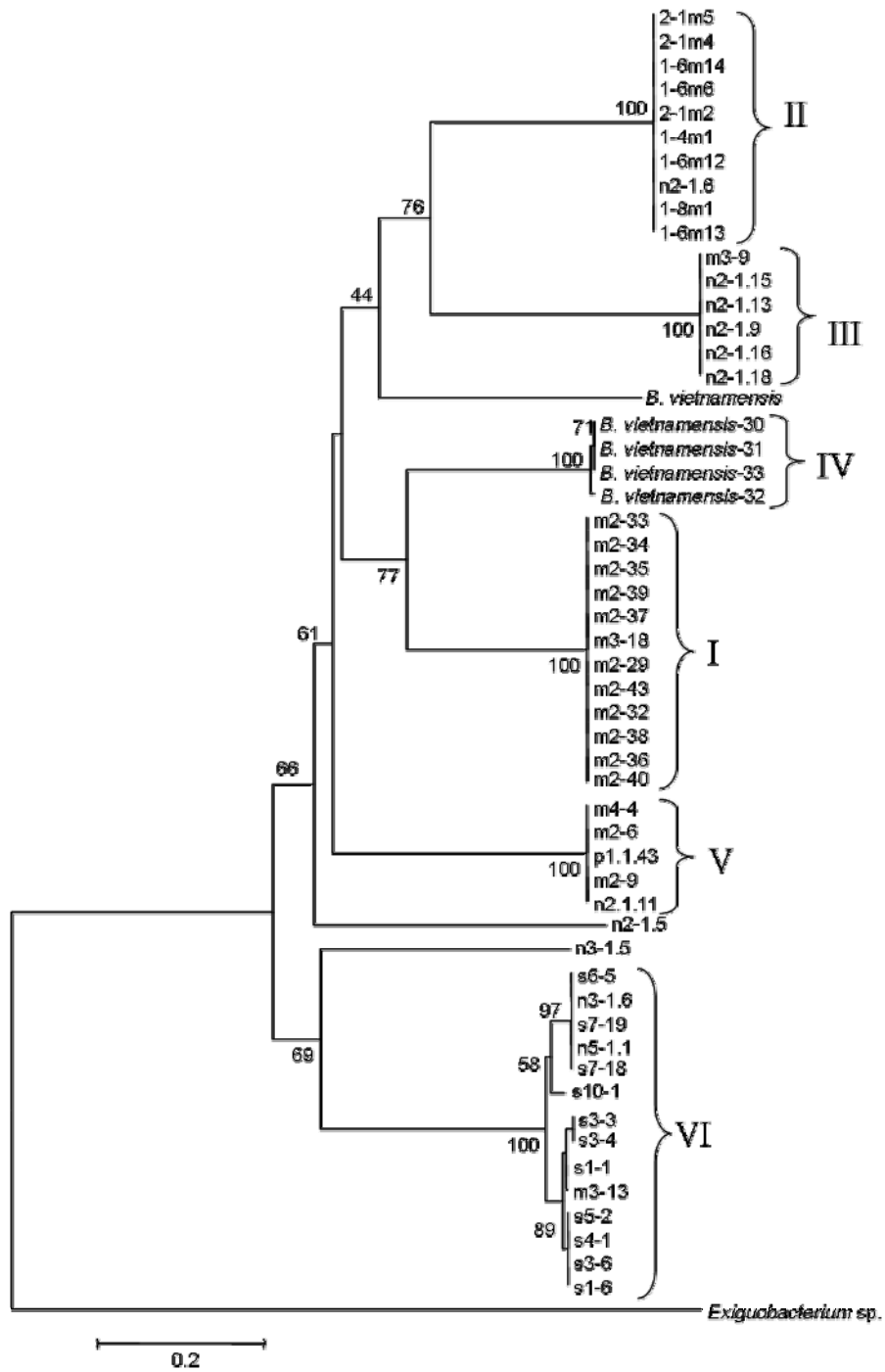


Figura 6. Reconstrucción filogenética mediante el método de Neighbor-joining a partir de las secuencias del gen *gltX* de las cepas del género *Bacillus*. Los números cercanos a los nodos indican los valores de bootstrap con una replicación de 2500. La barra (0.2) presenta las sustituciones de nucleótidos en cada posición.

Variación genética

En todas las poblaciones se encontró una estructura clonal con una baja diversidad genética. En la tabla 1 se muestran los distintos parámetros de genética de poblaciones para los tres distintos marcadores moleculares en las distintas poblaciones. El marcador molecular que mayor polimorfismo presentó fue el 16S rRNA, observando 33 haplotipos en total. Para este gen el grupo que mayor número de haplotipos presentó fue Hor con 11 de un total de 15 individuos. En tanto los marcadores *recA* y *gltX*, presentaron solo 15 haplotipos cada uno. En los dos genes el grupo Hor presentó 5 y 7 variantes respectivamente. Los valores de π y θ_w fueron bajos para todos los grupos y todos los marcadores. En general los valores más altos de π se observaron en la población Hor para los tres distintos marcadores, en tanto el grupo que menor diversidad se observó fue Lgm, con valores de 0.002 para 16S rRNA y de 0 para *recA* y *gltX*.

Los análisis de D de Tajima (Tabla 1) para contrastar la hipótesis de un modelo neutro indican que la mayoría de las poblaciones están sometidas a selección purificadora, encontrando valores negativos, sin embargo solo cuatro valores fueron estadísticamente distintos de 0. El grupo Lgm y Hor para el gen 16S rRNA presentaron valores de -2.00 y -1.84, mientras que Lgn en *recA* y Hor en *gltX* se observaron valores de -1.52 y -1.94 respectivamente. Cuando el análisis de selección se hace tomando en cuenta los 55 individuos como una sola población se observan valores positivos, aunque estos no son estadísticamente distintos de 0.

Los análisis de diferenciación genética basados en el estadístico F_{st} sugieren una alta estructuración genética. La ausencia de alelos compartidos entre las poblaciones hace que se observen valores cercanos a 1. Los valores que más se alejan de 1 son las comparaciones de los grupos Mez-Lgn con 0.57 con el gen 16S rRNA, y Mez-Lgn y Lgn-Hor con valores de 0.41 y 0.52 respectivamente con el gen *recA*.

Finalmente, los análisis de recombinación mediante las pruebas de split decomposition mostraron una ausencia de recombinación dentro y entre los grupos (Fig. 7). En la mayoría de los árboles se observó que las ramificaciones no presentan reticulaciones, lo que indicaría una posible señal

de recombinación. Solo en el grupo Mez con recA, y Lgn y Lgm con 16S rRNA se observa una sola reticulación por árbol, sin embargo entre todas las demás ramas hay un comportamiento clonal. En la mayoría de los grupos de los marcadores gltX y recA solo aparece una sola línea.

Ordenamiento de datos por individuo y correlación de matrices

A partir de las diferentes fuentes de descripción de los grupos del género *Bacillus* se estructuraron los datos en forma de matrices para finalmente formar una matriz promedio. Los resultados de esa matriz aparecen en la figura 8a, la cual fue sometida a un análisis de componentes principales de dos dimensiones. Estos resultados indican que hay una perfecta delimitación entre los 6 grupos analizados. El grupo más distante entre ellos es Hor, mientras que los grupos Lgm, Viet y Mez están muy cercanos entre sí. Los dos individuos de las dos especies más cercanas a los grupos acuáticos de *Bacillus* de Cuatro Ciénegas también aparecen muy cerca del grupo Lgm y Mez. Con respecto a los individuos, solo aquellos pertenecientes al grupo Lgn y Hor restan muy dispersos entre sí, lo que indica que hay una gran diferencia entre ellos de acuerdo a los distintos atributos que se tomaron en cuenta. Por ejemplo los individuos n5-1.1, s5-2, n3-1.6, n2-1.5 y n3-1.5, tienen patrones de Repts y un perfil bioquímico muy diferentes con respecto a los individuos que se encuentran más agregados. Lo mismo ocurre en el grupo Lgn con los individuos m3-9 y n2-2.15, los cuales se alejan de los restantes individuos a consecuencia de presentar diferencias en la genotipificación y fenotipificación. De manera similar para el grupo Coa ocurre que el individuo m4-4 se aleja de manera significativa de los restantes 5 aislados, la razón es que este presenta un perfil bioquímico completamente distinto al del resto del grupo.

Tabla 1. Parámetros relacionados con la estructura genética de 6 distintos grupos del género *Bacillus*, usando tres distintos marcadores moleculares. Se observa una baja diversidad genética en todos los grupos.

	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>P</i>	π	θ_w	<i>D</i>
Población						
16S rRNA						
Lgm	12	7	15	0.002	0.004	-2.00*
Mez	10	8	108	0.01	0.009	-0.83
Lgn	6	5	14	0.005	0.006	-0.86
Coa	5	5	21	0.006	0.007	-1.23
Vie	4	4	15	0.009	0.001	0
Hor	16	11	85	0.01	0.015	-1.84*
Total	55	33	154	0.04	0.037	0.30
Población						
recA						
Lgm	12	1	0	0	0	0
Mez	10	5	19	0.008	0.007	-1.35
Lgn	6	2	47	0.03	0.042	-1.52
Coa	5	1	0	0	0	0
Vie	4	1	0	0	0	0
Hor	16	5	42	0.01	0.004	-1.40
Total	54	15	79	0.04	0.049	0.26
Población						
gltX						
Lgm	12	1	0	0	0	0
Mez	10	1	0	0	0	0
Lgn	6	1	0	0	0	0
Coa	5	2	1	0.002	0.002	1.22
Vie	4	2	1	0.002	0.002	-0.61
Hor	16	8	102	0.048	0.088	-1.94*
Total	53	15	134	0.027	0.131	0.73

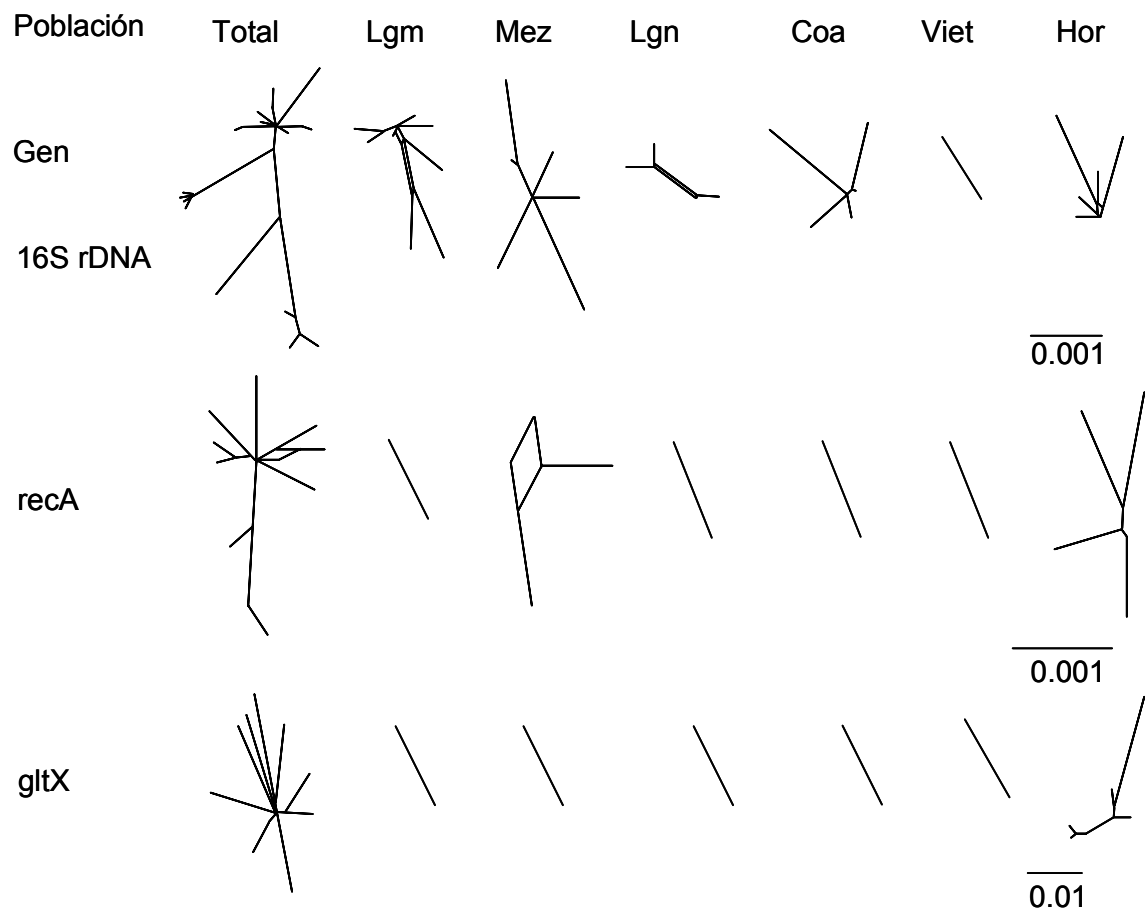


Figura 7. Se muestran los análisis de split decomposition para evidenciar eventos de recombinación dentro y entre los distintos grupos. En todos los casos se observa que las poblaciones del género *Bacillus* son básicamente clonales.

Con respecto a la correlación pareada de matrices se observó que los valores más altos se encontraron cuando las comparaciones se hacen entre los datos filogenéticos, es decir, entre 16S rRNA, recA y gltX. Por ejemplo el valor más bajo dentro de esta división que es de 0.50 se observa cuando se comparan 16S rRNA con recA, mientras que el más alto fue entre recA con gltX con 0.71. Por otro lado, los valores de correlación más bajos se dieron entre los caracteres fenotípicos con los marcadores moleculares con valores que van de 0.23 a 0.37 se compara con 16S rRNA y gltX respectivamente. En tanto la matriz obtenida a partir de la genotipificación por Repts presentaron una correlación media con valores de 0.43 a 0.61 cuando se compara con la fenotipificación y gltX en ese orden. En la figura 8 aparecen de manera gráfica las relaciones entre las distintas matrices. El tamaño de las esferas corresponden al total de variantes de cada una de las matrices, por ejemplo, la esfera más grande que es la de fenotipificación por pruebas bioquímicas tuvo 39 distintas variantes de 55 posibles. En tanto la esfera más pequeña que corresponde a la matriz de gltX solo presento 15 haplotipos de 55 posibles.

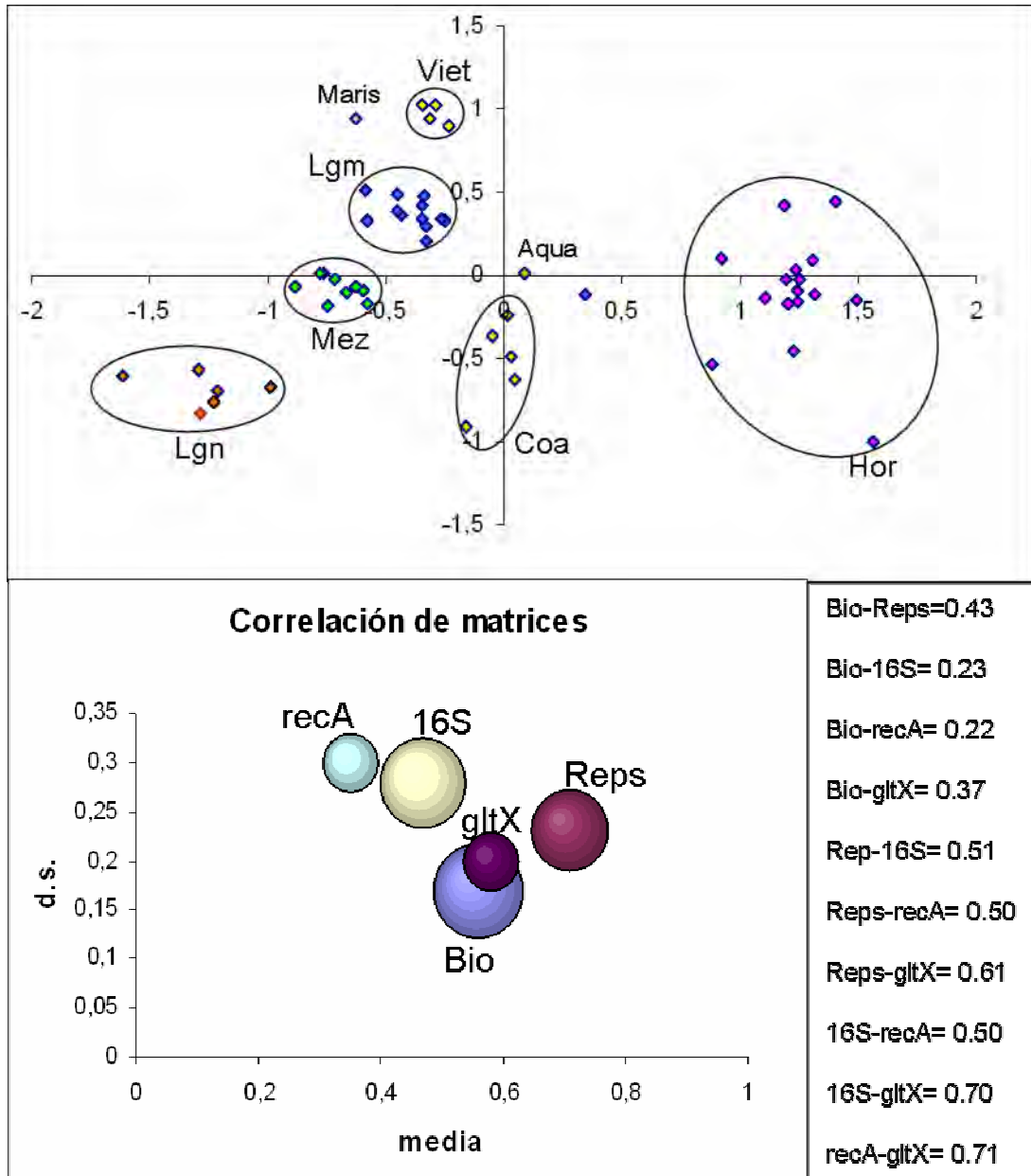


Figura 8. Análisis de ordenamiento de datos mediante el método de componentes principales y correlación de matrices pareadas mediante el estadístico de Pearson. Por un lado se muestran los 55 individuos estructurados en 6 diferentes grupos, en tanto la correlación de matrices indica que las herramientas bioquímicas y genotípicas son muy distintas respecto a las herramientas filogenéticas.

DISCUSIÓN

Evidenciando el proceso de especiación para poder describir especies

Teóricamente, hay dos ideas encontradas que se relacionan con los procesos de diversificación en bacterias (Nesbo *et al.*, 2006). La primera supone que la recombinación homóloga es la fuerza que dirige la divergencia entre las especies, así, mientras menor frecuente sea la recombinación homóloga, mayor será el grado de divergencia, y mayor la posibilidad de que se origine una nueva especie. (Istock *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2000; Maynard-Smith *et al.*, 2000; Frandsen *et al.*, 2001; Vinuesa *et al.*, 2005). La segunda supone que no hay recombinación homóloga y que las poblaciones son básicamente clonales; la divergencia se da como un resultado de la selección periódica que actúa eliminando o manteniendo las variantes originadas por mutaciones puntuales, seguida por un proceso de diversificación por colonización o desplazamiento de nicho (Robert y Cohan, 1995; Feil *et al.*, 1999, 2000; Cohan, 2001, 2002). Otra tercera idea asume que la diversificación y diferenciación de los procariontes está fuertemente relacionada con la recombinación no homóloga (Gogarten y Townsend, 2005). En este caso la adquisición de nuevas funciones producto de la transferencia horizontal de genes puede ocasionar la colonización de nuevos ambientes y consecuentemente la divergencia con respecto al grupo ancestral (Gogarten y Olendzenski, 1999; Jain *et al.*, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Gogarten y Townsend, 2005).

Para hacer una descripción y delimitación de las especies bacterianas tenemos que saber como se lleva a cabo el proceso de especiación y sobre todo definir las barreras que limitan el intercambio de genes en las poblaciones y que promueven la divergencia entre los procariontes (Nesbo *et al.*, 2006; Retchless y Lawrence, 2007; Fraser *et al.*, 2007). Las barreras que promueven esta diversificación en el caso de grupos clonales es la especialización de los ecotipos a un nuevo ambiente (Cohan, 2002), mientras, en grupos de bacterias con cierto grado de intercambio genético es la reducción de eventos de recombinación homóloga (Hanage *et al.*, 2005). Esta reducción es causada básicamente por tres factores: cambio en la

especificidad de vectores como bacteriófagos; aislamiento ecológico o geográfico y/o (Whitaker, 2006) una reducción en la recombinación homóloga debido a divergencia en las secuencias (Nesbo *et al.*, 2006).

Es claro que si queremos hacer un sistema natural de clasificación en procariontes, necesitamos que los métodos para reconocer y delimitar especies traten de evidenciar los mecanismos que promueven su diversificación (Cohan, 2006). Al mismo tiempo necesitamos que estos métodos sean reproducibles y de fácil manejo de tal manera que resulte práctica su aplicación. En este sentido se requieren métodos que reconozcan, describan y delimiten a las unidades evolutivas de una manera sumamente práctica, en otras palabras, un sistema de clasificación natural pero al mismo tiempo práctico. En la actualidad, contamos con las herramientas teóricas y prácticas para llevar a cabo metodologías que se apeguen más a describir a las especies de procariontes.

Métodos para delimitar unidades evolutivas

Uno de los métodos clave para entender como evolucionan y como divergen las especies es la genética de poblaciones (Templeton, 1998; Vinuesa *et al.*, 2005). Las herramientas de esta área permiten conocer como se estructuran las poblaciones a nivel genético, aportando entre otros datos los relacionados a la frecuencia e importancia de flujo de genes, de la distribución de las variantes alélicas dentro y entre las poblaciones, el impacto que tiene la selección en determinados genes, y por supuesto la diversidad genética de las poblaciones en estudio. Estadísticos basados en reconocer el grado de recombinación (desequilibrio de ligamiento, incongruencia entre los sitios informativos, distribución de los polimorfismos), el grado de diferenciación genética (F_{st} , G_{st}), las distintas pruebas de selección y los estimadores para medir diversidad a nivel de secuencia (π y θ), son claves para entender la diversificación de los procariontes. En otras palabras, mediante el uso de la genética de poblaciones podemos reconocer el grado de entrecruzamiento entre los individuos y llegar a reconocer a las especies biológicas siguiendo las ideas de Mayr (1942) y Dobzhansky (1937): los individuos con capacidad de entrecruzarse serán considerados como de la misma especie. Para hacer un estudio de este tipo se pueden usar secuencias de genes funcionales,

secuencias no codificantes e incluso otro tipo de técnicas que permitan reconocer variantes de un mismo marcador molecular (Istock *et al.*, 1996). Asimismo y de manera muy importante, un estudio de genética de poblaciones necesita el análisis de varios individuos para que se pueda hacer una comparación entre ellos y se puedan medir los correspondientes parámetros. Un aspecto de la sistemática bacteriana que contradice este tipo de análisis es la forma en que se describen especies, ya que solo se necesita un aislado para llevar a cabo tal descripción. En un estudio reciente encontramos que casi un 35% de las especies procariontes han sido descritas con uno o dos aislados. En algunos trabajos se ha manejado la importancia de describir a las especies con más de un individuo, e incluso se ha propuesto como requisito para publicar nuevas especies (Mayden, 1997; Stackebrandt *et al.*, 2002), sin embargo hasta la fecha no se ha difundido esta idea. En este trabajo se hizo la descripción usando varios aislados por especie: en total se analizaron 55 individuos agrupados a priori en 6 distintas especies.

Otra de las metodologías que se podría aplicar teniendo varios individuos o incluso varias poblaciones que a priori puedan ser de la misma especie es hacer análisis fenotípicos, y genotípicos y compararlos con el ambiente en el que viven (Ward *et al.*, 2006). De manera clásica las descripciones para proponer una nueva especie, hacen un estudio formal del fenotipo mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y de crecimiento diferencial. Sin embargo, en ningún caso se hace referencia o se correlaciona con el ambiente en donde fue aislado ese individuo (Cerritos *et al.*, en proceso). En este caso, se propone hacer análisis de tipo ecofisiológico en donde de manera empírica se plantee una hipótesis de tipo adaptacionista en donde el fenotipo pueda ser correlacionado con algún o algunos factores ambientales. Hacer este tipo de correlaciones para delimitar especies, tal y como lo afirma Templeton (1998), es muy complejo sobre todo por las implicaciones estadísticas que resultarían de comparar todas las posibles variables ambientales con todas las posibles características fenotípicas. Sin embargo, en la actualidad contamos con una serie de pistas para determinados grupos bacterianos en donde hay correlaciones muy marcadas entre el fenotipo y el ambiente (Ward *et al.*, 1998; Ward, 2006). Lo equivalente a este tipo de correlación es lo que

van Valen (1978) descubrió cuando formuló el concepto ecológico de especie: un grupo de individuos que tienen un nicho ecológico diferente con respecto al de otros grupos estrechamente emparentados. La idea en este sentido es aplicar este concepto y esta metodología para el grupo de los procariontes.

Aunado a estas dos metodologías y de acuerdo a lo expuesto en otros trabajos, para conocer la filogenia de las especies es necesario usar varios marcadores moleculares (Felsenstein, 1985; Avise, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998; Franzot *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Hanage *et al.*, 2006). En la actualidad, el único marcador que se usa para reconocer las relaciones filogenéticas en bacterias es el gen 16S rRNA (Vandamme *et al.*, 1996). El uso de varios marcadores permite reconocer la congruencia en la historia evolutiva de los genes, así pues, si varios marcadores moleculares presentan la misma historia es muy probable que esa misma dinámica se siga en la mayoría de los genes y por lo tanto se podrá proponer esa filogenia como única para esa especie. Existen varios métodos para comprobar la congruencia entre las filogenias, asimismo existen diversos programas de cómputo que nos permiten hacer comparaciones entre ellas de una manera sencilla y clara (Leconitre *et al.*, 1998; Rokas *et al.*, 2003). El uso del concepto filogenético de especie se aplica en este caso: cuando todos los individuos comparten la misma historia evolutiva se pueden definir como una misma especie.

Estas tres metodologías en conjunto con los criterios actuales para delimitar y describir especies se tendrían que desarrollar de manera sistemática, de tal manera que toda esta información se pueda sintetizar para conocer la historia natural de manera más profunda de las especies procariontes. De igual manera todas estas distintas fuentes de información descriptivas de las especies pueden ser correlacionadas con la finalidad de encontrar patrones para determinados grupos de procariontes (Fig. 8).

En la actualidad existen varios trabajos que intentan delimitar especies bacterianas a través de uso de este tipo de metodologías. Vinuesa *et al.* (2005) haciendo un estudio de genética de poblaciones y un análisis filogenético usando varios marcadores moleculares en tres grupos del género *Bradirhizobium* pudo delimitar perfectamente las distintas unidades

evolutivas. Hanage *et al.* (2005) haciendo un análisis de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) usando siete distintos marcadores moleculares en tres grupos del género *Neisseria* resolvieron la genealogía de las especies. Además, estos autores proponen que para resolver la filogenia de las especies es necesario hacer un análisis concatenado de una gran cantidad de marcadores moleculares y tener un gran número de individuos. Por otro lado Nesbo *et al.* (2005) haciendo un análisis de varias regiones del genoma de ocho individuos del género *Thermotoga* encuentra que a pesar de las diferencias fisiológicas, de contenido de genes y de las diferencias en el gen 16S rRNA existen señales de recombinación. Estos autores proponen que la recombinación por si misma no debe de ser tomada como único parámetro para delinear especies.

El caso de los 55 *Bacillus* de Cuatro Ciénegas

Desde hace más de 15 años se cuestionaba el uso de la regla del 97% de diferencia en el gen 16S rRNA como regla universal para delimitar especies, sobre todo en algunos grupos de bacterias. (Robert y Cohan, 1995). En una gran cantidad de casos se encuentra que aislados de la misma especie presentan diferencias ecológicas muy distintas entre ellos (Balmentti y Piffaretti, 1996; Roberts y Cohan, 1995; Roberts *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1999). El género *Bacillus* y algunos géneros de la clase actinobacteria presentan este problema. En el caso del género *Bacillus* se demostró que tres aislados que presentan una similitud del 99.5 % tienen una dinámica evolutiva muy distinta entre ellos, por lo cual pueden ser considerados como especies distintas (Fox *et al.*, 1992; Palas *et al.*, 2000). Asimismo, para bacterias del grupo Actinobacteria se ha demostrado que aislados que presentan un 100% de similitud en esta secuencia han diversificado en algunos caracteres fisiológicos, como respuesta a ambientes diferenciales (Nedwell *et al.*, 2004; Hahn y Pöckl, 2005). Palys *et al.* (2000) encuentra que *Bacillus psychrophilus* y *B. globisporus* tienen una similitud en la secuencia del gen ribosomal de casi 99% y sin embargo presentan diferencias ecofisiológicas muy marcadas entre ellos. Estos autores proponen que para este grupo es necesario la utilización de genes codificantes que presenten una divergencia mayor que los genes ribosomales. Fox *et al* (1992) propone

que esta metodología basada en las diferencias en los genes ribosomales puede ser muy limitada sobre todo en grupos que recientemente han diversificado.

Varios aislados de los 55 que se analizaron presentan este mismo problema. Caso particular es el que se presenta en el grupo Coa, en donde los cinco aislados presentan una similitud en la secuencia del 16S rRNA de más del 99.5% y sin embargo, tienen un perfil morfofisiológico muy distinto. De este grupo, el aislado m4-4 (cepa tipo) que fue descrito como una nueva especie llamada *B. coahuilensis* (Cerritos *et al.*, en prensa) tiene la particularidad de carecer de la mayoría de los genes de degradación de fuentes de carbono, principalmente de azúcares. Sin embargo, las cepas que por el criterio del 97% podrían pertenecer a la misma especie (m2-6, m2-9, p1.1.43 y n1.1.11) pueden degradar la mayoría de las fuentes de carbono probadas. La cepa tipo m4-4 fue aislada de un sitio distinto al de las otras cepas, donde las condiciones ambientales (pH, temperatura, conductividad, concentración de oxígeno disuelto) son muy distintas y donde posiblemente los recursos también pueden ser diferenciales entre sitios. Además y de manera muy interesante, Alcaraz *et al* (en prensa) al secuenciar el genoma completo de la cepa m4-4 encontraron varias señales de transferencia horizontal, particularmente de genes que son funcionales y que presentan una ventaja adaptativa importante en el ambiente oligotrófico de Cuatro Ciénegas. Es posible que el mecanismo por el cual, esta especie adquiere nuevos genes sea la transformación. En ese sentido este mecanismo junto con la transducción pueden ser relevantes en dirigir la dinámica evolutiva no solo de esta especie, sino de la mayoría de los grupos bacterianos del sitio. Esta serie de diferencias dentro del grupo Coa sugiere que todas las cepas pueden ser consideradas como especies distintas, sobre todo porque no se evidenciaron señales de recombinación y tienen un perfil fenotípico muy diferente entre ellas. Por otro lado, se sugiere que se lleven a cabo otros análisis donde se aumente el tamaño de muestra y sobre todo se usen marcadores moleculares que presenten mayor grado de polimorfismo.

Caso contrario ocurre con el grupo Lgm, Viet y Mez, donde la mayoría de las cepas tienen una correspondencia entre fenotipo, genotipo y su filogenia. (Fig. 8). En estos grupos los aislados presentan diferencias muy pequeñas en

todas las formas de descripción que se usaron. En este sentido podríamos decir que todos los aislados que corresponden a cada uno de los grupos se pueden considerar como una sola especie. Aunque, por otro lado, los análisis de genética de poblaciones, particularmente los relacionados a recombinación homóloga demuestran que esta es muy rara dentro de estos grupos y por lo tanto, se podría afirmar que todo individuo que presente un nuevo alelo en la población puede en el límite ser considerada como una nueva unidad evolutiva. De manera general se puede decir que todos los seis grupos analizados son individuos clónales con ausencia de recombinación homóloga pero con una gran variación fenotípica, en algunos grupos. Este modelo se ajusta al propuesto por Cohan (2002), que señala que las poblaciones bacterianas evolucionan y divergen básicamente cuando la selección periódica actúa sobre las variantes deletereas o semideletereas originadas como producto de la mutación, purgándola y manteniendo esas mutaciones que sean de tipo neutro. Solo una mutación benéfica puede provocar que ese nuevo genotipo pueda colonizar un ambiente distinto y eventualmente originar un nuevo ecotipo al que se le puede llamar como una nueva especie, o en su defecto desplazar al genotipo ancestral por competencia y por acción de la selección periódica.

Conclusión

En este trabajo se propone desarrollar una nueva descripción de las especies bacterianas basado en métodos que introduzcan el conocimiento de aspectos biológicos claves en la evolución y diversificación de los organismos. La estructura genética de los individuos, los aspectos ecofisiológicos y una filogenia mucho más robusta usando varios marcadores moleculares es en síntesis lo que se propone desarrollar dentro de cualquier descripción de una especie. Esta nueva forma de descripción abre un panorama más cercano para entender la dinámica evolutiva que siguen los organismos procariontes y más aún, pretende crear un vínculo entre la sistemática bacteriana con la biología evolutiva y la ecología microbiana. En otras palabras, se pretende que los estudios descriptivos de las especies sirvan a su vez para entender los procesos de divergencia, especiación, diversificación de los procariontes y por supuesto, la influencia que tienen las

condiciones y recursos del ambiente en dirigir tales procesos. En el caso particular de las seis distintas especies analizadas del valle de Cuatro Ciénegas y de acuerdo a los resultados de las correlaciones de las distintas matrices (Fig 8) se puede mencionar que: son unidades básicamente clonales, pero con una gran diversidad fenotípica muy probablemente como resultado de eventos de transferencia horizontal de genes y/o pérdida de genes; esta diferencia fenotípica puede estar asociada a presiones diferenciales del ambiente; la baja diversidad genética encontrada en los grupos sugiere una reciente divergencia entre ellos; hay congruencia entre las distintas filogenias; la divergencia fenotípica es mucho más rápida que la genotípica, la cual se puede explicar como resultado de la transferencia horizontal.

Muchas de estas ideas acerca de la dinámica evolutiva que siguen estas especies de *Bacillus* no son concluyentes y por supuesto requieren de métodos más sofisticados para reafirmarlos. Los análisis a nivel genómico, correlaciones más robustas entre el ambiente y los caracteres de los organismos, así como la implementación de nuevas técnicas para cultivar y aislar a los distintos grupos bacterianos son algunos de estos métodos a seguir. Como se mencionó al inicio, en la actualidad podemos acceder a este tipo de herramientas para poder descifrar esta dinámica y la sistemática bacteriana tendría también que incluirlos dentro de su programa metodológico.

Literatura citada

- Aman, R. I., C. Lin, R. Key, L. Montgomery y D. A. Stahl.** 1992. Diversity among *Fibrobacter* isolates: Towards a phylogenetic classification. *Systematic and Applied Microbiology*. **15**: 23-31.
- Avise, C.J.** 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Balmetti, T. y J. Piffaretti.** 1996. Analysis of the genetic polymorphism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by multilocus enzyme electrophoresis. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46**: 167-172.
- Barker, G. L., B. A. Handley, P. Vacharapiyasophon, J. R. Stevens y P. K. Hayes.** 2000. Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filament in the baltic sea. *Microbiology* **146**: 2865-75.
- Brown, E. W., M. L. Kotewicz y T. A. Cebula.** 2002. Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length differences test. *Molecular and Phylogenetic Evolution* **24**: 102-120
- Cohan, F. M.** 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 1985-1996.
- Cohan, F. M.** 2001. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology* **50**: 513-524.
- Cohan, F. M.** 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. **56**: 457-487
- Cracraft, J.** 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* **1**: 159-187.
- Curtis, T. P., W. Sloan y J. Scannell.** 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 494-499.
- Curtis, T. P., I. Head, M. Lunn, S. Woodcock, P. Schloss y W. Sloan.** 2006. What is the extent of prokaryotic diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 2023-2037.
- Huson, D.H. y R. Wetzell.** 1995. Analyzing and visualizing distance data with SPLITSTREE 1.0, Technical Report, FSPM, Bielefeld University, Germany.
- Huson, D. H.** 1998. Splits Tree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**: 68-73.
- Darwin, C.** 1958. *The origin of species*. J. Murray.Londres.

- Dobzhansky, T.** 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Feil, E. J., J. M. Smith, M. C. Enright y B. G. Spratt.** 2000. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* **154**: 1439-1450.
- Feil, E. J., M. C. Maiden, M. Achtman y B. G. Spratt.** 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1469-1502.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Zoology* **34**: 152-161.
- Frandsen, E. V., K. Poulsen, M. A. Curtis y M. Kilian.** 2001. Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infection and Immunity* **69**: 4479-85.
- Franzot, S. P., I. F. Salkin y A. Casadevall.** 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 838-840.
- Fraser, C., Hanage, P. W. y Spratt, G.** 2007. Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science* **315**: 476-480.
- Fulthorpe, R. R., A. N. Rhodes y J. M. Tiedje.** 1998. High level of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1620-1627.
- Gevers, D., F. Cohan, G. Lawrence, G. Spratt, T. Coenye et al.,** 2005. Opinion : re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3** : 733-739.
- Gogarten, J. P., R. D. Murphey y L. Olendzensky.** 1999. Horizontal gene transfer: pitfalls and promises. *Biology Bulletin* **196**: 359-362.
- Gogarten, P. J. y J. Townsend.** 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 679-687.
- Hahn, M. W., y M. Pöckl.** 2005. Ecotypes of planktonic actinobacteria with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habits. *Appl Environ Microbiol* **71**: 766-773.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hanage, P. W., C. Fraser, y S. Brian.** 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biology* **3**: 1-7.
- Hanage, W., C. Fraser y G. Spratt.** 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 1917-1927.

- Isctock, C. A., J. A. Bell, N. Ferguson y N. L. Isctock.** 1996. Bacterial species and evolution: theoretical and practical perspectives. *Journal of Industrial Microbiology* **17**: 137-150.
- Istock, C. A., K. E. Duncan, N. Ferguson y X. Zhou.** 1992. Sexuality in a natural population of bacteria- *Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol Ecol* **1**: 95-103.
- Jain, R., M. C. Rivera y J. A. Lake.** 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**: 3801-3806.
- Jaspers, E. y Overmann, J.** 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in Bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4832-4839.
- Jonson, J. L.** 1973. Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **23**: 308-15.
- Konstantinos, T., A. Ramette, y M. Tiedje.** 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 1929-1940.
- Kumar. S., K. Tamura y M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques, p. 115-175. In E. Strackebrant and M. Goodfellow (ed), *Bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- Lecointre, G, Rachdi, L., Darlu, P. y Deamur, E.** 1998. *Escherichia coli* Molecular Phylogeny Using the Incongruence Length Difference Test. *Molecular Biology Evolution* **15**: 1685-1695.
- Leifson, E.** 1963. Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J Bacteriol* **85**, 1183-1184.
- Li, W.-H.** 1997. *Molecular Evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Liu, S. L. y K. E. Sanderson.** 1998. Homologous recombination between *rrn* operons rearranges the chromosome in host-specialized species of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters* **164**: 275-81.

- Ludwig, J. A., y J. F. Reynolds.** 1988. Principal component analysis, p. 223-241. In Ludwig, J. A. and J. F. Reynolds (Ed.), *Statistical Ecology. A primer on methods and computing*. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- Mayden, R. L.** 1997. A hierarchy of species concept: The denouement in the saga of the species problem. En: *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, Londres.
- Maynard-Smith, J., E. J. Feil y N. H. Smith.** 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *BioEssays* **22**: 1115-22.
- Mayr, E.** 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Nakamura, L. K., M. S. Roberts. y F. Cohan.** 1999. Relationship between the *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *B. subtilis* subsp. *spizizeni*. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**: 1211-1215.
- Nedwell, D. B., T. M. Embley y K. J. Purdy.** 2004. Sulphate reduction, methanogenesis and phylogenetics of the sulphate reducing bacterial communities along an estuarine gradient. *Aquatic Microbiol Ecol* **37**: 209-217.
- Nei, M. y S. Kumar.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Nesbo, L. C., M. Dlutek, y W. F. Doolittle.** 2006. Recombination in *Thermotoga*: Implications for species concepts and biogeography. *Genetics* **172**: 759-769.
- Nixon, K.C. y Q. D. Wheeler.** 1990. An amplification of the phylogenetics species concept. *Cladistics*, **6**: 211-223.
- Ochman, H., J. G. Lawrence y E. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- O'Donnell; K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.
- Palys, T., E. Berger, I. Mitrica, L. K. Nakamura, F. y Cohan.** 2000. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1021-1028.
- Papke, R. T., O. Zhaxybayeva, E. J. Feil, K. Sommerfeld, D. Muike and W. F. Doolittle.** 2007. Searching for species in haloarchaea. *PNAS* **104**: 14092-14097.
- Posada, D. y K. A. Crandall.** 1998. Model test: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.

- Rademaker, J. L. y F. J. de Bruijn.** 1998. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis, p. 157-159. In Akkermans, A.D. L., J.E.van Elsas and de Bruijn F.J. (Eds.), *Molecular Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ravin, A. W.** 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *American Naturalist*, **97**: 307-318.
- Retchless, C. A., y G. Lawrence.** 2007. Temporal fragmentation of speciation in bacteria. *Science* **317**: 1093-1096.
- Robert, M. S. y F. M. Cohan.** 1995. recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* **49**: 1081-1094.
- Roberts, M. S. y F. M. Cohan.** 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* **49**: 1081-1094.
- Roberts, M. S., N. K. Nakamura, y F. M. Cohan.** 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46**: 470-475.
- Rokas, A., L. Barry, N. Williams y S. Carroll.** 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**: 798-804.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas.** 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and method. *Bioinformatics* **19**: 2496-97
- Sacchi, C.T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant y T. Popovic.** 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* **8**, 1117- 1123.
- Silva, C., L. E. Eguiarte y V. Souza.** 1999. reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology* **8**: 277-287.
- Simpson, G. C.** 1961 Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, Nueva York.
- Souza, V. S., T. T. Ngyen, R. R. Hudson, D. Piñero y R. E. Lensky.** 1992. Hierarchical análisis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 8389-3893.
- Stackebrandt, E. y B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16s rRNA sequence análisis in the present species

definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 846-49.

- Stackebrandt, E., W. Fredericksen, G. Garrity, P. Grimont, P. Kampf, Mayden, M. et al.**, 2002. Report. of the Ad Hoc Committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, J. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampf, C. J. M. Maiden, X. Nesme, R. Rosello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. L. Ward y B. W. Whitman.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kuntsmann, I. Dyrek y M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 12619-24.
- Taylor, T. A., J. A. Jacobson, S. Kroten, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett y M. C. Fisher.** 2000. Phylogenetics species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21-32.
- Templeton, A. R.** 1989. The meaning of species and speciation: A genetics perspective. En : *Progress in population genetics and human evolution*. Springer, Nueva york.
- Templeton, A. R.** 1998. Species and speciation: geography, populations structure, ecology and gene trees. En: *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* **22**, 4673-4680.
- Vinuesa. P., J. L. Rademaker, F. J. de Bruijn y D. Werner.** 1998. Genotypic characterization of Brayrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Island by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rRNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2096-2104.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. y Martínez-Romero E.** 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of

migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 29-54.

Ward, D. M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Ecology and industrial microbiology*, **1**: 271-277

Ward, D. M., M. Bateson, M. Ferris, M. Kühl, A. Wieland, A. Koeppel y F. M. Cohan. 2006. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **361**: 1997-2008.

Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L.H. Moore, W. E. Moore, R.G. Murray, E. Stackebrandt. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacteria systematics. *Int. Journal of Systematics Bacteriology*, **37**: 463-464.

Whitaker, R. J., D. W. Grogan y J. W. Taylor. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**: 976-978.

Wiley, E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, **27**: 17-26.

Zeigler, D. R. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1893-1900.

Bacillus coahuilensis sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico

René Cerritos,¹ Pablo Vinuesa,² Luis E. Eguiarte,¹ Luis Herrera-Estrella,³ Luis D. Alcaraz-Peraza,⁴ Jackeline L. Arvizu-Gómez,⁴ Gabriela Olmedo,⁴ Enrique Ramirez,⁴ Janet L. Siefert⁵ and Valeria Souza¹

Correspondence

Valeria Souza

souza@servidor.unam.mx

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, Mexico

²Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 565-A, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico

³Langebio, Cinvestav, Apartado Postal 629, Irapuato, Gto. 36821, Mexico

⁴Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Cinvestav Unidad Irapuato, Apartado Postal 629, Irapuato, Gto. 36821, Mexico

⁵Department of Statistics, Rice University, Houston, TX 77251, USA

A moderately halophilic, Gram-positive and rod-shaped bacterium, strain m4-4^T, was isolated from a Chihuahuan desert lagoon in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. Strain m4-4^T was found to grow optimally at 30–37 °C, pH 7.0–8.0 and 5% NaCl and to tolerate from 0.5% to 10% NaCl. It was shown to be aerobic. The genomic DNA G + C content was about 37 mol%. Strain m4-4^T exhibited minimal or no growth on most sugars tested. Its major cellular fatty acids were C_{14:0}, C_{16:0} and C_{18:1}. Based on phylogenetic analysis of 16S rRNA and *recA* gene sequences, we observed that the closest relatives of the isolate are moderately halophilic *Bacillus* species, with 16S rRNA gene sequence similarity ranging from 96.6 to 97.4% (*Bacillus marisflavi*, *Bacillus aquimaris* and *Bacillus vietnamensis*). Additionally, using genomic data it was determined that the type strain contains a total of nine rRNA operons with three slightly different sequences. On the basis of phenotypic and molecular properties, strain m4-4^T represents a novel species within the genus *Bacillus*, for which the name *Bacillus coahuilensis* sp. nov. is proposed, with the type strain m4-4^T (=NRRL B-41737^T =CECT 7197^T).

A number of halophilic and moderately halotolerant, Gram-positive, endospore-forming aquatic isolates in the genus *Bacillus* have been described. A large number of them have been isolated from marine environments (Siefert *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2003, 2004; Noguchi *et al.*, 2004; Yoon & Oh, 2005; Lee *et al.*, 2006). However, little is known about species inhabiting non-marine, high salinity aquatic environments (Lim *et al.*, 2006; Souza *et al.*,

2006). In this study, the *Bacillus* strain m4-4^T was isolated in August 2003 from a desiccation lagoon in the Churince system, a hydrological system on the western side of the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico (26° 50.830'N, 102° 09.335'W).

Strain m4-4^T was analysed using taxonomic and biochemical methods. Two markers were used for phylogenetic reconstruction (16S rRNA and *recA* gene sequences). Studies have shown that more robust results are obtained when additional markers such as housekeeping genes are used, especially in closely related isolates (Stackebrandt *et al.*, 2002; Zeigler, 2003). We determined the phylogenetic affiliation of the isolate m4-4^T by means of 16S rRNA gene phylogeny reconstruction and determined its taxonomic status as a representative of a novel species by using a polyphasic approach. The study also included genomic analysis to determine environmental genome size and diversity of ribosomal operons.

GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequences: m4-4^T, EF014450, EF014451 and EF014452; and the *recA* gene sequences: m4-4^T, EF014455; *B. marisflavi* TF-11, EF014457; *B. vietnamensis* NRIC 0530, EF014458; *B. vietnamensis* NRIC 0531^T, EF014459; *B. vietnamensis* NRIC 0532, EF014460; *B. vietnamensis* NRIC 0533, EF014461.

Photomicrographs of *Bacillus coahuilensis* m4-4^T, a phylogenetic tree of the *recA* sequences of m4-4^T and other bacilli and a table showing the fatty acid composition of m4-4^T are available with the online version of this paper.

Strain m4-4^T was isolated from surface water samples that were taken and placed in sterile flasks. These were subjected to a shock temperature of 80 °C for 20 min by means of damp heat (Istock *et al.*, 2001). Subsequently, 1:100 and 1:1000 dilutions were made. Aliquots (100 µl) from each dilution, as well as from the original water samples, were placed in Petri dishes with marine agar 2216 medium (MA; Difco) and incubated at 37 °C for 2 days. Cultures were purified by subculturing on the same medium and maintained at -80 °C in 5 % MA and 15 % (w/v) glycerol.

We studied the cell morphology and sporulation process for strain m4-4^T using phase-contrast microscopy. Cells were negatively stained with 1 % (w/v) malachite green and contrasted with 1 % (w/v) safranin. Characterization of strain m4-4^T included the study of cultural, physiological and biochemical parameters. Single carbon source assimilation tests were performed in MA (4 g l⁻¹), replacing the yeast extract and peptone with the main carbon source. Nitrate reduction was determined as described by Lányi (1987) in the presence and absence of 3 % (w/v) NaCl. Growth at different temperatures was measured on MA between 30 and 50 °C. Urease activity was determined as described previously by Cowan & Steel (1965).

For quantitative analysis of whole-cell fatty acids, strain m4-4^T was cultivated on MA for 2 days at 37 °C. The whole-cell fatty acid composition was determined by using a gas chromatograph (model 5890; Hewlett Packard) equipped with a capillary column HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film thickness) coupled to a mass spectrometer detector (model 5972; Hewlett Packard). Operating conditions were an injection temperature of

1500 °C for 3 min, increasing at the rate of 40 °C min⁻¹ to a final temperature of 3000 °C, which was maintained for 20 min. Helium was used as carrier gas with a constant flow of 1 ml min⁻¹. Fatty acid methyl esters were identified using the mass spectral library search (NIST MS Data Base) distributed by the National Institute of Standards and Technology (NIST).

A combination of Sanger (Nunally, 2005) and 454 Life Sciences sequencing methods (Margulies *et al.*, 2005) were used to sequence the m4-4^T genome, as described by Alcaraz *et al.* (2008). The genome sequencing found nine ribosomal operons; three of them had slight differences, giving sequences m4-4a, b and c (Fig. 1). The G+C content was obtained directly by genomic analysis.

The 16S rRNA gene was amplified using the 27F and 1492R primers under conditions described previously (Lane, 1991) in 100 µl final volume. The *recA* gene was chosen for sequencing and phylogenetic analysis. Oligonucleotide primers were designed using the *recA* genes of the complete genomes of *Bacillus* strains reported in GenBank. These primers extended from position 28 to 48 (5'-GATCGTCARGCAGSCYTGWGAT-3') and from position 583 to 602 (5'-TTWCCRACCATAACSCCRAC-3'), yielding a 574 bp product. PCR mixtures (25 µl) were prepared with 1 U *Taq* polymerase (Roche), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 2 µM each *recA* primer and 1 µl DNA (25–100 ng µl⁻¹). The PCR program was one cycle of initial denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 45 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s, and a final extension cycle at 72 °C for 5 min. PCR products were purified using a gel extraction

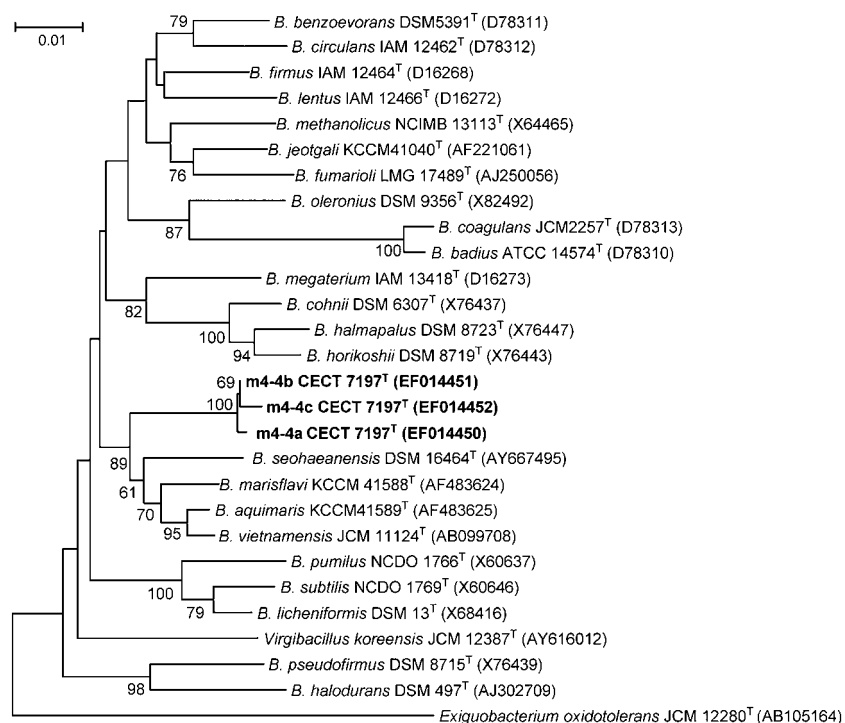


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree using the neighbour-joining method and derived from the analysis of the 16S rRNA gene sequences of strain m4-4^T and other representative *Bacillus* strains. Numbers next to the branches represent bootstrap values expressed as percentages of 2500 replications; only values greater than 70% are indicated. GenBank accession numbers of sequences are shown in parentheses. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

DNA kit (Qiagen). For the 16S rRNA gene, a fragment of approximately 1400 bp was sequenced with the primer set reported previously (Sacchi *et al.*, 2002). For the *recA* gene, a 450 bp segment was sequenced from strain m4-4^T, *B. marisflavi* TF-11^T and from four isolates of *B. vietnamensis* (NRIC 0530, 0531^T, 0532 and 0533). The sequencing reaction had a total volume of 15 µl consisting of 2 µl Big Dye Terminator sequencing buffer (Applied Biosystems), 1.6 µM primer and 5 µl purified amplified product. The amplification conditions were as follows: one cycle of 5 min at 95 °C, and 45 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 50 °C and 4 min at 60 °C. Sequencing was done in a capillary sequencer (ABI-Avant 100). Sequences (GenBank accession numbers EF014450–EF014452, EF014455 and EF014457–EF014461) were manually edited with the BioEdit program (Hall, 1999). In the case of the 16S rRNA gene sequences, isolate identities were established by comparing the

sequences obtained with the Ribosomal Database Project and the NCBI databases. Phylogenetic reconstruction for the *recA* gene was done using seven complete genomes of *Bacillus* strains reported in the NCBI database. Sequences were aligned using the CLUSTAL_W program (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic reconstruction for the 16S rRNA and *recA* genes was done using the neighbour-joining algorithm with Kimura two-parameter distances, as implemented in MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004).

Strain m4-4^T was subjected to morphological and physiological tests that showed significant differences with respect to other closely related *Bacillus* species (Table 1). Strain m4-4^T grew on only three carbon sources (starch, glycerol and trehalose). Cells were rod-shaped, approximately 0.5–0.7 µm in diameter and 1.5–3 µm in length after 2 days of cultivation at 37 °C (Supplementary Fig. S1, available in

Table 1. Differential characteristics of strain m4-4^T and closely related strains

Strains: 1, m4-4^T; 2, *B. marisflavi* JCM 11544^T; 3, *B. aquimaris* JCM 11545^T; 4, *B. vietnamensis* NRIC 0531^T. The four strains were positive for utilization of starch, glycerol, L-glutamine, citrate, trehalose and fumarate. All strains were negative for nitrate reduction, H₂S and urease.

Characteristic	1	2	3	4
Spore position*	C	s or C	C	C
Colony colour†	LY	PY	PO	O
Utilization of:				
D-Mannose	–	+	–	–
Raffinose	–	+	–	–
Sucrose	–	+	+	+
D-Glucose	–	+	+	+
Lactose	–	+	+	+
Arabinose	–	+	+	+
Dulcitol	–	+	+	+
Fructose	–	+	+	+
Adonitol	–	+	+	+
D-Sorbitol	–	+	+	+
Salicin	–	+	+	+
D-Mannitol	–	+	+	+
D-Xylose	–	+	+	+
L-Rhamnose	–	+	+	+
Optimal temperature for growth (°C)	30–37	30–37	30–37	30–40
Growth at 45 °C	–	+	–	+
Optimal pH for growth	7.0–8.0	6.0–8.0	6.0–7.0	6.0–8.0
Growth at:				
pH 4.5	–	+	–	–
pH 9.0	+	+	–	+
NaCl for growth (% w/v):				
Optimum	5	5	9	5
Maximum	10	10	15	15
Major cellular fatty acids (% of total)‡	C _{14:0} (29.4 %), C _{16:0} (22.3 %), C _{18:1} (15.2 %)	ai-C _{15:0} (27.7 %), i-C _{15:0} (22.9 %), i-C _{14:0} (9.1 %)	i-C _{15:0} (46.9 %), ai-C _{15:0} (22.2 %), i-C _{14:0} (6.5 %)	ai-C _{15:0} (48.3 %), i-C _{15:0} (16.2 %), ai-C _{17:0} (13.6 %)
DNA G + C content (mol%)	37	49	38	44

*C, Central; s, subterminal.

†LY, Light yellow; O, orange; PO, pale orange; PY, pale yellow.

‡i, iso; ai, anteiso.

IJSEM Online). The G+C content of 37 mol% for strain m4-4^T is significantly different from that for *B. marisflavi* (49 mol%) and *B. vietnamensis* (43–44 mol%), but not from that for *B. aquimaris* (38 mol%).

The major cellular fatty acids of strain m4-4^T were C_{14:0} (29.4%), C_{16:0} (22.3%), C_{18:1} (15.2%) and C_{17:0} (7.9%). Fatty acids occurring in minor amounts were C_{12:0} (1.3%), anteiso-C_{17:0} (4.7%) and anteiso-C_{15:0} (4.8%) (Supplementary Table S1). Fatty acids profile comparisons between strain m4-4^T and other species of the genus *Bacillus* reveal significant differences (Table 1).

16S rRNA gene sequence similarity between strain m4-4^T and type strains of other phylogenetically closely related *Bacillus* species (*B. marisflavi*, *B. aquimaris* and *B. vietnamensis*) ranged from 96.6 to 97.4%. Values obtained in this study meet widely accepted criteria for delineating species in current bacteriology (Stackebrandt & Goebel, 1994). A 16S rRNA gene-sequence-based neighbour-joining phylogeny analysis revealed that the three different ribosomal operons of strain m4-4^T formed a tight and highly supported clade (100% bootstrap support) nested within a deeper cluster that comprises *B. aquimaris*, *B. marisflavi*, *B. vietnamensis* and *Bacillus seohaeanensis* at a bootstrap confidence level of 87% (Fig. 1). In addition, a *recA*-based neighbour-joining tree also grouped strain m4-4^T as a strongly supported monophyletic lineage (Supplementary Fig. S2), which is distinct from the clade comprising *B. marisflavi* and *B. vietnamensis*.

Our results show that strain m4-4^T can grow in medium containing NaCl in the range 0.5 to 10% (w/v). From these data we concluded that this *Bacillus* strain is moderately halophilic (Ventosa *et al.*, 1998).

In this study we described a *Bacillus* isolate using biochemical and genomic data as well as phylogenetic reconstructions involving 16S rRNA and *recA* gene sequences. This approach showed that m4-4^T is a member of a distinct group within the genus *Bacillus*. The strain displayed characteristics typical of *Bacillus* species, like spore production and low DNA G+C content (37 mol%). However, the fatty acid composition for strain m4-4^T is completely different from those of other closely related *Bacillus* species (Supplementary Table S1). Chains C₁₄, C₁₆, and C₁₈ are characteristic for this novel isolate. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences showed that the novel isolate formed a distinct clade compared with the closely related type strains of *B. marisflavi* (JCM 11544^T), *B. aquimaris* (JCM 11545^T), *B. vietnamensis* (NRIC 0531^T) and *B. seohaeanensis* (DSM 16464^T). Phylogenetic reconstruction using *recA* gene sequences also showed that the novel isolate formed a distinct group compared with *B. marisflavi* JCM 11544^T and *B. vietnamensis* strains NRIC 0531^T, 0530, 0532, and 0533. We suggest, on the basis of the data described above, that strain m4-4^T should be placed within the genus *Bacillus* as a representative of a novel species, for which the name *Bacillus coahuilensis* sp. nov. is proposed.

Description of *Bacillus coahuilensis* sp. nov.

Bacillus coahuilensis (co.a.hui.len'sis. N.L. masc. adj. *coahuilensis* in reference to Coahuila, the state in Mexico where the type strain was collected).

Vegetative cells are rod-shaped, occurring in large chains (Supplementary Fig. S1a), approximately 0.5–0.7 µm in diameter by 1.5–3 µm in length. Central ellipsoidal endospores are observed in swollen sporangia and are 1.0 µm wide and 1.5–1.7 µm long (Supplementary Fig. S1b, c). Colonies on MA are light yellow and 2–5 mm in diameter after 2 days growth at 37 °C; they are low, convex, circular and slightly irregular. Optimal growth temperature is 30–37 °C and the maximum growth temperature is 45 °C. Minimum pH for growth lies between 5.0 and 5.5, the optimum pH for growth is between 7 and 8 and the maximum pH for growth is 9. Acid is produced from glycerol, but not from D-glucose or lactose. Citrate and fumarate can be utilized. Nitrate reduction was not present. H₂S and urease are not produced. Does not utilize sucrose, lactose, arabinose, dulcitol, fructose, adonitol, D-sorbitol, salicin, D-mannitol, D-xylose, L-rhamnose and L-glutamine as sole carbon and energy sources. DNA G+C content of the type strain is 37 mol%. Halotolerant, growing in NaCl salt concentration from 0.5 to 10%. The major fatty acids are C_{14:0}, C_{16:0} and C_{18:1}. Additionally, based on genome analysis, strain m4-4^T showed nine ribosomal operons with three different sequences (Fig. 1).

The type strain, m4-4^T (=NRRL B-41737^T =CECT 7197^T), was isolated from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico.

Acknowledgements

This research was supported by a CONACyT scholarship to C. R. The project was funded by SEMARNAT/CONACyT and SEP CONACyT (C01-0237/A1 and 44673 Q) to V. S. and L. E. F. We thank Antonio Cruz, Laura Espinosa and José Luis Hernández for specialized technical assistance and Morena Avitia and Miguel Contreras for laboratory work. Special thanks to Alejandro Rooney for incorporating the strains to the NRRL collection and Luisa Falcon and Ana M. Noguez for thoughtful comments and Mark Schneegurt for providing useful bacillus strains.

References

- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E., Putonti, C., Jiménez, B. & other authors (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* (in press).
- Cowan, S. T. & Steel, K. J. (1965). *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.
- Istock, C. A., Ferguson, N., Istock, N. L. & Duncan, K. E. (2001). Geographical diversity of genomic lineages in *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn *sensu lato*. *Org Divers Evol* 1, 179–191.

- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004).** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150–163.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
- Lányi, B. (1987).** Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol* **19**, 1–67.
- Lee, J.-C., Lim, J.-M., Park, D.-J., Jeon, C. O., Li, W.-J. & Kim, C.-J. (2006).** *Bacillus seohaeanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium that contains L-lysine in its cell wall. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1893–1898.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, S. M., Lee, J. C., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2006).** *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 373–377.
- Margulies, M., Elgholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembem, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J. & other authors (2005).** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380.
- Noguchi, H., Uchino, M., Shida, O., Takano, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (2004).** *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2117–2120.
- Nunnally, B. K. (2005).** *Analytical Techniques in DNA Sequencing*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis CRC Press.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S. & Popovic, T. (2002).** Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* **8**, 1117–1123.
- Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. A., Moore, E. R., Fox, G. E. & Jurtshuk, P., Jr (2000).** Phylogeny of marine bacillus isolates from the Gulf of Mexico. *Curr Microbiol* **41**, 84–88.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Soberon, X. & other authors (2006).** An endangered oasis of aquatic microbial diversity in the Chihuahuan desert. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6565–6570.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846–849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kämpfer, P., Maiden, C. J. M., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J. & other authors (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Ventosa, A., Nieto, J. & Oren, A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 504–544.
- Yoon, J.-H. & Oh, T.-K. (2005).** *Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1945–1948.
- Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T. K. & Park, Y. H. (2003).** *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1297–1303.
- Yoon, J.-H., Kim, I.-J., Kang, K. H., Oh, T.-K. & Park, Y.-H. (2004).** *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genomospecies, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 803–808.
- Zeigler, D. R. (2003).** Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1893–1900.

CAPÍTULO III

Diversity of culturable thermo-resistant bacterial species along an environmental gradient in an aquatic system in the valley of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México

René Cerritos¹, Luis E. Eguiarte¹, Morena Avitia¹, Janet Siefert² and Valeria Souza^{1*}

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, México.

²Rice University, PO box 1892, MS-138, Houston, TX 77251-1892.

Date of receipt and correspondence footnote:

*Corresponding author: Valeria Souza

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n anexo al Jardín Botánico Exterior. Apartado Postal 70-275, México D.F. 04510, México.

Tel. (+52-55 56229006) Fax: (+52-55 56228995)

E-mail: souza@servidor.unam.mx

Keywords: environmental gradient, aquatic system, *Bacillus*, Actinobacteria, Cuatro Ciénegas

Running title: High diversity of bacterial species along an environmental gradient

Submitted to FEMS Microbiology Ecology

Abstract

In this study we describe the diversity of cultivable high-temperature resistant strains of bacteria from an environmental gradient in the Churince aquatic system, located in the desert oasis of Cuatro Ciénegas, México. This site originates at a spring head, traverses an intermediate lagoon, and terminates in a seasonally variable dessication lagoon where calcium sulfate is the dominant salt. The system characterized by concentration gradients of salinity and oxygen with variations in pH and temperature. A total of 407 isolates were gathered from 10 sites along the system and characterized by REP-PCR and 16S rRNA. Four environmental variables were obtained in each site including temperature, conductivity, dissolved oxygen and pH. REP-PCR fingerprinting analysis revealed a large number of unique genotypes at each site. Furthermore, 16S rRNA sequences of the different REPs genotypes revealed a large number of novel isolates of the genus *Bacillus* in the dessication lagoon with affinities to marine environmental species while the intermediate lagoon and the spring head exhibited greater diversity of novel Actinobacteria related to continental environmental species. A Principal Component Analysis revealed considerable differentiation among the sites in relation to species composition and their relative abundance and a Multiple Correlation Analysis showed that salinity is the most important factor regarding species distribution. We conclude that the known endemic nature of macrobial life resident in Cuatro Cienegas extends to the microbial community in the valley. These new microbial species are a result of the environmental factors, isolation and geology of the region and are valuable in illustrating the evolutionary process of diversification.

Introduction

The distribution and abundance of organisms in relation to environmental factors is a central topic of ecological studies. Although much has been written in relation to this subject regarding animals and plants (MacArthur & MacArthur, 1961; Fajer, 1968; Reacher, 1969), information of this type concerning microorganisms have been recently studied.

Diversity of aquatic microorganisms like bacteria is known to be determined by factors such as temperature, pH, oxygen concentration and salinity (Kaartokallio *et al.*, 2005; Lüdemann *et al.*, 2000; Princic *et al.*, 1998; Sievert *et al.*, 1999; Sievert *et al.*, 2000) which can also determine the genotype distribution within species (Ferris & Ward, 1997; Laamenem *et al.*, 2002; Hahn & Pöckl, 2005). For example, it is known that salinity can determine the bacterial composition in continental and marine environments (Casamayor *et al.*, 2004; Ayadi *et al.*, 2004; Crump *et al.*, 2004; Demergasso *et al.*, 2004). In aquatic environments, oxygen concentration in combination with light intensity along a vertical gradient produces a unique species composition, and, of course, all of these should be considered within a temporal dimension (Balkwill *et al.*, 1989; Battin *et al.*, 2001; Crump *et al.*, 2004; Nedwell *et al.*, 2004). If gradients of one or more environmental conditions can be determined precisely, and if, a particular group of bacterial diversity can also be determined along this gradient, it will be possible to establish species-environment correlations at that scale and within the studied group. These types of correlations can be helpful in understanding the interaction between species and environmental conditions not only on a distribution and

abundance level, but also regarding their physiological, ecological and genetic interactions.

In this study we have analyzed the distribution and relative abundance of a specific group of bacterial species along a measurable environmental gradient. Our study site is the Churince aquatic system, found in the Valley of Cuatro Ciénegas, Coahuila, in the Chihuahuan desert, México. The Churince system, like many of the hydrological systems and pozas found in this oasis of diversity (Souza *et al.*, 2006), is extremely oligotrophic (concentrations of PO_4 lower than $1 \text{ } \mu\text{mol}$) (Elser *et al.*, 2005), rich in sulfate salts and low in sodium chloride. In addition, the Churince system has two unique characteristics within the Cuatro Ciénegas valley: 1) it has a strong gradient for salinity, temperature, pH and dissolved oxygen and 2) it is a closed continuous system with no evident physical barriers. Studies of fish and mollusks carried out in this specific system show a defined community structure as well as population fluctuations related to the environmental gradient (Carson & Dowling, 2005; Elser *et al.*, 2005). More generally, a large number of endemic species occur within the aquatic and terrestrial systems for the valley including animal and plants (Minkley, 1984; Contreras-Balderas & Lozano-Vilano, 1996; Contreras-Arquieta, 1998). These studies have suggested that Cuatro Cienegas is a model site for the study of micro evolutionary forces equivalent to the Galapagos islands (Minkley, 1984; Souza *et al.*, 2006). We believe that this high speciation and diversification is in part due to historical factors that suggest that the site is very old (Taylor, 1966; Meyer, 1973; Souza *et al.*, 2006) and has been physically isolated for a long time and in another part due

to the diversity and fluctuation of key environmental factors (Escalante *et al.*, in press).

To understand the relationship between environment and bacterial diversity, we are studying spore-forming bacteria that are resistant to high temperatures and desiccation. We chose such this specific group due to their numerical importance at the site where environmental fluctuations and high temperatures make spore formation a selective advantage (Nicholson, 2000). The most representative organisms in this group are species of the class Actinobacteria and species of the *Bacillus* genus (Souza *et al.*, 2006), which present a high diversity of species and where most species are easy to select and cultivate (Taakizawa *et al.*, 1993).

The goals of this study were primarily described the diversity of culturable thermo-resistant bacterial species along a measurable environmental gradient and then compared them by mean 16S rRNA gene sequences with the other previously described, including the environmental and strains sequences, and finally, determined the correlation between the distribution of this species with respect to different environmental factors in an aquatic system of Cuatro Ciénegas, Coahuila

Materials and methods

Study site

The Churince system is located in the valley of Cuatro Ciénegas, in northern México. This valley, in the arid zone of the Chihuahuan desert, is characterized by a system of water springs and ponds of diverse geological

nature, and it is one of the two oases found in the central and northern region of America (Johannesson *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2006).

The Churince system (Fig. 1) consists of three main zones connected by small water causeways: a spring (WS), an intermediate lagoon called Laguna Intermedia (IL) and finally, a desiccation lagoon called Laguna Grande (DL). The total length of the system is apparently superficial and measures around 3Km. The system is characterized by its strong environmental gradients. The amounts of calcium, magnesium, sodium, potassium, chlorine and sulfates are in WS 440, 54, 140, 9.3, 108 and 1250 (mg,kg⁻¹), respectively. The value of these ions in DL is 588, 262, 373, 29.9, 307 and 2900 respectively. Values of pH increase from WS to DL from 7 to 10 (Johannesson *et al.*, 2004). The environmental variables measured *in situ* were: conductivity, temperature, pH and dissolved oxygen, all of which were estimated using multi-electrode equipment (YSI, model 556 multi-probe system).

Bacterial sampling and isolation

Exploratory analyses of cultivable bacterial populations in the Churince as well as other systems in the valley were made prior to this study. The sampling was done seasonally in 2000-2002 using LB, Marine Agar media and *Vibrio* media. Single colonies were isolated, classified by colony color, size and texture to estimate the phenotypic diversity. Representative colonies were sequenced to determine their taxonomic position using a fragment of 500pb of the 16S rRNA gene. This study showed that *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, Rhizobaceae, *Vibrio*, as well as several genera of Actinobacteria class were the most representative groups along with a high diversity of rare

species (Souza *et al.*, 2006, supplementary material). Moreover, in studies using culture-independent methods as T-RFLP and 16S rRNA clone libraries of environmental DNA (Souza *et al.*, 2006; Escalante, *et al.*, in press) *Bacillus*, *Pseudomonas* and Actinobacteria were confirmed as predominant species in the aquatic community of the Churince.

In August 2003, surface water samples were taken in 10 sites along the Churince system together with the respective environmental measurements. Two sample sites are located inside the spring (WS m10, m9), four in the intermediate lagoon, and four in the desiccation lagoon (DL m4, m3, m2, m1) (Fig. 1). Three samples of surface water were collected from each of the sampling sites and placed in sterile containers.

As suggested by Istock and collaborators (1992) to select for the desired groups, ten ml of water was taken from each sample and placed in sterile flasks, which were subjected to a temperature shock of 80°C for 20 min by means of damp heat. This technique is an efficient method to select organisms capable of forming resistance structures such as spores, as well as to activate the spore germination (Istock *et al.*, 1992). Dilutions Subsequently 1:100 and 1:1000 dilutions were made of the heat shock samples, as well as from the original water samples, which were plated onto Marine Agar media (Difco 2216) and incubated at 30°C from 1 to 5 days. Resulting colonies were purified by single colony isolation on marine agar to obtain a single clone plate. Sixty single colonies per site were selected when the number of colonies was higher than 100 colonies/plate. Single colonies were obtained in all cases. The characterization of colonies was done considering their morphology, color and colony size. A number proportionate to the total of

strains was then isolated from each type of colony. Finally, the isolates were stored at -80°C in 5% of the propagation media with 15% (vol/vol) glycerol.

DNA extraction and REP-PCR fingerprint analysis

DNA was extracted using a “DNA easy tissue” Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. A total volume of 25 μl REP-PCR reactions were prepared with 1U of Taq polymerase (Roche), 5.0mM of MgCl_2 , 1mM of dNTP's, 2 μM of BOX A1R primer (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Rademaker & De Bruijn, 1998) and 1 μl of DNA 25-100 ng/ μl . The PCR conditions were the following: 2min at 95°C for initial incubation, followed by 30 cycles of 45 sec at 93°C , 1min at 50°C , and 8min at 65° , followed by a final extension step of 8min at 65°C (Vinuesa *et al.*, 1998). The band patterns obtained with this technique were analyzed manually and characterized to recognize all of the isolates belonging to the same clone and, therefore, to the same genotype.

Phylogenetic identification and analysis through the sequentiation of the 16S rRNA gene

The 16S rRNA gene from isolates was amplified using the 27F and 1492R primers under conditions previously described (Lane, 1991). The PCR product was purified using the “Gel Extraction DNA (Qiagen) kit and a fragment of approximately 500 bp was sequenced with the 1492R primer under previously described conditions (Lane, 1991). Subsequently, the complete gene, for several of the different species, was sequenced using a previously reported set of primers (Sacchi *et al.*, 2002)The sequencing reaction had a total

volume of 15 μ l consisting of 2 μ l of Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied BioSystem), 1.6 μ M of primer and 5 μ l of the purified amplified product. The amplification conditions were: 1 cycle of 5min at 95°C, 45 cycles of 10 sec at 95° C, 10sec at 50°C and 4min at 60°C. Sequencing was done in a capillary sequencer (ABI-Avant 100).

Sequences were manually verified with the BioEdit program (Hall, 1999). Isolate identity was established by comparing the obtained sequences of (16S rRNA) against the Ribosomal Database Project and Genebank (NCBI) data bases (Cole *et al.*, 2003). Sequences were aligned using ClustalX software program (Thompson *et al.*, 1997). Phylogenetic reconstruction for 16S rRNA gene were done using the neighbor joining algorithm implemented in MEGA v3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Model tests program was used for determining de substitution Model. The general time-reversible model (six rate classes) of DNA substitution. For each reconstruction assuming a portion of invariable sites with γ -distributed substitution rates of remaining sites (GTR+I+G).

Data analysis and environment-species correlation

The genotypic diversity per site was obtained with the results from REP-PCR fingerprinting. This index was calculated as N_t/N_g where N_t is the total of isolates per site and N_g is the number of genotypes per site. Values of this index range from 0 to 1; 1 indicates that each strain is represented for a genotype unique.

Richness and abundance, as well as the Simpson and Shannon indexes (Ludwig & Reynolds, 1998) were obtained for each of the sampling sites (Fig. 1). In order to identify similarities and differences in the diversity of the various

sampling sites, an Ordination Analysis was applied using the Principal Component Analysis (PCA) method (Ludwig & Reynolds, 1998). A Similitude Matrix, which includes both the identity (obtained by analyzing the 16S rRNA gene) and the species abundance (obtained through the REP-PCR fingerprinting techniques), was used in the PCA analysis (JPM program, SAS, 2005). Finally, a Main Component Multiple Correlation was applied to the different environmental conditions (Conductivity, pH, oxygen concentration and temperature) in each of the sampling points and compared against the values of the first two components in each point. This analysis, done with the NTSYS (Numerical Taxonomy) program version 2.02 (Rohlf, 1998), determined the variance percentage provided by each variable in explaining the correlation of species richness and abundance. Species were defined as a group of genotypes that share a 97% similarity of the 16S rRNA sequence.

Nucleotide sequence accession numbers

The partial 16S rRNA gene sequences of the 151 strains determined in this study have been deposited in GenBank under accession number DQ923162 to DQ923313.

Results

The Environmental conditions in Churince

Estimates of environmental parameters showed differences along the Churince system (Table 1). pH ranged from 8.3 in the spring m10 to 10.0 in m1 from the desiccation lagoon (DL). There was little variation in pH in the intermediate lagoon (IL) estimates (9.5 to 9.3). Dissolved oxygen concentration varied from 6.0 in the spring (m10) to 9.6 in the most alkaline

site in the desiccation lagoon (m1), while values at IL varied from 8.0 in m8 to 8.5 in m5. The water emerging from the underground in the spring head at the m10 site where the Churince system begins has a minimal oxygen concentration, but when it moves along the riverbed it gradually becomes oxygenated until it reaches its maximum value in DL. The variation of oxygen within intermediate lagoon suggests additional input of underground water in this site that corresponds with the fault system running along the sierra San Marcos. Conductivity values (μOhms) also increased from the spring to the desiccation lagoon, from 1400 in m10 and 4200 in m1, m2 and m3. Conductivity values at IL had the most variation in relation to the other conditions, from 1800 in m8 to 3200 in m5. A large amount of minerals are transported and carried by the fluctuating current from the spring to DL. As expected, the desiccation lagoon had the highest concentration of ions due to water evaporation. Temperature had an inverse gradient in which values varied from 31°C in WS to 23°C in m10 DL point during the sampling. Values in IL were, again, very similar; ranging from 25.5°C-26°C.

Genotypic variation and Species distribution in an environmental gradient

The REP-PCR technique identified a high degree of clonality in all of the Churince sites. In general, the results showed one genotype per species per site. Site m1 showed a genotypic diversity index of 0.20 (Table2). Sixteen of the 20 strains isolated in this site belonged to a genotype of *Staphylococcus* sp. (Fig. 2). The same is true with the species *Cellulomonas* sp. 1 and 2 with one genotype per site (m5, m6 and m10). In contrast *B. coahuilensis* sp. nov.,

Exiguobacterium sp. and *Halobacillus* sp. that were much more diverse in the desiccation lagoon presenting 7, 5 and 4 different genotypes per species respectively.

Using 16S rRNA partial sequences for compared the similitude percentage, a total of 51 cultivable thermoresistant species were identified along the Churince system, 20 of which belonged to the genus *Bacillus* and 2 to *Exiguobacterium* spp., 22 to the class Actinobacteria and 7 to different genus (*Staphylococcus*, *Luteimonas* and *Brevundimonas*) (Table 3). We identified at least 15 new discrete groups of genus *Bacillus* from Churince including the newly described *B. coahuilensis*.(Fig. 2) (Cerritos *et al.*, in press) . Furthermore, we founded that several groups showed differences of 6%, 4% and 3% when comparing this sequences with the most closets reported in the gene bank data base. For example strains m1-17, m3-9 and m8-3 showed differences with *B. isabelae* of 6%, *B. marisflavi* of 4% and *B. chardigarhensis* of 3% respectively. For Actinobacteria class we founded that Almost 7 of this 21 Actinobacteria species can be considered as a new (Fig. 3), for example, strains of the genus *Onithinimicrobium* (m10-36, m6-33), *Curtobacterium* (m6-44), *Citrococcus* (m2-14) and *Nocardiodes* (m8-36) showed a similitude percentage highest to 3% with respect to species near closest deposited in the gene bank data base.

On the other hands, a unique species composition was evident in each of the sampling sites (Table 3). *Bacillus* species are mostly distributed in sites belonging to the extreme, unpredictable desiccation lagoon (DL), while almost all the Actinobacteria group was found associated to the more mesic conditions in IL and in the WS. Moreover, a relative of the marine *Bacillus*

aquamaris: *B. coahuilensis* (Cerritos *et al.*, in press), was found in the salty sites from DL (m2, m3 and m4) as well as the halophilic *Halobacillus* sp. (sites m1, m2 and m3), and other *Bacillus* spp. (m1, m2 and m5).

The only species of the Actinobacteria class found in DL, (site m2), were the halophilic *Citroccoccus* sp. and *Kokuria* sp. The intermediate lagoon had the largest diversity of Actinobacteria. We found two different non-described *Cellulomonas* sp. that are very abundant in sites m5 and m10; while strains closest to *Kokuria* sp. is common in sites m6, m7 and m8, as well as the two non-described species of *Microbacterium*. In the spring, we also found several individuals of *Luteimonas* sp., *Aeromicrobium* sp. and *Brevundimonas* sp.

The distribution of some of these species, such as *Bacillus* sp. and *Psychrobacter* sp. in the desiccation lagoon site m2, *Curtobacterium* sp. in the intermediate lagoon site m7 and *Cellulosimicrobium* sp., *Aeromicrobium* sp. and *Brevundimonas* sp. in site the spring, is restricted to only one site. In general terms, the number of species per site in IL and WS is higher compared to DL. The Simpson and Shannon Indexes varied similarly (Table 2). The contrasting sites: m2 (the saltiest within the desiccation lagoon) and m10 (spring) had the highest number of species (Table 3) followed by site m8 in the river with 12 species. The highest diversity indexes were found in site m8, with values of 7.83 and 2.27, for the Simpson and Shannon indexes respectively. In contrast, the sites with the lowest number of species and lowest diversity values were the desiccation lagoon sites m1, m3, m4 and the delta of the river that feeds into the lagoon m5 (Table 2).

Environmental conditions and species composition

Data ordainment analysis with PCA revealed a great differentiation between sites (Fig. 5). Species composition in each site showed close relationship between the saline sites m1, m2 and m3 and in the delta of the river m4. These sites shared species, especially those of the *Bacillus* genus such as *B.coahuilensis*, *B. litoralis*, *Halobacillus sp.* and *B. marisflavi sp.* Nevertheless, there is a very large difference between the remaining sites, especially those of the heterogeneous intermediate lagoon. Sites m5 and m6, had the widest difference between these two principal components, and, although they share species (*Cellulomonas* and *Ornithinimicrobium sp.*), the different sampling sites in the lagoon showed a marked difference in species variation and abundance. This pattern agrees with the species composition found in each of the sites (Supplementary Table 1), showing in some cases a shared species assemblage but with differences regarding relative abundance.

Conductivity is the environmental condition that better explains the variance between components 1 and 2, with 66.3 and 50.4 % respectively (Table 4). The conditions with the least effect on the correlation were, pH for component 1 (6.1%) and, temperature, for component 2 (16.0 %). The correlation between composition and conductivity is very evident, especially in DL sites where conductivity values did not vary in sites m1, m2 and m3, (Table 1) as they have a very similar species composition, particularly of the genus *Bacillus*. On the other hand, there is large variation in the conductivity values in intermediate lagoon, consistent with the varied species composition of Actinobacteria (Supplementay Table 1). Temperature, pH and oxygen concentration values, on the other hand, showed very little variation between

the IL sites, a fact that does not agree with the results on species composition. Finally, these same conditions varied a lot between sites in the desiccation lagoon. Even though we are actively selecting to isolate strains that are capable of making spores. Based on the clone library data and the preliminary description of the cultivable bacteria, we believed that the studied strains are mostly coadapted to their environmental conditions and that they are mostly metabolically active.

Discussion

Relation between the environmental conditions with the isolates distribution

As a first clue we obtained that the thermo-resistant bacterial species composition along the Churince system is mostly explained by the conductivity gradient. It has been previously reported that conductivity is one of the environmental factors that can affect the composition of species of bacteria (Dean-Ross & Mills, 1989; Schutlz & Ducklow, 2000; Ayadi *et al.*, 2004; Casamayor *et al.*, 2004; Demergasso *et al.*, 2004). On a physiological level, bacteria that inhabit extremely saline environments have certain characteristics, especially concerning osmotic regulation. Studies on moderate halophylic bacteria of the genus *Halobacillus* (Roebler & Müller, 1998) show a very strong correlation between the structure of the ionic pumps that control the entrance of sodium (Na⁺) and chloride (Cl⁻), with the concentration of these ions in the environment. Sites of DL showed a very similar species composition to the one found in extreme and/or moderate saline environments (Tiago *et al.*, 2004) even, as we already mentioned, there

is no sodium chloride abundance in Churince but a large amount of sulfate salts. We also know that the phylogenetically nearest species of our strains such as *Staphylococcus* sp., *Citrococcus*, *Halobacillus* sp., and several *Bacillus* spp. and *B. aquimaris*, among others, have been isolated in marine environments, hypersaline lagoons and soils with high concentrations of Cl and Na (Humayoun *et al.*, 2003). In spite of this, it is very probable that the characteristics regarding the physiological regulation of species inhabiting the desiccation lagoon are very similar to those of bacteria from saline environments where chloride and sodium are the most abundant ions.

Affinities of the isolates with other described species: continental and marine origin

The phylogenetic reconstruction of the thermoresistant cultivable bacteria from Churince shows the diversity and divergence from the previously well-known species in these studied groups as new groups emerge in the tree (Fig. 3 and 4). In general, we observed that species of *Bacillus* from the saltier parts of the system (DL) have a greater affinity with bacteria from marine environments, even if sodium chloride is rare in the system, while species found in the intermediate lagoon and in the spring have greater affinities to cosmopolitan species (*B. subtilis* and *B. pumilus*) or to species of different continental environments (*B. humi* and *B. halmapus*). Besides, the isolated *Exiguobacterium* sp., are equally related to bacteria of cold marine origin, presenting two subgroups, one of which is found in the m2 site and the other in the m5.

The phylogenetic reconstruction of the class Actinobacteria (Fig. 4) revealed 22 groups, most of which have affinity to bacteria from alkaline

aquatic environments and from other continental environments (Taakizawa *et al.*, 1993; Maldonado *et al.*, 2005; Warnecke *et al.*, 2005). As an example, the most abundant genera in the intermediate lagoon are: *Agrococcus*, *Microbacterium* and *Ornithinimicrobium*, that share affinities with bacteria from slightly alkaline, underground water systems. On the other hand, the strains isolated of *Janibacter* and *Kokuria*, are very similar to bacteria from continental and marine environments from Korea, China and Japan. Interestingly, related strains isolated from the hot and unpredictable desiccation lagoon site (m2), are very similar to *Psycobacter* sp. that has only been found in environments where the temperature is very low, such as the Antarctic Sea (Bowman, 1996). Moreover, this is not one isolated case as several other new species were found in the system, all of them appear to show the same pattern (Figures 3 and 4). It has been described that the swallow sea of Cuatro Ciénegas Basin has indeed been connected to the cold polar waters by the “Bear Paw geological event” that connected the proto-Gulf of Mexico with the Northern seas of Europe and the Antarctic (Emery & Uchupi, 1984). 95-75 million years ago. The data of spore forming cultivable bacteria reinforces the environmental DNA findings where 50% of the clones were related to marine microbes, strongly suggesting that Cuatro Ciénegas pozas present a relict biota of the Jurassic/Cretacic era (Souza *et al.*, 2006).

Explaining the highest genotypic diversity and of species in the Churince system

This research showed that aquatic systems in Cuatro Ciénegas Coahuila is a important source of potentially new species of the genus *Bacillus* and class

Actinobacteria. We can hypothesize for the *Bacillus* species that if DNA is an important source of Phosphorous and the study site is extremely oligotrophic then, we would expect that the transforming ability of this group would allow the microorganism to ingest the missing nutrient as soon as a neighbor bacteria dies, we would also expect that at least some of this DNA would be incorporated as information rather than food, mostly increasing the genetic diversity and possibly, the acquisition of novel function. Most of the studied species of the genus *Bacillus* are not only capable of forming spores but also of natural transformation (Istock *et al.*, 2001). We could also hypothesize that under certain circumstances, horizontal gene transfer will act as a powerful diversifying force generating new adaptative possibilities and even new species. The complete genome sequence of *B. coahuilensis* (m4-4) reveals several events of horizontal gene transfers, wich provide insights into the divergence, evolution and adaptation to the Cuatro Cienegas Valley environment. This genes acquired from horizontal transfer includes novel functions involved in the phosphorous utilization efficiency (Alcaraz, *et al*, in press).

It is possible that Actinobacteria and *Bacillus* species are under the same evolutionary scheme showing a clonal-type population structure with a low degree of recombination and with epidemic adaptations a specific environment (Cohan, 2001). For example by Actinobacteria species, although various genotypes of the genus *Agrococcus*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Kokuria* and *Agromyces* were present, none of them is shared by the sites in spite of having a 100% identity in the fragment of the 16S rRNA gene. Previous research has reported that species of Actinobacteria with a 100%

identity in the 16srRNA gene can show physiological differences in response to different environments (Nedwell *et al.*, 2004; Hahn & Pöckl, 2005). It is also possible that the species of continental Actinobacteria that we found in Cuatro Ciénegas have restricted ecological niches and that they are not successful in competing in more salty waters. For the *Bacillus* species when we analyzing the genetic structure for 5 different groups isolates of Churince and other aquatic systems in the Cuatro Ciénegas valley we founded a clonal population structure, a low degree of recombination, and finally there are several strains with a 100% identity in the 16SrRNA, RecA and gltX genes, however, showed a great physiological differences between them. (Cerritos *et al.*, in process).

Cuatro Ciénegas valley is an acknowledged important site for the study of diversification in endemic macroscopic organisms (Minkley, 1984; Contreras-Balderas & Lozano-Vilano, 1996; Contreras-Arquieta, 1998). This research increases the newly obtained information about the bacterial biodiversity (Souza *et al.*, 2006, Escalante *et al.*, in press, Falcon *et al.*, in press, Alcaraz *et al.*, in press) of this unique oasis of biodiversity. Bacterial species probably have become historically isolated and diverged from the original populations due to the geographic isolation as well as the environmental heterogeneity and chemical barriers. Constantly, genotypes with local adaptations have appeared and disappeared due to the environmental instability. It has been shown that non equilibrium situations were season fluctuation as well as moderate perturbation (as the aridification of the Chihuahuan desert) can maintain a large number of species that can adapt to very local and temporal situations.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by an UNAM scholarship to RC, as well as grants from SEMARNAT (0237) and CONACyT SEP (44673) to VS and LE. We thank Ana Escalante, Laura Espinosa and Ana Noguez for their helpful opinions, field work and laboratory support, as well as Antonio Cruz for field work, media preparation and colony isolation. Special thanks to Alejandro Zavala for statistical support and Mike Travisano, Luisa Falcon and Rodolfo Salas for thoughtful comments.

REFERENCES

- Ayadi H, Abid O, Elloumi J, Bouaïn A & Sime-Ngando T (2004) Structure of the phytoplankton communities in two lagoons of different salinity in the Sfax saltern (Tunisia). *J Plank Res* **26**: 669-679.
- Badino G, Bernabei T, De Vivo A, Giulivo I & Savino G (2004) Under the Desert: The Mysteriuous Waters of Cuatro Cienegas. Associazione geografica La Venta, Treviso, Italy.
- Balkwill DL, Fredrickson JK & Thomas JM (1989) Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep sotheast coastal plain subsurface sediment. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1058-1065.
- Battin TJ, Wille A, Sattler B, & Psenner R (2001) Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradient in a glacial stream. *Appl Environ Microbiol* **67**: 799-807.
- Benlloch S, López-López A, Casamayor E, O.; Øvreås L, Goddard V, Daae Frida L, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedrós-Alió C & Rodríguez-Valera F (2002) Bacterial and archaeal assemblages have been studied in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 349-360
- Bowman JP, Cavanagh J, Austin JY & Sanderson K (1996) Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. *Int J Sys Bacteriol* **46**: 841-848.
- Carson EW & Dowling TE (2005) Influence of hydrogeographic history and hybridization on the distribution of genetic variation in the pupfishes *Cyprinodon atrorum* and *C. bifasciatus*. *Mol Ecol* **15**: 667-679.

- Casamayor E, Calderon-Paz J & Pedrós Alió C (2004) 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokariotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **34**: 113-119.
- Cerritos R, Vinuesa P, Eguiarte L, Herrera-Estrella L, Alcaraz-Peraza L, Arvizu-Gómez J, Olmedo G, Ramirez E, Siefert J & Souza V (2007) *Bacillus coahuilensis* sp. nov. a new moderately halophilic species from pond in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, México. *Int J Syst Evol Microbiol*. In press
- Cohan F (2001) Bacterial species and speciation. *Syst Biol* **4**: 513-524.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrel DM, Schmidt TM, Garrity GM & Tiedje JM (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): Previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokariotic taxonomy. *Nucleic acid Res* **31**: 442-443.
- Contreras-Arquieta A (1998) New records of the snail *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Thiaridae) in the Cuatro Ciénegas basin, and its distribution in the state of Coahuila, México. *South Nat* **43**: 283-286.
- Contreras-Balderas S & Lozano-Vilano M L (1996) Extinction of most Sandia and Potosí valleys (Nuevo León, México) endemic pupfishes crayfishes and snail. *Icht Exp Fresh* **7**: 33-44.
- Crump BC, Hopkinson C, Sogin M & Hobbie JE (2004) Microbial Biogeography along an estuarine salinity gradient: Combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1494-1505.
- Dean-Ross D & Mills AL (1989) Bacterial community structure and function along a heavy metal gradient. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2002-2009.

- Demergasso L, Casamayor E, Chong G, Galleguillos P, Escudero L & Pedrós-Alió C (2004) Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama desert Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 57-69.
- Elser JJ, Schambel JH, Kyle M, Watts J, Carson EW, Dowling TE, Tang C & Roopnarine PD (2005) Response of grazing snails to phosphorus enrichment of modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biol* **50**: 1808-1825.
- Emery K. O. y E. Uchupi, 1984, The geology of the Atlantic Ocean, Nueva York, Springer Verlag
- Fajer EW (1968) The community of invertebrates in decaying oak wood. *J Anim Ecol* **37**: 121-142.
- Ferris MJ & Ward DM (1997) seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1375- 1382.
- Hahn MW, & Pöckl M (2005) Ecotypes of plancktonic actinobacteria with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habits. *Appl Environ Microbiol* **71**: 766-773.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**:95-98.
- Humayoun SB, Bano N & Hollibaugh JT (2003) Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. 2003. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1030-1042.

- Istock CA, Ferguson N, Istock NL & Duncan KE (2001) Geographical diversity of genomic lineages in *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn sensu lato. *Org Divers Evol* **1**: 179-191.
- Istock CA, Duncan KE, Ferguson N & Zhou X(1992) Sexuality in a natural population of bacteria- *Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. *Mol Ecol* **1**: 95-103.
- Johannesson HK, Cortés A & Kilroy KC (2004) Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *South Ame Earth Sci* **17**: 171-180.
- Kaartokallio H, Laamanen M & Sivonen K (2005) Responses of Baltic sea ice and open-water natural bacterial communities to salinity change. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4364-4371.
- Kumar S, Tamura, K & Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Laamenem MJ, Forsström L & Sivonen K (2002) Diversyty of *Aphanizomenom flos-aquae* (Cyanobacterium) populations along a baltic sea salinity gradient. *Appl Environ Microbiol* **68**: 52-96-5303.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques, p. 115-175. In E. Strackebrant and M. Goodfellow (ed), Bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- Lüdemann H, Arth I & Liesack W (2000) Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl Environ Microbiol* **66**: 754-762.

- Ludwig JA, & Reynolds JF (1988) Principal component analysis, p. 223-241. In Ludwig, J. A. and J. F.Reynolds (Ed.), *Statitistical Ecology. A primer on methods and computing*. John Wiley and Sons, New York, N. Y.
- MacArthur RH & MacArthur JW (1961) On bird species diversity. *Ecology* **42**: 598-598.
- Maldonado LM, Stach JE, Pathom-aree W, Ward AC, Bull A L & Goodfellow M (2005) Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**: 11-18.
- Meyer ER (1973) late-Quaternary Paleoecology of the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. *Ecology* **54**: 982-995.
- Minkley WL (1984) Cuatro Ciénegas fishes: research review of a local test of diversity vesus habiat size. *Arizona-Nevada Acad Sci* **19**: 13-21.
- Nedwell DB, Embley TM & Purdy KJ (2004) Sulphate reduction, methanogenesis and phylogenetics of the sulphate reducing bacterial communities along an estuarine gradient. *Aquatic Microbiol Ecol* **37**: 209-217.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ & Setlow P (2000) Resistance of endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environment. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 548-572.
- Princic A, Mahne I, Megusar F, Paul EA & Tiedje JM(1998) Effects of pH and Oxygen and Ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3584-3590.
- Rademaker JL & de Bruijn FJ (1998) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis, p. 157-159. In Akkermans, A.D. L., J.E.van Elsas and de Bruijn

- F.J. (Eds.), *Molecular Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Reacher HF (1969) Bird diversity and habitat diversity in Australia and North America. *Am Nat* **103**: 75-80.
- Roebler M & Müller V (1998) Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3813-3817.
- Rohlf JF (1988) NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system (2.02c). Exeter publishing. USA.
- Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW, Morey R, Steigerwalt A, Boras A, Weyant RS & Popovic T (2002) Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* **8**: 1117- 1123.
- SAS. (2005) Institute, Cary, NC, USA
- Schutlz GE & Ducklow H (2000) Changes in bacterioplankton metabolic capabilities along salinity gradient in the York river estuary, Virginia, USA. *Aquatic Microbiol Ecol* **22**: 163-174.
- Sievert SM, Brinkhoff T, Muyzer G, Ziebis W & Kuever J (1999) Spatial heterogeneity of bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl Environ Microbiol* **65**: 3834-3842.
- Sievert SM, Ziebis W, Kuever J, & Sahm K (2000) Relative abundance of archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallow-water hydrothermal vent quantified by rRNA slot-blot hybridization. *Microbiology* **146**: 1287-1293.

- Souza V, Espinoza-Asuar L, Escalante AE, Eguiarte LE, Farmer J, Forney L, Lloret L, Rodríguez-Martínez JM, Soberón J, Dirzo R & Elser JJ (2006) An endangered oasis of aquatic microbial diversity in the Chihuahuan desert. *Proc Nat Acad Sci* **17**: 6565-6570.
- Taakizawa M, Colwell RR, & Hill RT (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* **59**: 997-1002.
- Taylor DW (1966) A remarkable snail fauna from Coahuila, Mexico. *Veliger* **9**: 152-228.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res* **24**: 4876-4882.
- Tiago I, Chung AN & Verissimo A (2004) Bacterial Diversity in a Nonsaline Alkaline environment heterotrophic aerobic populations. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7378-7387.
- Vinuesa P, Rademaker JL, de Bruijn FJ & Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Island by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rRNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2096-2104.
- Warnecke F, Sommaruga R, Sekar R, Hofer JS & Pernthaler J (2005) Abundances, Identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5551-5559.

Yannarell AC, & Triplett EW (2005) Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* **71**: 227-239.

Yoon JH, Kim IG, Kang KH, Oh TK & Park YH (2003) *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow sea in Korea. *Int J Sys Evol Microbiol* **53**: 1297-1303.

Tables and figures

Figure 1.

Map of the Churince system, constituted by the water spring (WS), the intermediate lagoon (IL) and the dessication lagoon (DL). The 10 sampling points are shown.

Figure 2.

Band patterns per site using the REP-PCR fingerprinting technique. Note the few band patterns in DL and the large majority of patterns per site that are unique. Letter above of the band indicated the taxonomic group. B= *Bacillus* spp., A= Actinobacteria, S= *Staphylococcus* spp., P= *Luteimonas* sp., *Brevundimonas* sp.

Figure 3.

Phylogenetic reconstruction of representatives of the genus *Bacillus* isolated in the course of this research, and high identity species, from data bases using the bayesian method of a fragment of 500 pb of the 16S rRNA gene. Numbers next to the branches represent the estimates of posteriori probabilities. The most similar individuals to each group are included indicated the access number.

Figure 4.

Phylogenetic reconstruction of the class Actinobacteria using the bayesian method of a fragment of 500 pb of the 16S rRNA gene. Number on branches are estimates for a posteriori probabilities. The most similar individuals to each group are included indicated the access number.

Figure 5.

Principal component analysis showing differences and similarities between the diverse sampling sites in relation to species composition. Sites m1, m2 and m3 are very similar between them.

Table 1.

Environmental measurements per site within the Churince system. Note that the values of pH, oxygen concentration and conductivity increase from the Water spring to the Desiccation lagoon, and that temperature follows an inverse pattern.

Table2.

Summary of the diversity results and clonality indexes per site. The number of strains and the number of species obtained from the sequencing of 16S rRNA gene is also shown.

Table 3. Similitude Percentage of several groups of *Bacillus* genus and Actinobacteria class respect to the sequences most related reported in the gene bank database. According to bacterial taxonomy strains that showed differences of 3% in the 16S rRNA gene can be proposed as new specie.

Table 4.

Results of the multiple correlation analysis between the environmental variables against components 1 and 2. Note that salinity provides the highest percentage of the correlations variance.

Supplementary Table 1. Total number of strains of the Churince system isolates in 2003. For 157 strains were sequenced.

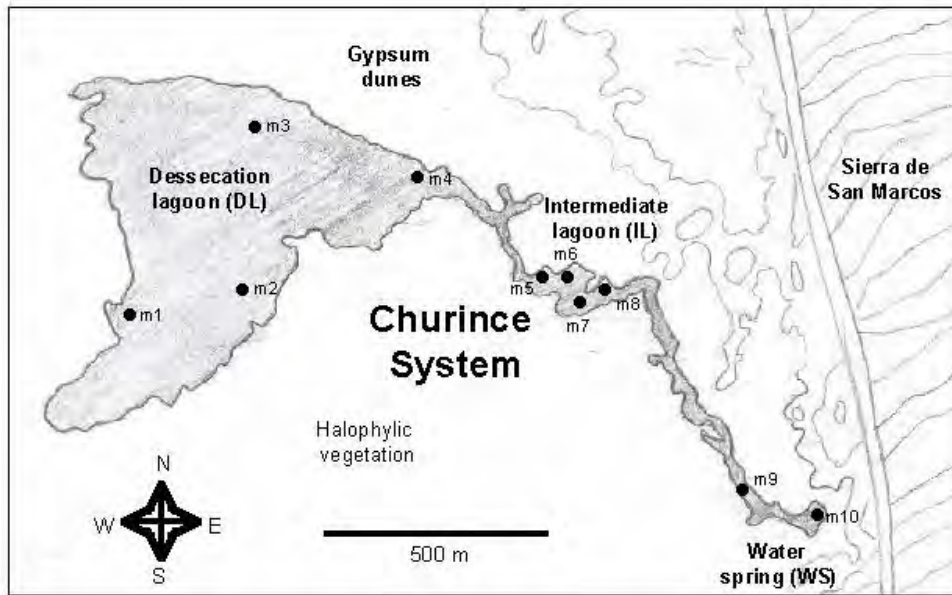


Figure 1

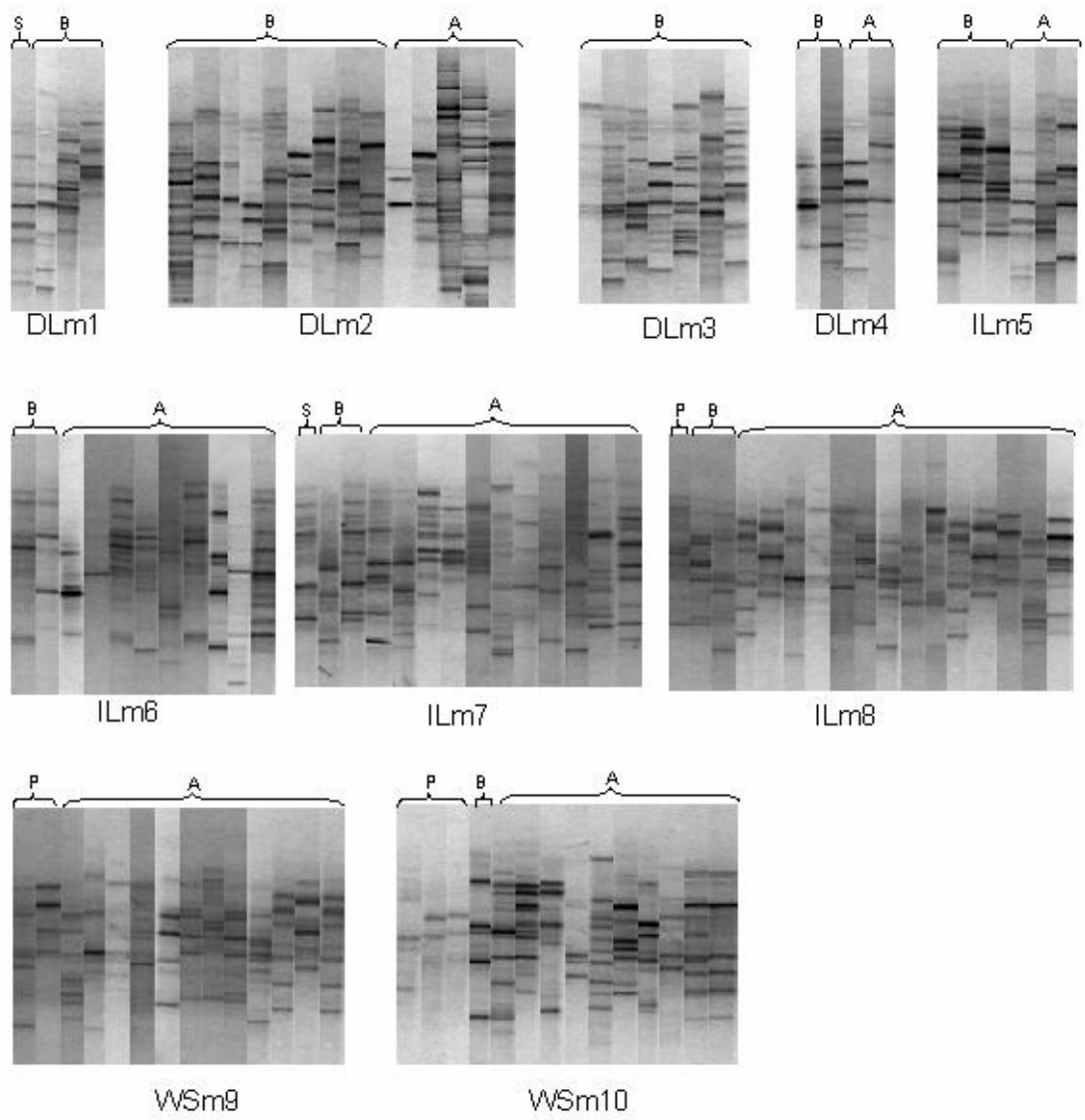


Figure 2.

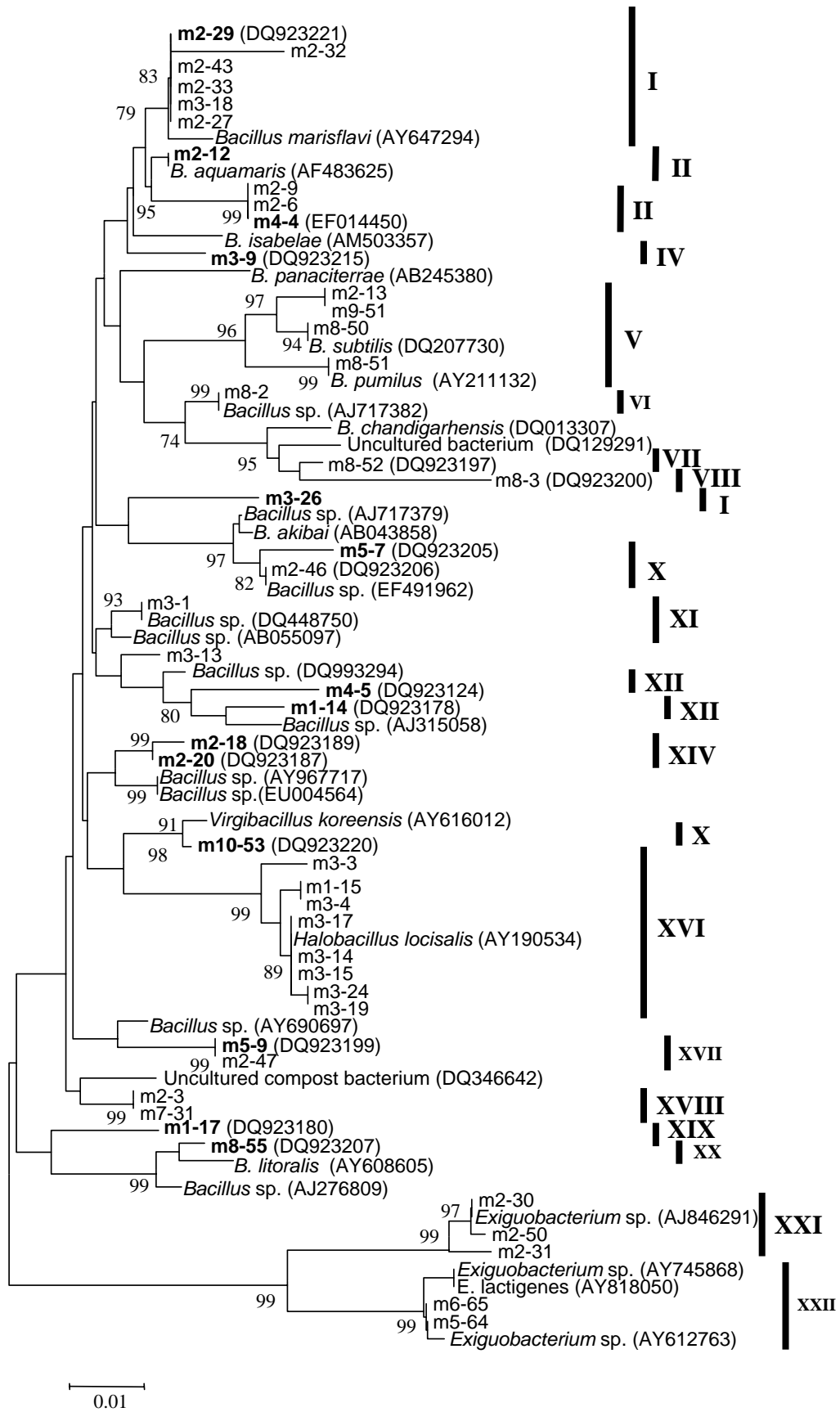


Figure 3.

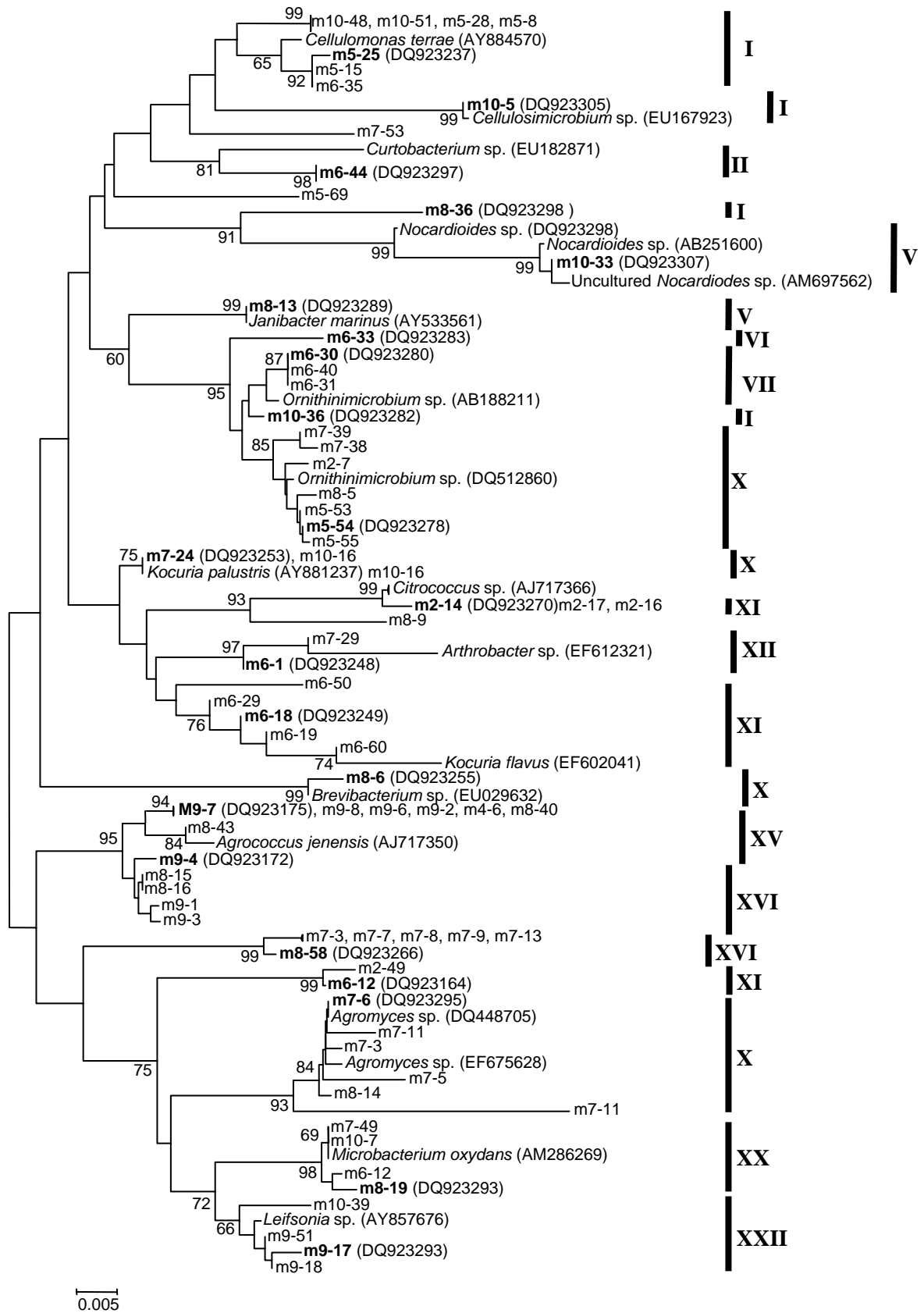


Figure 4.

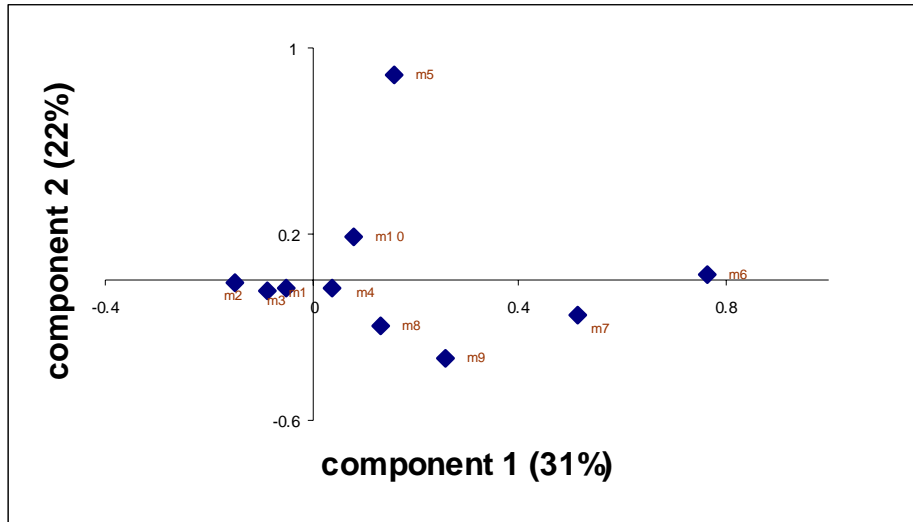


Figure 5.

Table 1

Sample	Latitude	Longitude	pH	DO	Conductivity (μmhos)x1000	$T(^{\circ}\text{C})$
DLm1	26°50.830'N	102°09.335'E	10	9.6	4.2	23
DLm2	26°51.199'N	102°09.009'E	9.8	9.5	4.2	24.5
DLm3	26°51.146'N	102°08.964'E	9.7	9.5	4.2	25
DLm4	26°51.222'N	102°09.040'E	9.6	9	3.2	25.5
ILm5	26°51.021'N	102°08.644'E	9.5	8.5	3.2	25.5
ILm6	26°50.927'N	102°08.539'E	9.3	8.2	2	26
ILm7	26°50.910'N	102°08.438'E	9.3	8	2	26
ILm8	26°50.897'N	102°08.558'E	9.3	8	1.8	26
WSm9	26°50.717'N	102°08.295'E	8.9	7.5	1.6	29.5
WSm10	26°50.421'N	102°08.047'E	8.3	6	1.4	31

Table 2.

Site	# Isolates	REP-PCR	# Species	Diversity index		
		Types	Diversity index	(16S rDNA)	<i>S</i>	<i>H</i>
DLm1	20	4	0.20	4	1.52	0.71
DLm2	47	14	0.40	13	5.05	2.05
DLm3	28	7	0.25	5	3.40	1.40
DLm4	8	4	0.25	4	4.00	1.38
ILm5	60	6	0.12	6	4.10	1.27
ILm6	56	11	0.20	7	3.71	1.56
ILm7	47	15	0.32	10	4.54	1.84
ILm8	46	18	0.39	13	7.83	2.27
WSm9	55	14	0.25	7	4.17	1.75
WSm10	50	15	0.30	12	6.61	1.98

(*S*) Simpson index and (*H*) Shannon index

Table 3

Type strain	access	pb number	Sequence most related	16S rRNA similitude
<i>Bacillus</i> spp.				
m1-14	DQ923178	1000	<i>B. panaciterrae</i> (AB245380)	94%
m1-15	DQ923179	581	<i>Halobacillus</i> sp. (AB166985)	99%
m1-17	DQ923180	1049	<i>Bacillus isabelae</i> (AM503357)	94%
m2-12	DQ923181	579	<i>B. aquimaris</i> (AF483625)	99%
m2-18	DQ923189	476	<i>Bacillus</i> sp. (EU004564)	98%
m2-20	DQ923187	581	<i>Bacillus</i> sp. (EU004564)	98%
m2-29	DQ923221	1400	<i>B. aquimaris</i> (AF483625)	98%
m2-3	DQ923190	579	<i>Bacillus</i> sp. (AB362829)	98%
m2-30	DQ923212	586	<i>Exiguobacterium</i> sp. (EF100530)	99%
m3-1	DQ923192	583	<i>Bacillus</i> sp. (DQ448750)	99%
m3-26	DQ923203	577	<i>B. thuringiensis</i>	100%
m3-9	DQ923215	1400	<i>B. marisflavi</i> (AF483624)	96%
m4-4*	EF014450	1400	<i>B. aquimaris</i> (AF483625)	97%
m4-5	DQ923124	528	<i>Bacillus</i> sp. (DQ993294)	97%
m5-64	DQ923195	583	<i>Exiguobacterium homiense</i> (DQ351341)	99%
m5-7	DQ923205	1203	<i>Bacillus</i> sp. (EF491962)	98%
m5-9	DQ923199	579	<i>Bacillus</i> sp. (DQ223135)	98%
m8-2	DQ923208	579	<i>B. foraminis</i> (AJ717382)	99%
m8-3	DQ923200	1385	<i>B. chardigarhensis</i> (DQ013307)	97%
m8-52	DQ923197	1386	<i>Bacillus</i> sp. (AJ276809)	98%
m8-55	DQ923207	1000	<i>Bacillus</i> sp. (AJ276809)	3%
m9-51	DQ923201	577	<i>B. licheniformis</i> (EF203098)	100%
m10-53	DQ923220	1398	<i>Virgibacillus korensis</i> (AY616012)	98%
Actinobacteria				
m2-14	DQ923270	1428	<i>Citrococcus</i> sp. (AJ717366)	97%
m4-6	DQ923163	1452	<i>Agrococcus jenensis</i> (AJ717350)	98%
m5-25	DQ923237	578	<i>Cellulomonas terrae</i> (AY884570)	99%

m5-54	DQ923278	657	<i>Ornithinimicrobium</i> sp. (DQ512860)	99%
m6-1	DQ923248	500	<i>Arthrobacter</i> sp. (EF612321F)	100%
m6-12	DQ923258	668	<i>Microbacterium oxydans</i> (AM286269)	100%
m6-18	DQ923249	495	<i>Kocuria flavus</i> (EF602041)	99%
m6-30	DQ923280	999	<i>Ornithinimicrobium</i> sp. (AB188211)	96%
m6-33	DQ923283	404	<i>Ornithinimicrobium</i> sp. (AB188211)	97%
m6-44	DQ923297	614	<i>Curtobacterium</i> sp. (EU182871)	97%
m7-24	DQ923253	494	<i>Kocuria palustris</i> (AY881237)	99%
m7-6	DQ923295	1006	<i>Agromyces</i> sp. (EF675628) F	99%
m8-12	DQ923164	601	<i>Agrococcus jenensis</i> (EU169180)	99%
m8-13	DQ923289	651	<i>Janibacter marinus</i> (AY533561)	99%
m8-19	DQ923265	668	<i>Microbacterium oxidans</i> (AB365061)	99%
m8-36	DQ923298	452	Uncultured <i>Nocardiodes</i> (AM697562)	97%
m8-6	DQ923255	500	<i>Brevibacterium</i> sp. (EU029632F)	99%
m9-17	DQ923293	517	<i>Leifsonia</i> sp. (AY857676)	98%
m9-4	DQ923172	614	<i>Agrococcus</i> sp. (AJ717350)F	99%
m10-33	DQ923307	571	<i>Nocardiodes</i> sp. (AB251600)	99%
m10-36	DQ923282	517	<i>Ornithinimicrobium</i> sp. (AB188211)	97%
m10-5	DQ923305	600	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. (EU167923)	99%
Others				
m8-11	DQ923292	510	Uncultured <i>Paracoccus</i> (EU071512)	98%
m7-52	DQ923302	563	Uncultured <i>Paracoccus</i> (DQ532129)	97%
m1-20	DQ923308	554	<i>Staphylococcus</i> sp. (EU177793)	99%
m10-20	DQ923304	554	<i>Brevundimonas</i> sp. (DQ413170)	99%
m10-45	DQ923313	551	<i>Luteimonas aestuarii</i> (EF660758)	99%
m2-41	DQ923306	349	<i>Psychrobacter</i> sp. (AM11100)	98%

Table 4.

	r^2	Conditions		T (°C)	Do
		pH	Conductivity		
Component 1	0.56	6.1	66.3	16.3	11.1
Component 2	0.49	24.5	50.4	16.0	24.1

Supplementary Table 1

Genus	strains	Gen Bank access number	Total strains/ site/ genus
<i>Agrococcus</i>			
	m2-49	DQ923162	
	m4-6	DQ923163	
	m8-12	DQ923164	
	m8-15	DQ923165	
	m8-16	DQ923166	
	m8-40	DQ923167	
	m8-43	DQ923168	
	m9-1	DQ923169	
	m9-2	DQ923170	
	m9-3	DQ923171	
	m9-4	DQ923172	
	m9-5	DQ923173	1 (m2)
	m9-6	DQ923174	2 (m4)
	m9-7	DQ923175	11 (m8)
	m9-8	DQ923176	20 (m9)
	m9-9	DQ923177	
<i>Bacillus</i>			
	m1-14	DQ923178	
	m1-15	DQ923179	
	m1-17	DQ923180	
	m2-12	DQ923181	
	m2-18	DQ923182	
	m3-4	DQ923183	
	m3-15	DQ923184	
	m3-24	DQ923185	
	m2-13	DQ923186	
	m2-20	DQ923187	
	m3-14	DQ923188	
	m3-17	DQ923189	
	m2-3	DQ923190	
	m3-3	DQ923191	
	m3-1	DQ923192	
	m3-19	DQ923193	
	m4-5	DQ923194	
	m5-64	DQ923195	
	m6-65	DQ923196	
	m8-52	DQ923197	
	m5-9	DQ923198	
	m2-47	DQ923199	
	m8-3	DQ923200	
	m9-51	DQ923201	
	m8-50	DQ923202	
	m3-26	DQ923203	
	m8-51	DQ923204	

m5-7	DQ923205	
m2-46	DQ923206	
m8-55	DQ923207	
m8-2	DQ923208	
m2-50	DQ923209	
m2-32	DQ923210	
m2-31	DQ923211	
m2-30	DQ923212	
m2-27	DQ923213	
m7-31	DQ923214	
m3-9	DQ923215	
m3-13	DQ923216	
m3-18	DQ923217	
m2-6	DQ923218	
m2-9	DQ923219	
m10-53	DQ923220	
m2-29	DQ923221	4 (m1)
m2-33	DQ923222	32 (m1)
m2-34	DQ923223	28 (m3)
m2-35	DQ923224	4 (m4)
m2-36	DQ923225	17 (m5)
m2-38	DQ923226	2 (m6)
m2-39	DQ923227	6 (m7)
m2-40	DQ923228	8 (m8)
m2-43	DQ923229	1 (m10)

Cellulomonas

m5-1	DQ923230	
m5-2	DQ923231	
m5-4	DQ923232	
m5-5	DQ923233	
m5-8	DQ923234	
m5-15	DQ923235	
m5-20	DQ923236	
m5-25	DQ923237	
m6-35	DQ923238	
m10-5	DQ923239	
m10-47	DQ923240	
m10-48	DQ923241	
m10-49	DQ923242	
m10-50	DQ923243	
m10-51	DQ923244	
m10-52	DQ923245	38 (m5)
m5-69	DQ923246	10 (m6)
m6-44	DQ923247	12 (m10)

Kokuria

m6-1	DQ923248	
m6-18	DQ923249	

m6-19	DQ923250	
m6-29	DQ923251	3 (m2)
m6-60	DQ923252	4 (m4)
m7-24	DQ923253	25 (m6)
m7-53	DQ923254	19 (m7)
m8-6	DQ923255	7 (m8)
m10-16	DQ923256	5 (m9)
m7-29	DQ923257	2 (m10)

Microbacterium

m6-12	DQ923258	
m7-4	DQ923259	
m7-7	DQ923260	
m7-8	DQ923261	
m7-9	DQ923262	
m7-13	DQ923263	
m7-49	DQ923264	
m8-19	DQ923265	10 (m6)
m8-58	DQ923266	8 (m7)
m10-7	DQ923267	7 (m8)
m9-17	DQ923268	10 (m9)
m9-18	DQ923269	2 (m10)

Citrococcus

m2-14	DQ923270	
m2-15	DQ923271	
m2-16	DQ923272	
m2-17	DQ923273	
m2-19	DQ923274	
m2-21	DQ923275	
m2-48	DQ923276	8(m2)
m8-9	DQ923277	2 (m8)

Ornithinimicrobium

m5-54	DQ923278	
m5-55	DQ923279	
m6-30	DQ923280	
m6-31	DQ923281	
m10-36	DQ923282	
m6-33	DQ923283	
m6-40	DQ923284	
m7-39	DQ923285	
m7-41	DQ923286	
m8-5	DQ923287	5 (m5)
m2-7	DQ923288	8 (m6)
m8-13	DQ923289	6 (m7)
m5-53	DQ923290	2 (m8)

	m7-38	DQ923291	1 (m10)
Others			
	m8-11	DQ923292	
	m9-17	DQ923293	
	m7-11	DQ923294	
	m7-6	DQ923295	
	m6-32	DQ923296	
	m6-44	DQ923297	
	m8-36	DQ923298	
	m7-40	DQ923299	
	m7-5	DQ923300	
	m8-14	DQ923301	
	m7-52	DQ923302	
	m9-18	DQ923303	
	m10-20	DQ923304	
	m10-5	DQ923305	
	m2-41	DQ923306	
	m10-33	DQ923307	2 (m2)
	m10-30	DQ923309	1 (m6)
	m10-6	DQ923310	8 (m7)
	m9-51	DQ923311	10 (m8)
	m9-47	DQ923312	12 (m9)
	m10-45	DQ923313	27 (m10)
Staphylococcus			
	m1-20	DQ923308	16 (m1)
	(m7)		1

APENDICE I

La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos

Cuando Darwin publicó el libro “El Origen de las Especies” (1859), se planteó la idea de que las especies pueden surgir de otras a causa de la acumulación de modificaciones por medio de la selección natural, y de otras fuerzas aún no muy claras para el autor. Darwin describió el proceso de especiación pero no propuso alguna forma de reconocimiento y delimitación del producto de tal proceso y, por lo tanto, el libro no tiene un concepto formal de especie.

Es probable que Darwin no haya tenido idea de la gran tarea que nos heredaría: a más de un siglo de la publicación de esta obra aún no se tiene un concepto “natural” que sea funcional para la mayor parte de los organismos, sobre todo aquellos que pertenecen al grupo de los procariontes (Bacteria y Archea), así como algunos grupos de hongos. En este capítulo analizaré los trabajos que se han realizado para reconocer y delimitar especies con base en la teoría evolutiva, haciendo énfasis en la repercusión que han tenido los marcadores moleculares en la resolución de este problema. Asimismo, explicaré cuáles son las principales limitaciones que se presentan al aplicar determinado concepto de especie a organismos con formas de vida muy distintas a las comúnmente estudiadas (plantas y animales), como los microorganismos. Finalmente, haré énfasis en la importancia pragmática que tiene reconocer y delimitar entidades evolutivas, sobre todo en áreas dedicadas a la conservación de la biodiversidad.

De lo natural a lo artificial y de lo universal a lo particular

Desde el punto de vista biológico, una especie se podría describir simplemente como un conjunto de individuos más o menos parecidos que puede variar en tamaño y composición dependiendo del criterio que se use para hacer tal agrupamiento. Cuando un agrupamiento se hace bajo criterios

que reconozcan y delimiten el resultado del proceso de especiación estamos ante un grupo natural; en caso contrario, un grupo artificial será aquel en el que hay una inclusión parcial o una inclusión de organismos que pertenecen a más de una entidad evolutiva (Ward, 1998). Estos criterios se fundamentan en teorías o simples patrones que se obtienen en el estudio de modelos biológicos, es decir, de los mismos organismos. Cuando estos modelos logran aplicarse a todas las formas biológicas, estamos ante un criterio universal. De modo contrario, cuando este modelo sólo es aplicable a un grupo muy reducido de formas, se está ante un criterio particular.

Es sorprendente cómo estas agrupaciones cobran importancia cuando se usan criterios naturales y, cuando es posible, universales para reconocerlas y delimitarlas: pensemos que si agrupamos toda la biodiversidad en unidades naturales bajo distintos criterios se pueden resolver muchas de las dudas que en la actualidad siguen rondando en nuestras cabezas. Por ejemplo, si la evolución es gradual o por saltos, si la especiación es simpátrica o alopátrica, cuáles son las velocidades de especiación, cuál es la interacción entre los factores ambientales y la diversidad genética de las poblaciones; éstas son algunas dudas que considero podrían resolverse con sólo aplicar métodos naturales de agrupación.

Criterio 1: semejanza entre los caracteres morfológicos

En el reconocimiento de las especies la forma comúnmente utilizada es intuitivamente muy sencilla: basta con la utilización de cualquier tipo de caracteres morfológicos, conductuales, fisiológicos u otros para descartar o en su defecto integrar individuos a estas entidades biológicas. Por ejemplo, algunas tribus de Nueva Guinea son capaces de reconocer con base en características morfológicas y conductuales cerca de 137 tipos diferentes de aves, que corresponden cada uno a una especie distinta utilizando marcadores moleculares (Avice, 2000). Este tipo de reconocimiento se formalizó antes de la teoría evolutiva, en especial con Linneo, quien introdujo en 1757 el concepto de *especie* como una forma de reconocer y dar nombre a las distintas entidades biológicas creadas por un ser superior, es decir, un Dios. Este tipo de reconocimiento a través de cualquier carácter morfológico

se conoce en honor a Linneo como concepto linneano o morfológico de especie (Mayden, 1997). Posteriormente, Darwin tomó esta misma forma de reconocimiento, aunque seleccionando determinados caracteres como base para sustentar sus explicaciones acerca del origen de las especies: el caso del tamaño y forma del pico de los pinzones de las islas Galápagos es un buen ejemplo para explicar los procesos evolutivos, al menos a esta escala (Darwin, 1859).

Por lo general, este tipo de caracteres se asocian con el método fenético, que tiene como característica principal la de tomar la mayor cantidad posible de caracteres independientemente de su relación ancestro-descendiente. El concepto fenético de especie forma grupos de acuerdo con la similitud de una gran cantidad de caracteres (Sneath, 1976), incluyendo los moleculares.

Criterio 2: los procesos evolutivos originan unidades discretas

Sin duda alguna, el concepto de especie que mejor se apega a la idea de Darwin acerca de la divergencia que se da entre los individuos de una misma población, producto de la selección natural con el paso de las generaciones y que culmina con la aparición de nuevas especies, es el sugerido por Simpson (1961) y Wiley (1978), conocido como **concepto evolutivo** de especie. Éste se define como un linaje (secuencia de poblaciones ancestro-descendiente) que evoluciona separadamente de otros linajes y que tiene una estructura evolutiva propia. Este concepto tiene la facultad de englobar las distintas fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones; además, da la pauta para considerar procesos de extinción y sobre todo de especiación.

Sin embargo, por sí mismo no permite reconocer a tales linajes, es decir, este concepto no propone un método capaz de reconocer y delimitar especies (Taylor *et al.*, 2000). Así, una conclusión anticipada sería que un concepto de especie que describa y delimite a estos grupos verdaderamente existentes será aquel que englobe la idea de que las especies son unidades evolutivas producto de la especiación con una metodología capaz de reconocerlas y delimitarlas.

Criterio 3: aislamiento reproductivo

Una propuesta que se acerca a la resolución de la problemática conceptual y práctica de las especies es el **concepto biológico** de especie formulado por Dobzhansky (1937) y Mayr (1942). Ellos consideran que la especie es un grupo de poblaciones naturales donde actual o potencialmente existe intercambio genético y que este grupo de poblaciones está aislado reproductivamente de otros grupos análogos. Al detectar eventos de reproducción sexual se infiere que el flujo génico está actuando como fuerza uniformadora en las frecuencias alélicas de las poblaciones y, por lo tanto, se considera que todas estas poblaciones pertenecen a una misma entidad evolutiva. En contraste, cuando se origina una barrera reproductiva o incluso geográfica entre algunas poblaciones, ésta provoca que se diferencien genéticamente hasta que divergen a tal grado que ocurre un proceso de especiación. El método para reconocer especies biológicas es en teoría muy sencillo y basta con registrar la existencia de reproducción sexual, ya sea en el campo o en laboratorio, entre individuos que *a priori* sean considerados de la misma especie.

Criterio 4: un nicho, una especie

El **concepto ecológico** de especie propuesto por Van Valen (1976) se refiere a un linaje (o grupo de linajes fuertemente relacionados) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferente a la de otros linajes. Una especie ecológica puede verse como un grupo de individuos que asimila recursos de una manera semejante y habita en determinadas condiciones abióticas y bióticas. La forma de reconocer las especies ecológicas es correlacionando las condiciones y los recursos del ambiente con algunas características adaptativas, generalmente morfológicas, de cada una de las poblaciones en evaluación. El concepto ecológico se desarrolla dentro de una concepción adaptacionista, en la que se supone que cuando ocurre alguna modificación de las condiciones y/o los recursos de determinado ambiente se crea un nicho vacío, el cual activa la selección natural hasta que la población alcanza un nuevo pico adaptativo asociado a ese nicho y con ello se genera una nueva especie. No obstante, este concepto también puede ser funcional dentro del punto de vista neutral, en cuyo caso se argumenta que los organismos tienen la capacidad de modificar su propio nicho de tal manera

que muchos de los caracteres que se observan en los organismos son producto de la deriva génica.

Criterio 5: las relaciones ancestro-descendiente en las poblaciones

En cuanto al **concepto filogenético** de especie, éste ha sido desarrollado por varios autores. Por ejemplo, está el que plantea Cracraft (1983) definido como el grupo más pequeño de organismos que es diagnosticablemente diferente de otros organismos similares y dentro del cual hay un patrón de ancestro-descendiente. Por otra parte, Nixon y Wheeler (1990) definen la especie como las agregaciones más pequeñas de poblaciones o linajes diagnosticadas por una única combinación de estados de carácter que reflejen una relación ancestro-descendiente.

Para reconocer y delimitar una especie filogenética primero se identifican y analizan los atributos que reflejen una secuencia ancestro-descendiente en los individuos de los grupos o poblaciones, para así obtener los estados de carácter. Posteriormente se realiza una comparación interpoblacional por medio de una matriz de los perfiles de cada población y finalmente, se divide la matriz en grupos a partir de los diferentes estados de carácter. Cada uno de estos grupos será una especie filogenética. Los resultados de un análisis filogenético se pueden representar en un cladograma donde los grupos o *clusters* más pequeños dentro de esta relación son considerados unidades evolutivas separadas.

El concepto filogenético asume que entre los grupos formados hubo un proceso de especiación, por lo que el flujo génico entre estos grupos es casi nulo y que probablemente la selección natural, la deriva génica y la mutación actúan de manera diferencial sobre los caracteres de los individuos. Los caracteres que se toman para reconocer y delimitar especies filogenéticas pueden ser fenotípicos (morfológicos, fisiológicos, bioquímicos o moleculares) o genotípicos, siempre y cuando reflejen una relación de ancestría en común entre los grupos.

Criterio 6: intercambio genético

El **concepto genético** de especie fue inicialmente propuesto por Ravin (1963) y surgió como una forma de resolver el problema de la aplicabilidad

del concepto biológico de especie en microorganismos tales como los procariontes. En este sentido una especie es definida como un grupo de individuos con capacidad de intercambiar información genética por medio de la conjugación, transducción o transformación. Ravin propone que la frecuencia del intercambio genético en procariontes puede ser un índice confiable para conocer las relaciones filogenéticas entre los microorganismos que realizan un proceso de recombinación: donador y receptor (ver capítulo 9). Posteriormente, con el avance de las técnicas en biología molecular, Wayne *et al.* (1987) proponen con base en este concepto una manera de reconocer y delimitar especies: aquellas muestras que tengan más del 70% de hibridización ADN-ADN serán consideradas como una misma especie.

Criterio 7: la cohesividad

El concepto cohesivo de especie propuesto por Templeton (1989, 1998, 1999) es sin duda el trabajo más integrador y completo realizado no sólo en el nivel teórico, sino también en el nivel operacional en el reconocimiento y delimitación de unidades evolutivas. Así, una especie es definida como un linaje (secuencia ancestro-descendiente) donde las fuerzas genéticas y ecológicas crean un grupo cohesivo único de organismos con capacidad de entrecruzamiento. En este sentido podemos redescubrir una especie como un grupo de organismos que tiene una determinada respuesta a las fuerzas ecológicas, es decir, a los factores ambientales (como humedad, temperatura, cantidad de nutrientes y distintos tipos de interacciones) y a las fuerzas genéticas, tales como la mutación, la selección, la deriva o el flujo génico, que interaccionan de tal manera que originan un grupo cohesivo único.

Para demostrar la existencia de especies cohesivas es necesaria la aplicación de bases teóricas y de herramientas moleculares (ver capítulo 2). Una vez que se reconocen los grupos en conflicto en la asignación del estatus de especie cohesiva, se genera una matriz de haplotipos a partir de uno o más marcadores moleculares. Sobre esta matriz de haplotipos se determinan procesos de coalescencia (ver capítulo 9) y a partir de estos puntos se producen anidamientos a los que se asigna el estatus de especie.

Finalmente se corrobora la existencia de cohesividad ecológica y genética dentro de los grupos.

El uso de genealogías por haplotipos permite descubrir la variación genética, ya sea dentro de una especie (nivel poblacional) o entre especies. Así, por medio de este método se puede conocer la interfase entre evolución intraespecífica e interespecífica (Templeton, 1993, 2001). Esta interfase es precisamente el límite entre una especie y otra. Para corroborar la cohesividad ecológica se realiza un análisis biogeográfico y filogeográfico. Para el primer caso se correlaciona la distribución espacial de las distintas variantes (en su mayoría morfológicas) de cada uno de los grupos, y para el segundo se correlaciona la distribución espacial de los distintos haplotipos resultantes. Para corroborar la cohesividad genética, son necesarios análisis de diferenciación genética, tales como los estadísticos F y sus distintas variantes (Wright, 1951; Nei, 1982; Slatkin y Barton, 1989; ver capítulo 14). Estos índices pueden evidenciar flujo génico o, en caso contrario, aislamiento reproductivo entre los grupos en conflicto (Templeton, 1994). Una ventaja que tiene el concepto cohesivo frente a otros conceptos es que los grupos permiten delimitar especies con criterios estadísticos.

Limitaciones de cada método para reconocer y delimitar unidades evolutivas

Cada método que se usa para reconocer y delimitar especies desde el punto de vista evolutivo trata de inferir procesos de especiación, ausencia de flujo génico entre grupos, o presión diferencial de la selección natural y la deriva génica sobre las poblaciones en relación con su ambiente. Sin embargo, en ocasiones estas inferencias para formar grupos naturales resultan no ser fiel reflejo de las unidades evolutivas existentes. A continuación ampliaré cuáles son los problemas más comunes que se presentan en el momento de reconocer y, sobre todo, de delimitar especies.

Problema 1: los caracteres morfológicos y los marcadores moleculares pueden presentar homoplasias

Antes que nada, hay que recordar que en todos los análisis es necesario usar caracteres de tipo homólogo, es decir, que todas las variantes de ese

carácter (estados de carácter) provengan de un ancestro común (Li, 1997). Sin embargo, hay ocasiones en que las variantes de determinado carácter provienen de más de un ancestro común, lo que se conoce como homoplasias (ver capítulo 4).

Los caracteres fenotípicos, principalmente morfológicos, conductuales y en algunos casos fisiológicos y bioquímicos, están expuestos a experimentar convergencias evolutivas -un tipo de homoplasia- en donde los caracteres tienden a converger en forma y función independientemente de la relación ancestro-descendiente. Además, un carácter fenotípico es producto no solo de la información genética, también el ambiente y la interacción entre genes y ambiente lo moldean; por ejemplo, puede ser que las diferencias encontradas a nivel morfológico no existan a nivel genético y lo que se observe sea simplemente producto de una plasticidad fenotípica. Entonces, cuando tomamos caracteres con plasticidad fenotípica o que han experimentado convergencias evolutivas, los límites de una especie pueden ser erróneos. El concepto fenético y morfológico de especie por la metodología que siguen están muy expuestos a producir grupos artificiales.

El reconocimiento de este tipo de caracteres en microorganismos es muy difícil. Las bacterias, arqueas y en algunos casos los hongos presentan una limitada cantidad de caracteres que pueden considerarse como homólogos. En el caso particular de los procariontes, el único método que se aplica en el reconocimiento y delimitación de especies es el fenético, tomando en cuenta caracteres como la forma celular (cocos o bacilos), el tipo de metabolismo (respiración-fermentación), la reacción a las técnicas de tinción (gram+ o gram-), pruebas bioquímicas (lactosa+ o lactosa-), la presencia en determinado ambiente (mesófilas o extremófilas), entre otras. La gran cantidad de homoplasias que pueden existir en estos caracteres hacen de la sistemática bacteriana un sistema completamente artificial, sobre todo en el nivel taxonómico de especie (Cowan, 1968; Priest, 1993; Goodfellow *et al.*, 1997). Las especies descritas a través del método fenético enmascaran una gran cantidad de entidades evolutivas. Ward (1998) demostró que la morfoespecie de cianobacteria *Synechococcus lividis* enmascara al menos 11 entidades evolutivas, cuando se aplica el concepto filogenético acompañado de una correlación ambiental (concepto ecológico). A partir de un muestreo a

lo largo de un gradiente de temperatura y usando la secuencia 16S rARN para reconstruir la filogenia, llegó a la conclusión de que cada grupo dentro del cladograma corresponde a aislados de un determinado gradiente ambiental.

Los caracteres fenotípicos no son los únicos expuestos a homoplasias, también los marcadores moleculares pueden experimentar convergencias evolutivas, evolución paralela y reversiones a estados ancestrales. Este último tipo de homoplasias ha sido estudiado en secuencias de ADN, en donde es probable que en algunas posiciones (sobre todo en la tercera posición de los codones) existan redundancias por saturación, es decir, si el estado ancestral de una posición en la secuencia es A (adenina), los estados derivados de esa secuencia pueden experimentar subsecuentes cambios (de A a G, de G a C, de C a G y de G a A) hasta llegar nuevamente a presentar la misma base en la misma posición (ver capítulo 4; Li, 1997).

Problema 2: no hay límites estrictos en el aislamiento reproductivo

Respecto al concepto biológico de especie, éste puede tener algunas limitaciones metodológicas, sobre todo cuando se inducen eventos reproductivos de manera artificial, sin contemplar el flujo génico actual. Detectar eventos reproductivos de esta manera no es sinónimo de un intercambio de genes de manera más o menos constante entre los grupos. En estos casos es probable que la reproducción sexual esté desacoplada y permanezca aún cuando la variación genética y el aislamiento geográfico sea muy grande (Taylor *et al.*, 2000). Con los análisis de entrecruzamiento se detecta el flujo génico potencial, mas no el flujo génico real y actual (Hibbett *et al.*, 1995). Un caso que ejemplifica lo anterior es el que se refiere a la especie morfológica del hongo *Pleorotus ostreatus*, en el que se reconocen ocho especies biológicas. Sin embargo, cuando se aplican análisis filogenéticos, usando marcadores moleculares y se correlacionan con las variantes ambientales en cada una de las ocho especies biológicas, se reconocen un total de catorce especies (Vigalis y Sun, 1994).

El concepto biológico pierde completa funcionalidad cuando se aplica a poblaciones en proceso de divergencia y donde en algunos casos puede existir flujo génico que origina grupos híbridos (Rieseberg, 1997). El término

de híbrido se puede restringir a aquellos organismos que se generan por entrecruzamiento entre individuos de diferentes especies (Rieseberg, 1997). Los híbridos pueden seguir dos rutas antagónicas. Primero, cuando los híbridos son producidos durante un proceso de especiación parapátrica o simpátrica en el que existe entrecruzamiento parcial entre los grupos en divergencia en una zona geográfica y ambientalmente intermedia por largos periodos de tiempo, los híbridos pueden desaparecer debido a la formación de barreras reproductivas definitivas entre los grupos progenitores. Cuando esto sucede se puede hablar de dos entidades evolutivas y un grupo temporal de organismos híbridos (Turner, 1971). Segundo, cuando los híbridos se aíslan reproductivamente de los grupos progenitores se puede originar una nueva especie, siempre y cuando la zona híbrida se mantenga constante en el tiempo. Cuando esto sucede estaríamos ante tres unidades evolutivas: los grupos progenitores y la incipiente especie originada por hibridación. La formación de nuevas especies a través de grupos híbridos se ha documentado extensamente en plantas (Knobloch, 1971; Ellstrand *et al.*, 1996; Rieseberg, 1997; ver capítulo 13); en el caso de animales y microorganismos se sabe muy poco.

Problema 3: no se puede hablar de un solo factor ambiental que ejerza una presión selectiva en las poblaciones

Cuando hablamos del concepto cohesivo, el concepto ecológico y las fuerzas ecológicas son infuncionales debido principalmente a la falta de recursos técnicos, estadísticos y conceptuales para analizar conjuntamente todos los factores del hábitat (condiciones y recursos) que puedan estar promoviendo un cambio en las poblaciones, y que finalmente conlleven a un proceso de especiación (Templeton, 2001). Asimismo, aún no se sabe cuál es el efecto que un cambio de una determinada variable ecológica pueda tener en las poblaciones, ni cómo la interacción de distintas variables ambientales afecta y promueve los procesos evolutivos.

Problema 4: un solo marcador molecular puede no ser representativo de la filogenia de la especie

Con respecto al concepto filogenético, el principal problema que se podría presentar al reconocer y, sobre todo, al delimitar unidades evolutivas sería que la filogenia estuviera disociada de la tokogenia (Henning, 1966). El término tokogenia se refiere al flujo génico actual en una población. En tal caso, las especies propuestas a través de la interpretación de un cladograma no corresponderían con los grupos que se formarían si se tomara en cuenta el grado actual de flujo génico. Sin duda el uso de uno o varios caracteres adecuados así como la aplicación correcta de los análisis estadísticos puede evitar esta disociación. David y Nixon (1992) proponen dos análisis filogenéticos para reconocer y delimitar especies. El primero, denominado Análisis de Agregación Poblacional (PAA), intenta separar grupos de acuerdo con atributos que puedan ser únicos en una población determinada (p. ej. fijación de alelos en las poblaciones estudiadas). El segundo, el análisis de Agregación Cladística de Haplotipos (CHA), agrupa las poblaciones que tienen haplotipos idénticos en una sola especie filogenética. En estos análisis se propone el uso de marcadores moleculares y en particular de secuencias de genes para la generación del cladograma. Diversos estudios han puesto a prueba estos dos análisis (De Salle y Vogler, 1994; Escalada *et al.*, 1996; Brower, 1999) pero Brower (1999), al examinar las implicaciones que tiene el uso del PAA para delimitar especies a partir de la secuenciación de genes, llega a la conclusión de que este método es inapropiado para inferir las unidades evolutivas. Uno de los problemas que presenta el PAA es que al usar datos como la secuenciación de genes es casi imposible identificar caracteres discretos (Crother, 1990).

El uso de los marcadores moleculares como herramientas en la reconstrucción filogenética presenta problemas adicionales bajo este concepto de especie. Particularmente, cuando se utilizan secuencias de genes muchas veces se muestrea un solo locus. Cuando este locus presenta una segregación de polimorfismos ancestrales (polimorfismos interespecíficos) la reconstrucción filogenética puede ser incorrecta (Wu, 1991; 1992; Hey, 1994; Templeton, 2001). La segregación de polimorfismos ancestrales hace referencia a los alelos que permanecen en la población aún después de un proceso de especiación. De esta manera, cuando se delimiten los grupos dentro del cladograma, aquellos que compartan este tipo de alelos

serán considerados como una sola entidad evolutiva. Para solucionar tal problema se proponen dos opciones: la primera es el análisis de coalescencia (Hudson, 1983,1990; Tajima, 1983; Nei, 1986; Takahata, 1989; Templeton, 1989, 1998, 2001) y la segunda es con el uso de varias genealogías de distintos genes. La concordancia entre las reconstrucciones resultantes en cada uno de estos genes es determinante en la delimitación de especies (Felsenstein, 1985; Wu, 1991, 1992; Avise, 1994, 2000; Hibbett *et al.*, 1995; Caccone *et al.*, 1996; Giraud *et al.*, 1997; O'Donell *et al.*, 1998; Streelman *et al.*, 1998; Franzot *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Usando tres distintas secuencias de genes en el complejo fúngico *Gibberella fujikuroi*, O'Donell *et al.* (1998) encuentran una concordancia entre las tres genealogías generadas, dando como resultado un total de 45 especies, de las que 23 son registradas como nuevas.

Problema 5: bajo el criterio de hibridación ADN-ADN, todos los primates perteneceríamos a la misma especie

El concepto genético incurre en dos faltas graves. La primera se refiere a la universalidad del concepto. Si aplicamos el criterio de que dos muestras que presenten más del 70% de hibridación ADN-ADN sean consideradas como la misma especie, todos los géneros de la familia de los primates serían consideradas como miembros de una misma especie (Stanley, 1997). La segunda se refiere a que el criterio de hibridación no está sostenido en algún mecanismo natural que pueda reflejar un proceso de especiación, además, aún no se sabe el papel que juega determinada secuencia en provocar especiación y sobre todo, es probable que esta correlación no sea la misma en diferentes linajes debido a una variación en las tasas de evolución (Maynard Smith, 1995; Embley y Stackebradt, 1997; Goodfellow *et al.*, 1997). Al tomar únicamente la hibridación como criterio para delimitar especies, el concepto genético niega la importancia de determinadas regiones del ADN en conferir una identidad a las especies. Es decir, asume que dentro de ese 70% de ADN total que hibridiza todas las posiciones tienen la misma importancia, independientemente si son secuencias codificantes o no. Sin embargo, es más probable que esa identidad se encuentre en el 30% del ADN total que no hibridiza.

Problema 6: cuando la cohesividad no es tan evidente

Un problema del concepto cohesivo puede surgir cuando las fuerzas ecológicas, las fuerzas genéticas y la reconstrucción genealógica por coalescencia (anidamientos de los haplotipos) delimitan de manera diferente los grupos en evaluación. En los pocos casos en que se ha aplicado el concepto cohesivo jamás se ha visto una discordancia entre los grupos formados a partir de estas tres formas de inferir unidades evolutivas (Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Carbone y Kohn, 2001; Templeton, 2001). No obstante, en el caso de que llegara a presentarse un evento de discordancia, habría que volver a replantear los tres tipos de inferencia. Para el caso de la cohesividad ecológica se tendrían que hacer nuevas investigaciones que relacionen ciertos factores ambientales con determinados atributos de los organismos; para el caso de la cohesividad genética, es posible que los marcadores moleculares no sean totalmente neutros o en su defecto, tengan una tasa de evolución diferencial entre los grupos en conflicto, en cuyo caso el uso de marcadores moleculares que sí cumplan estos requisitos es la solución.

Un claro problema que se presenta al usar haplotipos para obtener la genealogía de los grupos es la carencia de una base teórica que iguale estas genealogías generadas por coalescencia con los verdaderos linajes de la población (Templeton, 2001). Asimismo, cuando existe una gran cantidad de alelos en un mismo locus los tiempos de coalescencia pueden ser erróneos (Takahata, 1989; Wu, 1991). Un ejemplo claro es el de la tricotomía de los linajes chimpancé-gorila-humano. Cann *et al.* (1987) encuentran que el tiempo de coalescencia del linaje humano usando ADN mitocondrial es de 200 000 años, mientras que el tiempo de coalescencia usando genes del núcleo es de 400 000 años; el tiempo estimado de divergencia del linaje humano usando otros métodos llega a 5 millones de años (Wu, 1991).

El concepto de especie en microorganismos, un problema aún no resuelto

Cada uno de los conceptos revisados en este capítulo fueron en su origen desarrollados tomando en cuenta determinadas formas de vida. El concepto

biológico, por ejemplo, se construyó tratando de reconocer grupos en organismos con una reproducción sexual, principalmente animales y en algunos casos, plantas (Petersen y Hughes 1999). El concepto ecológico se planteó pensando básicamente en macroorganismos, en los que claramente puede hacerse un análisis de correlación entre la variabilidad morfológica de los grupos con los recursos y condiciones del hábitat (Van Valen, 1976). Es entonces evidente que surge un problema de funcionalidad cuando queremos aplicar un determinado concepto de especie a formas de vida distintas de aquellas para las que inicialmente fue creado.

Los hongos y sus distintas formas de reproducción

En algunos grupos de hongos la aplicación del concepto biológico puede ser impráctico debido a que la formación de meiosporas no se lleva a cabo. Reynolds (1993) afirma que un 20% de toda la diversidad de hongos se reproduce de manera asexual y no produce meiosporas. Algunas otras variedades son homotálicas y pueden producir meiosporas sin la necesidad de una entidad complementaria. En hongos heterotálicos, la presencia de meiosporas no es suficiente para inferir entrecruzamiento, por lo que para reconocer y delimitar sus especies, es necesario cultivarlos en el laboratorio para inducir posteriormente su entrecruzamiento. Sin embargo, un problema relevante es que hay variedades que no son cultivables y en algunos casos es casi imposible que en condiciones de laboratorio puedan entrecruzarse.

Considerando esta diversidad reproductiva la solución para reconocer y delimitar especies es el concepto filogenético. En una gran cantidad de estudios, existe concordancia entre las genealogías de distintos genes, de manera que los grupos descritos son considerados entidades evolutivas (Sullivan *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1997; Mayden, 1997; O'Donnell, 1998; May *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2000). Carbone y Kohn (2001), además de usar secuencias de genes, aplican en *Sclerotinia* la teoría de la coalescencia para generar genealogías en cada uno de los loci analizados con la finalidad de evidenciar los tiempos de divergencia tanto de las poblaciones como de las especies del género. Usando secuencias de haplotipos en nueve distintas regiones del ADN nuclear para 385 individuos, obtienen una concordancia entre los nueve loci estudiados, con los mismos tiempos de coalescencia

tanto en el nivel poblacional como en el nivel de especie. Asimismo, un análisis filogeográfico de los nueve loci señala que determinados haplotipos son exclusivos de ciertas regiones, perfectamente diferenciadas por una serie de factores ambientales.

Los procariontes se reproducen de manera asexual pero pueden experimentar transferencia horizontal de genes

En los procariontes (Archaea y Bacteria), la aplicación de cada uno de los conceptos de especie se complica más que en cualquier otro grupo de organismos. La forma de vida de la mayoría de los procariontes es completamente diferente de la de los organismos que se han tomado como modelo para desarrollar los conceptos de especie desde el punto de vista evolutivo, a excepción del genético. La diferencia radica en dos procesos: la reproducción y la recombinación. Todos los procariontes sin excepción se reproducen de manera asexual, de tal manera que las células progenitoras son idénticas a las células hijas, a menos que ocurra alguna mutación. Esta reproducción está desligada de la recombinación, de tal manera que el flujo de genes se lleva a cabo de manera lateral u horizontal, ya sea por recombinación homóloga o no homóloga de material genético cromosomal o extracromosomal (plásmidos; ver capítulo 9). Por su parte, la recombinación puede suceder dentro de la misma unidad evolutiva o incluso entre entidades evolutivas filogenéticamente muy distantes (p. ej. entre especies del dominio Bacteria y especies del dominio Eucaria; Bushman, 2001).

La forma actual de reconocer y delimitar las especies procariontes desconoce por completo la dinámica evolutiva, ya que la metodología, completamente fenética, consiste en tomar cualquier tipo de caracteres morfológicos (forma y tamaño), fisiológicos (actividad enzimática) o moleculares (hibridación ADN-ADN o similitud entre las secuencias) para después compararlos con las otras especies fenéticas. Desde hace unos 10 años el único marcador molecular que se utiliza de manera extensiva para tal efecto es el gen que codifica para la subunidad 16s del rARN. Para definir una especie utilizando este marcador se aplica la regla universal del <97%: aquellos aislados que tengan una diferencia mayor a 97% en la secuencia de este gen serán considerados como especies diferentes (Stackebrandt y

Goebel, 1994). Esta metodología tiene sus raíces en la hibridación ADN-ADN, propuesta como criterio a partir de que se encontró que la mayoría de las especies definidas con base en análisis morfofisiológicos presentan una diferencia mínima de 70% cuando se realiza este tipo de hibridación.

El concepto biológico se podría ajustar sin problema a los procariontes, siempre y cuando la frecuencia de recombinación intraespecífica sea muy alta, al grado de generar un monto de variación en las poblaciones equivalente al de la mutación. Es importante mencionar que cuando la contribución de la recombinación a la variación genética es muy baja, la mutación es la fuerza que la está generando, por lo que consideramos que un buen parámetro para definir especies con base el concepto biológico la contribución de la recombinación vs. la de la mutación a la variación genética. Se sabe que en especies como *Staphylococcus aureus* -un organismo clonal- la contribución de la mutación a la variación es 15 veces mayor que la de la recombinación (Fiel *et al.*, 2003). En cambio, en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Campilobacter jejuni* la contribución de la recombinación es, respectivamente, 5, 10 y 50 veces más importante que la mutación (Feil *et al.*, 2003; Schouls *et al.*, 2003). En este caso, la genética de poblaciones puede resolver el problema de delimitación de especies mediante los índices de diferenciación genética y de recombinación (p. ej. desequilibrio de ligamiento). Por su parte, el concepto filogenético se puede aplicar siempre y cuando la recombinación no homóloga sea muy baja, ya que de lo contrario cada gen tendrá una historia filogenética muy diferente a la de la especie. Lo anterior cobra mayor sentido cuando usamos marcadores moleculares ya que si se utiliza una secuencia genética que tiene la propiedad de transferirse de manera interespecífica, los análisis filogenéticos reflejarán la filogenia de ese gen y no la de la especie.

En la actualidad una de las controversias más fuertes en el estudio evolutivo de los procariontes es la que se refiere a la frecuencia de la recombinación homóloga en poblaciones naturales. Diversos estudios han corroborado que el intercambio genético es extremadamente raro en poblaciones naturales (Robert y Cohan, 1995; Feil *et al.*, 1999, 2000; Cohan, 2001, 2002); análisis con diversos marcadores moleculares sugieren que algunos genes o segmentos de genes presentan una frecuencia de

recombinación igual o menor que la de la mutación (Selander y Musser, 1990; Maynard Smith *et al.*, 1993; Whittam y Ake, 1993; Robert y Cohan, 1995; Feil *et al.*, 1999, 2000). Por otro lado, diversos estudios demuestran que la frecuencia de la recombinación es muy alta (Istock *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2000; Maynard-Smith *et al.*, 2000; Frandsen *et al.*, 2001). Es muy probable que la frecuencia de la recombinación varíe dependiendo de la forma de vida de las entidades evolutivas: en casi todos los ejemplos en los que el intercambio genético es bajo, las especies estudiadas son simbioses patógenos sumamente virulentos (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, cepas patógenas de *Escherichia coli*), mientras que los grupos donde se encuentra una alta frecuencia de recombinación son simbioses mutualistas (*Rhizobium etli* y muchas cepas de *Escherichia coli*). Los estudios de recombinación en organismos de vida libre son escasos, reportándose sólo el caso del complejo *Bacillus subtilis*, que demuestra que la recombinación es un evento sumamente frecuente en la naturaleza (Istock *et al.*, 1992).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que un buen muestreo que abarque la mayoría de las variantes en una población puede ser determinante en los análisis de recombinación. En varios análisis en los que se determinó una baja frecuencia de recombinación, los organismos muestreados se obtuvieron de lugares sumamente distantes y en otros casos se obtuvieron muestras de una sola línea clonal virulenta (Selander y Musser, 1990; Whittam y Ake, 1993; Robert y Cohan, 1995).

En ausencia de recombinación intraespecífica, Cohan (2001, 2002) propone una serie de rutas evolutivas que los procariontes siguen para llegar a procesos de divergencia y consecuentemente a la especiación. Este autor afirma que la mutación es la única fuerza evolutiva capaz de generar variación genética y que la recombinación en cualquier grupo bacteriano es despreciable. El modelo predice que cuando se produce una mutación adaptativa en una población clonal, todos los individuos que no presenten dicha mutación desaparecerán producto de la selección periódica. Debido a la eficiencia que tiene esa nueva variante ante una serie de recursos y condiciones dentro de un espacio dado (nicho ecológico), la selección

periódica modifica las frecuencias alélicas drásticamente de 1 (los individuos con la mutación adaptativa) a 0 (todos los individuos que no la presenten). Un proceso de divergencia ocurrirá cuando las mutaciones adaptativas lleven a un subgrupo a modificar la forma de asimilar los recursos y a reaccionar de manera diferencial ante las condiciones del medio. Esta divergencia ocasiona que la selección periódica no afecte al grupo inicial y por lo tanto, estamos ante un proceso de especiación (Fig. 1). Estos grupos que se forman por una cohesión ecológica son llamados ecotipos; para Cohan pueden ser considerados unidades evolutivas, independientes unas de otras. Sin embargo, en presencia de recombinación intraespecífica este modelo evolutivo propuesto para procariontes puede no ser correcto (Fig. 1). Las mutaciones adaptativas en conjunción con intercambio genético ocasionan que la mutación adaptativa se propague en la misma población o incluso en distintas poblaciones que presenten un nicho ecológico distinto, por lo que la frecuencia de los recombinantes en la población estará determinada por procesos de selección natural y deriva génica, más que por selección periódica. Siendo cierto esto, un ecotipo no siempre puede ser considerado como una unidad evolutiva, y puede ser que varios ecotipos conformen una especie.

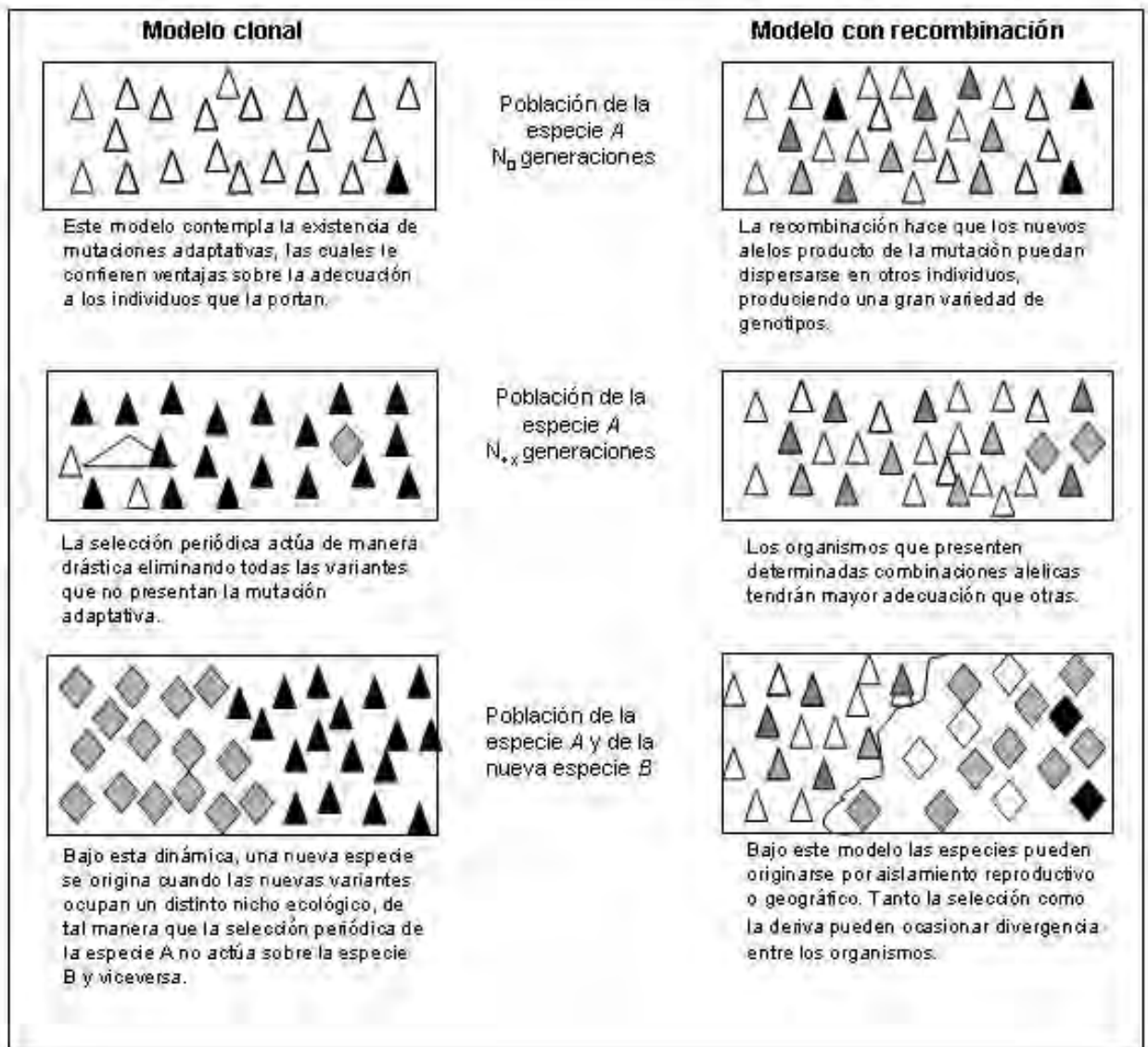


Figura 1. Dos modelos que explican la dinámica evolutiva de las especies procariontes: el modelo clonal propuesto por Cohan (2000, 2001) y el modelo con recombinación.

Consideraciones finales

El reconocimiento y delimitación de especies desde un punto de vista evolutivo es de suma importancia en áreas relativamente nuevas de la biología. En la Biología de la Conservación, por ejemplo, busca conocer la riqueza biológica de determinada región en un plano temporal para tomar medidas de protección adecuadas al número de variantes biológicas que ahí existan (ver capítulo 8). La riqueza biológica de una región puede medirse en distintos niveles, desde el nivel genético hasta niveles taxonómicos superiores. En diversos trabajos se plantea la idea de tener unidades

formales para medir la biodiversidad (Avice, 1989; Waples, 1991, Moritz, 1994), como las unidades evolutivamente significativas (ESU) que han sido propuestas por varios autores (Ryder, 1986; Waples, 1991; Dizon *et al.*, 1992; Avice, 1994; Moritz, 1994; Crandall *et al.*, 2000; Fraser y Bernatchez, 2001). Una ESU se describe como un linaje en el que el flujo génico está restringido en relación con otros linajes filogenéticamente muy cercanos, y que tiene una estructura evolutiva propia (Fraser y Bernatchez, 2001). En sentido estricto una ESU es una especie evolutiva y en el inicio del capítulo se planteó la problemática metodológica que tiene el concepto evolutivo de especie para reconocer y delimitar unidades evolutivas. En tal caso la aplicación de los distintos conceptos con una metodología propia pueden conducir al reconocimiento y delimitación de las especies y por consiguiente de las ESUs.

En el presente trabajo se revisó de manera general el uso y aplicación de los distintos conceptos de especie en microorganismos. Sin embargo, grupos tan importantes como los protoctistas o algas no fueron abordados. Asimismo, dentro de los grupos de los hongos y de los dominios Bacteria y Eucaria existe una gran diversidad de rutas evolutivas, por lo que la funcionalidad de los conceptos puede variar dependiendo de ellas.

Un problema que no se abarcó en este trabajo es el que se refiere a la reestructuración de la taxonomía en los niveles inferiores. Buena parte de los grupos que tienen el nivel taxonómico de especie no corresponden a las unidades evolutivas existentes, como el caso de una morfoespecie que puede enmascarar varias unidades evolutivas. Cuando esto ocurre, sin duda hay que tomar decisiones formales y universales para nombrar a éstas y darles un nivel taxonómico determinado.

Los microorganismos han sido agrupados siguiendo un método simplista; el de concebirlos como un mero conjunto de individuos con características morfológicas y bioquímicas similares. Este método usado por los microbiólogos del siglo XIX no ha cambiado mucho hoy día. El panorama puede ser muy alentador, si al igual que en los macroorganismos vemos estos grupos desde un punto de vista evolutivo, donde cada una de las fuerzas evolutivas interactúan para generar entidades evolutivas con propiedades genéticas, ecológicas y filogenéticas propias. Si asumimos lo

anterior cualquier concepto de especie puede ser aplicado en estos grupos para reconocer y delimitar las unidades evolutivas, esas de las que tanto se habla en macroorganismos.

Literatura citada

Avise, C. J. 1989. A role for molecular geneticists in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution* **4**: 279:281.

- Avise, C. J.** 1994. *Molecular markers, Natural history and evolution*. Chapman and Hall, Nueva York.
- Avise, C.J.** 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Barker, G. L., B. A. Handley, P. Vacharapiyasophon, J. R. Stevens y P. K. Hayes.** 2000. Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (cyanobacteria) filament in the baltic sea. *Microbiology* 146: 2865-75.
- Brower, A. V.** 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50: 195-221.
- Brower, A. V.** 1999. Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: A critique of David and Nixon's population aggregation analysis. *Systematics Biology* 48 (1): 199-213.
- Bushman, F.** 2001. *Lateral DNA transfer, mechanisms and consequences*. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Caccone, A., E. N. Moriyama, J. M. Gleason, L. Nigro y J. R. Powell.** 1996. A molecular phylogeny for the *Drosophila melanogaster* subgroup and the problem of polymorphism data. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1224-1232.
- Cann, R. L., M. Stoneking y A. C. Wilson.** 1987. Mitochondial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.
- Carbone, I. y L. M. Kohn.** 2001. A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent interface with multilocus data. *Molecular Ecology* 10: 947-964.
- Cohan, F. M.** 2001. Bacterial species and speciation. *Sistematic Biology* 50: 513-524.
- Cohan, F. M.** 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. 56: 457-487
- Cowan, S. T.** 1968. *A dictionary of microbial taxonomy usage*. Oliver and Boyd, Edinburgo.
- Cracraft, J.** 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Crandall, K. A., O. R. Binida-Emonds, G. M. Mace y R. K. Wayne.** 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 390-395.

- Crother, B. I.** 1990. Is "some better than none" or do allele frequencies contain phylogenetically useful information? *Cladistics* **6**: 677-281.
- Darwin, C.** 1958. *The origin of species*. J. Murray.Londres.
- David, J. I. y K. C. Nixon.** 1992. Populations, genetics variation, and the delimitation of phylogenetics species. *Systematics Biology* **41**: 421-435.
- De Salle, R. y A. P. Vogler.** 1994. Phylogenetics analysis on the edge: The application of cladistic techniques at the population level. En: *Non-neutral evolution: Theories and molecular data*. Chapman and Hall, Nueva York.
- Dizon, A. E., C. Lockyer, W. F. Perrin et al.** 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. *Conservation Biology*, **6**: 24-36.
- Dobzhansky, T.**1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Ellstrand, N. C., R. Whitkus y L.H.Rieseberg.** 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**: 5090-93.
- Embley, T. M. y E. Stackebradt.** 1997. Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. En: *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, Londres.
- Encalada, S. E., P. N. Lahanas, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten, M. M. Miyamoto y B. W. Bowen.** 1996. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: A mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Molecular Ecology* **5**: 473-483.
- Feil, E. J., J. E. Cooper, H. Grundmann, D. A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S. J. Peacock, J. M. Smith, M. Murphy, B. J. Spratt, C. E. Moorey N. P. Day.** 2003 How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology* **185**: 3307-16.
- Feil, E. J., J. M. Smith, M. C. Enright y B. G. Spratt.** 2000. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* **154**: 1439-1450.
- Feil, E. J., M. C. Maiden, M. Achtman y B. G. Sratt.**1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1469-1502.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Zoology* **34**: 152-161.
- Fisher, M. C., G. L. Koenig, T. J. White y J. W. Taylor.** 2000. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites

- in the pathogenic fungus *Coccidiodes immitis*. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1164-1174.
- Frandsen, E. V. , K. Poulsen, M. A. Curtis y M. Kilian.** 2001. Evidence of recombination in *Pophyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infection and Immunity* **69**: 4479-85.
- Franzot, S. P., I. F. Salkin y A. Casadevall.** 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 838-840.
- Fraser, D. J., y L. Bernatchez.** 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* **10**: 2741-2752.
- Giraud, T., D. Fortín, C. Lewis, P. Leroux y Y. Brygoo.** 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryoyinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 1177-1185.
- Gómez-Zurita, E. Petitpierre y C. Juan.** 2000. Nested cladistic análisis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Ecology* **9**: 557-570.
- Goodfellow, M., G. P. Manfio y J. Chun.**1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. En: *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, Londres.
- Henning, W.** 1966. *Phylogenetics systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hey, J.** 1994. Bridging phylogenetics and populations genetics with gene tree models. En: *Molecular ecology and evolution: Approaches and applications*. Birkhäuser verlag, Basel, Suiza.
- Hibbett, D.S., Y. Fukumasa-Nakai, A. Tsuneda y M. J. Donoghue.**1995. Phylogenetics diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 618-638
- Hudson, R. R.** 1983. Testing the constant-rate neutral allele model with protein sequence data. *Evolution* **37**: 203-217.
- Hudson, R. R.** 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford surveys* En *Evolutionary Biology* **7**: 185-194.
- Knobloch, I. W.** 1971. Intergeneric Hybridisation in flowering plants. *Taxon* **21**: 97-103.
- LI, W.-H.** 1997. *Molecular Evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.

- Liu, S.-L. y K. E. Sanderson.** 1998. Homologous recombination between *rrn* operons rearranges the chromosome in host-specialized species of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters* **164**: 275-81.
- May, G., F. Shaw, H. Badrane y X. Vekemans.** 1999. The signature of balancing selection. Fungal mating compatibility gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**: 9172-9177.
- Mayden, R. L.** 1997. A hierarchy of species concept: The denouement in the saga of the species problem. En: *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, Londres.
- Maynard Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke y B. G. Spratt.** 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**: 4384-4388.
- Maynard Smith, J.** 1995. Do bacteria have population genetics? *Society in Genetics Microbiology* **52**: 1-12.
- Maynard-Smith, J., E. J. Feil y N. H. Smith.** 200. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *BioEssays* **22**: 1115-22.
- Mayr, E.** 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.
- Moritz, C.** 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends and Ecology and Evolution* **9**: 373-375.
- Nei, M.** 1982. Evolution of human races at the gene level. En: *Human Genetics*. Alan R. Liss, Nueva York.
- Nei, M.** 1986. Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. En *Evolutionary perspectives and the new genetics*. Alan R. Liss, Nueva York.
- Nixon, K.C. y Q. D. Wheler.** 1990. An amplification of the phylogenetics species concept. *Cladistics* **6**: 211-223.
- O'Donell; K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.
- Petersen, R. H. y K. W. Hughes.** 1999. Species and speciation in Mushrooms. *BioScience* **49**: 440-452.
- Priest, F. G.** 1993: *Systematics and ecology of Bacillus , in Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington.
- Ravin, A. W.** 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *American Naturalist* **97**: 307-318.

- Reynolds, D. R.** 1993. The fungal holomorph: An overview. En: *The Fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Cab International, Londres.
- Rieseberg, L. H.** 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review in Ecology and Systematics* **28**: 359-389.
- Robert, M. S. y F. M. Cohan.** 1995. recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* **49**: 1081-1094.
- Ryder, O. A.** 1986. Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* **1**:9-10
- Schouls, L. M., S. reulen, B. Duim, J. A. Wagenaar, R. J. Willems, K. E. Dingle, F. M. Colles y J. D. Van Embden.** 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: Strain diversity, host range, and recombination. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 15-26.
- Selander, R. K. y J. M. Musser.** 1990. Populations genetics of bacterial pathogenesis. En: *Molecular basis of bacterial pathogenesis*. Iglewsky, B. H. Y V. L. Clark, San Diego.
- Silva, C., L. E. Eguiarte y V. Souza.** 1999. reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology* **8**: 277-287.
- Simpson, G. C.** 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, Nueva York.
- Slatkin, M. y N.H. Barton.** 1989. A comparison of three indirect methods for satimating average of gene flow. *Evolution* **43**: 1349-1368.
- Sneath, P. H.** 1976. Phenetic taxonomy at the species level and above. *Taxon* **25**: 437-50.
- Souza, V. S., T. T. Ngyen, R. R. Hudson, D. Pinero y R. E. Lensky.** 1992. Hierarchical análisis of linkege disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex? *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 8389-3893.
- Stackebrandt, E. y B. M.Goebel.** 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definitionin bacteriology. *International Journal of Systematics Bacteriology* **44**: 846-49.
- Stanley, J. T.**1997. Biodiversity are microbial species threatened? *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 340-345.

- Streelman, J. T., R. Zardoya, A. Meyer y S. A. Karl.** 1998. Multilocus phylogeny of chichlid fishes (Pisces: Perciformes) Evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Molecular Biology and Evolution* **15**: 798-808.
- Suerbaum , S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kuntsmann, I. Dyrek y M. Achtman.** 1998: Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 12619-24.
- Sullivan, D. J., T. J. Westerneng, K. A. Haynes, D. E. Bennett y D. C. Coleman.** 1995. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV.infected individuals. *Microbiology* **141**: 1507-1521.
- Tajima, F.** 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite population. *Genetics*, **105**: 437-460
- Takahata, N. 1989.** Gene genealogy in three related populations: consistency probability between gene and population trees. *Genetics* **122**: 957-966.
- Taylor, T. A., J. A. Jacobson, S. Kroten, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbett, M. C. Fisher.** 2000. Phylogenetics species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21-32.
- Templeton, A. R.** 1989.The meaning of species and speciation: A genetics perspective. En : *Progress in population genetics and human evolution*. Springer, Nueva york.
- Templeton, A. R.** 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* **34**: 659-669.
- Templeton, A. R.** 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. En: *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. Birkhäuser verlag, Basel, Suiza.
- Templeton, A. R.** 1998. Species and speciation: geography, populations structure, ecology and gene trees. En: *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford.
- Templeton, A. R.** 1999. Using genes tree to infer species for testable null hypothesis: cohesion species in the Spalax ehrenbergi complex. En *Evolutionary theory and processes: modern perspectives*. Kluwer Academic, Dordrencht.
- Templeton, A. R.** 2001. Using phylogeogric analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, **10**: 779-791.

- Turner, J. R.** 1971. Two thousand generations of hybridisation in a *Heliconius* butterfly. *Evolution* **25**: 471-482.
- Van Valen, L.** 1976. Ecological species, multispecies and Oaks. *Taxon* **25**: 233-239.
- Vigalis, R. y B. L. Sun.** 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleorotus* revealed by phylogenetics analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 4599-4603.
- Waples, R. S.** 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. And the definition of species under the endangered species act. *Marine Fisheries Reviews* **53**: 11-22.
- Ward, D. M.** 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Ecology and industrial microbiology*, **1**: 271-277
- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L.H. Moore, W. E. Moore, R.G. Murray, E. Stackebrandt.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacteria systematics. *International Journal of Systematics Bacteriology* **37**: 463-464.
- Whittam, T. S. y S. E. Ake.** 1993. Genetic polymorphisms and recombination in natural populations of *Escherichia coli*. En: *Molecular paleopopulation biology*. Sci. Soc. Press, Tokio.
- Wiley, E.O.** 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, **27**: 17-26.
- Wright, S.** 1951. The genetical structure of population. *Annual Eugenics* **15**: 323-354.
- Wu, C. I.** 1991; Inferences of species phylogeny in relation to segregation of ancient polymorphisms. *Genetics* **127**: 429-435.
- Wu, C. I.** 1992. Gene trees, species trees and the segregation of ancestral alleles. *Genetics* **131**: 513-513.

