

## CONSIDERACIONES SOBRE LA TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS

POR NORBERTO J. PALLERONI <sup>1</sup>, RAMÓN E. SOLANES <sup>2</sup> Y PEDRO F. ROSELL <sup>3</sup>

### INTRODUCCION

SIMPSON (1961) definió a la *taxonomía* como el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas <sup>3</sup>. Se trata de una disciplina de importancia básica en la Biología, porque suministra las bases para el ordenamiento natural de las entidades vivientes, y enriquece la significación de las investigaciones en otros terrenos biológicos al suministrar el marco apropiado que sirve de referencia para las relaciones entre los organismos.

La taxonomía es una disciplina muy antigua que se ha desarrollado en forma más o menos aislada, y en ella han tenido un peso considerable los elementos subjetivos. Esto ha sido condensado en una definición mordaz: "el taxónomo es un sujeto subjetivista objetivo" (NIEDERPRUEM y RAGLAND, 1964). En este siglo, la información genética, bioquímica y citológica acumulada sobre numerosos organismos es muy voluminosa y ha puesto en evidencia lo inadecuado de muchas clasificaciones aceptadas. Esas clasificaciones fueron producto, en muchos casos, de la actividad de aficionados con escasa preparación científica básica y con deseos de alcanzar notoriedad por el reordenamiento o la aplicación de nombres nuevos a entidades conocidas. La taxonomía, más que ninguna otra disciplina, regida más por re-

<sup>1</sup> Profesor titular de Microbiología en la Facultad de Ciencias Agrarias.

<sup>2</sup> Investigador con dedicación exclusiva en la Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias.

<sup>3</sup> *Taxonomía, clasificación y sistemática* con términos que a menudo se toman como sinónimos. Con esta definición y las que se dan a continuación, SIMPSON ha concretado cierta tendencia actual a separar los términos. Así, para este autor, *clasificación* es el ordenamiento de organismos en base a sus relaciones (o sea las asociaciones por similitud, contigüidad o ambas) y *sistemática* es el estudio científico de las clases y diversidad de los organismos y de todas y cada una de las relaciones entre los mismos.

glamentos que por principios lógicos, ha incorporado muchas veces el producto de la incompetencia. Al mismo tiempo, hay que admitir que en otros casos, la actividad de los "amateurs" ha resultado en estructuras sistemáticas de solidez notable.

Afortunadamente, existe hoy un marcado optimismo sobre la posibilidad de establecer la taxonomía sobre bases científicas firmes, y ese optimismo irradia de los que preconizan la aplicación de métodos numéricos a los problemas taxonómicos, como único medio de lograr la objetividad deseada.

Esta comunicación, dedicada a discutir algunos de los problemas de la taxonomía bacteriana, con especial referencia a la taxonomía del género *Pseudomonas*, será dividida en dos partes principales. En la primera parte, discutiremos los métodos para la obtención de datos aplicables a la sistemática bacteriana, y en la segunda bosquejaremos las bases y los procedimientos propios de la taxonomía numérica, que representa la tendencia moderna para el procesamiento racional de los datos recogidos.

#### MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS CON FINES A LA OBTENCIÓN DE DATOS DE VALOR TAXONÓMICO

Hace unos cuarenta años, como consecuencia del gran desarrollo de la bacteriología sanitaria, se inició en Estados Unidos un movimiento tendiente a crear un conjunto tipo de técnicas con las cuales se haría posible la identificación de las bacterias. El tiempo ha probado que este criterio estaba lejos de constituir el ideal de la bacteriología determinativa y mucho menos, de sentar las bases para el ordenamiento taxonómico de los distintos grupos microbianos. La selección de las técnicas recomendadas estaba fuertemente influenciada por los requerimientos de las bacterias del grupo del colibacilo, y esas técnicas no eran aplicables a muchos géneros importantes con requerimientos especiales, o fallaban en explorar las potencialidades de otros géneros más versátiles que el colibacilo.

Entre las bacterias se encuentran formas tan variadas desde el punto de vista fisiológico, que no es posible tipificar los métodos de estudio más allá de los requeridos para definir los grandes grupos naturales. Por lo que antecede, nosotros nos cuidaremos especialmente de sugerir que los métodos aquí indicados puedan constituir un cuerpo rígido aplicable a cualquiera de los grupos microbianos. Los métodos que discutiremos son aplicables en su mayoría al estudio del género *Pseudomonas*. Muchos de ellos pueden ser utilizados directamente o adaptados para el estudio de otros géneros. Quedan excluidos de la discusión los métodos muy especializados, que pueden llegar a ser muy variados y en cierto modo "circunstanciales". Como ejemplo citaremos los ensayos ideados para estudiar el modo de rotura del anillo bencénico por cepas de *Pseudomonas* (STANIER y colab., 1966), métodos que, como se ve clara-

mente, sólo pueden aplicarse a bacterias capaces de oxidar compuestos aromáticos. Estos métodos a menudo son inventados sobre la marcha en el trabajo taxonómico, y surgen del esfuerzo por buscar bases sobre las cuales pueda fundarse la subdivisión interna de un grupo con funciones especializadas.

### 1) *Métodos citológicos*

La reacción de GRAM, utilizada extensamente durante tanto años en la identificación de bacterias, es capaz de definir dos grandes grupos que poseen caracteres diferenciales muy netos. Hoy sabemos que todas las bacterias tienen en la pared celular un muco-complejo formado por un mucopolisacárido y un mucopéptido. El primero (al cual se debe probablemente la rigidez de la pared) tiene unidades de N-acetil-hexosamina, y ácido murámico (3-0-carboxietil-D-glucosa). El mucopéptido tiene pocos aminoácidos: alanina, glutámico, lisina y/o ácido diaminopimélico, y pequeñas proporciones de aspartato, glicina, treonina y serina. Este muco-complejo es el sustrato de la lisozima y el centro de la sensibilidad a la penicilina. Forma la casi totalidad de la pared de los GRAM positivos, y sólo el 10 al 20 por ciento de la pared de los GRAM negativos; de allí la sensibilidad mucho menor de estos últimos a la penicilina y a la lisozima. Los GRAM negativos contienen en la pared una proporción relativamente alta de lípidos y muchos otros aminoácidos, incluyendo los azufrados y los aromáticos. Entre los GRAM positivos y los GRAM negativos hay también diferencias que se aprecian con el microscopio electrónico observando secciones ultradelgadas. Los GRAM positivos muestran la membrana citoplásmica y hacia afuera una zona densamente uniforme; los GRAM negativos, en lugar de esta última tienen tres componentes (denso, transparente y denso) bien definidos. En realidad hay toda una constelación de diferencias biológicas, químicas y arquitectónicas que señalan diferencias fundamentales en la organización de las células de cada grupo. Puede decirse que pocas veces, como en el caso del GRAM, se tropieza con reacciones diagnósticas tan profundamente significativas. El mecanismo de la reacción parece depender de la baja permeabilidad del muco-complejo por el producto cristal violeta-iodo (SALTON, 1960).

La forma general de las células, tal como se la estudia bajo el microscopio común o de contraste de fases asiste a la división de las bacterias en grupos relativamente amplios. Hay géneros como *Pseudomonas* donde la forma de las células no ayudan a la subdivisión interna del grupo.

Una característica celular que merece especial comentario es el de las ciliias. *Pseudomonas* ha sido definido en base a la forma de bastón, la reacción negativa hacia el GRAM, y la posesión de ciliias polares. En estos últimos tiempos la validez del carácter cilial ha comenzado a tambalearse. Hay géneros como *Chromobacterium*

(SNEATH, 1960) donde es evidente el dimorfismo ciliar; hay cilias de distinta longitud de onda y además, de acuerdo a la edad del cultivo hay una predominancia de células monótricas o perítricas. Un fenómeno similar ocurre en algunas especies del género *Pseudomonas*. Así, en *P. stutzeri* el profesor HANS LAUTROP (comunicación personal) ha observado la aparición de cilias laterales cuando las células son cultivadas a unos 4° C. Esas cilias laterales tienen una menor longitud de onda que las polares. La significación de estas observaciones es difícil de valorar al momento presente. Para los fines prácticos, todavía puede decirse que las bacterias del género *Pseudomonas* tienen cilias polares cuando se las cultiva a 30° C, pero desde el punto de vista biológico estos hechos fuerzan a una revisión crítica del problema, y nosotros creemos que ésta es una de las principales cuestiones que quedan abiertas a la investigación en el futuro.

El citoplasma de las bacterias presenta estructuras que en muchos casos están correlacionados con otros caracteres de importancia taxonómica. En algunos casos se observan en el citoplasma arrollamientos membranáceos que son una prolongación de la membrana celular. Estas estructuras han sido llamadas *mesosomas* por FITZ-JAMES (1961). Las bacterias fotosintéticas tienen vesículas (cromatóforos) que contienen todo el pigmento fotosintético de la célula, y, a diferencia de los organismos fotosintéticos eucarióticos, no están agrupados dentro de un envoltorio como ocurre con los cloroplastos. Hay también en el citoplasma acumulaciones de productos de reserva, que pueden ser polisacáridos, polimetáfosfato (volutina) o el interesante polímero poli-beta-hidroxibutirato. En el género *Pseudomonas* la presencia de este polímero tiene significación taxonómica porque se correlaciona estrechamente con otros caracteres propios de grupos que aparecen "naturales".

## 2) *Métodos para la determinación de los compuestos de carbono utilizables por las células*

Hace más de cuarenta años, L. E. DEN DOOREN DE JONG, en el laboratorio de BELJERINCK en Delft se propuso estudiar los componentes de la microflora de los suelos responsable de los procesos de mineralización, y de inmediato tropezó con las bacterias del género *Pseudomonas* que tienen en estos procesos un papel de importancia fundamental. Siguiendo un razonamiento lógico, DEN DOODEN DE JONG trató de analizar la complejidad de las especies de ese género en base a la determinación de la variedad de compuestos carbonados que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía.

Este análisis puede ser practicado de diversas maneras. DEN DOOREN DE JONG utilizó cajas de PETRI conteniendo agar de un medio mineral apropiado y un compuesto orgánico por vez como fuente única de carbono y energía. La superficie de la caja de PETRI se

presta para el ensayo de un buen número de cepas, las cuales son sembradas con un ansa en posiciones prefijadas en cada caja. Es evidente que el método tal como lo practicó DEN DOOREN DE JONG exige un buen número de manipulaciones por caja. En la práctica actual este número de siembras por caja puede reducirse a una sola operación utilizando el método de impresión ideado por los LEDERBERG (LEDERBERG y LEDERBERG, 1952). Esta variante fue introducida con buenos resultados por STANIER y colab. (1966). Cada conjunto de cepas se siembra con ansa en posiciones definidas de una caja de PETRI conteniendo medio orgánico complejo, y luego de la aparición de desarrollo se imprime con terciopelo en las ca-

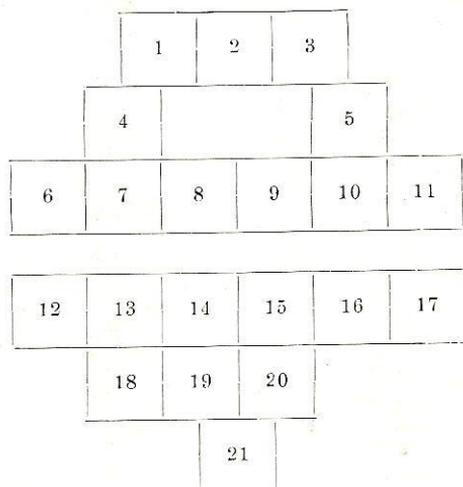


Fig. 1. — Plato usado en las siembras para el análisis nutricional de 21 cultivos de *Pseudomonas*. Algunos de los resultados se ilustran en la figura 2.

jas conteniendo los medios químicamente definidos con las fuentes de carbono a probar. El desarrollo indica la utilización del compuesto en cuestión como fuente de carbono y de energía, y es anotado a los cuatro días de la impresión (figs. 1 y 2)

El análisis nutricional introducido por DEN DOOREN DE JONG (1926) puede también ser practicado en medio mineral líquido, distribuido en tubos a razón de 4 a 5 ml por tubo. Luego de la siembra, los tubos se incuban preferentemente con agitación. El método es considerablemente más laborioso que los procedimientos que usan cajas de PETRI, pero ofrece algunas ventajas, tales como: a) no se agrega una sustancia de pureza dudosa como el agar<sup>1</sup>; b) no existe competencia entre las cepas, lo cual puede ocurrir en las

<sup>1</sup> Se recomienda el uso de agar purificado (p. ej. Oxoid N° 2, o Ionagar).

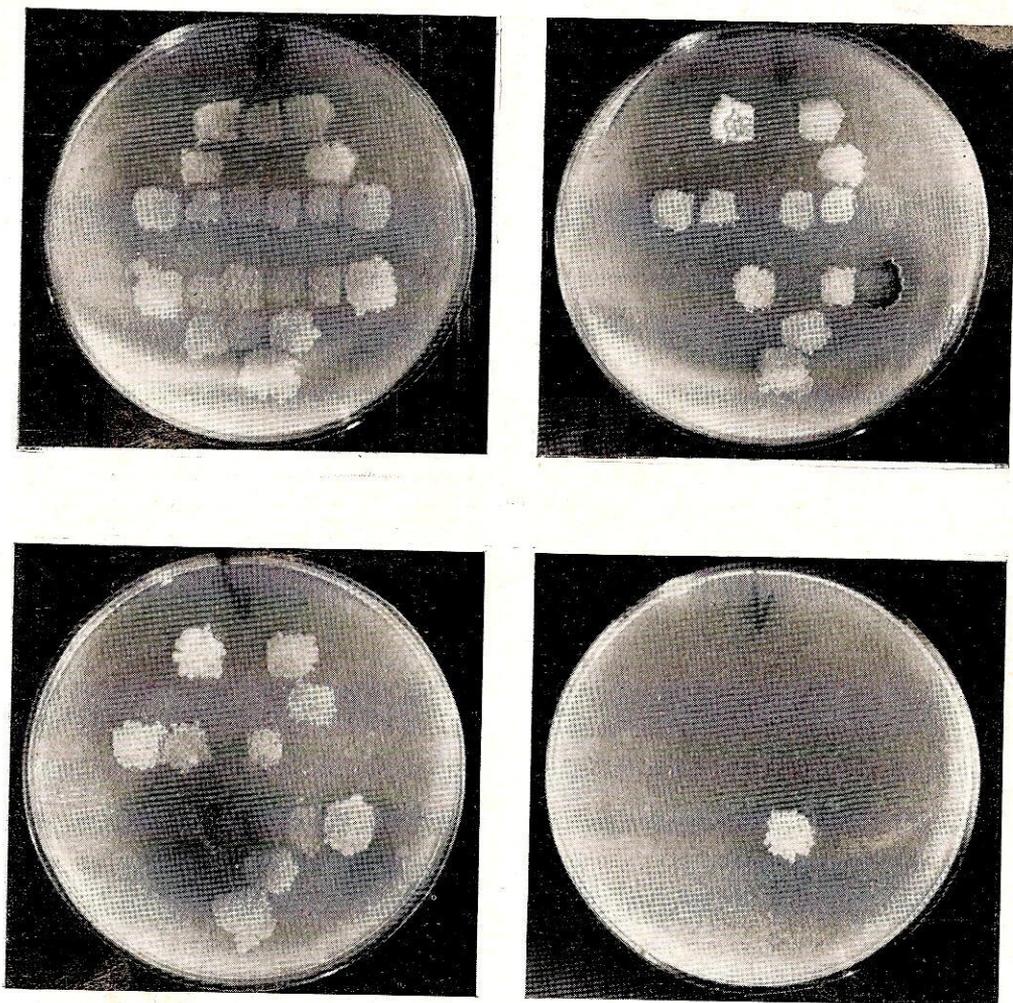


Fig. 2. — a) *superior izquierda*: medio conteniendo putrescina. Todos los cultivos impresos mediante la técnica de LEDERBERG Y LEDERBERG (1952) han desarrollado. b) *superior derecha*: medio con amilamina. Han dado desarrollo completo (+) los cultivos 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20 y 21. Los cultivos 2 y 11 han desarrollado a medias ( $\pm$ ). El cultivo 17 ha producido un pigmento anaranjado que no difunde al medio. c) *inferior izquierda*: medio con fenil-acetato. Son positivos los cultivos 1, 3, 5, 6, 7, 9, 14 (con formación de pigmento rosado difusible), 16, 17, 20 y 21. El cultivo 15 da escaso desarrollo ( $\pm$ ). d) *inferior derecha*: medio con D-arabinosa. Solo el cultivo 15 ha dado desarrollo. La marca que se nota en la parte superior de las cajas sirve para la orientación de la impresión con terciopelo y para las lecturas.

cajas de PETRI cuando las zonas sembradas con distintas cepas están muy cercanas entre sí; *c*) si el crecimiento es pobre, puede hacerse inoculaciones sucesivas, con lo cual desaparece el efecto de las impurezas acarreadas por el inóculo original. Los sucesivos transplantes en medio líquido producen una dilución muy grande de las impurezas, y los resultados son de más fácil interpretación; *d*) el desarrollo en los tubos puede ser medido turbidimétricamente, o el líquido puede ser sometido a análisis cualitativo para el reconocimiento de algunos productos finales, etc. En la práctica, el método de las cajas de PETRI es excelente. Los resultados son claros y reproducibles. Es aconsejable, sin embargo, controlar los resultados dudosos en tubos de medio líquido.

### 3) *Métodos para el reconocimiento del ataque parcial de compuestos orgánicos*

El ataque de un compuesto orgánico por las bacterias puede ser parcial, y el producto formado a veces se acumula cuantitativamente en el medio. En esos casos no hay crecimiento a menos que se agregue al medio otro substrato carbonado asimilable. El ataque parcial de los compuestos de carbono tiene importancia en la caracterización de los microbios. Para reconocerlo es preciso medir la desaparición del compuesto original y la acumulación del producto del metabolismo. Hasta el presente no hay métodos prácticos para estudiar este tipo de caracteres en un gran número de cepas a la vez, como se hace con el análisis nutricional de DEN DOOREN DE JONG. De los métodos que se utilizan en la práctica, el más difundido es el propuesto por HUGH y LEIFSON (1953), utilizando un medio conteniendo sustancias orgánicas complejas en concentración baja, un indicador y la sustancia orgánica (casi siempre un azúcar) cuyo ataque parcial, con formación de ácido, se desea estudiar.

El método evidentemente cubre un aspecto muy unilateral del ataque parcial de los substratos, porque sirve para reconocer la producción de sustancias que alteran el pH del medio. No obstante, los resultados son muy claros y reproducibles. Sería muy conveniente tratar de idear métodos más generales, aplicables a un gran número de cepas y a una gran variedad de substratos.

### 4) *Determinación de la temperatura óptima de desarrollo.*

Fuera de la determinación del rango aproximado de temperaturas a las cuales se logra el desarrollo óptimo, esta determinación no tiene gran aplicación sobre todo por lo tediosa cuando se estudia un gran número de cepas. En el género *Pseudomonas* ha resultado más ilustrativo estudiar el comportamiento a dos temperaturas extremas, 4° y 41° C, y en algunos casos (como en el grupo *P. stutzeri* - *P. stantieri*) la determinación precisa de una temperatura extrema ha resultado de interés.

### 5) *Determinación del pH óptimo de desarrollo.*

Esta es una determinación que pocas veces se practica sobre un rango amplio de pH, y en la práctica, el bacteriólogo usa medios que están cerca del valor que se supone conveniente para el grupo bacteriano bajo estudio. La determinación del pH óptimo es muy difícil porque es engorroso mantener constante el pH durante el crecimiento, especialmente cuando el pH en estudio está lejos del valor pK del fosfato, ya que es muy complicado elegir un buffer no tóxico o que no sea utilizado por las células (como sucede con las sales de los ácidos orgánicos).

El pH puede mantenerse constante con instrumentos especiales de uso corriente en los laboratorios, pero estos instrumentos no se prestan para trabajar en condiciones de asepsia, y se hace muy complicada la prueba de varias cepas a diversos valores de pH a la vez.

### 6) *Requerimientos de factores de crecimiento.*

Muchas bacterias no crecen en medio mineral con ninguna de las fuentes de carbono y energía a menos que se agregue algunos factores de crecimiento en pequeñas cantidades. Estos requerimientos constituyen caracteres de importancia taxonómica. Una vez que se conocen, el análisis de DEN DOOREN DE JONG es posible, usando medio mineral al cual se ha agregado los factores requeridos. Así, *Pseudomonas maltophilia* pudo ser estudiada nutricionalmente (STANIER y colab., 1966) gracias a haber podido determinar en el curso del trabajo su requerimiento por pequeñas cantidades de metionina (25 microgramos por mililitro). El medio conteniendo metionina sin el agregado de ninguna otra sustancia orgánica no da desarrollo visible; el agregado de una fuente de carbono apropiada (p. ej. L-malato) produce un desarrollo abundante. Otro buen ejemplo lo tenemos en el análisis nutricional de las cepas de *Moraxella oxidasa-positivas* realizado por BAUMANN (1966). Es posible que otros géneros puedan ser estudiados de la misma manera.

En ciertos casos, las sustancias requeridas para desarrollar en medio mineral son de tal complejidad y pueden necesitarse en tal concentración que ya no es posible estudiar la utilización de compuestos simples de carbono por los métodos descriptos. En esos casos, se requieren determinaciones más tediosas y precisas (como por ejemplo, experimentos manométricos) para conocer el rango de substratos utilizables.

### 7) *Fuentes de nitrógeno utilizables*

Las fuentes de nitrógeno aprovechables para el crecimiento y que son comúnmente ensayadas, son el nitrógeno gaseoso, las sales de amonio, los nitratos, urea y los aminoácidos. Ocasionalmente (TSUKAMURA, 1966) puede probarse aminas y amidas diversas.

### 8) *Crecimiento autotrófico*

Esta propiedad refleja la capacidad de usar  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono. El  $\text{CO}_2$  puede ser asimilado por fotosíntesis o bien gracias a la posesión de un sistema enzimático especial que acopla la oxidación de ciertas sustancias inorgánicas con la fijación de  $\text{CO}_2$ . En las bacterias todavía no se ha explorado la presencia de sistemas incompletos de fijación, por ejemplo, la presencia de carboxidismutasa en organismos incapaces de vivir con  $\text{CO}_2$  como única fuente de carbono.

En el género *Pseudomonas* la determinación de la capacidad de fijar  $\text{CO}_2$  en una atmósfera conteniendo hidrógeno y oxígeno tiene una importancia especial. El género *Hydrogenomonas* ha sido considerado como un apéndice fisiológico del género *Pseudomonas*, pero en estos últimos tiempos, por las investigaciones realizadas en Berkeley, se ha puesto en duda que las bacterias del hidrógeno sean un grupo morfológicamente homogéneo, ya que se ha encontrado que algunos de sus representantes tiene cilias laterales. Estas formas peritricas se parecen notablemente a algunas de las especies del género *Pseudomonas* desde el punto de vista nutricional. Es evidente que habría que agotar los procedimientos que permitirían saber si esas especies de *Pseudomonas* son capaces de dar cilias laterales, y de lo contrario, estos casos tal vez deban ser clasificados junto a los ejemplos de evolución convergente.

### 9) *Denitrificación*

Esta propiedad se pone en evidencia por la producción de gas a partir de nitrato en ambiente anaerobio. El medio debe contener una fuente de carbono apropiada que sirve para la reducción del nitrato como dadora de electrones. Este es un punto de interés. En teoría se podría elegir cualquiera de los substratos que son utilizados como fuentes de carbono y energía por la bacteria a estudiar, con la única excepción de aquellos substratos (como benzoato) cuyo ataque inicial es catalizado por oxigenasas. Sin embargo este punto nunca ha sido estudiado.

### 10) *Reducción de nitrato con formación de nitrito*

STANIER y *colab.* (1966) no usaron esta propiedad para la caracterización de taxones dentro del género *Pseudomonas*, aunque es un carácter que goza de bastante popularidad entre los taxónomos. Estos autores dejaron de lado la determinación por las razones siguientes: a) en todas las cepas estudiadas se determinó la capacidad de denitrificación, que es definida como la reducción de nitrato a nitrógeno o a óxido nitroso. Esta reducción pasa por nitrito como intermediario; b) todas las especies estudiadas, salvo una (*P. maltophilia*) viven con nitrato como fuente de nitrógeno,

y eso implica que el nitrato es reducido para ser transformado en el grupo amino de los aminoácidos. Es posible que en otros grupos la acumulación de nitritos a partir de nitrato tenga una significación taxonómica más clara.

### 11) *Reacción de la oxidasa*

Esta reacción se produce en pocos segundos al poner en contacto células jóvenes en presencia de una solución acuosa de p-fenilenediamina; el mecanismo es desconocido hasta el presente, aunque sus resultados son claros y se correlacionan bien con otros datos característicos de algunos grupos. STANIER y colab. (1966) hallaron una correlación entre la presencia de citocromo *c* y la reacción oxidásica positiva. Esa correlación había sido observada por primera vez por el Dr. BAUMANN en el mismo laboratorio trabajando con el género *Moraxella*. BAUMANN también había señalado que el colibacilo sigue la regla. Tal vez la correlación sea válida en general para las bacterias GRAM negativas. En los GRAM positivos no parece haber tal correlación.

### 12) *Producción de pigmentos*

Algunas especies de bacterias producen pigmentos y éste es un carácter importante desde el punto de vista taxonómico. Cuando se produce una mutación apigmentada, en muchos casos es difícil la identificación cuando se usan los métodos convencionales. Un análisis profundo puede sin embargo colocar los mutantes apigmentados junto a los otros organismos de su propio grupo, como ha sucedido con *Pseudomonas* fluorescentes apigmentados en las investigaciones de STANIER y colab. (1966).

El pigmento puede permanecer en las células (eso ocurre especialmente en el caso de los pigmentos liposolubles como los carotenoides o en el caso de pigmentos que intervienen en procesos energéticos, como los flavínicos y los citocromos) o pueden difundirse en el medio. Hay en la bibliografía un número de medios de cultivo especiales que estimulan la producción de pigmentos.

### 13) *Espectro de citocromos*

En las bacterias aerobias tiene un gran interés el conocimiento de la composición de los pigmentos transportadores de electrones llamados citocromos. Estos pueden ser estudiados en las células intactas mediante el uso de suspensiones muy densas, usando espectrofotómetros de gran sensibilidad y preferentemente de registro automático. La posición de los picos que aparecen en la zona visible luego de la reducción de la suspensión con nitrógeno gaseoso o ditionito, es altamente característica, y se correlaciona con otras propiedades de los grupos bacterianos (STANIER y colab., 1966).

#### 14) *Enzimas hidrolíticas extracelulares*

Las principales enzimas extracelulares cuyo ensayo cualitativo puede hacerse en medios comunes por métodos aplicables a un gran número de cepas a la vez, con las que intervienen en: *a)* la hidrólisis de proteínas (gelatina, caseína); *b)* hidrólisis de polisacáridos (almidón, pectina, quitina) *c)* hidrólisis de lípidos (grasas, aceites, Tween 80); *d)* hidrólisis de lecitina; *e)* hidrólisis de poli-beta-hidroxibutirato; etc.

Los métodos corrientes para el estudio de la hidrólisis de las moléculas complejas son satisfactorios, y no requieren comentario. Sin embargo, hay que estar convenientemente prevenido acerca de la interpretación de las reacciones débiles y tardías, porque pueden ser debidas a enzimas endocelulares, que se liberan por lisis de las células.

La hidrólisis de la lecitina merece cierta discusión. Esta reacción se estudia en la práctica cultivando las células en presencia de un medio natural que contiene lecitina (yema de huevo). El mecanismo de la reacción de la yema de huevo es desconocido. Los tipos de reacción de las cepas de *Pseudomonas* en el medio sólido con yema de huevo son tres bien diferenciables. Una clara reacción positiva está indicada por un halo blanco rodeando la colonia. Un segundo tipo de reacción es la formación de un halo transparente. Este halo, que probablemente indica proteolisis, puede ser permanente (en cuyo caso la reacción se anota como negativa) o puede presentar, luego de algunos días, un precipitado débil, de aspecto irisado, en la inmediata vecindad de la zona de desarrollo. Este último caso puede anotarse como reacción débil. Aunque desde el punto de vista enzimológico han sido estudiadas varias lecitinasas, que se diferencian principalmente por el punto de ataque de la molécula de lecitina, hasta ahora no se sabe a qué lecitinasa corresponde cada tipo de reacción observado en la prueba de la yema de huevo. Es posible que en la reacción tal como se la observa en las cajas de PETRI haya también participación de las proteínas del medio.

Es muy posible que en el futuro, cuando se conozcan mejor las enzimas extracelulares responsables de la hidrólisis de las macromoléculas, esos conocimientos tengan una significación más profunda en la taxonomía de las bacterias. Hay algunos tipos de enzimas extracelulares que ofrecen un campo muy atrayente a la investigación. Entre ellas se encuentran las proteasas que intervienen en la licuación de la gelatina. Es curioso que esta reacción, que es tan vieja como la bacteriología misma, haya sido estudiada sólo en contados organismos. Sería interesante conocer aspectos tan importantes como el número y la clase de enzimas que pueden producir los distintos grupos bacterianos, y los aspectos del control. Este tema merece un estudio cuidadoso que hoy podría realizarse gracias al número de substratos artificiales disponibles y a la excelencia

de los métodos enzimológicos. El aislamiento, cristalización y caracterización de la proteasa extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* por MORIHARA (1963) es un ejemplo digno de ser extendido con fines comparativos a otras especies de *Pseudomonas*.

#### 15) *Susceptibilidad a bacteriófagos*

La susceptibilidad al ataque de determinada cepa de bacteriófago es una propiedad muy específica. Los bacteriófagos líticos aislados a partir de determinada cepa bacteriana por lo general sólo atacan a cepas de características muy cercanas a la que sirvió para el aislamiento. La tipificación usando bacteriófagos es muy interesante desde el punto de vista taxonómico; así, por ejemplo, las investigaciones realizadas en Davis por el Profesor MORTIMER P. STARR y colaboradores utilizando las mismas cepas de *Pseudomonas* estudiadas en Berkeley (STANIER y colab., 1966) han dado con la tipificación con bacteriófagos esencialmente los mismos resultados que los alcanzados por el análisis nutricional. La susceptibilidad al ataque de un mismo bacteriófago por dos cepas bacterianas indica un grado de homología muy marcado, porque depende de la semejanza de las superficies celulares y de la composición del citoplasma donde ocurrirá la multiplicación vegetativa de las partículas del bacteriófago.

#### 16) *Métodos para el estudio directo de las macromoléculas importantes*

Al estudiar caracteres cuyo fundamento bioquímico puede expresarse con precisión, el bacteriólogo puede definir un aspecto especial del fenotipo, el "enzimotipo". Los genes tienen información que se expresa finalmente en la estructura de proteínas. Definir el enzimotipo significa, pues, describir un producto relativamente directo de la actividad génica y aunque las consecuencias secundarias de las mutaciones puede llegar a ser extremadamente complicadas, no hay duda que la distancia entre el carácter que se estudia y el gen es más corta en las bacterias que en los seres superiores.

Esta ventaja de las bacterias fue aprovechada por los biólogos modernos cuando apareció la necesidad imperiosa de ahondar más el análisis para obtener la información más directa posible contenida con las macromoléculas (especialmente ácidos nucleicos y proteínas) de importancia fundamental. De allí surgió una disciplina que ya tiene estructura de ciencia independiente, la Biología Molecular, que ha incorporado métodos bioquímicos y biofísicos apropiados para visualizar la estructura y el comportamiento de esas macromoléculas.

El esquema de la síntesis de las proteínas es una de las conquistas científicas más grandes de todos los tiempos. Ese esquema parte de la estructura del ácido desoxiribonucleico del núcleo, que

es copiado por un mecanismo enzimático delicadamente controlado, en un estructura similar, la del ácido ribonucleico.

A esta etapa de copia se llama *transcripción* y al ribonucleico que es producto de la transcripción se lo llama mensajero. El mensaje es luego traducido (etapa de *traducción*) a nivel del ribosoma, en el proceso de síntesis de las proteínas. El conocimiento de los componentes de este sistema para cada uno de los caracteres de un individuo es una meta que tal vez nunca va a ser alcanzada. Sin embargo, la información obtenida hasta hoy especialmente en bacteriología, aunque infinitesimal, ha sido extremadamente interesante. A continuación resumiremos el aporte de las investigaciones directas de las macromoléculas al campo de la taxonomía bacteriana.

En la doble hélice del ADN, adenina está apareada con timina y citosina con guanina. Las proporciones de esas bases es fija para una misma especie, y en organismos distintos pueden ser muy diferentes. Es éste, como veremos, un dato de utilidad que tiene amplia aplicación en la taxonomía actual de las bacterias. Para caracterizar la composición global en bases de ADN, bastaría con determinar químicamente una de las cuatro bases. Así, si hallamos que hay un 18 por ciento de guanina, también citosina será 18 por ciento, y la suma de adenina y timina representará el 64 por ciento restante, con 32 por ciento para cada base. En la práctica hay métodos más cómodos, aunque más indirectos, y se basan en la determinación de la temperatura media de denaturación del ADN, o en la determinación de la densidad de éste, valores ambos que se hallan correlacionados con la proporción de las bases en la molécula intacta. La expresión más corriente de los resultados en moles por ciento de guanina más citosina ( $\frac{G + C}{G + C + A + T} \cdot 100$ ),

Este valor al cual llamaremos GC de aquí en adelante, no muestra grandes variaciones en plantas y animales, que se agrupan en el rango 30 a 50, mientras que en las bacterias va desde 20 a 75, aproximadamente.

Si aceptamos que los organismos que se hallan relacionados deben poseer amplias zonas de sus ADN con igual contenido en bases, los valores de GC de los mismos deben ser iguales. Los organismos entre los cuales puede demostrarse la transferencia de material genético y donde el material genético es incorporado al genoma del recipiente, en general cumplen con esta condición.

Los organismos no relacionados entre sí, no necesariamente deben tener igual valor de GC; en otras palabras, es de esperar que muchas especies distintas tengan igual valor de GC. Desde el punto de vista práctico, entonces, es fundado alejar entre sí los organismos con distinto GC en la clasificación, y sólo tomar en cuenta la igualdad de GC de dos organismos cuando otros caracteres indiquen estrecho parentesco entre los mismos.

Al presente, muchos valores de GC para bacterias han aparecido en la literatura. Estos valores han confirmado en muchos casos las divisiones y agrupamientos logrados por los buenos taxónomos usando métodos convencionales. Algunas consecuencias de interés de los valores aparecidos en la literatura son el agrupamiento de *Bacillus cereus* con sus variedades *mycoides* y *anthracis*; la separación de *Neisseria catarrhalis* y *Neisseria meningitidis*; el agrupamiento de *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*; la delimitación de dos grupos en el género *Vibrio*.

*Pseudomonas* ofrece una amplia variación de valores de GC (de 58 a 68) (MANDEL, 1966). Esto es un indicio evidente de la gran heterogeneidad interna del grupo, que puede ponerse de relieve con otros caracteres taxonómicos diversos. Así por ejemplo, desde el punto de vista nutricional, una especie, *P. lemoignei*, usa 8 compuestos de carbono, y otra *P. multivorans*, más de 100, a partir de una lista de 150 substratos.

Otro método para la caracterización del ADN es la determinación de la frecuencia con que se encuentran los 16 posibles ( $2^4$ ) dinucleótidos. Estas frecuencias pueden servir para comparar organismos, pero en la práctica, dado que se trata de determinaciones químicas o enzimáticas relativamente complejas, no se cuenta con muchos datos aplicables a problemas taxonómicos generales.

Dos preparaciones de ADN de distintos orígenes pueden ser comparadas para saber si tienen zonas homólogas, mediante una técnica que consiste en hibridar in vitro las moléculas. El principio de las hibridaciones moleculares ofrece perspectivas muy interesantes desde el punto de vista taxonómico.

En general existe una estrecha correlación entre los datos de composición del ADN, la compatibilidad genética, y la formación de híbridos moleculares in vitro.

Mientras el estudio del ADN ha ayudado en buena medida a la taxonomía bacteriana, no puede decirse lo mismo de los estudios de ARN todavía. Las razones no son difíciles de imaginar. Una gran proporción del ARN celular es ribosómico, y la composición en bases es muy uniforme en distintas especies. Esto no sorprende dada la aparente equivalencia de los ribosomas (aún en los sistemas in vitro reconstruidos con elementos de distintas especies) en cuanto a su capacidad de "entender" distintos mensajes en el proceso de traducción del código genético. El ARN soluble también parece ser marcadamente uniforme. En cuanto al ARN mensajero, es de esperar que éste refleje la variación en composición del ADN, y como se trata de un producto de transcripción del ADN y mucho más difícil de aislar que éste, no tendría objeto tomarlo como base para el examen de rutina de organismos que deben ser comparados desde el punto de vista taxonómico. No obstante estas razones, el estudio del ARN tiene un futuro de interés en el campo de la taxonomía. Por ejemplo, la invariancia en la composición de bases

del ARN ribosómico es muy interesante ya que YANKOFESKY y SPIEGELMAN (1962) demostraron la complementariedad con parte del genomio, y que esa complementariedad sólo existía si el ADN y el ARN ribosómico provenían del mismo organismo. Otro interesante aspecto es la hibridación molecular entre ARN mensajero y ADN, como medio de estudiar la homología taxonómica.

Las proteínas, como expresión final del mensaje contenido en el genomio, son macromoléculas de gran valor para el estudio taxonómico de las bacterias. Ya hemos visto que en estos organismos, la posibilidad de definir el "enzimotipo", es decir, el conjunto de las actividades bioquímicas debidas a las proteínas de actividad catalítica, representa un análisis más profundo que el estudio de la mayoría de los caracteres susceptibles de enfoque genético en los organismos superiores. El enzimotipo no es simplemente el catálogo de las actividades bioquímicas, sino también el conocimiento de las propiedades de las enzimas como especies químicas. Así, por ejemplo, dos organismos con ADN de distinta composición, pueden ofrecer un parecido superficial porque pueden ser capaces de llevar a cabo vías metabólicas complejas idénticas. Un examen de las enzimas que intervienen a menudo demuestra que la semejanza es superficial y que esas proteínas tienen diferencias fundamentales en su composición.

Hoy se dispone de métodos apropiados para el estudio de las proteínas; así, puede estudiarse la composición y la secuencia de los amino ácidos; la composición ("impresión digital") de los péptidos que se obtienen por digestión con proteasas de especificidad conocida; las propiedades electroforéticas, catalíticas, serológicas, etc. La comparación de las enzimas que catalizan la misma reacción bioquímica y que provienen de distintas especies, es uno de los aspectos más interesantes desde el punto de vista taxonómico. Es evidente que el ideal lo constituye la determinación de la secuencia de aminoácidos y la estructura terciaria y cuaternaria, pero hasta el presente éste es un objetivo que sólo puede cumplirse muy laboriosamente con las proteínas de peso molecular más pequeño. En la práctica se puede obtener información sobre las diferencias entre proteínas mediante técnicas como la electroforesis, el estudio de las propiedades físico químicas generales, la afinidad por análogos de coenzimas (cuando éstas son necesarias para la reacción), el análisis inmunológico, etc.

La bioquímica provee hoy otro elemento de gran valor para la taxonomía: el estudio del control de las reacciones metabólicas en la célula. Este control puede ejercerse sobre la actividad misma de las enzimas ("feed-back" o realimentación), o bien puede ser de tipo mediato, al ejercerse al nivel de la síntesis de las enzimas (inducción y represión enzimáticas). Estos aspectos son explorados intensamente en un buen número de laboratorios y han sido revelados ya detalles muy interesantes de la coordinación de las reacciones polienzimáticas, que prometen aplicaciones taxonómicas importantes.

METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LOS DATOS  
DE VALOR TAXONOMICO

El procesamiento de los datos recogidos en el estudio de los cultivos bacterianos, ha sido efectuado por lo general de una manera arbitraria. Esta es la etapa en la cual el taxónomo por lo general introduce los elementos subjetivos que han sido criticados a menudo por los no-taxónomos, y es aquí, justamente, donde se ha sentido la falta de normas y procedimientos objetivos y reproducibles. La taxonomía numérica representa el intento más coherente para lograr este propósito.

Los propulsores más destacados de la taxonomía numérica, SOKAL y SNEATH (1963) definen a esta disciplina como "la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el ordenamiento de estas unidades en taxones sobre la base de sus afinidades". Estos autores definen (ob. cit., p. 50) las "posiciones básicas" de la taxonomía numérica de la manera que lo expresan en los axiomas siguientes:

1. La taxonomía ideal es aquella en la cual los taxones tienen el contenido más grande de información, y está basada en tantos caracteres como sea posible.
2. A priori, todos los caracteres tienen igual "peso" en la creación de taxones naturales<sup>1</sup>.
3. La similitud (o afinidad) general entre dos entidades cualesquiera está en función de la similitud de los numerosos caracteres en los cuales esas entidades son comparadas.
4. Puede construirse taxones definidos en base a las diversas correlaciones de caracteres en los grupos en estudio.
5. La taxonomía, tal como la concebimos es, por consiguiente, una ciencia estrictamente empírica.
6. La afinidad es estimada en forma independiente de toda consideración filogenética.

Para una revisión de la historia del desarrollo de los métodos numéricos en taxonomía remitimos al lector a la obra citada (SOKAL y SNEATH, 1963). No obstante, nos parece conveniente aclarar algunas de estas "posiciones básicas" utilizando los conceptos conteni-

<sup>1</sup> Las posiciones básicas 1 y 2 están estrechamente enlazadas. En base a un solo carácter, el vuelo, los antiguos ponían a los murciélagos entre los pájaros. De la misma manera, sería igualmente criticable colocar a los murciélagos junto a otros mamíferos por la posesión de glándulas mamarias, un carácter de igual peso que el vuelo, según el concepto adansoniano. Es evidente que la idea adansoniana debe ir reforzada con la colección de buen número de caracteres, y que únicamente de esta manera los murciélagos podrán ser ubicados más cerca de las ballenas que de los gorriones.

dos en esa obra. Los métodos numéricos preconizados por los taxónomos modernos arrancan de las obras de un botánico francés, M. ADANSON, que vivió entre 1727 y 1806. ADANSON se lanzó contra el principio aristotélico de las "esencias", y trató de basar la separación de los taxones en la correlación de caracteres, tomando todos los caracteres en estudio, tratándolos a un mismo nivel (es decir, dándoles igual "peso"), y estableciendo su relación numérica para definir la afinidad.

La igualación del "peso" de distintos caracteres atrajo la tormenta de la crítica sobre la obra de ADANSON y ésta quedó prácticamente tapada hasta época reciente cuando, a partir del desarrollo de la biometría y de la difusión de las computadoras electrónicas, los métodos numéricos en biología toman vuelo.

Este punto de la igualdad de jerarquía para todos los caracteres estudiados merece un comentario especial, por su posición central en la taxonomía adansoniana, y aunque extensa, la siguiente traducción de los conceptos de SOKAL y SNEATH (1963, pp. 34-35) nos parece el comentario más apropiado. Dicen los autores: "La teoría de la jerarquía de los caracteres es una falacia que, afortunadamente se está desvaneciendo. Esta teoría sostiene que uno puede establecer *a priori* reglas acerca de cuáles caracteres separan las especies, cuáles separan los géneros, cuáles separan las familias, y así siguiendo. Esto es la antítesis del método de descubrimiento *a posteriori*. Este último *encuentra* las características que realmente separan los taxones naturales previamente reconocidos. Este es, lo sostenemos, el procedimiento correcto. La idea de la jerarquía es otra forma de la teoría del peso desigual y *a priori*. Es muy vieja; de hecho, como CAIN (1958) ha mostrado, arranca de la teoría aristotélica de las esencias. Este autor cita a CESALPINO, quien mantenía que la nutrición era de importancia capital para las plantas, y por lo tanto, *a priori*, la forma de la raíz era la primera característica para la subdivisión de las plantas, dando la división principal de hierbas y árboles. DE CANDOLLE (1813, pp. 73-89) llamó a esto el principio de la subordinación de los caracteres, lo atribuyó a BERNARD DE JUSSIEU, y dio una lista de importancia de los caracteres botánicos en el siguiente orden: los del embrión, los de los estambres y pistilo, los de las envolturas del embrión, y los de las estructuras florales accesorias. Sin embargo, calificó estas reglas con tantas excepciones que su validez es muy dudosa tal como él las presenta, y es bien claro que en la práctica la base real de sus teorías es la correlación entre los diversos caracteres.

"Nosotros creemos que no se pueden hacer tales jerarquías *a priori*, y es bien sabido que en la práctica se usan jerarquías bien diferentes para diferentes grupos taxonómicos. Los caracteres que separan las especies de un género usualmente no lo hacen en el género siguiente: donde parecen hacerlo, las taxonomías son a menudo arbitrarias y artificiales. Muchos sistemáticos han creído que ciertas clases de caracteres separarán especies dentro de géneros (por

ejemplo caracteres fisiológicos) mientras que otras clases, (tales como los caracteres morfológicos) separarán géneros dentro de cada familia. Es fácil encontrar excepciones en la mayoría de las clasificaciones naturales, y en la práctica se encuentra que algunos caracteres fisiológicos y morfológicos sirven indistintamente para separar especies y para separar géneros. La dificultad es decidir qué caracteres fisiológicos y qué caracteres morfológicos obedecen la regla y cuáles son excepciones; de cualquier modo, muchos de ellos pueden ser plausiblemente considerados como fisiológicos y morfológicos a la vez. Objeciones similares se aplican a todas las clases de caracteres y a todos los rangos taxonómicos. Sería ciertamente curioso si la evolución, que es responsable de la jerarquía natural, fuera tan servicial como para operar solamente sobre cierta clase de caracteres en rangos taxonómicos especificados. Y de nuevo aparece claro que en la práctica son las correlaciones entre los caracteres, cualquiera sea su naturaleza, las que deciden la cuestión, porque de otra manera sería imposible explicar por qué diferentes sistemáticos de indiscutible competencia sostienen puntos de vista diametralmente opuestos. Frecuentemente el problema de clases de caracteres surge porque los taxónomos apuntan hacia propósitos mutuamente incompatibles como cuando, por ejemplo, se usan caracteres adaptativos para estimar el grado de convergencia evolutiva, mientras los caracteres no-adaptativos se usan para las relaciones filogenéticas; las discrepancias entre los esquemas es entonces inevitable."

Los artículos de SNEATH (1962), SNEATH y SOKAL (1962) y, sobre todo, el libro de SOKAL y SNEATH (1963) son las mejores fuentes para el aprendizaje de los procedimientos usados en taxonomía numérica. Por lo tanto, sólo esbozaremos aquí las líneas generales de estos procedimientos.

Entre los organismos del grupo que se estudia se trata de establecer similitudes *fenéticas* (es decir, similitudes en los caracteres que constituyen el fenotipo). En la taxonomía numérica se da por sentado que: *a*) es muy probable que cada carácter sea afectado por más de un gen; *b*) no hay grandes grupos de genes que afectan exclusivamente un tipo de caracteres o los caracteres de una parte del organismo. En otras palabras, si se recoge un número mucho más grande de datos acerca de una parte del cuerpo de un animal, en relación a los datos recogidos para otras partes del cuerpo, no se corre el riesgo de estar estudiando la expresión de una clase principal de genes; *c*) aunque es deseable tomar en consideración un gran número de caracteres (los autores mencionados recomiendan un número no menor de cuarenta) los incrementos de información que se logran disminuyen progresivamente con el aumento de ese número. Teóricamente debiera llegarse a un límite pasado el cual el aumento del número de caracteres ya no es provechoso.

Los organismos en estudio y los caracteres elegidos se disponen en una tabla de doble entrada, y se anotan los resultados de las

observaciones. Estos pueden ser de dos clases. Un carácter puede presentar los estados 0, 1, 2, 3, etc., o bien puede estar presente o ausente (caso común en bacteriología) en cuyo caso las anotaciones más comunes son + y -. Para computar la similitud entre dos organismos dados, se usa uno de tres tipos de coeficientes diferentes. Estos tres tipos son los *coeficientes de asociación* (usados para caracteres anotados como + ó -), *coeficientes de correlación* y las *medidas de distancia* (usando un espacio multidimensional con una dimensión por carácter).

Los coeficientes de asociación son los más usados en bacteriología. Diversos coeficientes han sido propuestos y éstos pueden ser divididos en dos grandes grupos, según que tomen o no en consideración los caracteres negativos para las dos cepas que se comparan. Una colección de coeficientes de asociación propuestos al presente se encuentra en el libro de SOKAL y SNEATH (1963, p. 129).

Los coeficientes mencionados son la medida de la similitud entre las entidades taxonómicas tomadas de a pares, y toman en cuenta el número de caracteres que los organismos tienen en común y aquellos caracteres en los cuales esos organismos difieren. Una vez obtenidos todos los coeficientes, los organismos se agrupan de acuerdo a la similitud que presentan entre sí, utilizando intervalos de clase apropiados. En las figuras 3 y 4 damos los resultados de un análisis efectuado por SNEATH (1962) sobre el género *Bacillus*, tomando datos de la literatura. El coeficiente aplicado en este caso por SNEATH es el cociente entre el número M de caracteres positivos para las dos cepas que se comparan, y la suma de ese número y el número N de caracteres positivos para una cepa y negativos para la otra y viceversa. Ese cociente se multiplicó por 100 para dar el porcentaje de similitud:

$$\% S = \frac{M}{M + N} \cdot 100$$

En el triángulo de la figura 3 están representadas las similitudes para cada par de organismos. El dendrograma de la figura 4 agrupa los organismos en una estructura ramificada, de acuerdo a los coeficientes de similitud entre organismos y entre grupos de organismos.

En este ejemplo, elegido por SNEATH con fines ilustrativos, se ha alcanzado las mismas relaciones taxonómicas que otros autores lograron por métodos convencionales. En éste, como en otros ejemplos, el resultado de la aplicación de la taxonomía numérica es la corroboración de las conclusiones de taxónomos "subjetivos" competentes. Pero aparte de su objetividad, la taxonomía numérica permite naturalmente manejar un número de datos muy grande ya que el procedimiento puede someterse al análisis con computadoras y reducirse el esfuerzo personal al mínimo.

El ejemplo presentado utiliza los mismos nombres con que figuran los cultivos en el trabajo taxonómico original. Salvo en casos como éste, que no presentan mucho más valor que el demostrativo, los taxónomos adansonianos prefieren no utilizar las categorías taxonómicas familiares (especie, género, familia, etc.) por las implicaciones filogenéticas adheridas a esos nombres, y proponen llamar a los grupos simplemente "fenones". Manipulando los datos

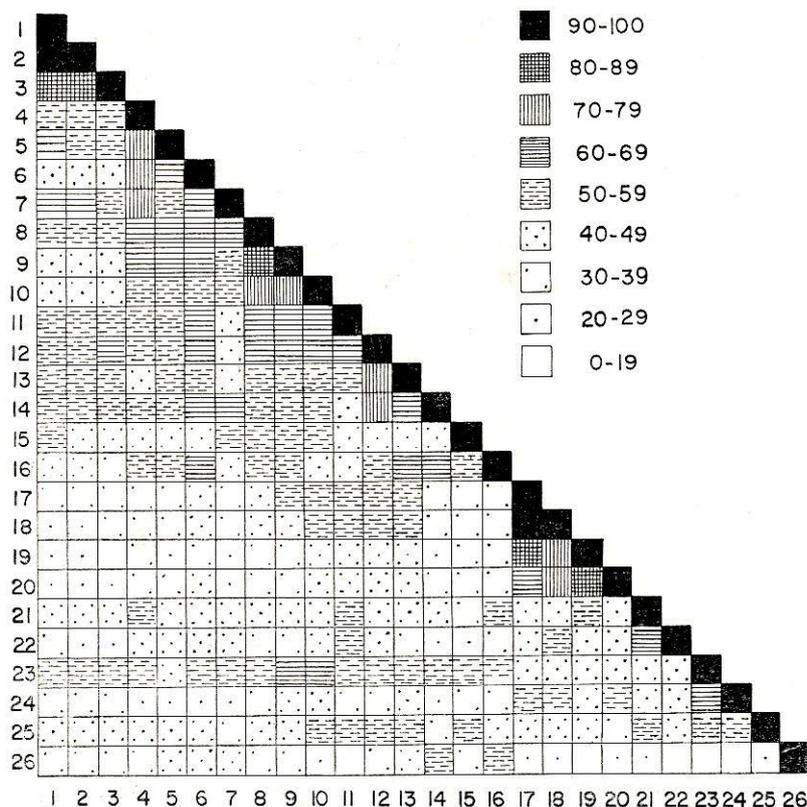


Fig. 3. — Matriz de similitudes de cepas *Bacillus* (SNEATH, 1962)

de las figuras presentadas, se puede ver que los grupos pueden constituirse a niveles altos de similitud o bien sobre bases menos estrictas, utilizando los niveles inferiores.

El método adansoniano se basa en dar igual peso a todos los caracteres observados, es decir, a procesarlos sin calificación ulterior. Esto no quiere decir que la taxonomía numérica tiene la virtud mágica de corregir vicios de observación o de neutralizar el efecto que pueden tener sobre los resultados finales los caracteres que han sido elegidos sin mayor criterio científico. En las bacterias,

donde es posible llegar al conocimiento del enzimatipo, es aconsejable profundizar en el análisis de los caracteres complejos para tratar de desmenuzarlos en caracteres más simples pero que conserven, sin embargo, su valor como elementos informacionales útiles desde el punto de vista taxonómico. Algunos ejemplos pueden ayu-

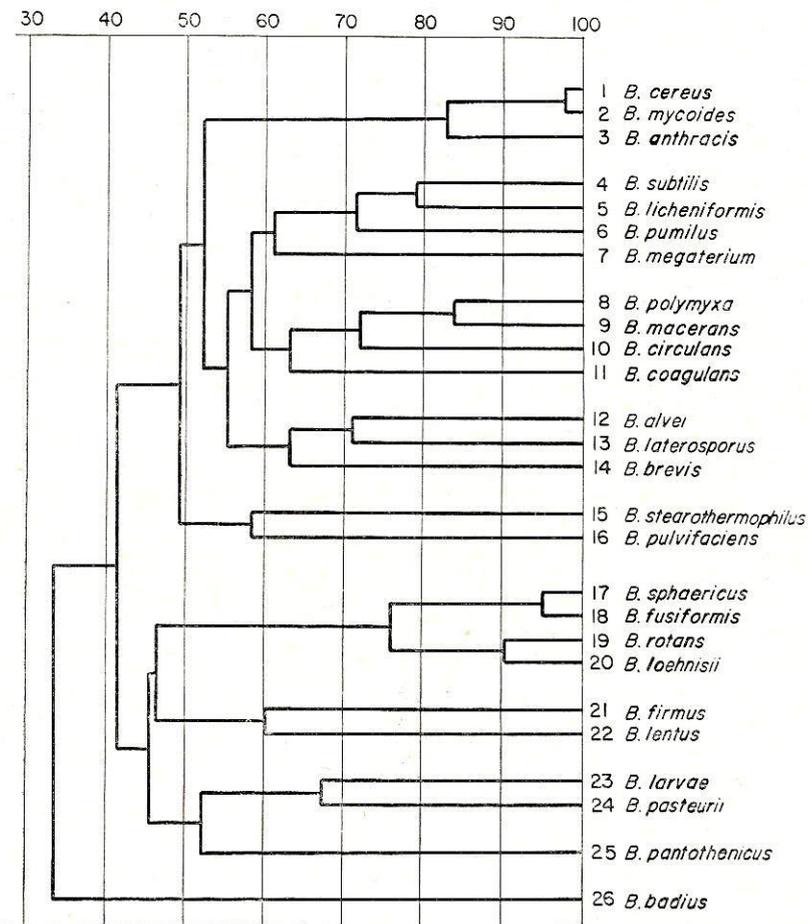


Fig. 4. Dendrograma representando las relaciones taxonómicas de las cepas de *Bacillus*, a partir de los datos de la figura 3 (SNEATH, 1962)

dar a aclarar estas ideas. Dos organismos distintos, *Pseudomonas fluorescens* y *P. acidovorans* utilizan triptofano. En un análisis nutricional corriente, ambos reciben un signo positivo en ese carácter. Sin embargo, las vías por las cuales estas especies oxidan triptofano son fundamentalmente distintas (STANIER y colab., 1966). Por otra parte, entre los organismos incapaces de utilizar triptofano se

cuentan aquellos mutantes cuyo bloqueo genético está en una de las primeras enzimas y también aquellas bacterias cuyo genomio está totalmente desprovisto de la información de la cual dependen la síntesis de las enzimas. Otro ejemplo está en el grupo *Escherichia coli* - *Shigella dysenteriae* en cuanto al carácter de fermentación de lactosa. *E. coli* cuenta con un operón formado por cuatro genes adyacentes que controlan, respectivamente, la adaptabilidad, la función de operador, la síntesis de beta-galactosidasa y la permeasa para beta-galactósidos. *S. dysenteriae*, conocido como lactosa-negativo tiene, sin embargo, la mayor parte del operón de lactosa, y sólo carece del gen que gobierna la producción del sistema permeable, o sea que no ataca lactosa simplemente porque no es permeable a este azúcar. En resumen, una cepa negativa puede tener  $n-1$  enzimas o ninguna de ellas y estas diferencias deben ser calificadas convenientemente aunque los componentes individuales de los caracteres complejos reciban luego igual peso en la taxonomía adansoniana.

La posible existencia de mutantes que pueden estar bloqueados en una de una serie de enzimas específicas para la utilización de un substrato dado como única fuente de carbono, plantea una interesante posibilidad experimental. Un análisis nutricional exhaustivo, en nuestra opinión, debiera explorar la posibilidad de reversión de los caracteres negativos, sea por la selección de los mutantes naturales o por el uso de agentes mutagénicos. En las investigaciones sobre el género *Pseudomonas* (STANIER y colab., 1966), se ha tenido oportunidad de comprobar en muchos casos la adquisición, por mutación, de la capacidad de utilizar un compuesto no atacado por la mayoría de las células de la población. Aún queda la posibilidad de que el carácter no pueda ser adquirido por mutación por pérdida de la zona correspondiente en el ADN. En estos casos, sólo la exploración de la utilización de intermediarios posibles puede dar una idea de la potencialidad nutricional del organismo.

Es nuestra opinión que todavía es demasiado temprano para tratar de sacar el máximo provecho de la aplicación de la taxonomía adansoniana al campo de las bacterias. La mayoría de los caracteres que se estudian en las bacterias son de tipo bioquímico y todavía debemos recorrer un largo camino antes que podamos completar nuestro conocimiento bioquímico de los distintos grupos microbianos. *E. coli*, la bacteria mejor conocida podrá ser descrita en forma completa desde el punto de vista metabólico en unos 10 a 20 años, según cálculos aproximados (WARSON, 1965, p. 99). Para otras especies ese lapso puede ser varias veces mayor. Recién entonces la taxonomía numérica podrá darnos un conocimiento preciso de las relaciones entre los distintos grupos naturales.

Los métodos numéricos aplicados a datos recogidos con el mayor rigor científico son, sin duda, el tratamiento más objetivo de los atributos de los organismos. Aún aquéllos que critican duramente

a la taxonomía adansoniana (ver, p. ej. MARMUR y colab., 1963, p. 330) por tediosa y por no haber aportado principios nuevos, no pueden menos que admitir (ob. cit., p. 34) que los datos del análisis de las macromoléculas y de las relaciones de los genomios por hibridaciones moleculares pueden ser analizados de la mejor manera con la ayuda de computadoras siguiendo técnicas adansonianas.

#### REFLEXIONES FINALES

Como bien lo señalan SOKAL y SNEATH (1963, p. 22), el éxito del ordenamiento sistemático debe estar basado en alcanzar a distinguir la *homología* (como expresión de ascendencia en común) de la *analogía*, que pueden presentar accidentalmente organismos que no tienen nada en común. Así, dentro de la analogía colocaríamos la capacidad para el vuelo en los animales, que pueden presentar insectos, aves o mamíferos, o la bioluminiscencia, que se encuentra en algas, bacterias, hongos, crustáceos, insectos, miriápodos, tunicados, celenterados, anélidos, moluscos y peces.

El taxónomo pretende (muy justificadamente) alcanzar clasificaciones tan "naturales" como se lo permitan los datos que maneja, ya que es consenso general que cuanto más natural es una clasificación, tanto más reflejará la filogenia de los organismos en estudio. Sin embargo, el hecho de haber alcanzado a definir la homología no nos autoriza, según algunos taxónomos, a pretender ir más lejos y dar a nuestro esquema un significado filogenético. Sin entrar a disputar el derecho a satisfacer estas aspiraciones, diremos que en general el procedimiento para establecer las homologías es criticable, porque se basa en tomar un grupo de caracteres que se eligen al principio como provisorios y luego, a medida que avanza el examen de los grupos logrados, hay una tendencia natural a reforzar el valor de esos caracteres elegidos provisoriamente con otros cuyo valor intrínseco no se juzga sino en función de soporte que suministran a la idea inicial. Los taxónomos numéricos critican esta inclinación, y tratan de basar la homología sobre el número de caracteres en común por los organismos que se comparan. Es preciso admitir, además, que la filogenia tiene hasta hoy escasísimas pruebas directas en la forma de fósiles que abarcan un área muy reducida del mundo viviente.

Un grupo distinguido de biólogos sostiene la tendencia onesta, y ve en la bacteriología un campo apropiado para desarrollar lo que podríamos llamar taxonomía filogenética experimental. Así, PIRIE (1955) se inclina a pensar que la ausencia de fósiles y de embriología no debe excluir la posibilidad de establecer una filogenia microbiana y de probar el esquema hipotético, porque los microbios se multiplican con suficiente rapidez como para hacer posible experimentos dirigidos a reconstruir el curso evolutivo supuesto.

Una de las tareas más ingratas para el taxónomo de bacterias es tratar de aplicar al reino microbiano las categorías taxonómicas utilizadas para los animales superiores o las plantas. Y aún en lo que se refiere a los seres superiores, esas categorías están lejos de carecer de artificialidad. COWAN (1963) cita a JOHN LOCKE quien, en 1689 dio un juicio preciso sobre algunos de esos conceptos: "genera and species... depend on such collections of ideas as men have made, and not on the real nature of things". Con el tiempo, los biólogos han seguido usando las categorías y al mismo tiempo, han tratado de esquivar la obligación de definir las. El advenimiento de la genética dio medios para una redefinición del término especie la cual tiene, sobre las otras definiciones propuestas, la ventaja de la verificación experimental. Una versión moderna de esta definición es dada por MARMUR y colab. (1963, p. 330): la especie es "a group of individuals who are potentially able to contribute to, or share in, a common gene pool."

En las bacterias han sido descriptos tres tipos principales de transferencia génica. Dos de estos métodos (transformación y transducción) no tienen paralelo en otros organismos, y el tercero (conjugación) tiene aspectos muy propios que sólo se encuentran en las bacterias y no en otros organismos conjugantes. El destino final del material transferido puede ser de tres tipos distintos: puede quedar activo, aunque sin multiplicarse ni integrarse al ADN de la célula recipiente; puede multiplicarse y no integrarse, y por fin, puede ser aceptado en la estructura del ADN bacteriano (LURIA, 1964)<sup>1</sup>. Aunque puede ocurrir transferencia genética entre bacterias cuyos ADNs tienen distinta composición, la integración de los elementos transferidos sólo ocurre cuando el valor GC de dador y recipiente es el mismo.

El análisis genético de las bacterias donde ocurre transferencia de ADN tiene, paradójicamente, dos efectos radicalmente opuestos sobre la taxonomía bacteriana. Desde el punto de vista teórico, la afinidad genética ha confirmado el grado de homología ya delineado por el taxónomo clásico competente. Pero por otra parte, desde el punto de vista práctico, las divisiones que han sido trazadas en bacteriología determinativa (p. ej., la separación de *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia*) son borradas en gran parte por las demostraciones de homología.

<sup>1</sup> Hablar de la integración del ADN bacteriano puede prestarse a confusión, ya que hay una molécula grande, que lleva la mayoría de los genes, y luego puede haber también episomas o estructuras similares formadas de ADN, y portadoras de información genética. La pieza mayor de ADN no puede llamarse razonablemente cromosoma, porque consiste en una molécula de ADN desnudo. KUHN (1961) ha propuesto llamarlo «lineom», que podemos traducir como *lineoma*. Cuando hablamos de integración de los elementos transferidos, nos referimos a su incorporación en el lineoma.

No todos los genetistas aceptan las definiciones que, como las de MARMUR y colab. (1963) agrupan organismos de acuerdo a su afinidad genética. LURIA (1964), el más original de los opositores, no está en favor de considerar como miembros de la misma especie a todos los organismos entre los cuales pueden ocurrir transferencias génicas, ni aún aquéllos en los cuales tales transferencias pueden resultar en la formación de una lineoma recombinante integrado. La cuestión crítica para LURIA es saber si en la naturaleza ocurre suficiente flujo de genes como para balancear y contrarrestar las influencias diversificantes de los medios interno y externo. Este concepto genético-ecológico de los límites de las especies puede contribuir a eliminar parte de las consecuencias perturbadoras que la genética parece introducir en la taxonomía cuando la evidencia se basa exclusivamente en experimentos de laboratorio.

La situación en bacteriología es particularmente confusa porque la genética no ha aclarado definitivamente el panorama en algunos grupos, y también porque la mayoría de las formas bacterianas no cuentan siquiera con el beneficio de mecanismos conocidos de transferencia genética. Tal vez sea demasiado prematuro pretender hacer taxonomía bacteriana hasta el nivel de especies, y en ese sentido es loable el deseo de los taxónomos adansonianos de evitar conclusiones infundadas y de definir las afinidades con objetividad estricta. Esta tendencia toma su forma más extremista en el deseo de algunos taxónomos de eliminar aún la nomenclatura binómica para reemplazarla por un sistema mononómica o simplemente por números. Esta tendencia puede ser resistida por lo que significa ir en contra de las reliquias más apreciadas del romanticismo taxonómico, pero permitiría crear esquemas sistemáticos provisionarios aunque sólidos, libres de compromisos riesgosos.

#### BIBLIOGRAFIA

- BAUMANN, P. (1966). *Taxonomic and Ecological Studies on the Noraxella Group of Bacteria*, Tesis (Univ. of California, Berkeley, U. S. A.).
- COWAN, S. T. (1963). En *Microbial Classification*, 12<sup>o</sup> Symposium of the Soc. for General Microbiology, P. 433. Cambridge Univ. Press.
- DEN DOOREN DE JONG, L. E. (1926). *Bijdrage tot de kennis van het mineralisatie-proces*. Rotterdam: Nijgh & van Ditmar.
- FITZ-JAMES, P. C. (1961). *J. biophys, biochem. Cytol.* 8, 507.
- HUGH, R. y LEIFSON, E. (1953). *J. Bact.* 66, 24.
- KÜHN, A. (1961). *Grundriss der Vererbungslehre*, p. 112. Fisher.
- LEDERBERG, J. y LEIDERBERG, E. M. (1952). *J. Bact.* 63, 399.
- LURIA, S. E. (1964). En *Recent Progress in Microbiology*, 8, 604, Univ. of Toronto Press.
- MANDEL, M. (1966). *J. gen. Microbiol.* 43, 273.
- MARMUR, J., FALKOW, S. y MANDEL, M. (1963). *Annual Rev. of Microbiology*, 17, 329.

- MORIHARA, K. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 113 y 125.
- NIEDERPRUEM, D. J. y RAGLAND, T. (1964). *A Graduate Student Manual for Millimicrosubmolecular Biology*.
- PIRIE, N. W. (1955). *J. gen. Microbiol.* 12, 382.
- SALTON, M. R. J. (1960). En *The bacteria* (Ed. d. C. Gunsalus y R. Y. Stanier), 1, 97. Academic Press.
- SIMPSON, G. G. (1961). *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia Univ. Press.
- SNEATH, P. H. A. (1960). *Iowa State Coll. J. Sc.*, 34, 243.
- (1962). En *Microbial Classification*, 12° Symposium of the Soc. for General Microbiology, p. 289. Cambridge Univ. Press.
- SNEATH, P. H. A. y SOKAL, R. R. (1962). *Nature*, 193, 855.
- SOKAL, R. R. y SNEATH, P. H. A. (1963). *Principales of Numerical Taxonomy*. Freeman.
- STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. y DOUDOROFF, M. (1966). *J. gen. Microbiol.*, 43, 159.
- TSUKAMURA, M. (1966). *J. gen. Microbiol.* 45, 253.
- WATSON, J. (1965). *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin.
- YANKOFSKY, S. A. y SPIEGELMAN, S. (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 48 1069.