

La taxonomía del siglo XXI

Ramón Rosselló Móra

Grup de Microbiologia Marina.
 Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB).
 C/Miquel Marqués, 21. 07190 Esporles. Illes Balears.
rossello-mora@uib.es

Hace una década nos estábamos preguntando cuántos pelos debíamos tener en la cabeza. La cuestión, sin embargo, prevalece no sólo porque nadie los ha contado, sino también porque el paso del tiempo provoca una caída inevitable que desanima a cuantificarlos. Dicen por ahí que tenemos entre 100.000 y 150.000, pero, claro, todo depende de cómo lo definamos. Los números pueden variar si cabello, vello, cejas, pestañas, barba... los consideramos sinónimos o no. Y es que la sinonimia y la homonimia (misma palabra con distintos significados) son aspectos que dan muchos dolores de cabeza a los científicos, que creen hablar de lo mismo cuando no lo hacen.

Sin embargo, otra cuestión que nos planteamos hace una década sobre qué es una especie en procariontes y qué parámetros son los que permiten su circunscripción, al no afectarnos directamente los ánimos, sí que se presta a revisión. En una década han ocurrido numerosos cambios en el ámbito de la taxonomía de procariontes. Han aparecido nuevas metodologías de análisis, así como nos hemos visto inmersos en la vorágine de la secuenciación de genomas. Como os podéis imaginar, todo ello sirve para especular y para discutir. En el fondo se están haciendo avances importantes en el campo de la clasificación basados en las nuevas tecnologías. Sin embargo, también está ocurriendo una explosión de información que genera mucho ruido de fondo y que impide un avance ordenado. Intentaremos desglosar de dónde venimos y a dónde vamos.

MONISMO, EL "ONE FOR ALL" DE LOS BIÓLOGOS Y UN POCO DE HISTORIA SOBRE TAXONOMÍA

El origen de las especies no hay que buscarlo entre los papeles de Darwin escritos hace aproximadamente dos siglos, sino que hay que remontarse mucho más atrás. El tér-

mino de especie, y por tanto la idea de lo que debe ser (concepto) se remonta a más de 2.400 años cuando Aristóteles formula por primera vez la existencia de las dos primeras categorías que conformarían el esquema taxonómico de los seres vivos. Aristóteles explica que los organismos están organizados en dos categorías, Especie y Género, ambas observadas desde un punto de vista esencialista, o sea, creadas por un determinado Dios. El abandono de los dogmas esencialistas se observa ya en la primera taxonomía seria que construyó el sueco Lineo, aproximadamente hace tres siglos. Este botánico amplió el número de categorías a cinco agrupando Especies y Géneros en Órdenes, Clases y Reinos. Durante doscientos años, éstas fueron los cajones taxonómicos en donde se iban clasificando los nuevos organismos que se describían. La botánica y la entomología fueron ramas del conocimiento de especial actividad, y las descripciones de nuevos taxones crecieron de forma exponencial, especialmente debido a la actividad de biólogos altruistas decimonónicos. El problema que surge del incremento de descripciones de especies, y por lo tanto de categorías superiores, es que con más frecuencia las unidades que se observan no se acomodan a las categorías prefijadas. La diversidad biológica no se podía explicar mediante el uso de sólo cinco estamentos jerárquicos. Debido a ello, hace aproximadamente medio siglo, los zoólogos Mayr y Simpson amplían la jerarquía en catorce categorías más, por tanto el esquema taxonómico de los seres vivos se estructura en diecinueve categorías. En fin, que tan sólo desde el punto de vista de animales y plantas, organismos mal llamados superiores, la clasificación de la diversidad biológica parece no ser un problema trivial.

Mayr y Simpson, con su multiplicación de las categorías, aparentemente solventaron el primer problema generado por la masiva descripción de especies. Éstas se realizaban generalmente desde un punto de vista morfológico (morfoespecies o taxoespecies), atribuyendo poder de discrimi-

nación a las diferencias en características observables. Sin embargo, los científicos creen que la teoría de la existencia de las especies no puede basarse en aspectos puramente morfológicos, sino que debe estar basada en fundamentos más funcionales. Por ello se formula el concepto biológico de especie (BSC), que está basado en la capacidad de reproducción con descendencia fértil. Éste, que ha sido uno de los conceptos más defendidos entre los taxónomos de animales y plantas, resulta inviable debido al número de excepciones observadas y que incluso ocurren entre animales. El BSC ha sido reformulado varias veces con tal de poder disponer de un concepto operativo. Sin embargo, pocas son las taxonomías que se muestran satisfechas con esta formulación.

En realidad, existe un tremendo guirigay entre taxónomos y filósofos que discuten el cómo es la unidad que se puede tomar como básica en un esquema taxonómico global. Tal y como mencioné, entonces ya se contabilizaban con aproximadamente 22 conceptos distintos, y muy probablemente este número ha crecido. Sin embargo, no hay manera de llegar a un consenso sobre cuál aplicar, o qué es realmente una especie. Cada uno de los conceptos es legítimo, ya que distintas taxonomías observan su diversidad biológica mediante distintos métodos y sistemas. Los biólogos pretenden usar un único sistema taxonómico, basado en una sola jerarquía, para describir la diversidad de todos los seres vivos. Además, se requiere que la unidad básica, especie, sea comparable entre todas las taxonomías. Esta línea de pensamiento de una unidad y un sistema para todos es lo que se llama monismo. De forma contrapuesta, otra línea de pensamiento sería la pluralística, y básicamente formula que se permita el que existan tantas taxonomías como sean necesarias, una clasificación para cada tipo de organismos. Lógicamente los biólogos tienen sus reparos en desistir de ser monistas. Desde mi punto de vista, el monismo tiene dos inconvenientes a destacar si se quiere obtener un sistema de clasificación que refleje las relaciones de parentesco entre todos los seres vivos. El primero es puramente mecánico y deriva del cómo se analiza la diversidad biológica. Por ejemplo, mientras en artrópodos la clasificación es puramente morfológica, frecuentemente basada en especímenes muertos, en otro tipo de animales se recurre a los impedimentos morfológicos, fisiológicos (especiación simpátrida), o geográficos (especiación alopátrida) para efectuar la reproducción. Más dramático es todavía el caso de microorganismos, en especial procariotas, en los que ninguno de estos aspectos se puede usar como parámetro para discriminar patrones de recurrencia naturales. De hecho, el cómo los investigadores observan e identifican sus unidades ya difiere enormemente entre distintos tipos de organismos. El segundo inconveniente es más bien inherente a la naturaleza de los seres vivos. El desarrollo de la evolución, y por tanto, las modificaciones a nivel genotípico y fenotípico dependen de las costumbres de cada tipo biológico. Parámetros intrínsecos como el tiempo de generación, tipo de reproducción,

eficiencia en la gestación y procreación, sistemas de detoxificación, de reparación de DNA, etc..., o del entorno como tipo de hábitat, disponibilidad de recursos, amenazas a su supervivencia, etc..., deben ser determinantes en cómo evoluciona un determinado tipo biológico. En consecuencia, las limitaciones en la evolución van a ser diferentes para cada tipo de ser vivo. Entonces, o bien admitimos que las unidades universales son necesariamente artificiales, y por ello podemos usar una misma vara de medir, o bien se aplica una unidad acomodada a cada tipo biológico, y entonces la circunscripción es más natural. Ambos casos nos permiten comparaciones, sólo hay que admitir la inevitable artificialidad de la primera.

De hecho, y ligando estos aspectos filosóficos con la discusión en el primer párrafo de este manuscrito, el término de especie adolece de "homonimia". O sea, que el mismo término se usa para explicar unidades biológicas esencialmente distintas. Distintos científicos usan el término de especie para explicar las unidades que ellos consideran se merecen tal clasificación. En el fondo, es un pluralismo (en contraposición a monismo) encubierto y no aceptado, pero ampliamente ejercido.

ESPECIES EN MICROBIOLOGÍA, CÓMO LAS CLASIFICAMOS

Tal y como ya mencioné, en el siglo pasado los microbiólogos tampoco estamos exentos de las discusiones sobre cómo se concibe la idea de especie. A pesar de querer ser monistas, y querer comparar nuestra unidad con la de las distintas taxonomías de eucariotas, la verdad es que las especies de procariotas pueden compararse poco, no en el concepto, sino en la manera de circunscribirlas. En microbiología se concibe especie como aquel grupo monofilético de organismos que muestran suficiente grado de coherencia genómica y fenotípica como para identificarse de forma aislada de sus semejantes. Nadie podrá decir que este concepto no sea universalmente aplicable. El problema, es cómo las definimos, o sea, como se enmarca una especie. Para empezar, necesitamos tener los organismos que se van a describir en cultivo puro, esta es la primera de las dificultades que encontramos para clasificar. Pero luego, se debe obtener la mayor cantidad de información tanto genética como fenotípica que nos muestre que éstos merecen ser clasificados independientemente.

La taxonomía, y en especial la de procariotas, demanda que el sistema que se genere sea operativo y predictivo. Eso significa que no se puede construir una clasificación que impida el avance de alguna de las disciplinas tan dispares como la medicina y la ecología. Sin embargo, ambas tienen unos requerimientos completamente distintos frente a la taxonomía. Por ello, se recurre al pragmatismo a la hora de clasificar microorganismos, para que el sistema sea operativo para todas las disciplinas que hagan uso de la clasificación. Además, el segundo requisito importante de un sistema

taxonómico es el que sea predictivo. O sea, que al identificar un aislado como miembro de un taxón existente, seamos capaces de predecir un buen número de aspectos tanto genéticos, fisiológicos o ecológicos de éste. Si el producto final no es útil, o genera una información que no es fiable, entonces no merece la pena.

El éxito de un buen sistema de clasificación de procariotas requiere de un exhaustivo estudio de los organismos que configurarían las distintas categorías. Es por ello que se demanda la obtención de la mayor cantidad de información posible sobre el taxón a clasificar. Hay tres aspectos básicos a tener en cuenta si se pretende dar nombre a una unidad:

i. **El número de aislados.** La clasificación de una nueva especie debería estar basada en un buen número de aislados. La descripción de la diversidad intraespecífica nos informa sobre qué aspectos pueden ser relevantes para el taxón, y cuáles son probablemente accesorios. Es muy importante disponer de la mayor cantidad de información que nos indique qué comparte un grupo de microorganismos que hace que los consideremos como una misma unidad. También lo es detectar aquellos caracteres accesorios que hacen que comprendamos la riqueza genética y fisiológica del grupo en estudio. Dependiendo del tipo de organismos (e.g. aerobios/anaerobios, copiotrofos/oligotrofos, versátiles/fastidiosos, de crecimiento lento/rápido), podemos encontrarnos con mayores o menores dificultades en la obtención de cultivos puros. Pero el esfuerzo de aislar varios organismos del mismo taxón confiere un enorme valor añadido al trabajo. Es difícil poder recomendar un número mínimo de organismos que deberían ser estudiados. Sin embargo, está claro que cuantos más estudiemos mejor va a ser la caracterización.

ii. **Los métodos utilizados.** Hay que estudiar el grupo de microorganismos aplicando el espectro más amplio posible de métodos. (a) El potencial genético del organismo así como la posibilidad de entender las relaciones genealógicas y evolutivas del grupo, debería ser estudiado de forma exhaustiva. Los parámetros clásicos como la secuencia del gen codificante para el RNAr 16S, el contenido GC y la hibridación DNA-DNA (DDH) son informaciones que deberían encontrarse en todo trabajo taxonómico. Hoy en día, es absolutamente necesario haber analizado la secuencia del gen que codifica para el RNAr 16S si se quiere publicar un nuevo taxón. Ésta nos informa no sólo de las relaciones genealógicas del nuevo grupo con sus semejantes, sino que permite la búsqueda de secuencias signatura que se usarían en la identificación de miembros de la especie mediante métodos moleculares. Si bien el contenido GC sólo se requiere para la descripción de nuevos géneros, es un parámetro que puede ser de mucha utilidad a la hora de confirmar la asignación de una especie a una jerarquía mayor. Finalmente el DDH no es un requerimiento si la secuencia del RNAr 16S difiere más de un 3% con los taxones más cercanos. Sin embargo, el uso de esta técnica es fundamental para enten-

Ramón Rosselló-Móra es Investigador Científico del CSIC y lidera el grupo de Microbiología Marina en el Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados (CSIC-UIB). El grupo está especializado en el estudio de microorganismos tanto marinos como halófilos extremos que habitan en ambientes costeros. La actividad científica combina el cultivo de organismos, en especial anaerobios, con la aplicación de técnicas moleculares al estudio de los ecosistemas donde éstos habitan, así como estudios genómicos y metabolómicos de los aislados. Además, el grupo ha desarrollado una importante tarea en la construcción de bases teóricas en la clasificación de procariotas. RRM es editor ejecutivo de la revista *Systematic and Applied Microbiology*. Además, es miembro de la Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes (JC-ICSP), así como del Ad Hoc Committee for the Evaluation of the Species Definition of Prokaryotes.



der que todos los aislados realmente pertenecen a un mismo taxón. Además de estas técnicas clásicas, se han desarrollado nuevos parámetros moleculares que permiten entender la coherencia filogenética y genotípica entre microorganismos. Métodos tales como el RAPD, AFLP, PFGE... nos pueden ayudar a entender si existen variantes clonales en el grupo de estudio. Además, se están desarrollando nuevas aproximaciones metodológicas que están llamadas a sustituir el DDH. Las más importantes son el cálculo del "Average Nucleotide Identity" entre genomas (ANI), o el uso de la metodología "Multilocus Sequence Analysis" (MLSA), pero ambas las explicaremos más exhaustivamente en el último apartado debido a la relevancia que están adquiriendo en Taxonomía.

(b) El fenotipo, que es la expresión del genotipo, debe ser también exhaustivamente estudiado. Sobretodo porque nos informa sobre aspectos funcionales de los organismos que pueden ser relevantes tanto en medicina, como en ecología u otras disciplinas microbiológicas. En general, se estudian aspectos metabólicos de los organismos mediante el uso de pruebas bioquímicas. Se está poniendo de moda el uso de sistemas miniaturizados comerciales (API, Biolog) para analizar el metabolismo de los nuevos organismos. Sin embargo, estos sistemas pueden no siempre funcionar adecuadamente ya que algunos requerimientos (e.g. salinidad, pH, vitaminas, elementos traza, presión parcial de oxígeno...) pueden no estar garantizados en el propio sistema. Ello conlleva a una observación errónea de la expresión del genotipo de los organismos en estudio. Es bueno usarlos, pero con conocimiento de causa. Sin embargo, existe una miríada de pruebas metabólicas que uno puede preparar en su propio

laboratorio (e.g. rangos de tolerancia a sal, temperatura, pH,..., o determinadas actividades enzimáticas,...). No exime de culpa el no hacerlo si es puramente un problema de desidia. Finalmente, se deben estudiar los aspectos quimiota-xonómicos de una manera también exhaustiva. Datos como perfiles de ácidos grasos, de poliaminas, de quinonas respi-ratorias, de lípidos polares, sideróforos, ... pueden dar infor-mación muy relevante y necesaria. Por ejemplo, el tipo de pared celular en grampositivos es un buen parámetro iden-tificativo de determinados grupos. En general, es muy útil recurrir a la quimiota-xonomía para poder encontrar aspectos fisiológicos que puedan ser útiles para identificar el taxón en estudio. Suelen no fallar.

iii. **Incluir cepas de referencia.** El tercer aspecto de gran importancia es que se deben estudiar los nuevos aislados juntamente con cepas de referencia. Es frecuente encontrar en la literatura nuevas clasificaciones que han establecido sus tablas de diagnóstico utilizando información publicada. Sin embargo, las pruebas bioquímicas pueden variar de labora-torio en laboratorio, y es absolutamente necesario que las cepas de referencia se estudien simultáneamente con las cepas problema. De hecho, hay que manejar *personalmente* las cepas tipo de cada especie que se quiera comparar. Éstas son las cepas de referencia con las cuales se describió origi-nalmente la especie. En las nuevas clasificaciones es impor-tante reportar las diferencias observadas con la literatura, y así enmendar la descripción original. En la propia descrip-ción se deberá denominar una cepa como la de referencia del grupo (cepa tipo de la nueva especie) que se depositará en dos colecciones de cultivo internacionales con tal de hacerla disponible a la comunidad científica.

DESCRIPCIONES DE UNA SOLA CEPA (EL “TODO A CIEN” DE LA TAXONOMÍA)

¡A y, si Samuel T. Cowan levantara la cabeza! Este inves-tigador, probablemente uno de los más influyentes en el siglo pasado, no daría crédito al ver cómo la taxonomía se ha convertido en un ejercicio en obtener publicaciones de “low cost”. Y es que una de las prácticas más importantes que podemos observar en las últimas décadas es la clasifi-cación de nuevos taxones basados simplemente en una sola cepa. Por ejemplo, y sólo analizando lo ocurrido durante el año 2008, de las 482 clasificaciones nuevas aparecidas en el IJSEM, el 80% sólo cuenta con una cepa, la cepa tipo. La abundancia de estas descripciones está provocando opinio-nes contrapuestas. Por un lado, es necesario describir toda la diversidad microbiana que se encuentra en la biosfera. Toda novedad debe ser reportada, y si tenemos en cuenta que en estos momentos sólo se han descrito unas 8.000 especies de procariotas (frente a más de 1.000.000 de insectos), estamos muy lejos de poder tener una idea clara de la verdadera diversidad existente que se hipotetiza de órdenes de magnitud superiores. Sin embargo, la práctica actual es que si se obtiene en cultivo puro un organismo que puede

representar una nueva especie, éste se convierte en el único material con el que se basan las descripciones, y pocos son los esfuerzos en obtener nuevos aislados semejantes. En principio no debería tratarse de un problema si no fuera por que el esfuerzo en la clasificación es en general muy parco. Muy pocas son las descripciones que cuentan con un amplio abanico de características que explican cómo es el organis-mo. La mayoría de descripciones están basadas en la secuenciación del gen codificante para el RNAr 16S, algunos caracte-res fenotípicos diferenciadores (generalmente basados en sistemas comerciales), y en algunos casos perfiles de áci-dos grasos. En pocas ocasiones se observa el estudio por DDH y la descripción de otros caracteres quimiota-xonómicos importantes. Además, en la mayoría de los casos el trabajo de laboratorio está limitado al uso del nuevo aislado ya que las características de los taxones más cercanos están toma-das de la literatura. En general cabe pensar que la calidad de las descripciones es tan baja que no garantiza la identi-ficación de nuevos miembros de la misma especie. Con una sola cepa no se puede describir la diversidad del taxon, ni tampoco poder entender qué caracteres son realmente rele-vantes para su caracterización. En este aspecto, el “Internati-onal Committee for Systematics of Prokaryotes” ha expre-sado su preocupación, y por ejemplo no se van a validar nuevas especies si no se demuestra que la caracterización en el laboratorio se ha realizado en paralelo con las cepas de referencia. En los últimos años, la tolerancia en la clasifi-cación de nuevas especies ha llevado a que con un bajo coste y esfuerzo se puedan obtener publicaciones en revistas SCl. Si tenemos en cuenta que la mayoría de éstas se realizan en países con relativamente pocos recursos en investigación (casi el 70% de las descripciones se realizan en naciones del lejano oriente, especialmente China, India y Corea), parece ser que hubieran encontrado un filón para obtener publica-ciones de manera fácil. Sin embargo, pocos son los taxóno-mos occidentales que no cuentan con una publicación de este estilo. ¡El que esté libre de pecado, que tire la primera piedra!

Realmente estamos frente a un problema cuyas dimen-siones son difíciles de prever. Se están describiendo simple-mente aislados, sólo que se les da un nombre y un sitio en la clasificación. Parece más un catálogo de nuevos organis-mos que de nuevos taxones. Probablemente, una descrip-ción tan parca de un aislado, sin proponer una clasificación, difícilmente se aceptaría para su publicación a no ser que tuviera unas particularidades fisiológicas o genéticas tan extraordinarias que fuera de interés científico. Es de prever, sin embargo, que en un futuro esta actividad disminuya al imponer mayores trabas en la publicación, así como buenos taxónomos emprendan estudios serios sobre grupos de especies ya clasificadas y así comprender su verdadera estructura taxonómica. Las clasificaciones basadas en una sola cepa deben ser permitidas, claro está, pero sólo si se muestra que el trabajo de caracterización es exhaustivo y convincente.

LA TAXONOMÍA DE LAS BASES DE DATOS O LA CLASIFICACIÓN DEL SIGLO VEINTIUNO

No todo es malo en la nueva era de la taxonomía. Si Samuel T. Cowan levantara la cabeza, también quedaría impresionado por las nuevas herramientas que se están desarrollando para poder catalogar la diversidad microbiana. En la última década han aparecido nuevos avances importantes en el estudio de los microorganismos. En general, los más exitosos están ligados al análisis del genoma o de determinantes genéticos. Estos esfuerzos llevan a que se generen bases de datos públicas que permiten estudios de forma independiente al cultivo en el laboratorio. Por lo que los estudios comparativos con nuevos aislados podrán hacerse sin tener que recurrir al material vivo.

Hay que aplaudir el que más del 90% de las especies descritas tengan su gen del RNAr 16S secuenciado. El actual esquema taxonómico está basado en los resultados de la reconstrucción de éste gen, así como las decisiones actuales sobre qué y cómo se conforman las categorías taxonómicas. Existen varias bases de datos donde poder encontrar las secuencias curadas de EMBL/GenBank como el “*Ribosomal Database Project*” (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>); *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>); *SILVA* (<http://www.arb-silva.de>), etc... Sin embargo nosotros hemos generado una base de datos curada sólo con las cepas tipo de las especies existentes en lo que hemos llama-

mado el “*Living Tree Project*” (LTP, <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree>). El LTP se actualiza de forma regular y ofrece las secuencias curadas y alineadas, una para cada cepa tipo de cada especie. Además, también presenta árboles en distintos formatos con la filogenia de las cepas tipo. Es una herramienta muy útil para identificar si uno está trabajando con una especie nueva o no.

Además, el desarrollo de la genómica está promoviendo que también se haga un esfuerzo importante en la obtención de la secuencia completa de los genomas de las cepas tipo. Si bien ahora sólo hay aproximadamente 150 cepas tipo secuenciadas, es de esperar que en un tiempo relativamente breve este número aumente al menos en un orden de magnitud. De hecho, la comunidad internacional está fomentando el que se de prioridad a la secuenciación completa de todas las cepas tipo. El disponer de secuencias permitirá dejar de lado métodos de análisis que se están quedando obsoletos. La determinación del contenido GC no va a ser analizado químicamente, sino sólo “in silico”. Además, la hibridación de ácidos nucleicos se podrá sustituir por métodos bioinformáticos de comparación de genomas. En este aspecto, han surgido varias propuestas como sustitutas de DDH. Vamos a destacar las dos más importantes.

En primer lugar el “*Multilocus Sequence Analysis*” (MLSA), que consiste en secuenciar varios genes esenciales (de entre 5 y 10) en todos los organismos en estudio y mediante la concatenación de sus secuencias se puede resolver con mayor sensibilidad la estructura genealógica del taxón y sus semejantes, y decidir si estamos trabajando con una nueva especie o no. Entre los genes más usados contamos con *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ*, *atpA*, *pheS*,... pero existen hasta más de 30 genes de presencia casi universal. Esta metodología se ha puesto de moda en taxonomía, sin embargo, pocos son los investigadores que usan más de tres genes. Además, es fácil caer en sesgos. El mayor problema en efectuar MLSA es la selección de los genes. La decisión sobre qué genes se amplifican y secuencian está generalmente ligada a la facilidad en diseñar cebadores y a que la amplificación funcione y sea específica. En general nos vamos a encontrar con problemas tanto en el diseño de cebadores como en la amplificación de los genes, sobretodo si el genoma de algún representante cercano no está secuenciado. Sé de “bona fide” que, en muchas ocasiones, si los cebadores no amplifican o el amplicón no es específico, entonces se elimina el gen de la lista. Todo ello conlleva a que al final se cometa un sesgo hacia los genes seleccionados más conservados y por tanto pueden no reflejar la verdadera filogenia del organismo en cuestión. Parece, sin embargo, que en general las divergencias de más del 3% en identidad de nucleótidos (utilizando más de 5 genes) podría reflejar las especies microbianas tal y como las hemos definido genómicamente.

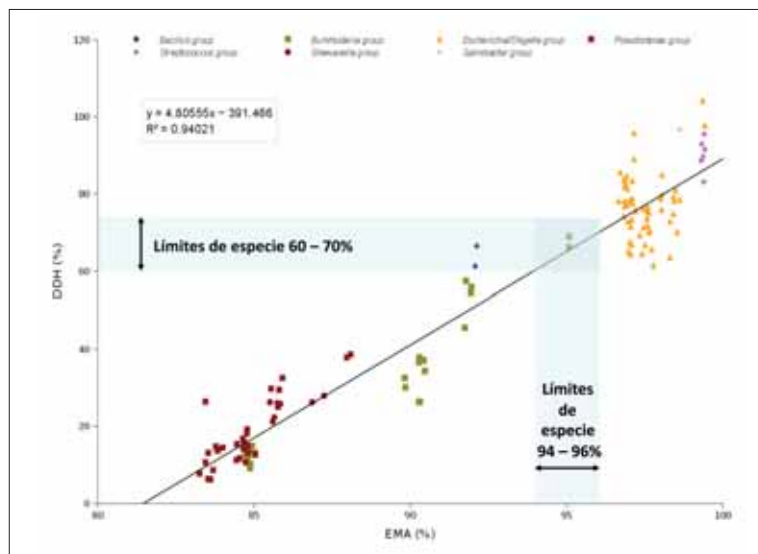


Figura 1. Correlación entre el porcentaje de similitud obtenido por hibridación (DDH) y el porcentaje medio de identidad de nucleótidos (ANI) entre genomas. El límite de especie generalmente se ha trazado entorno al 60-70% de similitud de DDH. Este rango de hibridación tiene su correspondencia en el entorno entre 94-96% de identidad ANI. En un futuro la secuenciación completa o parcial (al menos un 20% del genoma al azar) permitirá determinar el ANI y evitar el uso de la técnica DDH. Estos parámetros se pueden calcular con el programa JSpecies (<<http://www.imedeia.uib.es/jspecies>>)

Por otra parte, el análisis comparativo entre genomas no está sometido a sesgo en la selección ya que se analiza todo contra todo. La medida del “Average Nucleotide Identity” (ANI), que es la media en la identidad de nucleótidos entre genes ortólogos compartidos entre dos genomas (o bien entre fragmentos originados al azar), parece dar una muy buena resolución para circunscribir especies. De forma empírica parece que entre 95 - 96% de ANI podría reflejar el entorno de 60 - 70% de similitud por DDH (Figura 1). Este parámetro muy probablemente sustituya en un futuro próximo la circunscripción clásica basada en DDH. De forma análoga el “Average Amino acid Identity” (AAI), que es la media en la identidad de aminoácidos entre proteínas codificadas por genes ortólogos compartidos entre dos genomas, parece reflejar las relaciones filogenéticas entre categorías superiores a especie, y podría ser usado en un futuro para su circunscripción. Es de prever que los análisis genómicos se transformen en el sustrato para la configuración de un sistema taxonómico estable.

Finalmente, no se puede concebir una descripción de taxones solamente basándose en parámetros genéticos. Por ello la descripción del fenotipo es de suma importancia. Al igual que la genómica, es de prever que en un futuro se fomente la generación de información que permita estudios *in silico* independientes del cultivo y fundamentados en bases de datos. Aunque el campo está todavía por explorar de manera exhaustiva hay dos posibilidades que me gustaría mencionar. En primer lugar, los estudios de metabolómica basada en espectrometría de alta resolución (ICR-FT/MS) permiten observar la diversidad de metabolitos de bajo peso molecular (entre 50 - 1.000 D) correspondientes a un organismo (Figura 2). En general la presencia e intensidad de éstos puede estar ligada a las condiciones de cultivo, pero aún así se pueden identificar metabolitos que puedan ser característicos y discriminativos del taxón en cuestión, tal y como se observó con los sulfonolípidos en *Salinibacter ruber*. Por otra parte, la técnica espectrométrica de Maldi-ToF permite observar la diversidad de moléculas de alto peso molecular (2.000 - 20.000 D). Aparentemente, los perfiles que se observan son menos dependientes de las condiciones de cultivo, y en los extractos celulares crudos muchos de los picos observados se corresponden con proteínas ribosomales. En este aspecto se está experimentando en la identificación de aislados clínicos ya que se requiere muy poco material celular y poca experimentación. En ambos casos, se generan bases de datos fundamentadas en perfiles moleculares. Éstas permitirán la comparación entre múltiples organismos con independencia de tener en las manos el material vivo.

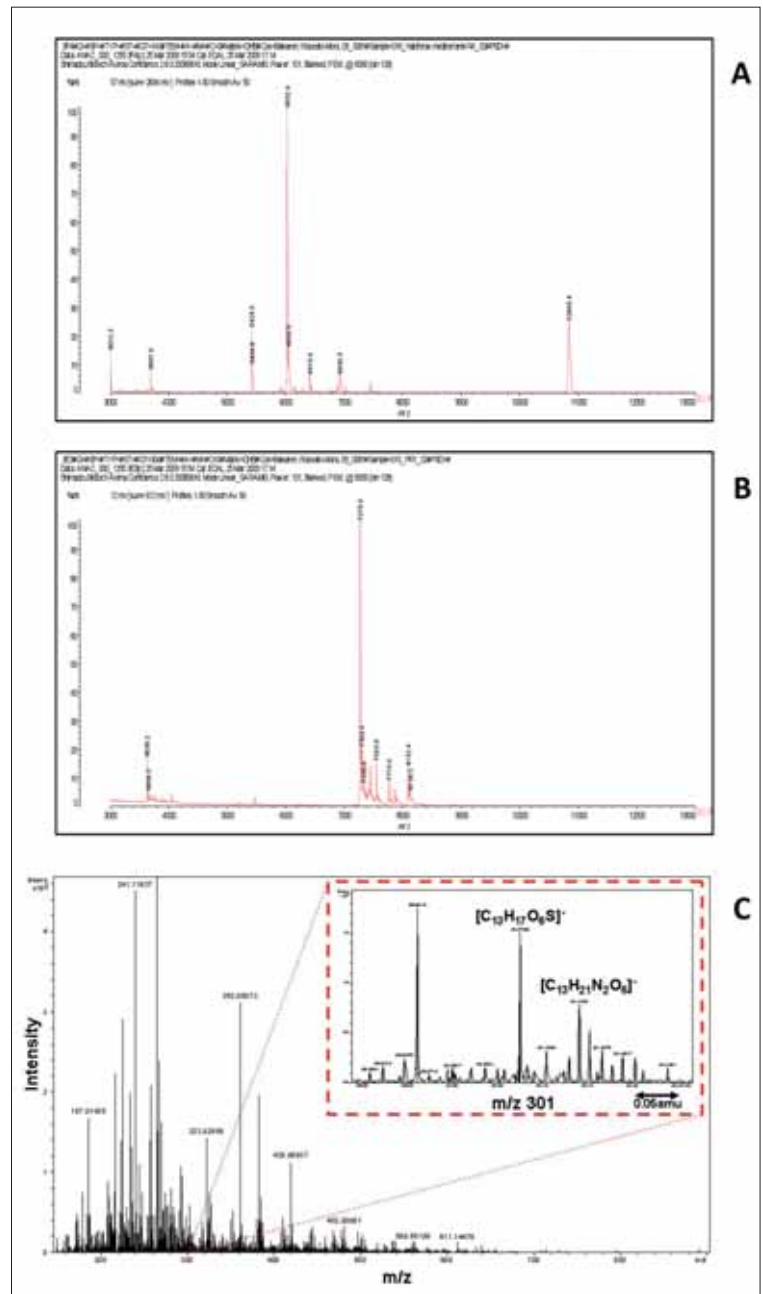


Figura 2. La espectrometría de masas permite estudios de la composición química de los organismos en estudio. Por ejemplo, los perfiles de extractos crudos de microorganismos por la técnica de Maldi-ToF (A, *Haloferax mediterranei*; B, *Salinibacter ruber*), nos muestran la presencia de moléculas de alto peso molecular de entre 2.000 y 20.000 D (en estos casos generalmente relacionadas con las proteínas ribosomales). Por otra parte, la técnica del ICR-FT/MS (C, perfil de *Salinibacter ruber*) permite determinar la presencia de masas moleculares pequeñas de entre 50 y 1.000 D, generalmente asociadas a metabolitos celulares directamente relacionados con el metabolismo celular. Ambos métodos generan perfiles que pueden ser usados en la identificación y comparación de aislados, y además, quedar recogidos en bancos de datos disponibles públicamente.

EPÍLOGO

La taxonomía es útil, no sólo para los taxónomos sino para cualquier ámbito del conocimiento. Sin embargo, la utilidad depende de la operatividad y capacidad de predicción del sistema generado. En microbiología, y a pesar de críticas por parte de no taxónomos, hemos conseguido generar un sistema de clasificación basado en el estudio tanto del genotipo como del fenotipo, a diferencia de la mayor parte de taxonomías de eucariotas que todavía se basan en estudios morfológicos. Los parámetros necesarios están muy claros a pesar de que muchas descripciones sean demasiado parcas. Sin embargo, las nuevas metodologías que producen enormes bases de datos que pueden ser comparadas *in silico* construyen el futuro de la taxonomía. Es de prever que en un futuro próximo, con el abaratamiento de los métodos analíticos, la catalogación de taxones esté fundamentada en comparaciones por métodos bioinformáticos y que los tubos de ensayo de colores pasen al recuerdo romántico del trabajo en la poyata.

BIBLIOGRAFÍA

- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361**: 1929-1940.
- Richter M, Rosselló-Móra R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **106**: 19126-16131.
- Rosselló-Móra R, Lucio M, Peña A, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M, Frommberger M, Antón J, Schmitt-Kopplin P. (2008). Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinitabacter ruber*. *ISME J.* **2**:242-253.
- Rosselló-Móra R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.* **187**: 6255-6257.
- Rosselló-Móra R. (2006). DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In: Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes (Stackebrandt, ed). Springer Verlag, Heidelberg (Alemania). Pp 23 -50. ISBN: 3-540-23155-2.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Móra R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward A, Whitman WB. (2002). Report of the Ad Hoc Committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- Rosselló-Móra R & Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.

Laboratorios MICROKIT
¡Pasión por la creatividad!

AENOR
Ingeniero Registrado
EK-46321999

CERTIFIED
ISO 9001

COLICULT-MCC
CRIOTECA®
PLAQUIS®
M-IDENT®

COSMETIKIT®
CHROMOSALM
KITPRO-5S
SEILAGUA®

COMPACT-DRY-PLATES®
DESINFECTEST®
NUTRILINIA
MUGPLUS CROMOKIT®

**Control de calidad microbiológico?
Tras 20 años, la respuesta sigue siendo:
MICROKIT®**

Somos pioneros en medios cromogénicos, medios de cultivo preparados y deshidratados, kits únicos, cepas cuantitativas y servicios intercomparativos, de asesoría y de protocolización, para control microbiológico industrial, ambiental (aguas, superficies y aire) y alimentario.

P.O. Box 44, 28210-Valdemorillo (Madrid, Spain) Tel.(34) 91 897 46 16 Fax.(34) 91 897 46 41
E-mail: microkit@microkit.es www.microkit.es