

Sobre el concepto de especie en Microbiología

Ramon Roselló-Mora

Molecular Ecology Group. Max-Planck Institute for Marine Microbiology.

Celsiusstrass 1, 28359 Bremen. Alemania.

E-mail: rrossell@mpi-bremen.de

Papá, ¿cuantos pelos tenemos en la cabeza? ¡Vaya pregunta! ¿Qué contestar? ¿Una barbaridad? ¿Decirle que estas cosas no se preguntan? La respuesta, me imagino, dependerá de la capacidad de improvisación de cada progenitor, pero probablemente no será capaz de contestarla correctamente.

En la misma situación nos encontramos frecuentemente los microbiólogos cuando se nos pregunta por el número total de especies de procariotas sobre la tierra. Muchas, pero ¿muchas muchas, o sólo muchas? Especie, entre otras, es una de las unidades más utilizadas para medir biodiversidad, algo que está tan de moda últimamente. En todos los intentos realizados para medir la diversidad total de organismos en la tierra parece que los microbiólogos estamos en desventaja. El total de casi 5000 especies de microorganismos clasificadas hasta el momento es irrisorio si lo comparamos con el casi un millón de especies de insectos catalogadas. Y es que estos números, que todos los microbiólogos sabemos que son fruto de un sesgo, juegan un papel primordial a la hora de repartir los *royalties* que genera el negocio de la biodiversidad.

Se ha calculado que en la biosfera se encuentran un total de 4 a 6×10^{30} células procariotas, y que el total de su biomasa protoplasmática supera con creces la supuesta para eucariotas. Lo más curioso del asunto es que el 90% de los procariotas habitan en el subsuelo, y por tanto, el 10% restante lo conforman todos aquellos que se encuentran habitando suelos, sedimentos, masas de agua, aire, y los parásitos, simbioses y comensales de eucariotas; en fin, los que centran nuestro interés. Existiendo tal número de procariotas es de esperar, tal y como lo demuestran indirectamente los estudios realizados mediante técnicas moleculares, que el número de especies sea enorme. Diversos cálculos llevados a cabo por algunos ecólogos apuntan a que tirando por lo bajo existirían un total de 10^9 especies de procariotas. Y consideran este número una infravaloración de la verdadera diversidad, debido a que el concepto actual de especie en microbiología puede ser demasiado general.

¿Qué importan uno, dos o incluso tres órdenes

de magnitud en el cálculo, si no somos capaces de ponernos de acuerdo sobre cual es nuestra unidad de referencia? Y es que al ojear la literatura parece que los microbiólogos ecólogos hablan de peras cuando los taxónomos hablamos de manzanas. Lo que ocurre es que tenemos básicamente dos problemas: uno, que pocos son los microbiólogos no taxónomos que entienden cual es el concepto de especie que hemos diseñado; y dos, que los taxónomos estamos asistiendo a un período de incertidumbre y desacuerdo sobre como definimos una especie.

Los taxónomos tenemos como misión el generar un código de comunicación entre científicos que facilite el intercambio de conocimientos. Este código tiene que ser útil en todos los ámbitos en que se desarrolla nuestra especialidad, y no tiene que responder solamente a las necesidades específicas de algunos. Taxonomía es el estudio teórico de la clasificación de los organismos, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas. El sistema que se genera tras la aplicación de sus fundamentos teóricos es el esquema de clasificación o simplemente, 'la clasificación'. Creo que es importante entender que siempre será artificial, a pesar de que existe la tendencia de reflejar de una manera lo más fiel posible las relaciones de parentesco entre organismos. Sería ideal contar con un sistema de clasificación válido para todos los seres vivos, y que por tanto nos permitiera poder establecer comparaciones entre eucariotas y procariotas, algo que hasta la fecha no es posible. Los niveles jerárquicos supraespecíficos (género, familia, orden, clase...) son entidades abstractas que pueden ser comparadas con las establecidas para eucariotas. Las especies, sin embargo, son entidades prácticas y los requisitos para su circunscripción dependen del tipo de concepto adoptado en cada uno de los esquemas de clasificación (biológico, fenético, evolutivo...).

La taxonomía se debate entre los fundamentos teóricos filosóficos y el pragmatismo. Y aquí es donde encontramos la mayoría de los problemas, al querer definir qué es una especie ¿Qué bagaje teórico tiene que tener el concepto de especie? No existe unanimidad. Hasta el momento se han

conseguido establecer unos 22 conceptos distintos de especie. Entre ellos existe toda una gradación que va desde el puro pragmatismo y ausencia de carga teórica, el concepto fenético de especie, a un concepto puramente teórico de difícil aplicación universal, el concepto evolutivo de especie. La polémica sobre cuál es el concepto de especie a adoptar afecta predominantemente a los esquemas de clasificación de eucariotas, para los cuales el tradicional concepto biológico de especie (aquella población de organismos capaces de intercambiar material genético con descendencia fértil y que sufre un aislamiento reproductivo, debido a causas como el reconocimiento de pareja, la infertilidad o el aislamiento geográfico) parece resultar cada día más impracticable.

Los microbiólogos estamos relativamente alejados de la polémica filosófica que gira en torno al concepto de especie. La razón principal hay que buscarla en las características intrínsecas de los microorganismos. La simplicidad morfológica, la ausencia de ciclos ontogénicos, la ausencia de un registro fósil útil, entre otros aspectos, han hecho que el estudio de las relaciones de parentesco entre microorganismos sea una tarea ardua, subordinada al desarrollo de técnicas de análisis. Tal es así, que durante el presente siglo el concepto de especie para procariotas, y por tanto el esquema de clasificación, se ha ido modificando a medida que han ido evolucionando los métodos de obtención de información. Todos podemos coincidir en que hoy en día la microbiología es una de las disciplinas técnicamente más avanzadas, y que por ello podemos obtener un volumen enorme de información sobre nuestros microorganismos, tanto de su fenotipo como de su genotipo. El establecimiento de relaciones de parentesco entre microorganismos se realiza tras el análisis de todos los datos obtenidos en un estudio que todos conocemos como taxonomía numérica, y que permite el manejo de grandes cantidades de información.

Es muy importante entender el significado de los tipos de relaciones que se generan tras los análisis de taxonomía numérica. Tenemos básicamente dos posibilidades para el establecimiento de relaciones:

1. Relaciones fenéticas

Muy frecuente es la errónea confusión entre fenético y fenotípico. Las relaciones fenéticas están basadas en la comparación del número mayor posible de caracteres independientes (tanto fenotípicos como genotípicos), a los que en general se les atribuye el mismo peso. La unidad de medida

es el porcentaje de similitud o disimilitud, y tras el análisis se produce una agrupación de los individuos en función de sus semejanzas. Los resultados se suelen expresar en forma de dendrogramas. De la topología de estos árboles no se puede deducir ningún tipo de relaciones evolutivas ni filogenéticas. No se puede, por ejemplo, hablar de líneas de descendencia, ya que los nodos en el dendrograma no indican ningún tipo de evento en la historia de la evolución, sino tan sólo puntos de agrupación por similitud. Este tipo de tratamiento es un fallo frecuente entre investigadores que debe evitarse, ya que puede generar conclusiones falsas. Los estudios fenéticos son frecuentes en análisis fenotípicos, análisis de patrones electroforéticos de ADN (*Ribotyping*, RFLP, PFGE, ARDRA, ERIC, RAPD...), en *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), etc.

2. Relaciones cladísticas.

Se trata básicamente de inferir relaciones de ascendencia-descendencia entre organismos. Este tipo de análisis se basa en la existencia previa de un modelo de evolución de caracteres homólogos. En microbiología las relaciones cladísticas se basan generalmente en la comparación de secuencias genómicas, y el gen que codifica el ARN ribosómico 16S es el más utilizado. Sería ideal poder expresar estas relaciones en unidades de tiempo. Sin embargo, la falta de un registro fósil útil no permite dar una dimensión temporal a los resultados de los análisis cladísticos en procariotas. Los resultados se expresan en porcentaje de similitud o identidad de secuencias, y nunca en porcentajes de homología. Dos genes o caracteres son homólogos o no, pero no existe ninguna gradación. De los resultados de un análisis cladístico de secuencias de genes homólogos se produce un árbol o cladograma que es fundamentalmente la reconstrucción de las relaciones genealógicas o filogenéticas entre éstos, y los nodos representan puntos de diversificación. Se supone que el análisis del gen del ARNr 16S refleja la filogenia de los microorganismos, al asumir que su tasa de mutación es muy baja, ya que se encuentra bajo una fuerte presión conservadora. Con los resultados de este tipo de análisis no podemos hablar de evolución de microorganismos, ya que nada nos indica la trayectoria evolutiva de un organismo, sino tan sólo la afiliación filogenética de un organismo o secuencia con respecto a otros. En resumen, este análisis nos indica el camino seguido, pero no lo que ha ocurrido durante ese camino.

Una vez aclarados estos puntos, podemos discutir cual es el tipo de concepto de especie que podemos adoptar en microbiología. Existen básicamente tres conceptos que se consideran, entre los filósofos, como los más adecuados para servir como conceptos universales:

Concepto evolutivo de especie: Es el concepto con más carga teórica, y se basa en la definición de especie como una línea de desarrollo, donde se puede reconocer una trayectoria evolutiva.

Concepto fenético de especie: Es el concepto más pragmático y con menos carga teórica; se concibe la especie como una unidad basada en el grado de semejanza entre los organismos que lo conforman.

Concepto filogenético de especie: Algo cargado de teoría, se basa en el reconocimiento de grupos monofiléticos que se pueden definir por un número determinado de caracteres, en principio autapomorfos (únicos y exclusivos del taxón).

No podemos conocer, hasta ahora, una trayectoria evolutiva de los microorganismos, y además el ARNr 16S carece de resolución cuando tratamos de circunscribir una especie procariota tal y como está en este momento concebida. Por tanto, sólo podemos adoptar el concepto fenético de especie para procariotas.

Puede resultar sorprendente, pero el concepto que en este momento está aceptado para procariotas es puramente fenético. La especie procariota está circunscrita por la combinación de un buen número (desgraciadamente, hoy la tendencia es la de minimizarlo) de caracteres independientes, tanto fenotípicos como genotípicos. Es lo que entre los microbiólogos se conoce como especie polifásica (fruto de un estudio taxonómico polifásico) que no es más que un sinónimo inadecuado de concepto fenético o politético de especie. La presente circunscripción de especie resulta más del empirismo que de una discusión filosófica de lo que debe significar esta unidad. Y creo que por este motivo hemos diseñado una unidad pragmática que carece de una base teórica significativa. Es por tanto el mejor concepto que hemos podido diseñar, y resulta válido (siempre con limitaciones) en todos los ámbitos de la microbiología.

Una especie procariota es aquel grupo de organismos que muestran un elevado grado de similitud global, y que se diferencian considerablemente de otros grupos relacionados con respecto a muchos caracteres fenotípicos y genotípicos independientes. Las fronteras de especie se están demarcando básicamente en función del grado de similitud genómica que se

obtiene por hibridaciones ADN-ADN. Los resultados de este análisis se expresan en porcentaje de hibridación (RBR) o en diferencias en grados centígrados de temperatura de fusión homólogo-híbrido (ΔT_m). Es importante entender que ésta es una medida indirecta de la semejanza de secuencia entre genomas, y que para que dos ADN muestren un mínimo grado de hibridación es necesario que ambas secuencias compartan al menos un 80% de identidad. Por tanto, entre 0 y 100% de similitud se distribuyen genomas que comparten entre el 80 y el 100% de identidad en las secuencias. De forma empírica se ha observado que una especie procariota agrupa organismos con una similitud interna superior al 70% de RBR o inferior a 5°C de ΔT_m . Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que estos límites numéricos no son absolutos, y que pueden oscilar entre 50% RBR ($\pm 9^\circ\text{C } \Delta T_m$) y 80% RBR ($\pm 3^\circ\text{C } \Delta T_m$). Es por tanto un error intentar forzar la clasificación de especies nuevas utilizando el 70% de RBR (o 5°C ΔT_m) o reclasificación de especies son, además de los datos de hibridación ADN-ADN, el reconocimiento de un fenotipo característico e identificativo del grupo en cuestión, así como encontrar una coherencia con otros datos genotípicos (por ejemplo el contenido G+C).

La secuencia del ARNr 16S es un parámetro adicional que aporta información importante. La obtención de estas secuencias es una tarea relativamente fácil y barata, y probablemente sea imprescindible para futuras clasificaciones de procariotas. El mayor problema, que no voy a discutir aquí, es la confección de los árboles que expresan la afiliación filogenética de una secuencia determinada. La reconstrucción filogenética no es un trabajo sencillo, ya que requiere de la realización de diversos cálculos con distintos algoritmos y variaciones en el número y tipos de secuencias. Es recomendable el asesoramiento por un experto en reconstrucciones filogenéticas si uno no está muy acostumbrado a este tipo de análisis, ya que puede llevar fácilmente a conclusiones erróneas.

La afiliación filogenética de un organismo nos aclara datos, como el parentesco de éste con otros organismos ya secuenciados, así como la naturaleza monofilética de los taxones que uno analiza. Sin embargo, la información que contiene este gen es limitada, y se encuentra en el umbral de resolución en la circunscripción de una especie procariota. Podemos encontrar variaciones sorprendentes en la secuencia de organismos pertenecientes a una misma especie, así como especies claramente distintas con secuencias prácticamente idénticas. No es posible establecer

unos valores numéricos de similitud de secuencias de ARNr 16S como frontera de una especie bacteriana.

Por tanto, para la clasificación de una especie bacteriana nueva es necesario disponer al menos de un fenotipo identificativo del grupo de cepas en cuestión, del grado de similitud genómica interna y al menos con las cepas tipo de las especies más cercanas, así como disponer del grado de oscilación interno del porcentaje G+C. Al disponer de la secuencia del ARNr 16S podemos conocer la posición de los organismos en un esquema de relaciones genealógicas, así como identificar cuales son los taxones más cercanos. La descripción ideal es aquella que se realiza con un número significativo de cepas, y en la que se aporta el mayor número de datos posible, tanto fenotípicos como genotípicos, y en la cual queda patente que este grupo se trata de una unidad coherente, aislada del resto de organismos conocidos.

Me gustaría recomendar una serie de pautas a seguir cuando uno quiere clasificar una especie nueva. Éstas son:

1. Hacer un esfuerzo por disponer de un número adecuado de cepas del taxón en estudio. Es recomendable evitar, aunque a veces imposible, la descripción de una especie basándose en una sola cepa. Ello puede provocar dificultades en la identificación de futuros aislamientos.
2. Reconocer, mediante la afiliación filogenética y las características fenotípicas, los taxones más cercanos y utilizar al menos las cepas tipo de éstos en los análisis taxonómicos.
3. No ceñirse exclusivamente a los valores de 70% de RBR (o $5^{\circ}\text{C } \Delta T_m$) para la circunscripción de una especie. Comprender que ésta puede estar compuesta por distintos grupos genómicos (a los que llamamos *genomovares*) que no necesariamente deben ser clasificados como especies distintas.
4. Hacer un esfuerzo en la descripción fenotípica del grupo de organismos en estudio. A pesar de ser útiles, los sistemas comerciales (por ejemplo, API o BIOLOG) pueden ser insuficientes para la descripción de la variabilidad metabólica. El fenotipo no es sólo el metabolismo, sino que hay parámetros como los perfiles de ácidos grasos, poliaminas, quinonas..., que pueden aportar información importante en la clasificación.
5. No ser tacaños en el tiempo ni en el esfuerzo a la hora de analizar taxonómicamente un grupo de organismos. La clasificación de una especie no es una tarea fácil, y en muchas ocasiones se encuentra infravalorada.
6. Seguir las normas de nomenclatura, que es la

Ramon Rosselló Mora es Licenciado y Doctor en Biología por la Universidad de las Islas Baleares (Abril 1992). Al finalizar su tesis, sobre la taxonomía de *Pseudomonas stutzeri* y la capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos por algunas de sus cepas, obtuvo una beca posdoctoral en el Departamento de Microbiología de la Universidad Técnica de Munich. Durante dos años trabajó con K.H. Schleifer sobre filogenia bacteriana y bacterias que llevan a cabo la reducción desasimilativa de óxidos de hierro. En 1995 obtuvo un contrato de reinserción en el IMEDEA (CSIC-UIB), donde prosigió sus estudios en taxonomía y filogenia de bacterias. Ante la imposibilidad de seguir contratado en España, retornó a Alemania, incorporándose de nuevo como becario posdoctoral al Departamento de Ecología Molecular del Instituto Max Planck de Microbiología Marina (Bremen), donde dirige desde Junio de 1997 el grupo de Bentos, cuyas investigaciones se centran fundamentalmente en el estudio de la estructura y función de las comunidades anaeróbicas de sedimentos marinos.



Es colaborador asiduo del *International Journal of Systematic Bacteriology*, del *Systematic and Applied Microbiology* y del *Applied and Environmental Microbiology* (totaliza 18 publicaciones en esas revistas) y es autor del capítulo sobre *Ferrimonas* en la nueva edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

única parte de la taxonomía que está reglamentada y profundamente discutida. No dar nombres absurdos ni impronunciables para que no se enfaden nuestros colegas.

A sí están las cosas. La taxonomía, así como los demás ámbitos en la investigación de microorganismos, es una disciplina dinámica. Es posible que con el tiempo, estos conceptos vayan evolucionando y lo que consideramos ahora válido, se considere en un futuro inadecuado. Estamos entrando en la era genómica. Muchos serán los genomas que se secuencien completamente. Esta información va a suponer importantes cambios en la concepción de las relaciones de parentesco entre microorganismos, e incluso es posible aventurar un esquema de clasificación puramente basado en las secuencias de sus genomas. Este futuro no está muy lejos, pero para entonces estaremos todos calvos, y esa pregunta de tan difícil respuesta que se nos abordó al principio de este manuscrito será mucho más fácil de responder que la que nos puedan seguir haciendo los ecólogos.

Bibliografía

- Claridge, M. F., Dawah, H. A., Wilson, M. R. 1997. *Species: the units of biodiversity*, Chapman & Hall, Londres. Libro que reúne la mayoría de conceptos de especie diseñados para los seres vivos. En él se discuten los aspectos filosóficos, así como se proporciona al lector la visión más moderna sobre el tema.
- Cowan, S.T. 1971. Sense and nonsense in bacterial taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 67, 1-8. Una publicación antigua, pero interesante. En ella se esclarecen conceptos importantes, y permite hurgar en la historia de la taxonomía.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.-H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* 19, 554-568. A pesar de no ser discutido en el manuscrito, es importante su lectura para comprender como se deben confeccionar los árboles filogenéticos, así como para conocer las limitaciones del análisis de la secuencia del ARNr 16S.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco. Fundamental para comprender conceptos básicos sobre taxonomía y análisis numérico.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6578-6583. En esta publicación se calcula la abundancia de procariotas así como su importancia en la biosfera.