CONTRIBUCION DE LA BACTERIOLOGIA A LA BIOLOGIA MODERNA

por *Norberto José Palleroni* *

La microbiología es una ciencia relativamente reciente. Esta gran rama de la biología dependió para su nacimiento y desarrollo de la invención del microscopio, y esta invención ocurrió relativamente tarde en la historia de las ciencias. Pero en realidad esta invención no es el punto de partida, pues si bien los microbios fueron observados por primera vez hace unos trescientos años, por doscientos años no se supo qué función cumplían en la naturaleza, y recién en la segunda mitad del siglo pasado, principalmente por los estudios de Luis Pasteur, se empezó a considerarlos como la causa y no la consecuencia de las fermentaciones, las enfermedades, el avinagramiento de las bebidas alcohólicas, la coagulación de la leche, la putrefacción de la carne, y otros procesos naturales.

Muchos investigadores distinguidos siguieron las enseñanzas de Pasteur, pero entre ellos dos sobresalen en particular por la calidad de numerosas observaciones que los llevaron a la identificación de muchos grupos microbianos de gran importancia. Beijerinck en Holanda y Winogradsky principalmente en Francia, describieron funciones microbianas tan diversas y fundamentales como la fijación de nitrógeno atmosférico por bacterias libres del suelo, la descomposición de la celulosa, la reducción de sulfatos y de nitratos, tipos especiales de fotosíntesis ligadas a la oxidación de materia orgánica o de hidrógeno sulfurado, la oxidación de amoníaco y de nitritos acoplada a la fijación de anhídrido carbónico. La variedad de microbios es tan grande que aún hoy la lista sigue creciendo, aunque naturalmente a un ritmo mucho más reducido.

En la primera mitad de este siglo, la gran versatilidad de los microbios fue aprovechada por los bioquímicos para la descripción de numerosos esquemas metabólicos. Por una parte, esquemas biosintéticos para la construcción de moléculas pequeñas constituyentes de las macromoléculas celulares, y por otras rutas catabólicas o destructivas que proveen energía a las células y al mismo tiempo son una parte esencial de los ciclos naturales de los elementos que constituyen la materia viviente. Para citar un ejemplo, es tan importante la participación de los microbios en

* Conferencia pronunciada el día 8 de noviembre de 1984 en el acto de su incorporación como Académico Correspondiente en New Jersey (USA).

el ciclo del carbono, en la función de retorno del anhídrido carbónico a la atmósfera, que este compuesto se agotaría en unos treinta años si se eliminaran los microbios. Este cálculo es erróneo en estos momentos, cuando el abuso en el consumo de combustibles fósiles y la destrucción progresiva de las selvas naturales se combinan para plantear el problema opuesto, pero las reservas de combustibles naturales tienen un límite, y los cálculos pueden recobrar su validez en un futuro no muy lejano.

La gran versatilidad metabólica de los microbios está acompañada de una variabilidad fisiológica que no tiene paralelo en otros grupos de organismos. Los microbios son citados a menudo como ejemplos de peculiaridades fisiológicas. Así, algunos se multiplican activamente a la temperatura de ebullición del agua, mientras otros viven en medios tan ácidos como el jugo gástrico, o en soluciones de sales de metales pesados o de desinfectantes, en desafío de las predicciones sobre el efecto que estos factores tienen en general sobre componentes del protoplasma viviente. Pero además de estos ejemplos de actividades curiosas, los microbios y, en particular, las bacterias, han permitido la invención de métodos de análisis biológico precisos e incisivos, y además sirven a menudo de modelos para entender aspectos esenciales de la biología de los seres superiores. Es a este tipo de contribución de los microbios a la biología moderna que me voy a referir, tomando unos pocos ejemplos seleccionados ya que de otra manera la lista sería demasiado larga y tediosa.

En 1928 F. Griffith publicó los resultados curiosos de sus experimentos con bacterias causantes de la neumonía. Griffith inyectó ratones con suspensiones de neumococos patógenos muertos, en mezcla con neumococos vivos de una variedad no patógena. La inyección de cada una de las dos suspensiones por separado, como era de esperar, no afectó a los controles, pero la mezcla resultó letal, y de los animales muertos. La intención de Griffith al planear el experimento no era demostrar la resucitación de las bacterias muertas, sino la transformación de las bacterias vivas inofensivas en un tipo idéntico al de las muertas, mediante una sustancia liberada por estas últimas.

El experimento de Griffith fue repetido por otros investigadores, y resultó realmente convincente cuando la transformación pudo ser probada fuera del animal, con bacterias cultivadas en medios de cultivo artificiales. Finalmente, dieciséis años más tarde Avery y sus colaboradores MacLeod y McCarthy comunicaron la extraña conclusión de que el principio transformador no era una proteína, como generalmente se sospechaba, sino ácido desoxiribonucleico (ADN). Este era responsable de la transformación de las bacterias de un tipo en otro y, además, tenía la propiedad de replicarse en las células transformadas, de modo que éstas podían transmitir el principio transformador a otras bacterias. El escepticismo con que fueron recibidas estas conclusiones fue finalmente neutralizado cuando diez años más tarde Watson y Crick propusieron una fórmula para el ácido desoxiribonucleico que satisfacía la condición de contener

información hereditaria, y sugirieron la manera en que el ADN podía replicarse en las células.

El drama que rodeó a estos descubrimientos, seguidos de la propuesta de un código genético universal, la actividad febril que despertó, y la rapidez con que se expandió el horizonte de la biología, no tienen paralelo en la historia de las ciencias. No cabe ahora la menor duda de que la identificación de ADN como material de la herencia hubiera tardado muchísimo más si no hubiéramos contado con la colaboración de los microbios, en especial las bacterias y sus virus, llamados bacteriófagos, pero para los bacteriólogos lo más sorprendente de este episodio fue el hecho de que unos pocos años antes se dudaba que las bacterias tuvieran material genético remotamente parecido al de los otros seres, o que las variaciones que se observaba en los cultivos bacterianos en el laboratorio merecieran ser llamadas mutaciones.

En la década de 1940-1950 ocurrieron otros dos descubrimientos muy significativos. Uno fue hecho por Lederberg y Tatum sobre el mecanismo de conjugación en las bacterias, que introdujo una herramienta muy útil para el estudio de la herencia en estos organismos. El trabajo que siguió a este descubrimiento fue tan intenso que a los pocos años la especie usada por Lederberg y Tatum, el colibacilo, fue el organismo mejor conocido desde el punto de vista genético. Entre sus ventajas están el tener generaciones de menos de media hora de duración, y la posibilidad de examinar enormes poblaciones con métodos directos y precisos.

El segundo episodio de la década tiene como protagonista a una mujer solitaria, Barbara McClintock quien, trabajando con maíz en un laboratorio de Long Island, en el estado de N. York, propuso una extraña explicación para el producto de ciertos cruzamientos en los cuales estudiaba la herencia del color de los granos. Su hipótesis tenía que ver con genes que, por alguna razón no muy clara, podían moverse de un cromosoma a otro y en esa migración, influir sobre otros genes vecinos, activándolos o inhibiéndolos. Esta hipótesis no fue aceptada con mucho agrado, en parte porque significaba introducir perturbaciones en la hermosa regularidad de la distribución de los genes en la herencia, pero principalmente por el hecho de que la teoría no podía ser probada al nivel molecular, y hubo que esperar unos cuarenta años para que McClintock recibiera la recompensa por esa observación tan aguda, cuando pudo demostrarse en las bacterias un mecanismo similar y los experimentos con los genes móviles pudieron ser más directos. El caso se parece un poco al de los neumococos de Griffith, e ilustra la ventaja que en ciertos casos existe en trabajar con las bacterias, dejando temporariamente de lado las complicaciones de los animales o las plantas.

La mayoría de los genes de las bacterias están en una molécula enorme de ADN que recibe el nombre de cromosoma. Unos pocos genes pueden estar ubicados en minicromosomas llamados plásmidos. Tanto el cromosoma como los plásmidos tienen la propiedad de replicación independiente, que está sincronizada con la división celular de manera tal que todas las

células reciben copias del cromosoma y de los plásmidos. Además, puede haber en las bacterias genes móviles similares a los estudiados en maíz por McClintock, incluidos en segmentos de ADN llamados transposones, que no tienen capacidad de replicación independiente a menos que estén integrados a otros elementos de ADN como el cromosoma o los plásmidos. Dado que muchos plásmidos pueden ser transmitidos de una célula a otra durante la conjugación, los transposones los aprovechan como vehículos para entrar a las células y, una vez adentro, se mueven libremente del plásmido al cromosoma o a otros plásmidos.

Las propiedades de algunos plásmidos de pasar de una célula a otra, y de los transposones, que pueden integrarse en muchos lugares distintos a otras moléculas de ADN, son usadas hoy extensamente en laboratorios donde se hace ingeniería genética. En nuestro laboratorio nosotros hacemos uso frecuente de estos elementos en nuestro trabajo con bacterias del género *Gluconobacter*. En estas bacterias aprovechamos el intercambio de material genético entre el cromosoma y los plásmidos para aislar genes de *Gluconobacter*, que luego son transferidos a bacterias del género *Pseudomonas* donde esos genes frecuentemente se expresan normalmente. *Gluconobacter* y *Pseudomonas* tienen muy escaso parentesco, y aún así, puede demostrarse intercambio genético cuando se usan determinados plásmidos de poca especificidad hacia el huésped.

Estos mecanismos de intercambio "ilegítimo" de material genético entre las células bacterianas han tenido un impacto muy grande aún en aquellas ramas de la microbiología que son notorias por su carácter estático, como la taxonomía. La clasificación de las bacterias se ha hecho siempre en base a la observación de un número de caracteres fenotípicos tanto morfológicos como fisiológicos, pero recientemente ha habido una tendencia marcada a incluir métodos tomados de la biología molecular que dan una idea más precisa de la constitución genética de los organismos bajo estudio. Para terminar este relato, yo quiero referirme a la parte principal del trabajo en que he participado en estos últimos años, y que tiene que ver con la clasificación de las bacterias del género *Pseudomonas*. Este es un género grande y complejo cuyas especies son comunes en medios naturales como el suelo y las aguas. La subdivisión interna del género en grupos de especies al presente está basada en la composición del ácido ribonucleico constituyente de los ribosomas, un criterio de clasificación que ha sido la culminación de una larga trayectoria iniciada por nuestro grupo en el Departamento de Bacteriología de la Universidad de California en Berkeley alrededor del año 1964.

El estudio de la composición del ácido ribonucleico permite establecer relaciones distantes entre organismos ya que este compuesto varía muy lentamente en el curso de la evolución.

Pseudomonas es el primer ejemplo de un grupo grande y complejo de bacterias al cual se aplicó el principio de análisis del ácido ribonucleico de ribosomas para la solución de problemas taxonómicos. Los resultados están presentados en la figura 1, en la cual las especies incluidas en el

Dos especies que se parecen en la secuencia de ADN, con un nivel de homología que puede ser demostrado por hibridación, tienen invariablemente gran homología en el ARN ribosómico. Esta correlación no ocurre necesariamente en el sentido inverso.

Pero lo más significativo de la clasificación de *Pseudomonas* presentada en la figura 1 es que dos especies de grupos distintos pueden diferir en la composición de su ARN ribosómico tanto o más que cualquiera de las dos con respecto a especies de otros géneros, a pesar de que esas dos especies comparten muchos caracteres generales y por los criterios tradicionales deben ser incluidas en el género *Pseudomonas*. De hecho, la comparación de sus ARN ribosómicos sugiere la creación de géneros distintos.

Estas conclusiones de nuestro trabajo han recibido confirmación en muchos laboratorios, donde se ha investigado con otros caracteres de *Pseudomonas* de un grado de conservatismo comparable al del ARN de ribosomas. En la tabla 1 se presenta el resumen de los resultados obtenidos por uno de esos grupos estudiando las propiedades de los sistemas biosintéticos de dos amino ácidos aromáticos, tirosina y fenilalanina.

El grupo encabezado por Woese en la Universidad de Illinois introdujo un método de análisis de uno de los componentes del ARN ribosómico. Este método está basado en determinar la secuencia de oligonucleótidos y en comparar los catálogos de secuencias de los organismos. Este método, mucho más laborioso que el método de hibridación usado por nosotros, da prácticamente los mismos resultados, confirmando la división de *Pseudomonas* en cinco grupos bien definidos. Pero estos investigadores extendieron el análisis a muchos otros géneros de bacterias, con resultados que ha producido una verdadera revolución en los sistemas de clasificación de estos organismos.

En resumen, el ejemplo de *Pseudomonas* y los resultados más extensos de Woese y colaboradores muestran que desde el punto de vista filogenético, las bacterias son mosaicos, con caracteres que derivan por una parte de antecesores remotos, pasados de una generación a la siguiente en forma "vertical", mientras que otros caracteres pueden haber sido adquiridos a distintos tiempos por transferencia "horizontal". Los genes que gobiernan estos últimos caracteres pueden haber formado parte de transposones llevados en plásmidos poco específicos, es decir, capaces de penetrar células de origen muy diverso. Estos mecanismos ocurren en la naturaleza, y el caso de *Glueonobacter* mencionado anteriormente muestra que es posible hacer ingeniería genética *in vivo* cuando se crean condiciones selectivas apropiadas.

Hay muchos ejemplos en la literatura científica de componentes celulares homólogos en células de especies de origen claramente diferente, y por el momento la transferencia horizontal ofrece la única explicación satisfactoria para tales casos. Las clasificaciones de significado filogenético deben basarse en una discriminación cuidadosa entre lo que ha sido adquirido por contaminación de plásmidos promiscuos llevando transposones. Pero el taxónomo también tiene que estar alerta acerca de la po-

TABLA 1. — Biosíntesis de amino ácidos aromáticos en distintos grupos de *Pseudomonas* ^a

Especies	Grupo de homología de ARN (1)	Subgrupo de homología de ADN	Biosíntesis de tirosina		Biosíntesis de fenilalanina		
			Efectores alostéricos de DAHP sintasa (2)	Dehidrogenasa (3)	Substrato de la deshidratasa		Factor de activación de la PF deshidratasa por tirosina
					AG	PF	
<i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. syringae</i> <i>P. cichorii</i>	I		L-tirosina	PF:NAD (AG:NAD)	+	+	1
<i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. alcaligenes</i>					-	+	
<i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>P. asplenii</i> <i>P. agarici</i>							
<i>P. cepacia</i> <i>P. marginata</i> <i>P. pseudomallei</i> <i>P. mallei</i> <i>P. caryophylli</i>	II	IIa	L-tirosina y L-fenilalanina	PA:NAD/ NADP (AG:NAD/ NADP)	+	+	2-3
<i>P. pickettii</i> <i>P. solanacearum</i>		IIb			+	+	1
<i>P. pyrrocinia</i> <i>P. andropogonis</i>							
<i>P. acidovorans</i> <i>P. testosteroni</i>	III	IIIa	L-tirosina y L-fenilalanina	PA:NAD/ NADP (AG:NAD/ NADP)	-	+	6-12
<i>P. facilis</i> <i>P. delafieldii</i>		IIIb			+	+	3-4
<i>P. saccharophila</i>		IIIc			+	+	15
<i>P. alboprecipitans</i> <i>P. flava</i> <i>P. pseudoflava</i> <i>P. palleronii</i>							
<i>P. diminuta</i> <i>P. vesicularis</i>	IV		L-triptofano	PA:NAD/ NADP	+	-	
<i>Xanthomonas</i> spp. <i>P. maltophilia</i> <i>P. garneri</i> <i>P. geniculata</i>	V		corismato	(PA:NAD) AG:NAD	+	+	1

sibilidad de "convergencia", que es la adquisición de propiedades fenotípicas similares por organismos no relacionados, simplemente como respuesta a la presión selectiva impuesta por el medio ambiente que comparten. Sin embargo los métodos modernos de análisis de macromoléculas ofrecen una solución directa: los caracteres similares que tienen un origen común siguen siendo marcadamente homólogos al nivel molecular, mientras que la similitud por convergencia no pasa del nivel superficial.

Es mi convicción que la taxonomía bacteriana va a beneficiarse sustancialmente en el futuro no muy lejano con los conceptos presentados en este breve relato, para cuya génesis y desarrollo el caso de *Pseudomonas* ha sido uno de los ejemplos más útiles. El impacto sobre los estudios con seres superiores va a ser menos inmediato, o tal vez no se sienta nunca, pero aquí es necesario recordar una hipótesis muy popular que sostiene que los seres superiores pueden haberse originado por la asociación simbiótica de organismos muy semejantes a las bacterias actuales, una asociación que ha sido seguida de una migración cuantiosa de material genético entre los distintos compartimientos celulares. Por esta razón, quizá no sea demasiado aventurado suponer que en este terreno las bacterias pueden servir una vez más como modelos para ayudar a entender la complejidad del mundo viviente.

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA

BYNG, G. S. *et al.*, MOL, J., 1983. *Evol.* 19: 272.

PALLERONI, N. J., 1983. *Bioscience*, 33: 370.

—, en Krieg, N. R. (editor), 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, *Williams & Wilkins, Co.*, Baltimore, pp. 141-199.

STACKEBRANDT, W. and WOESE, C. R., en CARLILE, M. J., COLLINS, J. G., y MOSELEY, B. E. B. (editores), 1981. *Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution*. *Cambridge Univ. Press* Cambridge, pp. 1-32.

WOESE, C. R. *et al.*, 1984. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 179.