Temas de actualidad

Patología bacteriana en piscicultura

Francesc Padrós[1,3] y María Dolores Furones[2,3]

1. Servicio de Diagnóstico Patológico en Peces. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès). Barcelona. *E-mail:* francesc.padros@uab.es.

2. Centre d'Aqüicultura. IRTA. Ctra. Poble Nou, s/n Km. 5,5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona. *E-mail:* dolors.furones@irta.es.

3. Centre de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.

Introducción

En los últimos años, la actividad productiva de la cría de especies piscícolas tanto marinas como de agua dulce, conocida con el término más general de acuicultura, en el que se incluye la cría de otras especies de organismos acuáticos, ha experimentado un crecimiento exponencial muy importante. Ello se ha debido, por una parte, a la necesidad de buscar soluciones a la sobreexplotación de los recursos naturales existentes en los medios acuáticos del planeta y por otra, a la puesta a punto de la tecnología necesaria para su desarrollo.

Sin entrar en un análisis detallado de la situación, pero a modo de ejemplo cabe señalar que, sólo en la Unión Europea, los desembarcos de pesquerías han descendido un 27% en la última década, acompañado también de un descenso de precios (18%) y de número de embarcaciones (7%). Paralelamente, durante el mismo periodo, el sector de la acuicultura en Europa ha aumentado significativamente, representando actualmente el 31% del total de la producción pesquera (1).

Sin embargo y al igual que muchas otras actividades de cría animal, el desarrollo de la acuicultura ha conllevado la aparición de numerosas complicaciones patológicas de diverso origen y entre ellos y de forma particular, problemas de origen bacteriano.

En comparación con los sistemas de cría animal en tierra, el medio acuático en el que se desarrolla la piscicultura representa un contexto totalmente distinto al medio terrestre. Adicionalmente, la acuicultura se desarrolla en sistemas diversos que van desde tanques de cultivo en circuito abierto, sistemas de recirculación, estanques en tierra o hasta jaulas en el mar, todos ellos representan sistemas con características físico-químicas específicas y complejas donde los microorganismos y en concreto las bacterias, juegan un papel extremadamente importante como punto de encuentro de las distintas vías de síntesis y degradación que tienen lugar en los mismos. Es importante indicar que, a diferencia de otros ambientes, en el medio acuático existen relativamente pocas bacterias que puedan ser consideradas estrictamente como patógenos obligados. Una parte importante de ellas son patógenos oportunistas que pueden vivir de forma más o menos independiente, sin necesidad de afectar a los peces, pero a los que en determinadas ocasiones, se les ofrecen buenas oportunidades para que puedan actuar como patógenas. De ahí el ya clásico, y tal vez demasiado simplista, paradigma indicado por autores clásicos como Sniesko (2) y Wedemeyer (3) sobre la importancia de las condiciones ambientales en la modulación de los procesos patológicos en peces. Las modificaciones a las que las actividades de la acuicultura someten de forma súbita, provocan situaciones que inducen cambios entre la microbiota bacteriana y sus relaciones con el resto de organismos presentes en el medio. Estos desequilibrios en muchos casos pueden desembocar en la generación de patologías, que en definitiva son un tipo especial de interacción entre las especies. El cultivo de peces en sistemas con alta biomasa, suele ser una de las causas más habituales de problemas patológicos, ya que se provocan variaciones en las concentraciones de gases disueltos debido a la respiración de los peces, cambios en el pH, presencia de mayor cantidad de amonio asociada a la excreción, mayor cantidad de materia orgánica en suspensión (y por lo tanto, nutrientes) debido a las heces y los restos de comida, etc. lo que hace que algunas poblaciones bacterianas disminuyan o desaparezcan y que otras puedan proliferar. Aparte de estos cambios en el medio, hay que considerar el importante sustrato que representan los propios peces, ya que se puede estar facilitando el desarrollo de especies que pueden asociarse de formas variadas con los peces y de forma particular como patógenos, ya sean oportunistas (los más habituales) o primarios. Si a todo esto añadimos factores epizootiológicos como los contactos entre distintas poblaciones o la inmunosupresión inducida por el estrés, la probabilidad de que alguna

de estas interrelaciones desemboque en una enfermedad es muy grande, y más en organismos como los peces con una importante dependencia directa de su fisiología con respecto a las condiciones del medio, tales como la temperatura (poiquilotermia), sobre todo comparado con mamíferos y aves. Por todo ello, en el caso particular del cultivo o cría de peces, los problemas patológicos de origen bacteriano suponen en la actualidad un lastre muy importante para el desarrollo presente y futuro de esta actividad.

La patología

A continuación, ofreceremos un breve repaso a los principales problemas patológicos de origen bacteriano. En esta exposición y debido a lo limitado del artículo, solamente abordaremos aquellas enfermedades que nos son más próximas, es decir infecciones bacterianas que afectan a especies de peces marinas y continentales de la península Ibérica o áreas cercanas. Por ello, el lector no debe buscar aquí un compendio de las infecciones bacterianas en peces, ya que para ello recomendamos la lectura de obras generales como las clásicas de Austin y Austin (4) y la de Inglis, Roberts y Bromage (5).

Tampoco lo abordamos desde una perspectiva taxonómica, sino que por la naturaleza del artículo, creemos que puede ser más interesante una aproximación desde el punto de vista práctico.

Entre los microorganismos productores de enfermedades en peces podemos destacar los siguientes grupos:

- Los bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos. Tal vez sea el grupo más extenso y que de forma general más problemas provoca. Entre ellos encontramos Enterobacteriaceas como *Yersinia* y *Edwardsiella*, Vibrionáceas como *Vibrio*, *Listonella* y *Photobacterium*, Aeromonadáceas como *Aeromonas* y Pseudomonadáceas como *Pseudomonas*.
- Los cocos y bacilos Gram-positivos: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Renibacterium*.
- Micobacteriáceas y Nocardiáceas.
- Flavobacterias.
- Otros microorganismos

Infecciones por Enterobacteriáceas

Dentro del grupo de las enterobacteriáceas y en comparación con mamíferos o aves, solamente unos determinados géneros son considerados como patógenos de peces. Entre ellos, *Yersinia* y *Edwardsiella* son los más conocidos, aunque de forma más ocasional se aíslan también otras enterobacteriáceas como *Citrobacter*, *Serratia* o *Proteus*. En este apartado solamente pasaremos a describir la yersiniosis ya que las infecciones por *Edwadsiella* son más propias de especies como el pez gato (*Ictalurus* sp.) cultivadas principalmente en los EEUU.

Infecciones por *Yersinia ruckeri*

La yersiniosis, conocida también como "enfermedad de la boca roja" está producida por *Yersinia ruckeri*. Se han descrito brotes en un amplio espectro de hospedadores, aunque la enfermedad es más prevalente en salmónidos y sobre todo en trucha arco iris, causando procesos septicémicos que puede o no ir acompañados de hemorragias en la zona de la boca. Los brotes de esta enfermedad suelen estar asociados a temperaturas altas y afectan principalmente a peces de talla grande. Puede causar elevadas mortalidades si no se trata a tiempo y de forma debida.

A pesar de ser un patógeno muy importante debido a su gran dispersión geográfica y a la agresividad de sus brotes, todavía hay muchos aspectos que precisan atención, desde su incierta posición taxonómica, su compleja y confusa nomenclatura serológica, la patogénesis de los distintos serotipos, etc. Sin embargo, el éxito temprano obtenido en el desarrollo de vacunas eficaces contra esta enfermedad podría explicar la aparente relajación en el esfuerzo dedicado al conocimiento de este importante patógeno. Para más detalles sobre esta enfermedad, recomendamos las revisiones de Furones y col. (6) y de Horne y Barnes (7).

Infecciones por *Aeromonas*

Dentro del apartado de las infecciones causadas por *Aeromonas*, las infecciones por *Aeromonas salmonicida* ocupan un lugar destacado por la importancia que presentan como productoras de pérdidas especialmente importantes en la cría de salmónidos (trucha arco iris y salmón), aunque también puede afectar a otras especies como el rodaballo, dorada o lubina si las salinidades no son altas. La infección por *A. salmonicida*, conocida popularmente como forunculosis o furunculosis conlleva el desarrollo de procesos septicémicos agudos o crónicos y se caracterizan por presentar, aunque sólo en algunos casos, lesiones necróticas conocidas como forúnculos en piel y musculatura. Se trata de una enfermedad particularmente asociada a situaciones de estrés relacionadas con el manejo de los peces y que habitualmente presenta graves problemas por la aparición rápida de resistencia a antibióticos. Tal vez sea una de las enfermedades de peces más conocidas desde hace más tiempo, por lo cual,

unido a las graves pérdidas económicas que produce, ha sido objeto de innumerables estudios. En este sentido, recomendamos la excelente revisión sobre esta enfermedad, que desde un punto de vista multidisciplinar, ha sido editada por Bernoth, Ellis, Midtlyng, Olivier y Smith (8).

También existen otros tipos de infecciones debidas a *Aeromonas* que se conocen con el nombre de "infecciones por *Aeromonas* móviles". Esta denominación es así debido a que uno de los caracteres diferenciales de *A. salmonicida* es que es un microorganismo inmóvil y este criterio es utilizado muy frecuentemente en su identificación. Dentro de las especies que se engloban como *Aeromonas* móviles, *Aeromonas hydrophila* es la especie más típica y habitual. Se trata de un microorganismo extraordinariamente ubicuo en agua "dulce" y representa el clásico ejemplo de patógeno secundario oportunista cuya acción casi siempre está provocada por un problema asociado a la calidad de agua o a un error grave en el manejo productivo.

Infecciones por especies de la familia Vibrionaceae

Dentro de la amplia familia Vibrionaceae encontramos diversos géneros que históricamente han sido considerados como organismos que son habitualmente aislados de ambientes acuáticos. Entre ellos destacan *Vibrio* y *Photobacterium*.

Infecciones por *Vibrio*

El género *Vibrio* es uno de los géneros de bacterias con mayor importancia en acuicultura marina. Sus especies son también extraordinariamente ubicuitarias aunque en este caso, en ambientes marinos o estuarinos. Entre las Vibrionáceas aislables en estos ambientes, algunas especies pueden considerarse patogénicas (primarias o secundarias) aunque muchas de las especies no lo son. Tal vez la especie patógena más conocida sea *Listonella anguillarum*, más conocida por su basónimo, *Vibrio anguillarum*. Las vibriosis, nombre con el que se conoce genéricamente a las infecciones de este grupo de bacterias, suelen cursar con procesos septicémicos con carácter hemorrágico, que es tal vez una de las características principales de esta enfermedad. En nuestra área geográfica suele afectar principalmente a alevines de especies de peces marinos, principalmente rodaballo y lubina, siendo más raro en dorada. En la actualidad se disponen de vacunas para los serotipos O1 y O2 bastante eficaces en la prevención de esta enfermedad y que han reducido sensiblemente el número de casos detectados. Para más datos sobre esta especie recomendamos la lectura de los trabajos de Toranzo y Barja (9) y Kühn y col. (10).

Existen también otras especies de Vibrionáceas como *Vibrio ordalii*, *Photobacterium* (*Vibrio*) damsela y otros que también son aislados con relativa frecuencia de procesos patológicos en peces. De forma particular, en los últimos años han empezado a aflorar con mayor frecuencia otras enfermedades debidas a vibrionáceas como *Vibrio alginolyticus*, descritas por Balebona y col. (11) o *Vibrio harveyi*, que suelen aparecer muy frecuentemente asociados a otros procesos víricos, bacterianos o parasitarios o bien a procesos incorrectos de cría.. Otro caso singular está representado por *Vibrio vulnificus*, una especie de Vibrionácea especialmente patógena para la anguila (especialmente el serovar E, biotipo 2) y que ha puesto en grave peligro este tipo de cultivo hasta que ha sido posible controlar esta enfermedad con técnicas de profilaxis general y con el desarrollo de una vacuna notablemente eficaz y estudiada en nuestro país (12).

Infecciones por *Photobacterium*

Dentro de este género incluimos una especie y una subespecie que hace relativamente poco tiempo estaban considerados como *Vibrio* y *Pasteurella*. La primera de las especies es *Photobacterium damsela*, que anteriormente había sido conocida como *Vibrio damsela* y *Listonella damsela*. A pesar de la nueva redenominación, la patogeneicidad de *Ph. damsela* es comparable a la de otros *Vibrio* comentados con anterioridad. De mayor importancia como patógeno de peces marinos es la subespecie *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, anteriormente conocida como *Pasteurella piscicida* y productor de Pasteurelosis (13). Esta enfermedad afecta principalmente a dorada y lubina, especialmente a alevines o ejemplares jóvenes y suele cursar con cuadros septicémicos que, en el caso de sobrevivir, pueden cronificarse, ocasionando la aparición de la típica lesión de bazos hipertrofiados y con granulomas blanquecinos en su interior, dando a este órgano un aspecto peculiar por el cual también se conoce a esta enfermedad con el nombre de "pseudotuberculosis". En la actualidad existen vacunas disponibles contra esta enfermedad.

Infecciones por *Pseudomonas*

Se trata también de un género de microorganismos muy habitual en los ambientes acuáticos. Generalmente han sido considerados patógenos oportunistas. Entre las especies descritas en la bibliografía destacaremos dos de ellas: *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas anguilliseptica*.

Las infecciones por *P. fluorescens* son típicamente secundarias o asociadas a condiciones de cultivo claramente incorrectas, pudiendo ser aislada como contaminante en lesiones externas o bien de procesos septicémicos. *P. anguilliseptica* ,por su parte, ha sido tradicionalmente aislada de procesos septicémicos en anguila, aunque recientemente esta especie también ha sido aislada en dorada (14) en asociación a lo que se ha venido a denominar como síndrome de invierno en la dorada (15).

Los cocos y bacilos Gram-positivos: *Streptococcus, Lactococcus* y *Renibacterium*

Hasta hace unos años, las infecciones bacterianas en acuicultura estaban prácticamente acaparadas por los microorganismos Gram-negativos. Sólo *Renibacterium salmoninarum* y algunas especies de *Streptococcus* parecían alterar un panorama básicamente dominado por los Gram-negativos. Sin embargo, en los últimos años y por alguna desconocida razón, las infecciones por Gram-positivos y especialmente las debidas a *Lactococcus* han irrumpido con fuerza y en la actualidad son uno de los principales problemas en acuicultura.

Infecciones por *Renibacterium salmoninarum*

Renibacterium salmoninarum es un bacilo Gram-positivo, agente productor de la que se conoce como enfermedad bacteriana del riñón o BKD *(Bacterial Kidney Disease)*. Afecta fundamentalmente a salmónidos y presenta la particularidad de ser un microorganismo de desarrollo intracelular (principalmente en macrófagos), lo que dificulta en gran manera la consecución de una respuesta inmune eficaz, así como su tratamiento. Aunque no se trata de una enfermedad especialmente extendida en nuestra área, los casos de BKD suelen ser bastante problemáticos por los problemas de diagnóstico diferencial y de tratamiento. Existen algunas revisiones recomendables sobre esta enfermedad, como las de Evenden y col. (16) o la más reciente de Wiens y Kaattari (16).

Infecciones por *Streptococcus* y *Lactococcus*

Las infecciones por *Streptococcus* han sido descritas en múltiples especies de peces tanto en aguas continentales como en aguas marinas. Suelen cursar con cuadros septicémicos generales que externamente se expresan en oscurecimiento de los animales, exoftalmia, aparición de áreas hemorrágicas y lesiones en piel y aletas. En nuestra área de influencia, los problemas por estos grupos de microorganismos son principalmente debidos a las infecciones en trucha por *Lactococcus garviae* (anteriormente conocido por *Enterococcus seriolicida*), por *Streptococcus iniae*, por *Carnobacterium piscicola* y por *Vagococcus salmoninarum* en trucha y por las infecciones en rodaballo causadas por *Streptococcus parauberis*. De ellas, tal vez sean las infecciones por *L. garviae* las que mayores pérdidas están ocasionando en el cultivo de la trucha. Conocida como Lactococosis o también denominada simplemente como "Estreptococosis" (aunque bajo este término frecuentemente se agrupan también las infecciones por *S. iniae*), esta enfermedad aparece siempre asociada a temperaturas por encima de los 15ºC, provocando cuadros graves de mortalidad, superiores en algunos casos al 40% de los peces. En la actualidad se están ensayando en campo distintos tipos de vacunas por inyección que están mostrando una notable efectividad en el control de esta enfermedad, aunque es esperable que en futuro próximo puedan desarrollarse vacunas con mayores niveles de protección, de mayor duración (las actuales tienen un periodo de protección demasiado limitado) y de más fácil administración.

S. iniae también puede ser aislada en algunos casos, aunque por el momento no presenta la misma importancia de *L. garviae*. *Carnobacterium piscicola* y *Vagococcus salmoninarum* son otros Gram-positivos que pueden ser aislados especialmente de salmónidos, aunque generalmente asociados a procesos infecciosos menos agresivos y que tienen lugar a temperaturas más bajas que los brotes de *L. garviae*. En el caso del rodaballo, *S. parauberis* (también denominado como *Enterococcus* sp.) significó hace unos años un grave problema para este sector (17). Sin embargo y gracias al desarrollo de una vacuna particularmente eficaz y a un correcto sistema de vacunación se consiguió minimizar el impacto de esta enfermedad.

Micobacteriáceas y Nocardiáceas

Al igual que en patología de especies de mamíferos o aves, estos géneros tienen también su representación en peces. Las infecciones por micobacterias en peces guardan algunos paralelismos con las infecciones por micobacterias en mamíferos: se trata de procesos crónicos en los que la formación de granulomas es un hallazgo bastante habitual. En peces se describen principalmente tres especies de micobacterias aisladas de procesos patológicos: *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonei*. Estas especies producen procesos infecciosos bastante comunes en especies tropicales y especialmente en especies ornamentales. También se han descrito problemas graves debidos a micobac-

teriosis en el cultivo de dorada y lubina en Israel (18) y a su vez parece ser que recientemente se han descrito en rodaballo. Aunque su impacto directo en las producciones piscícolas, por el momento, no es comparable al de otros grupos de microorganismos, es importante en el futuro seguir de cerca el desarrollo de estas infecciones por la importancia que supone el hecho de que estos organismos pueden ser potencialmente considerados como productores de zoonosis.

También se han descrito infecciones por *Nocardia*, tanto en especies de peces de agua dulce como en marinas, aunque en nuestro entorno y por el momento, no representan un problema grave.

Flavobacterias

El grupo de las flavobacterias presenta una gran importancia dentro de las bacterias causantes de infecciones en peces. Son las responsables de enfermedades tan habituales como la "enfermedad bacteriana de la branquia" o BGD *(Bacterial Gill Disease)* o la "enfermedad por columnaris".

Se trata de procesos infecciosos externos que afectan a piel, aletas y branquias pero que en algunos casos, como las infecciones por *Flavobacterium psichrophylum*, pueden llegar a producir procesos septicémicos. Antiguamente estos organismos se encuadraban bajo el erróneo término de "Mixobacterias" o "bacilos Gram-negativos pigmentados" y en la actualidad se encuentran reorganizados básicamente bajo los géneros *Flexibacter* y *Flavobacterium*, aunque este grupo de microorganismos se encuentran hoy en día en profunda revisión.

Tal vez una de las enfermedades más habituales y conocidas desde hace más tiempo sean las infecciones de piel conocidas por "enfermedad por columnaris", producidas por *Flavobacterium columnare* (también conocido por los nombres de *Chondrococcus columnaris*, *Cytophaga columnaris* o de *Flexibacter columnaris*). Afecta tanto a salmónidos de agua dulce (truchas) como a otras especies, incluyendo la gran mayoría de especies ornamentales. Este proceso se caracteriza por el desarrollo de infecciones dérmicas generalmente asociadas a factores como temperaturas altas, excesiva presencia de materia orgánica en el agua y manejo inadecuado de los peces, especialmente si en éste manejo se producen alteraciones en el mucus o lesiones en la piel que son fácilmente colonizables por este microorganismo. Estas infecciones se localizan especialmente en la zona de la aleta caudal o dorsal (dando en esta localización la lesión típica que en terminología inglesa recibe la denominación de "*saddleback disease*"). Estas lesiones suelen evolucionar en lesiones de piel más extensivas y con frecuencia en úlceras.

Existe también una enfermedad similar a la anterior, pero que afecta a temperaturas más bajas y que es la producida por *Flavobacterium psychrophylum* (también denominado antiguamente como *Cytophaga psichrophila*). Afecta principalmente a salmónidos a temperaturas inferiores a 15ºC y produce lesiones en las aletas similares en cierto modo a las producidas por *F. columnare*. Un caso particular de infección por *F. psichrophylum* es el proceso que se ha denominado como RTFS *(Rainbow Trout Fry Syndrome)* o "síndrome del alevín de trucha arco iris", una enfermedad causante de alta mortalidad en alevines de esta especie. En este caso particular, aparte de provocar lesiones en piel, afecta a la mayoría de

María Dolores Furones Nozal se licenció en Biología por la *Universitat de les Illes Balears*. Es uno de los 34 Técnicos Superiores en Acuicultura que se formaron a través de un Plan específico de la CAICYT para aportar personal cualificado al sector emergente de la acuicultura en España. Realizó su tesis doctoral en el *Fish Diseases Laboratory* de Weymouth y en el Laboratorio de Microbiología del *Biological Sciences Department* de la Universidad de Plymouth (Reino Unido), estudiando los mecanismos de patogenicidad de *Yersinia ruckeri*. Su trayectoria profesional se ha desarrollado en distintos aspectos de la acuicultura; ha sido Responsable del *Centre Nacional de Aqüicultura* de la *Generalitat* de Cataluña y actualmente es Directora del *Centre de Aqüicultura* del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimetàries* (IRTA) de Cataluña.

Francesc Padrós es Doctor en Veterinaria y especialista en medicina y patología de peces. Su actividad se desarrolla principalmente en la gestión sanitaria en acuicultura, peces ornamentales, peces de acuario y en control sanitario de ictiofauna en poblaciones naturales. En la actualidad es el responsable técnico del Servicio de Diagnóstico Patológico en Peces de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autonoma de Barcelona. También es miembro del *Council* de la EAFP *(European Association of Fish Pathologists)*, con el cargo de *Meetings Secretary*.

órganos internos y provoca anemia severa.

Otro ejemplo de infecciones por flavobacterias es la conocida como "enfermedad de la branquia" debida a *Flavobacterium branchiophylum*, bacteria que puede afectar a salmónidos, pero también a otras especies de peces. En este caso, la enfermedad es debida a una proliferación de este microorganismo en las branquias, provocando hiperproducción de mucus, inflamación branquial y progresiva necrosis de las branquias, lo que induce a los peces a sufrir una insuficiencia respiratoria.

En peces marinos también existen infecciones asociadas a estos tipos de bacterias. Es el caso particular de *Flexibacter maritimus* (recientemente redenominado como *Tenacibaculum maritimum*) un microorganismo que puede producir cuadros lesionales en piel y branquias en especies marinas. En nuestra zona está suponiendo un problema particularmente grave para especies cultivadas como el rodaballo, lenguado, lubina y dorada. En la actualidad los trabajos para el desarrollo de una vacuna eficaz contra esta patología se encuentran ya muy avanzados.

Otros microorganismos: La gastroenteritis de la trucha

El rápido desarrollo de la piscicultura en los últimos años ha generado que a su vez hayan aparecido nuevas infecciones bacterianas, como hemos comentado en el apartado de los *Lactococcus*. Un caso particular y bastante reciente es denominado como "gastroenteritis de la trucha", una enfermedad asociada a temperaturas altas y que en la actualidad ocupa uno de los primeros lugares dentro de las enfermedades de esta especie. Aunque sólo se conocen aspectos parciales de la misma, parece ser que en su patogénesis se encuentra implicada una bacteria filamentosa segmentada denominada como "Candidatus Arthromitus" (19).

¿Cómo se convive con las infecciones bacterianas en acuicultura?

Las enfermedades en general suelen intensificarse y diversificarse a medida que los procesos de producción también lo hacen, lo que obliga a incorporar a los mismos las medidas pertinentes para proteger a los animales y mantener la actividad rentable. Ha habido una evolución muy importante en este sentido, podría simplificarse anotando que en la década de los años 80, los trabajos científicos y técnicos se centraban en los estudios taxonómicos y en la quimioterapia, intentando aportar información sobre la naturaleza de los patógenos y su control directo, estableciendo protocolos de diagnóstico y de tratamiento.

Aunque los trabajos taxonómicos siempre han mantenido un lugar muy importante, en la década de los años 90, se concentraron muchos esfuerzos en el desarrollo de vacunas, al manifestarse los múltiples problemas que acompañaban a la antibioterapia. Los éxitos obtenidos con las vacunas han sido desiguales para los distintos patógenos, lo que hace que, en la actualidad, a los estudios de nuevas formulaciones de vacunas, se vayan sumando otros que buscan alternativas o complementos dentro del campo de los inmunoestimulantes y probióticos.

Diagnóstico, tratamiento y profilaxis

El diagnóstico

El diagnóstico rutinario de estas enfermedades se realiza de forma habitual siguiendo las técnicas de aislamiento clásicas, de cultivo en medio sólido o líquido, aislamiento e identificación mediante caracterización bioquímica utilizando galerías de identificación comerciales con o sin pruebas complementarias. Los medios generales más habituales utilizados son TSA sin suplementar o suplementado con sal (cloruro sódico), dependiendo del tipo de bacterias a aislar, agar-sangre, agar marino, agar cytophaga (suplementado o no con sal), medios específicos como el TCBS para vibrionáceas y medios más específicos como el CFMM desarrollado por el grupo de Microbiología de la Facultad de Santiago de Compostela. Sin embargo, algunas especies presentan dificultades especiales para su aislamiento, entre ellas destacaremos *Renibacterium salmoninarum* y las micobacterias, en las que aparte de que son necesarios medios muy específicos como los KDM2; KDMC y SKDM para *Renibacterium* y los clásicos para micobacterias (Lowesntein-Jensen, Dorset egg, Ogawa egg, etc.), la velocidad de crecimiento es muy lenta. Por ello, rutinariamente se procede a su diagnóstico mediante técnicas cito-histológicas o inmulológicas. En el caso particular del BKD, la OIE también acepta como alternativa al cultivo la identificación mediante pruebas serológicas, como aglutinación y ELISA, así como técnicas moleculares (PCR).

Las pruebas serológicas, en al caso de algunos patógenos como *Vibrio* y *Yersinia*, resultan determinante a la hora de valorar las posibles repercusiones de un aislamiento sobre el cultivo de peces, en función del serotipo del que se trate. En este sentido, las pruebas inmunológicas y moleculares han ido alcanzando en los últimos años una mayor importancia, por si solas o como complemento a las pruebas de aislamiento e identifica-

ción. Si bien en un primer momento estas pruebas se restringían solamente a investigación, en la actualidad se encuentran ya disponibles de forma comercial o más o menos integradas en protocolos de identificación en determinados laboratorios. Sin embargo, hay que advertir que, a pesar de que las técnicas moleculares puedan potencialmente acelerar la obtención de información y por la tanto de reacción frente al problema, el hecho de que la mayoría de los patógenos bacterianos de peces puedan ser encontrados habitualmente en el medio acuático, hace que la implantación de estas pruebas de diagnostico, basadas en la detección de fracciones de ácido nucleico del patógeno y no en el patógeno viable, pueda generar conflicto a la hora de ser aceptadas por parte de las autoridades oficiales responsables del tema en los distintos países. Por lo tanto, una de las necesidades más importantes para el futuro es la unificación de las metodologías aplicadas y la normalización de las técnicas de diagnóstico. De lo contrario, la comparación de los datos obtenidos por los distintos laboratorios seguirá siendo poco precisa.

El tratamiento

El tratamiento de las infecciones bacterianas se realiza mediante el uso de dos grandes grupos de productos: desinfectantes externos y antibióticos. Los desinfectantes se utilizan, aparte de su uso en profilaxis, principalmente para el tratamiento de las enfermedades que cursan con lesiones externas (Flavobacteriosis externas de piel o branquias, Vibriosis y Aeromonosis externas, etc.). Suelen utilizarse distintos productos como el formol, la cloramina-T, el permanganto potásico o el peróxido de hidrógeno, principalmente, aplicados en forma de baños cortos de más o menos duración o bien directamente en el agua de cultivo. Estos productos se utilizan solos o combinados con antibioterapia.

El otro grupo de tratamientos lo constituyen los antibióticos. La aplicación de antibióticos en acuicultura generalmente se realiza por vía oral, por baño o por inyección. La administración de antibiótico a través del alimento (generalmente pienso) es el método más habitual en piscicultura, mientras que la aplicación por baño, aunque real, está más restringido a casos específicos. Esto es debido a la gran cantidad de antibiótico a utilizar, a las interferencias que se pueden establecer por las características físico-químicas del agua (salinidad, presencia de sustancias quelantes como el calcio), y a la problemática medioambiental por la facilidad de generación de resistencias que supone. La aplicación por inyección frecuentemente se restringe a problemas puntuales en animales reproductores, en especies ornamentales o en peces de acuarios de gran valor económico, aunque en algunos casos graves puede llegar a tratarse individualmente por inyección a gran número de peces. Como hemos comentado anteriormente, la aplicación oral de antibióticos es la forma de administración más habitual y se realiza a través de piensos medicamentosos. Actualmente se está trabajando en la línea de mejora de las dosificaciones a emplear, siendo necesario un mayor conocimiento sobre la cinética de cada una de los antibióticos sobre cada una de las especies, y teniendo en cuenta otros factores como la aceptación de este pienso por parte de los peces y las mermas que se pueden producir (el antibiótico puede empezar a perderse si no se ingiere rápidamente).

Aunque son muchos los antibióticos que se han utilizado en piscicultura: ampicilina, amoxicilina, enrofloxacina, eritromicina, flumequina, furazolidona, nifurpirininol, nitrofurazona, ácido oxolínico, oxitetraciclina y sulfamidas potenciadas, entre otros, su uso ha sido notablemente restringido, especialmente en lo que concierne a la aplicación en especies con destino a alimentación humana. En este sentido, solamente está legalmente permitido la utilización de aquellos antibióticos que presenten MRL (niveles mínimos de residuos) y estén expresamente autorizados para peces. Por ello, en la actualidad existen muy pocos antibióticos que tengan la licencia, aunque sea provisional, para poder ser legalmente aplicables a peces. El reducido volumen (afortunadamente, según como se mire) de ventas que representan los antibióticos en acuicultura, sobre todo comparado con el existente en otras producciones terrestres, como avicultura o porcino, hace que los esfuerzos, principalmente económicos, que hay que realizar para intentar licenciar un producto no compensen la posibilidad de ventas.

La aparición de resistencias a antibióticos (20) en la práctica de la acuicultura, la opinión del consumidor sobre temas de calidad del producto, el elevado coste para obtener las licencias y las restricciones legales, posiblemente hayan sido un factor decisivo en la potenciación de estudios encaminados a la obtención de vacunas comerciales e inmunoestimulantes

La prevención

Huelga decir que la primera y posiblemente más eficaz, medida de prevención consiste en la puesta a punto de un buen programa de higiene y de manejo en las piscifactorías, así como un

control de la situación sanitaria de los animales que entran en la misma procedentes de otros lugares. No obstante, la puesta a punto de este tipo de medidas no siempre puede evitar la aparición de problemas que puedan provenir del medio circundante, esto es especialmente relevante en las cada vez más numerosas piscifactorías en jaulas flotantes, donde existe un contacto con patógenos potenciales presentes en el medio, sin posibilidad de establecer las barreras físicas o químicas que se pueden aplicar en algunos casos en las piscifactorías en tierra.

Comentábamos antes que en la década de los 80 se trabajó mucho en temas de quimioterápia, se podría admitir la generalización de que los 90 han sido la década de las vacunas. Después de las vacunas contra *Yersinia*, aparecieron las de *Vibrio* (ya en los 80) y hasta los 90 no aparecieron las primeras contra *Aeromonas salmonicida*. Actualmente, en Europa, se encuentran en estudio avanzado o están ya licenciadas vacunas contra los principales patógenos bacterianos (desgraciadamente no ocurre lo mismo para los virus): *Vibrio anguillarum*, serotipo O1 y O2 (α y β), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garviae* y *Streptococcus*. En general, las vacunas comerciales consisten en formulaciones relativamente sencillas donde el antígeno (el patógeno completo inactivado habitualmente con formol y/o fracciones) se presenta en solución acuosa o asociado a adjuvantes, como en el caso de *Aeromonas*. Las vacunas pueden ser aplicadas por medio de inyección, inmersión o por vía oral. Cada uno de estos tipos de aplicación presenta unas ventajas específicas, como son la posibilidad de vacunar a la vez a un gran número de peces sin apenas manejo (oral) o con un manejo mínimo (inmersión), o aumentar la intensidad y duración de la respuesta inmune, pero con un proceso de aplicación más dificultoso (vacunas inyectables). Aparte de las características propias de la formulación de la vacuna, la estrategia de la vacunación a realizar dependerá de una serie de factores tales como la epizootiología de la enfermedad en la zona y del propio proceso de producción y manejo de cada piscifactoría.

Es importante destacar que previamente a una vacunación es muy importante confirmar que los peces se encuentren en un buen estado sanitario y que su manejo antes y después de la vacunación sea el adecuado para garantizar una buena inmunocompetencia y con ello unos resultados adecuados. Como práctica habitual, los peces se vacunan por inmersión antes de salir de las hatcheries (criaderos) y pueden (o no) recibir una dosis de recuerdo durante el ciclo de producción. El desarrollo de las vacunas orales (utilizadas básicamente como recuerdos o *boosters*) está siendo crucial en acuicultura ya que mediante este sistema de administración se posibilita el proceso de vacunación en sistemas donde sería muy difícil o prácticamente imposible llevarlo a cado de otro modo, como por ejemplo en jaulas flotantes o en grandes estanques en tierra. Para quienes quieran adentrarse más en el campo de la vacunación de peces les recomendamos las obras de Ellis (21) y el recopilatorio *Fish Vaccinology* (22).

La investigación está aportando también resultados muy interesantes sobre vacunas recombinantes, pero existen aún problemas legales y económicos importantes todavía que limitan su desarrollo y aplicación en sistemas de producción.

En los últimos tiempos también se está trabajando intensamente sobre el uso de inmunoestimulantes e inmunomoduladores en acuicultura (23). La lista de productos utilizados o potencialmente utilizables es extensa y variada en lo que se refiere a la naturaleza de los mismos, aunque con resultados que requieren ser en ocasiones contrastados, pero en cualquier caso, se puede considerar que se abre una nueva era encaminada a mejorar la calidad de vida de los animales y la seguridad del consumidor. Encontramos entre ellas LPS, toxinas bacterianas, ß-Glucanos, productos de síntesis química (levamisol), moléculas de origen vegetal, extractos de algas (algunos ya se comercializan), citoquinas, lisozima, ARN, vitaminas, PUFA's y más. Algunos de los que aún están en fase de estudio quedarán atrapados en las barreras legales, que en función de que sean considerados aditivos de alimentos o fármacos se someterán a escrutinio más o menos rigurosos. Algunos saldrán victoriosos de la batalla y podrán ser incorporados al arsenal para combatir y/o paliar las enfermedades de este sector emergente de la producción animal.

Los probióticos también están buscando un lugar en el mundo de la acuicultura, gozan tanto de defensores como de detractores, todavía hay que identificar a los posibles candidatos. Algunos de estos probióticos han sido ya probados como estabilizadores de la microbiota bacteriana en sistemas de cultivo larvario o para la regulación de la microbiota intestinal en algunas especies. Estemos pendientes.

Sin embargo, este no es el final del trayecto. Cuando tengamos resueltos muchos de estos temas, se identificarán nuevas especies de peces de interés para la acuicultura, se desarrollaran y se pondrán a punto nuevos sistemas intensivos de cultivo y como consecuencia, aparecerán nuevos

patógenos que habrá que identificar, diagnosticar, combatir, etc. y cerramos el círculo una vez más.

Afortunadamente en España disponemos de grupos de investigación muy importantes en patología de animales acuáticos y que en muchos casos pueden considerarse como referentes a nivel europeo y mundial. Muy probablemente estos equipos jugarán en el futuro un papel clave, como el que ya están jugando hoy, a la hora de abordar los problemas que sin duda aparecerán.

Bibliografía

1- FAO. 2000. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). http://www.fao.org/sof/sofia/index_en.htm. ISBN 92-5-104492-9.

2- Snieszko S.F. (1973). Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. In: Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine (C.A. Brandly & C.E. Cornelius, eds). Academic Press, New York, 291-314.

3- Wedemeyer, G.A., Meyer, F.P. and Smith, L. (1976). Environmental stress and fish diseases. Book 5 of Diseases of Fish, edited by S.F. Snieszko and H.R. Axelrod. Jersey City, New Jersey, T.F.H. Publications.Inc. Ltd., 192 pp.

4- Austin, B. and Austin D.A, (1993). Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. 2nd edn. Ellis Horwood, London.

5- Inglis, V., Roberts R.J. and Bromage, N.R. (eds.) (1993). Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 312 pp.

6- Furones, M.D., Rodgers C.J. and Munn, C.B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases, 3, 105-125.

7- Horne, M.T. and Barnes, A.C. (1999). Enteric Redmouth Disease (*Yersinia ruckeri*). En: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal infections (P.T.K. Woo and D.W. Bruno, Eds), 455-477.

8- Bernoth, E.-M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds). (1997). Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research. Academic Press, London.

9- Toranzo, A.E. and Barja, J.L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. Diseases of Aquatic Organisms, 9, 37-82.

10- Kühn, I., Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Möllby, R., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L. and Swings, J. (1996). Diversity of *Vibrio anguillarum* isolates from different geographical and biological habitats, determined by the use of a combination of eight different typing methods. Sys. Appl. Microbiol., 19, 442-450.

11- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A. and Borrego, J.J. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Applied and Environmental Microbiology, 64 (11), 4296-4275.

12- Collado C., Fouz, B., Sanjuán, E. and Amaro, C. (2000). Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. Diseases of Aquatic Organisms, 43: 91-101.

13- Quaglio, F., Fucilli, F., Bertja, G.L. and Giorgetti, G. (1991). Fish Pasteurellosis: a review. Riv. Ital. Acquacol., 26: 179-197.

14- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J.F., García, J.A., Cutuli, M.T., Blanco, M., Gibello, A., Moreno, M.A. and Domínguez, L. (1999). Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with 'winter disease' in sea bream, *Sparus aurata* L. Journal of Fish Diseases, 22, 69-71.

15- Tort, L., Padrós, F., Rotllant, J. and Crespo, S. (1998). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. Fish & Shellfish Immunology, 8, 37-47.

16- Wiens, G.D. and Kaattari, S.L. (1999). Bacterial Kidney Disease (*Renibacterium salmoninarum*). In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal infections (P.T.K. Woo and D.W. Bruno, Eds), 269-301.

17- Doménech, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Pascual, C., Garcia, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D. and Dominguez, L. (1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. Journal of Fish Diseases, 19, 33-38.

18- Colorni, A. (1992). A systemic mycobacteriosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* cultured in Eilat (Red Sea). The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 44(3), 75-81.

19- Michel, C., Bernardet, J-F., Daniel, P., Chilmonczyk, S., Urdaci, M. and de Kinkelin, P. (2002). Clinical and aetiological aspects of a summer enteric syndrome associated with the sporulating segmented filamentous bacterium 'Candidatus Arhromitus' in farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 25, 533-543

20- Rodgers, C.J. (2001). Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. Aquaculture, 196(3-4): 325-345.

21- Ellis, A.E., (ed.). (1988). Fish vaccination. Academic Press, New York (USA), 272 pp.

22- Developments in Biological Standardization Vol. 90. Fish Vaccinology. (1997). R. Gudding, A. Lillehaug, P. Midtlyng and F. Brown (Eds.). Karger. Basel.

23- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science, 4 (3): 229-288.

La Ecología Microbiana se hace mayor de edad

Ricardo Guerrero[1] y Mercedes Berlanga[2]

[1]Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona
[2]Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Universidad de Barcelona
E-mail: guerrero@retemail.es

If I could do it all over again, and relieve my vision in the twenty-first century, I would be a microbial ecologist. [...]. La ecología microbiana se desarrolla como disciplina independiente sólo durante la segunda mitad del siglo XX. El primer libro de texto con el nombre de ecología microbiana *(Principles of Microbial Ecology)* fue publicado en 1966 por Thomas D. Brock (nacido en Cleveland, Ohio, en 1926). No obstante, el concepto y bases metodológicas de la ecología microbiana estaban ya presentes en las investigaciones pioneras de Martinus Beijerinck (1851-1931), Sergei Winogradsky (1856-1952) y otros microbiólogos a finales del siglo XIX. La ecología microbiana ha demostrado que los principios ecológicos generales son aplicables a los microorganismos y que estos principios pueden integrarse en los actuales paradigmas ecológicos. Los procariotas son miembros esenciales de la biosfera, componentes indispensables de los ecosistemas, que hacen posible el funcionamiento de todos los ciclos biogeoquímicos. Todos los seres vivos de la Tierra dependen de la vida procariótica. Los procariotas están presentes en todos los lugares en los que puede existir vida, ocupando un amplio abanico de condiciones ambientales, desde aquellos ambientes en que se dan las condiciones "ideales" para el crecimiento (ideales, obviamente desde el punto de vista de los "macroorganismos"), hasta los ambientes extremos (impensables para las formas "más evolucionadas", es decir, más recientes).

La ubicuidad de los microorganismos se basa en tres características principales: su tamaño pequeño, que les permite una gran capacidad de dispersión, su variabilidad y flexibilidad metabólica, que les permite tolerar y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables, y su plasticidad genética (o gran capacidad de transferencia horizontal de genes), que les permite recombinar y recolectar los caracteres positivos y persistir durante largo tiempo adaptándose a condiciones ambientales cambiantes. Independientemente de la constante relación "rechazo" (enfermedad, degradación)-"dependencia" (utilización de microorganismos para fabricar productos, queso, cerveza, antibióticos, enzimas, etc.) entre los humanos y los microorganismos, este grupo de organismos "invisibles" representan un vasto terreno inexplorado de conocimiento y diversidad biológicas. Sin el conocimiento de los microorganismos la biología sería mucho más limitada, no sabríamos que hay vida en condiciones de temperatura, salinidad o pH extremas, la fotosíntesis solamente sería aerobia y oxigénica y los seres vivos más longevos no superarían (como las secuoyas) los mil años de edad.

Es tarea de la ecología microbiana investigar el papel de los microorganismos en la naturaleza. En el pasado, la ecología microbiana estaba fragmentada en muchas disciplinas distintas, tales como la microbiología del suelo, la microbiología de los alimentos, la microbiología marina, etc. Sin embargo, ahora se intenta integrar todos estos campos en una visión unificada y unificadora. Un ejemplo fue el simposio internacional sobre "Nuevas Fronteras en Ecología Microbiana" que se celebró del 11 al 13 de diciembre del 2001 en Barcelona, patrocinado por la Fundación Ramón Areces. Las principales conferencias que se presentaron en el Simposio se recogen en el número de diciembre de 2002 de INTERNATIONAL MICROBIOLOGY. Los artículos publicados tratan de bioterrorismo (R. M. Atlas, actual presidente de ASM), interacciones entre los microorganismos y las plantas (E. Montesinos *et al.*), ecosistemas mínimos (R. Guerrero *et al.*), biorremediación de petróleo (Y. Cohen), microbios marinos (C. Pedrós-Alió y R. Simó), transformación del arsénico y el

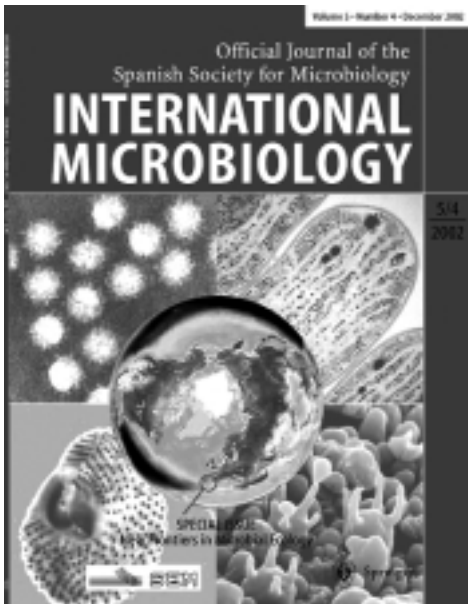

Figura 1. Portada del número de International Microbiology de Diciembre de 2002.

selenio (J. F. Stolz *et al.*), bacterias magnetotácticas (D. Schüler), estudio de los microorganismos litobiónticos antárticos (C. Ascaso y J. Wierzchos), y la búsqueda de vida en Marte (K. H. Nealson *et al.*).

El campo de la ecología microbiana ha experimentado cambios revolucionarios en estos últimos años, debido al impacto de las nuevas tecnologías de la biología celular y molecular. "*Microbial Ecology and Genomics: a crossroads of opportunity. A report from the American Academy of Microbiology*" (publicado recientemente y editado por David A. Stahl y James M. Tiedje), recoge los objetivos y discute la aplicación de la genómica para mejorar y profundizar en el conocimiento de la ecología microbiana básica (relaciones microorganismos-ambiente), y aplicada (salud, agricultura, control de la contaminación, biorremediación, etc.). Los microorganismos constituyen el principal componente de biodiversidad, pero se requiere unas herramientas (avances tecnológicos e intelectuales) apropiadas para cuantificar esta diversidad, tanto en "modelos" como en las comunidades naturales. La evaluación de la diversidad (microorganismos presentes), de la distribución (heterogeneidad espacial y temporal de las comunidades en su ambiente), y de la actividad (funciones de los microorganismos) han estado limitados durante muchos años al estudio de la microbiota que puede ser cultivada en el laboratorio (cultivos axénicos). Las técnicas de enriquecimiento y aislamiento de microorganismos establecen unas condiciones ambientales artificiales que sólo permite el desarrollo de unos pocos microorganismos, los más aptos para este ambiente fabricado. Sin embargo, estas "condiciones" son resultado de la habilidad, persistencia y suerte del investigador. No debe sorprendernos, pues, que la vasta inmensidad del mundo microbiano permanezca incultivable. No debería sorprendernos, tampoco, que la mayor parte de los procesos de biorremediación en medios naturales se deban a microorganismos "naturales", es decir, presentes previamente en el medio, y no a cepas de laboratorio.

En 1986, dos artículos fueron el detonante de una nueva era en el estudio de la ecología microbiana, uno de Olsen *et al.* [*Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337-365], y el otro de Pace *et al.* [*Adv. Microbial Ecol.* **9**:1-55]. Estos artículos proponían una metodología que liberaba a la microbiología de la "esclavitud" del cultivo en placa. La nueva técnica se basaba en que los organismos podían ser detectados y potencialmente identificados *in situ*, basándose solamente en su rRNA, detección que se extendía incluso a aquellos microorganismos que no habían sido aislados en cultivo axénico. En los últimos diez años del siglo XX ha habido un

Figura 2. *"Nature vs. Culture"*, o la efectividad de las poblaciones autóctonas.

aumento exponencial del número de secuencias de rRNA detectadas en muestras ambientales sin necesidad de cultivar los microorganismos. Esta explosión de resultados se debe al desarrollo de la técnica de la PCR. Aunque las técnicas moleculares en ecología microbiana normalmente implican la manipulación o identificación de DNA o RNA, de hecho, esas técnicas moleculares abarcan la detección o manipulación de cualquier constituyente molecular de la célula (es decir, no sólo los ácidos nucleicos "enteros", sino también los nucleótidos [ATP, NAD, GTP, etc.], proteínas, lípidos, polisacáridos, y sus posibles combinaciones).

Los avances en el conocimiento del mundo natural van normalmente precedidos de alguna innovación tecnológica que permite medir u observar algo nuevo, o bien realizar nuevos planteamientos experimentales, previamente imposibles. Las técnicas moleculares son las herramientas, los medios que nos permiten estudiar la composición, fisiología y filogenia de las comunidades microbianas. Sin embargo, esas técnicas deben estar conectadas con la historia natural de los microorganismos.

La información genética proporciona la vía de acceso a aquellas criaturas que son difíciles de cultivar en el laboratorio. La "secuenciación del mundo microbiano" permitirá el descubrimiento de nuevos microorganismos, de sus funciones y de sus interacciones. El DNA se puede obtener de los microorganismos vivos o muertos, así como de aquéllos no cultivables; la obtención de DNA constituye el vehículo para determinar la presencia de un organismo y su relación genética con otros. La biología molecular, como insiste el documento (*Microbial Ecology and Genomics*) que estamos comentando, permitirá descubrir qué microorganismos tienen determinados genes necesarios

para un particular ambiente y cómo estos genes les permiten adaptarse a otros hábitats menos usuales; proporcionará la base para predecir qué características deberá tener un nuevo microorganismo basándonos en las actividades (genes) de sus vecinos, porque, como observó G. Evelyn Hutchinson (1903-1991), los actores (microorganismos) pueden cambiar de un teatro (hábitat) a otro, pero la representación en el escenario (procesos fisiológicos) será igual para la misma obra (un ambiente determinado, unas relaciones específicas).

La secuenciación ha revelado una insospechada plasticidad genética entre las denominadas "especies" microbianas. En la actualidad se acepta que el intercambio horizontal de DNA puede ser la principal fuerza de innovación bioquímica y de adaptación y tolerancia a ambientes cambiantes. Los taxones básicos de la sistemática (especies, géneros, familias) no sirven para los procariotas, donde la transferencia horizontal de genes y los mecanismos de especiación son variados y complejos. Un ejemplo claro es la comparación de la información genética de dos conocidas cepas de *Escherichia coli*: la cepa K-12 habitual y la patógena O157:H7. El genoma de la primera tiene 4,6 Mb y el de la segunda 5,5 Mb. Comparten una secuencia de aproximadamente 4,1 Mb, que es equivalente a 3.574 proteínas codificadas. La cepa patógena codifica 1.387 nuevos genes (!), que han sido adquiridos por transferencia horizontal. Es decir, que consideramos dos cepas de una misma especie a una que tiene un 134% más de DNA que la otra. Debido a la importancia evidente de la transferencia génica en la evolución microbiana, es imprescindible determinar los factores que influyen en la frecuencia y transferencia de unos genes determinados, qué tipo de genes rompen la barrera de las "especies", y si son todos potencialmente transferibles.

Desde el inicio de la secuenciación de los genomas celulares en julio de 1995 (publicación del genoma de *Haemophilus influenzae*), hasta diciembre de 2002 (publicación del genoma del ratón), se han publicado unos 80 genomas completos, incluido el humano. La descripción y aplicación de una amplia variedad de técnicas moleculares en el estudio de los microorganismos de muestras ambientales queda reflejado por la voluminosa bibliografía publicada, y esta situación induce a pensar que los procedimientos son rutinarios y los resultados incuestionables. Sin embargo, es imprescindible comprobar y optimizar las técnicas para estar seguros de que los resultados son fidedignos y consistentes. Tanto los investigadores experimentados como los noveles deben conocer las limitaciones de las técnicas empleadas para evitar interpretaciones incorrectas de los resultados. En la base de datos del GenBank hay disponibles aproximadamente 5000 secuencias de 16S rRNA de bacterias no identificadas; en algunos casos, se tardará tiempo en necesitar repetirlas y refrendarlas; es por tanto imprescindible que estos datos se correspondan con la realidad. Un ejemplo ilustrativo es el caso de dos secuencias casi idénticas (99,8 % de similitud) de dos β-proteobacterias, una aislada de un sedimento marino [Rochelle *et al.* (1994) *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**:215-226] y otra de un absceso dental [Dymock *et al.* (1996) *J. Clin. Microbiol.* **34**:537-542], realizadas por dos grupos de investigación distintos, con una diferencia temporal de tres años, pero que en ambos casos utilizaron las mismas soluciones de laboratorio. En 1998, Tañer *et al.* (*Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3110-3113) demostraron que estos resultados eran consecuencia de un contaminante común.

La genómica por sí sola no puede representar un cuadro acabado de la realidad biológica. Una de las limitaciones de la aplicación de las técnicas moleculares de muestras ambientales es que los resultados obtenidos frecuentemente son cualitativos y no cuantitativos. Aunque obviamente sí que es útil saber qué hay en una muestra, en microbiología es también importante conocer la abundancia relativa de los diferentes organismos. Otro reto de la biología molecular es poder convertir estas "piezas inanimadas de información" (genes) en conocimiento de la actividad celular. La integración de los estudios tradicionales de fisiología y genética con las técnicas modernas de la genómica ofrece la oportunidad de avanzar en el estudio de la evolución microbiana y entender cómo actúan y controlan la biosfera los microorganismos. La única manera de comprender un genoma es mirar dónde vive este genoma, conocer su hábitat natural y comprender el complejo entramado de interacciones bióticas y abióticas. El ambiente es el contexto en el que evoluciona y funciona un material genético, y el que, en el fondo, determina la supervivencia y forma del genoma. Por tanto, los conceptos básicos y técnicas fundamentales de la ecología microbiana "clásica" continúan siendo útiles. La ecología microbiana, desarrollada a finales del siglo XX, es una herramienta esencial para entender el verdadero significado de los genomas que se descifrarán a principios del siglo XXI.

El famoso entomólogo y padre de la sociobiología Edward O. Wilson, nada sospechoso de ser un "*microbial chauvinist*", escribió lo siguiente para finalizar su libro autobiográfico *Naturalist* (1994,

Island Press, Washington, p. 364): «*If I could do it all over again, and relieve my vision in the twenty-first century, I would be a microbial ecologist. Ten billion bacteria live in a gram of ordinary soil, a mere pinch held between thumb and forefinger. They represent thousands of species, almost none of which are known to science. Into that world I would go with the aid of modern microscopy and molecular analysis. I would cut my way through clonal forests sprawled across grains of sand, travel in an imagined submarine through drops of water proportionately the size of lakes, and track predators and prey in order to discover new life ways and alien food webs. All this, and I need venture no farther than ten paces outside my laboratory building.*» Un vasto universo de "vida invisible", todavía inexplorado, será observado en los próximos años. La combinación e integración de la ecología, de la genómica, de la proteómica y de otros estudios moleculares, será la llave que abrirá las puertas del misterio. Pero, como ocurre con cada descubrimiento, esa nueva visión no hará más que cohibirnos al percatarnos, aún más, de la enorme hermosura y diversidad de la naturaleza.

El rincón de la lengua

por Ricardo Guerrero y Mercè Piqueras, de la revista INTERNATIONAL MICROBIOLOGY

El ordenador no es una máquina de escribir

Un conocido pediatra de Barcelona contaba recientemente una anécdota de su actividad profesional. Debido a su pésima caligrafía, el pediatra escribe siempre las recetas a máquina: una *Pluma 22* antigua, de esas que caben en cualquier rincón. Un día, mientras estaba escribiendo la prescripción con aquella antigualla, su joven paciente, un niño de seis años, se lo quedó mirando extrañado y, volviéndose hacia su madre, le dijo: «*Mira, mama, l'ordinador del doctor no té pantalla!*» (Mira, mamá, ¡el ordenador del doctor no tiene pantalla!).

Las máquinas de escribir son casi historia. Hasta hace poco aún se usaban para rellenar impresos, pero ahora la mayoría de los asuntos burocráticos se resuelve a través de Internet; los impresos suelen estar disponibles en la red y se rellenan "en línea". Los ordenadores, cada vez más pequeños, más rápidos y más potentes, ocupan un lugar destacado y preferente en despachos y laboratorios. Dada su facilidad de utilización, la autoedición se ha convertido en una práctica frecuente, si no exclusiva. Los programas, cada vez más elaborados, permiten realizar todo tipo de gráficos y figuras y componer un artículo casi con la misma facilidad que lo haría un profesional. Sin embargo, disponer de un ordenador de la última generación y de una magnífica impresora láser no servirá de mucho para mejorar la calidad tipográfica del producto final si el usuario utiliza el ordenador como si fuese "una máquina de escribir con pantalla".

Cuando intentábamos copiar a máquina un fragmento de un libro procurando reproducir el texto tal como aparecía en las páginas de la obra original, posiblemente nos encontrábamos con algunos problemas que no podían resolverse usando únicamente los caracteres del teclado. ¿Cómo escribir una palabra en cursiva? ¿Cómo lograr los varios tipos de guión, con longitudes diferentes? ¿Cómo reproducir ese circulito elevado para indicar los grados de temperatura, o cómo poner las letras griegas necesarias en fórmulas y compuestos? ¿Cómo indicar una fracción para que quede de la misma manera que en el libro? ¿Cómo (y cuándo y por qué) poner las comillas altas ("americanas") o las comillas bajas («latinas»), por no hablar de las alemanas („"), etc.?

La máquina de escribir tradicional permitía resolver parcialmente algunos de estos problemas, siempre que estableciéramos una convención: el subrayado de una palabra equivalía a la cursiva (Escherichia), como al escribir a mano; con dos **guiones** seguidos (--), se remedaba el guión largo; los **grados** de temperatura solían indicarse con el signo que se usa para los ordinales en castellano (una o subrayada); la fracción se indicaba usando la barra inclinada (1/2); las comillas altas se indicaban con dos **apóstrofos** (''); en vez del signo de multiplicar, un **aspa**, escribíamos la letra x. Para otros signos de la escritura, como muchos símbolos matemáticos, caracteres de alfabetos poco corrientes o **letras griegas** no había solución, por lo que se dejaba el espacio en blanco para rellenarlo luego a mano.

Los modernos programas de procesado de texto de los ordenadores permiten escribir prácticamente cualquier tipo de signo y usar los mismos tipos de fuente que usaría un impresor, aunque muchas veces los usuarios siguen recurriendo a las soluciones parciales de la máquina de escribir. Eso ocurre porque no se suele leer el manual de instrucciones, ni la ventana de ayuda del programa usado (suponiendo que no se trate de un programa pirateado, se disponga del manual correspondiente y se haya copiado todo el "programario", o software), ni se conocen las posibilidades del teclado mediante combinaciones de teclas. La exploración del teclado y de las ventanas permitirá descubrir muchos trucos para mejorar la presentación de los textos y la elaboración de tablas y gráficas. Así, podrá hallarse la manera de escribir los tres tipos de guiones: el guión corto (-), el medio, también llamado guión ene, o N, porque tiene la misma anchura que esa letra (–) y el largo o guión eme, o M, porque tiene la misma anchura que esa otra (—); de insertar las comillas tipográficas sencillas, altas y bajas (‘ ’; “ ”;« »), y no será necesario escribir "alfa", "beta" o "gamma" en algunas fórmulas químicas, "ji cuadrado" (o erróneamente, "chi cuadrado") en un texto estadístico, ni usar la x para el signo de multiplicar porque se podrá poner directamente α, β, γ, χ^2 y $\times$; y en vez de escribir tres puntos seguidos ..., podrá escribirse …, que parece lo mismo, pero no lo es (los puntos de suspensión están algo más espaciados que tres puntos uno tras otro, y nunca quedan cortados al final de línea.)

Quienes deben manejar originales recibidos para su publicación, como los editores de una revista científica, suelen encontrarse con textos

que, incluso presentando muy buen aspecto sobre el papel, resultan complicados en su versión electrónica: párrafos entrados mediante sangrías forzadas con los tabuladores por la izquierda y con la tecla de retorno por la derecha; tablas enteras hechas también con los tabuladores; páginas en blanco hechas mediante el uso continuado de la tecla del punto y aparte; y así, *ad nauseum*. Hay veces en las que parece que el autor conoce algunas de las posibilidades del ordenador y ha solucionado ciertos problemas que planteaba el texto mecanografiado clásico, por ejemplo las letras griegas o algunos signos matemáticos. Pero al cambiarlo a otro tipo de letra, las letras griegas y los signos pueden haberse transformado en algo ininteligible. Cuando se trabaja con Microsoft Word® (tanto en un PC® como en un Macintosh®), que es quizás el programa de texto más usado, hay una solución: escribir las letras y caracteres especiales usando para ello el menú "insertar" y eligiendo el signo correspondiente, en el panel que se abrirá en el submenú "símbolo". Aunque se cambie el tipo de letra, esas letras y caracteres especiales se mantendrán intactos. Una letra griega que es especialmente maltratada es la β, que suele sustituirse por la ß alemana, que es parecida.

Los minutos y segundos como unidades metrológicas de tiempo se abrevian únicamente con los símbolos "min" y "s". Cuando se trata de la medida de ángulos y arcos, los símbolos correspondientes son ' y ". No se pueden utilizar estos últimos símbolos (geométricos o geográficos) para indicar las unidades de tiempo mencionadas. El signo "menos" matemático (–) coincide con el guión N o medio, que debe usarse siempre aunque parezca muy pequeño cuando forma parte de un exponente negativo. Nunca se escribirá como guión corto (-).

Los errores que a veces se observan en el orden alfabético y numérico en la bibliografía de un artículo también pueden evitarse ordenándolos automáticamente. En el caso de la bibliografía, habrá que repasarla luego manualmente porque la ordenación estrictamente alfabética no tiene en cuenta aspectos como que haya más de un autor. (Hay revistas que tienen normas especiales para la ordenación de los artículos con más de un autor y no siempre se corresponden con la ordenación alfabética estricta, por ejemplo en los casos de los apellidos que empiezan por De, Van, etc.).

A pesar de la aparente complejidad de los ordenadores, estas máquinas pueden facilitar mucho el trabajo de preparación de artículos, aportando soluciones a problemas tipográficos y de composición aparentemente complicados. Para ello hay que familiarizarse con el programa que se utiliza, saber cuáles son los símbolos correctos y, sobre todo, recordar que el ordenador es algo más que una máquina de escribir.