

# Temas de actualidad

## La conservación de cepas microbianas

**María Dolores García López y Federico Uruburu Fernández**

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (València).

E-mail: cect@uv.es - <http://www.uv.es/cect>.

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general. Vamos a resumir estos métodos agrupándolos en tres apartados, que son: Métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.

### 1.- Métodos de elección o de conservación a largo plazo.

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: congelación y liofilización.

#### 1.1.- Conservación por congelación.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También

resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas. Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

**1.1.1.- Edad de las células:** En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

**1.1.2.- Velocidad en la congelación y descongelación:** Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.

**1.1.3.- Temperatura de almacenamiento:** Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C.

En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C. Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de

plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con criobolas (bolas de tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

#### 1.1.4.- Empleo de agentes crioprotectores:

Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar.

#### 1.2.- Conservación por liofilización.

Tampoco se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante la liofilización, que es un proceso suave. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, pues la liofilización se hace en dos etapas y se añade la sublimación del agua a la congelación previa. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liofilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo.

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que

habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación. Sin embargo, antes de pasar a explicar éstos, tenemos que hacer unas breves consideraciones sobre los que antes hemos mencionado para el caso de la congelación. La congelación puede hacerse rápida o lentamente, la primera sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Respecto a los crioprotectores, ya vimos que se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liofilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o *chopped meat* (sin carne) para bacterias anaerobias, etc.

Los nuevos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

**1.2.1.- Tipo de microorganismo.** Hay algunos microbios que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.

**1.2.2.- Concentración celular.** Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de  $10^8$ - $10^9$  células/ml en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.

**1.2.3.- Temperatura durante la sublimación.** Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C.

**1.2.4.- Grado de deshidratación alcanzado.** Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.

**1.2.5.- Atmósfera del tubo.** Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.

**1.2.6.- Condiciones de almacenamiento.** La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Los liofilos se deben guardar en la oscuridad.

## 2.- Métodos alternativos.

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

### 2.1.- Conservación por transferencia periódica.

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos gene-

ralmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C-8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Hay que tener en cuenta que los microorganismos muy aerobios, como por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados. Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos.

### 2.2.- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en criotubos de los anteriormente mencionados. En este caso la concentración celular no debe ser superior a  $10^4$ - $10^5$  células/ml en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida.

Los resultados obtenidos por la CECT en la conservación de microorganismos por este método muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos a veces superiores a 5 años. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es

#### Federico Uruburu Fernández y María Dolores García López

obtuvieron su Doctorado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, e iniciaron su trabajo de investigación en Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Son responsables de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, de la que el primero ha sido fundador y es Director.

**Federico Uruburu** ha trabajado también en el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC (Madrid), en el Instituto Politécnico Nacional Suizo (Zurich), en la Universidad de Salamanca y en la Universidad del País Vasco en Lejona. Actualmente es Catedrático de Microbiología en la



Universidad de Valencia y Director del Departamento de Microbiología y Ecología. Sus investigaciones han sido sobre ultraestructura, identificación y conservación de hongos filamentosos y levaduras y microbiología de la elaboración de vinos.



**María Dolores García** ha trabajado como investigadora en el Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn y en la Universidad de Utrecht (Holanda), en la Universidad de Salamanca y en la Universidad del País Vasco en Lejona. Actualmente es Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Valencia. Sus trabajos versan sobre identificación y conservación de actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras.

buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo, etc.

### 3.- Métodos restringidos.

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. Los cuatro métodos que vamos a citar se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

#### 3.1.-Desecación en papel de filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (*L-Dry*) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células.

#### 3.2.- Desecación en suelo, arena, silicagel, etc.

Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método.

#### 3.3.- Desecación en bolitas de alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales.

#### 3.4.- Desecación en sal gorda para halobacterias.

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espon-

táneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible.

Por último, y a modo de resumen, unas consideraciones finales. Cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, cuando éstas se recuperan para hacer nuevos lotes para su conservación o para trabajar con ellas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés más o menos fuerte (sobre todo cuando se han conservado por liofilización) y por lo tanto no son adecuadas para ningún tipo de prueba. Primero habría que revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en un medio no selectivo, es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, y a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario. Igualmente hemos de tener presente que, dada la enorme diversidad microbiana, cada microorganismo soportará determinados métodos de conservación mejor que otros, o será necesario tomar precauciones especiales en su conservación. Como ya dijimos al comienzo, no existe un método general de conservación de los microorganismos, aunque no resulta difícil determinar el más aconsejable en cada caso. La mayoría de microorganismos de interés sanitario pueden conservarse a largo plazo con los métodos generales de congelación y/o liofilización, y para periodos cortos pueden mantenerse vivos por alguno de los métodos alternativos si se hace en las condiciones adecuadas y bien controlados por un microbiólogo.

Con lo anteriormente expuesto pretendemos contestar a las numerosas preguntas que se plantean a la CECT sobre esta cuestión. Este artículo se ha confeccionado no solamente mediante una consulta bibliográfica que se puede ampliar con la completa bibliografía que se incluye al final, sino también gracias a la experiencia adquirida por el personal de la CECT a lo largo de los años, y los autores agradecen su información y consejos.

Finalmente, la CECT organiza cada año en el mes de Septiembre un curso teórico-práctico de 40 horas de duración repartidas en cinco días consecutivos sobre el tema "Conservación y control de cepas microbianas". Las plazas disponibles son 15, y en él los alumnos pueden aprender con más detalle lo que antes hemos resumido. La información sobre este curso y más detalles sobre la CECT se pueden consultar en su página web (<http://www.uv.es/cect>).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Beech FW, Davenport RR (1971) Isolation, purification and maintenance of yeasts. En: *Methods in Microbiology*, Vol. 4. Academic Press, London, pp. 153-182
2. Day JG, McLellan MR (1995) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press, Totowa (New Jersey)
3. Hatt H (1980) American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, Rockville
4. Hunter-Cevera JC, Belt A. (1996) Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, London
5. Juarros E, Tortajada C, García MD, Uruburu F. (1993) Storage of stock cultures of filamentous fungi at  $-80^{\circ}\text{C}$ : effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología SEM* 9:28-33
6. Kirsop BE (1980) The stability of industrial organisms. Commonwealth Mycological Institute, Kew
7. Kirsop BE, Doyle A (1991) Maintenance of microorganisms and cultures cells. Academic Press, London
8. Lapage SP, Shelton JE, Mitchell TG, Mackenzie AR (1970) Culture collection and the preservation of bacteria. En: *Methods in Microbiology*. Vol. 3. Academic Press, London, p. 135
9. Malik KA (1992) Technical information for culture collections curators in developing countries UNESCO/WFCC Education Committee, Braunschweig
10. Onions AHS (1971) Preservation of fungi. En: *Methods in Microbiology*. Vol. 4. Academic Press, London, pp. 113-151
11. Smith D, Onions AHS (1994) The preservation and maintenance of living fungi. International Mycological Institute, CAB International.

## Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones

Ricardo Guerrero y Mercedes Berlanga

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona. E-mail: guerrero@retemail.es

A partir de los átomos formados en los primeros tiempos de nuestro actual universo, hace unos 15.000 millones de años, se constituyeron las galaxias. Dentro de las galaxias, fueron formándose y desapareciendo estrellas. Y al formarse las estrellas se originan planetas, que también desaparecerán con ellas. Así ocurrió con nuestra estrella, el Sol, y con nuestro planeta, la Tierra, que se formaron hace unos 4.550 millones de años. A partir de los átomos del universo atrapados en nuestro planeta se organizaron y evolucionaron los sistemas vivos, hace unos 3.850 millones de años. Todos los átomos de nuestro cuerpo proceden de la Tierra y eran parte de nuestra galaxia. Por tanto, somos de carne y hueso, pero también "polvo de estrellas".

Las diferentes especies atómicas se formaron durante periodos de expansión muy primitivos, cuando toda la materia del universo se hallaba aún comprimida, con densidades muy elevadas, y sometida a temperaturas altísimas, lo que ofrecía unas condiciones favorables para toda clase de transformaciones nucleares. Geofísicos y astrofísicos han calculado la abundancia relativa de los elementos a partir del análisis químico de la corteza terrestre y del estudio de los meteoritos, del análisis espectral del Sol, de las estrellas y de la materia difusa esparcida en el abismo sideral. El resultado de este estudio indica que la constitución química del espacio interestelar es sorprendentemente uniforme: el 55 % de toda la materia cósmica es hidrógeno, el 44 % está constituido por helio (parejas siamesas de hidrógeno) y sólo el restante 1 % corresponde a todos los demás elementos. Sin embargo, la composición química de la Tierra representa una notable excepción a dicha uniformidad. En nuestro planeta, el helio y el hidrógeno son muy escasos. El principal depósito de hidrógeno lo constituye el agua, en forma de gas, líquida o en estado sólido. Pero esta cantidad es despreciable si la comparamos con las rocas graníticas y basálticas que constituyen la corteza de la Tierra, o con el resto de la parte sólida de nuestro planeta. La escasez de hidrógeno y helio es consecuencia de los procesos que ocurrieron durante el nacimiento de la Tierra. La formación de los planetas menores (Mercurio, Venus, la Tierra o Marte) empezó por un proceso de agregación de polvo del disco que dio origen al sistema solar, que formó pequeñas partículas sólidas lla-

mas planetésimas. Sin embargo, estas agregaciones de planetésimas no crecieron lo suficiente para que su gravedad pudiera capturar aquellos gases. En cambio, Júpiter, Saturno y otros planetas mayores sí fueron capaces de rodearse de pesadas atmósferas de hidrógeno y helio.

Cada elemento químico se caracteriza por poseer un número determinado de protones, que se denomina número atómico y se representa por la letra  $Z$ . Como los átomos son entidades eléctricamente neutras, el número atómico también indica el número de normal de electrones. El número másico ( $A$ ) es la suma de protones y neutrones del núcleo del átomo. Para representar esquemáticamente un núcleo, se escribe el símbolo del elemento y se añaden dos índices en el lado izquierdo, uno en la parte superior ( $A$ ) y otro en la parte inferior ( $Z$ ). La representación sería:  ${}^A_ZX$ . Por ejemplo,  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^4_2\text{He}$ ,  ${}^{12}_6\text{C}$ ,  ${}^{14}_7\text{N}$ ,  ${}^{16}_8\text{O}$ ,  ${}^{32}_{16}\text{S}$ .

### Fraccionamiento isotópico

Un mismo elemento (definido por su número atómico) puede tener diferente número de neutrones, y por tanto diferente peso atómico. Los átomos con el mismo número atómico pero con diferente peso atómico se denominan isótopos ("igual lugar"). Los átomos de carbono tienen generalmente 6 protones y 6 neutrones, y por tanto un peso atómico de 12. Pero hay átomos de carbono con peso atómico 13, isótopo estable y pesado, o con peso atómico 14, isótopo inestable o radiactivo, ya que emite radiactividad a medida que se transforma en un elemento estable. Una cosa similar ocurre con el hidrógeno: existe el hidrógeno normal, el deuterio (pesado y estable, con un neutrón), y el tritio (radiactivo e inestable, con dos neutrones). El primer isótopo pesado observado, en 1931, fue el deuterio; su descubridor fue Harold Urey, el mismo que, muchos años después, en 1952, dirigiría los trabajos del joven Stanley Miller sobre síntesis abiótica de aminoácidos.

Las moléculas que componen las sustancias están compuestas por átomos. La mayor parte de las moléculas tienen átomos normales, pero algunas, menos frecuentes, tienen átomos pesados. Así, por ejemplo, la mayor parte de las moléculas de  $\text{CO}_2$  del aire pesan 44 ( $12+16+16$ ), pero una minoría pesan 45 ( $13+16+16$ ), porque tienen car-

bono pesado. Los organismos fotolitotrofos y quimilitotrofos fijan CO<sub>2</sub> para formar materia viva. La materia viva tiene carbono, que en su mayor parte es <sup>12</sup>C, pero también hay átomos <sup>13</sup>C (y, por supuesto, también <sup>14</sup>C). Como el <sup>13</sup>C es estable, esta cantidad no va disminuyendo a partir de la muerte del organismo, como ocurre con la cantidad de <sup>14</sup>C, que se va desintegrando. Sorprendentemente, la cantidad o proporción de <sup>13</sup>C (con respecto a la de <sup>12</sup>C) en la materia viva es menor que la que existe en el material de partida, en este caso el CO<sub>2</sub> del aire. No se sabe el mecanismo molecular último, pero las enzimas de los seres vivos "discriminan" negativamente las moléculas de CO<sub>2</sub> que tienen el isótopo pesado, y "escogen" preferentemente las que tienen el isótopo normal. Y lo mismo ocurre en el caso de las moléculas con oxígeno (donde escogen el <sup>16</sup>O, y no el <sup>18</sup>O), con nitrógeno (donde prefieren el <sup>14</sup>N, y no el <sup>15</sup>N), o con azufre (donde eligen mayormente el <sup>32</sup>S, y no el <sup>34</sup>S). (A estas alturas del relato, no hace falta aclarar que <sup>18</sup>O, <sup>15</sup>N, y <sup>34</sup>S son isótopos pesados de los correspondientes elementos). Nadie sabe la causa pero el efecto es que la materia viva "discrimina en contra" de las moléculas que tienen isótopos pesados.

Midiendo la cantidad de <sup>14</sup>C de un resto orgánico se puede saber su "edad", es decir, el tiempo que hace que dejó de incorporar nuevo <sup>14</sup>C; que murió. Midiendo la cantidad de isótopos estables en una sustancia no se puede saber su edad pero sí si es de origen biológico. La materia viva prefie-

re las moléculas con isótopos ligeros e incorpora menos de los pesados que están a su disposición en el material de partida. Y además, lo hace diferencialmente. Las distintas vías metabólicas (que tienen enzimas distintas) producen moléculas con diferente disminución de isótopos pesados. Viendo la proporción de éstos en un producto biológico puede deducirse las posibles vías metabólicas que lo han originado. La discriminación isotópica de un elemento se indica por la letra delta minúscula ( $\delta$ ). Para hacer comparables las frecuencias obtenidas en distintas muestras, los resultados se refieren a un valor estándar, un material que se toma como referencia del valor del isótopo pesado con respecto al ligero. Además, para facilitar la expresión de los resultados, los números resultantes se multiplican por mil (es más fácil hablar y escribir 4 ó 40 ‰, que 0,004 ó 0,040). Así, la discriminación de un isótopo pesado, <sup>A</sup>X, en partes por mil ( $\delta$  ‰), es:

$$\delta \text{ ‰ } ^A\text{X} = \left\{ \frac{R_m - R_{st}}{R_{st}} \right\} \times 1000$$

Donde R es la cantidad de isótopo pesado dividida por la cantidad del ligero, tanto en la muestra, "m", como en el estándar, "st". Es evidente que si los organismos discriminan contra el isótopo pesado, los valores de  $\delta$  ‰ de la materia viva serán negativos.

Los principales elementos de interés para el fraccionamiento isotópico son el carbono, azufre, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno. Los respectivos estándares son: para el C, el PDB; para el S, el CDM; para el N, el aire; para el O y el H, el SMOW.

**Ricardo Guerrero** es Doctor en Ciencias por la Universidad de Barcelona. Fue investigador postdoctoral en la University of California-Davis, bajo la dirección del Prof. John L. Ingraham. Ha sido Visiting Professor en la University of California-Davis, en la Boston University y lo es actualmente de la



University of Massachusetts-Amherst. Fue catedrático de la Universidad Autónoma de Barcelona, y actualmente lo es de Microbiología de la Universidad de Barcelona. Ha organizado diferentes congresos y reuniones científicas internacionales; es autor de gran número de artículos científicos en revistas de referencia y redactor de diversas obras de comunicación científica. Su investigación se centra en el estudio de las comunidades procariotas multilaminadas semejantes a las existentes en la Tierra primitiva, la evaluación de riesgos de la liberación al ambiente de bacterias modificadas genéticamente, el estudio de bacterias magnetotácticas y la producción de plásticos biodegradables por bacterias. Su trabajo sobre interacciones poblacio-

nales procarióticas primitivas ha atraído la atención de microbiólogos de todo el mundo hacia ese tipo de comunidades. Es de destacar su descripción del concepto de ecopoyesis y su aplicación al estudio de los primeros ciclos biogeoquímicos.

**Mercedes Berlanga** es Doctora en Biología por la Universidad de Barcelona. Realizó la tesis doctoral en el Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, Facultad de Farmacia y Unidad de Microbiología del Campus de Bellvitge de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Miquel Viñas. Su actividad investigadora se ha centrado en el estudio de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, en concreto la resistencia a las quinolonas en patógenos nosocomiales, así como la del género *Vibrio* presente en moluscos y peces de las piscifactorías del delta del Ebro. Además de sus actividades científicas, posee una gran habilidad para representar humorísticamente el mundo de los microbios, y sus protagonistas, las bacterias.



(El significado de las siglas se explica después.) La medición de la cantidad de los distintos isótopos se lleva a cabo mediante el espectrómetro de masas.

### Algunos ejemplos de discriminación isotópica

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  referidos en ‰ (para abreviar,  $\delta^{13}\text{C}$ ) se calculan respecto al estándar PDB (PeeDee Belemnite), que corresponde a un fósil marino del Cretácico (*Belemnitella americana*) de la formación "PeeDee" (probablemente un nombre indio) en Carolina del Sur, EE. UU. Dado que la fijación biológica de  $\text{CO}_2$  discrimina contra  $^{13}\text{C}$ , los valores  $\delta^{13}\text{C}$  del material celular biosintetizado son "más negativos" que el sustrato de carbono utilizado, generalmente,  $\text{CO}_2$  atmosférico o carbonato marino. Los principales pasos de discriminación isotópica en la incorporación biológica del carbono son: (i) la captación y difusión intracelular del  $\text{CO}_2$ , y (ii) la fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$ .

Se conocen tres vías fotosintéticas principales: el ciclo de Calvin-Benson o C3, el ciclo de Hatch-Slack, o C4, y el ciclo CAM (*Crassulacean acid metabolism*). La vía C3 opera en aproximadamente el 85 % de las plantas y domina los ecosistemas terrestres. Las plantas C3 fijan el  $\text{CO}_2$  con la enzima rubisco (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa). Sin embargo, ésta también puede admitir oxígeno como sustrato alternativo del  $\text{CO}_2$ , proceso que se denomina fotorrespiración, que disminuye el rendimiento fotosintético. Parece ser que esta "dualidad" enzimática es resultado de un artefacto evolutivo, ya que en la atmósfera no había apenas oxígeno y en consecuencia, la fotosíntesis de los primeros organismos no estaba disminuida por la fotorrespiración. Fue precisamente la acción de los organismos fotosintéticos la que determinó un aumento de la concentración de  $\text{O}_2$  en la atmósfera. Pero lo que en principio no era un problema, significó una disminución sustancial de la eficacia fotosintética. El desarrollo de las plantas con fotosíntesis C4, que se expandieron rápidamente a finales del Mioceno (aproximadamente entre 8 a 4 millones de años) les permitió ciertas ventajas selectivas, al menos en zonas de elevada temperatura y secas, e incluso a veces en ambientes salinos. Las C4 representan menos del 5 % de las fanerógamas. Las plantas C4 tienen un paso inicial en la fijación donde el fosfoenol piruvato (PEP) aporta más carbono a la rubisco para la fijación de  $\text{CO}_2$ . La mayoría de plantas C3 tienen valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre  $-24$  a  $-30$  ‰. La PEP carboxilasa discrimina menos que la rubisco, de tal mane-

ra que, en plantas C4, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se sitúan entre  $-10$  y  $-16$  ‰. Estas diferencias de composición isotópica sirven para saber si una planta tiene fotosíntesis C4 o C3. Y aparte del interés académico, dicho resultado permite distinguir, por ejemplo, el azúcar de caña (planta C4) del azúcar de remolacha (planta C3), lo que puede tener valor económico. Finalmente, la fotosíntesis CAM domina en los ecosistemas desérticos, con plantas tales como los cactus. Tienen la capacidad de cambiar de una fotosíntesis C3 durante el día a otra C4 durante la noche. El fraccionamiento isotópico es intermedio entre las plantas C3 y las C4.

Las plantas y algas, cianobacterias, bacterias rojas del azufre y bacterias rojas no del azufre (y la mayor parte de las bacterias quimiolitotrofas), fijan  $\text{CO}_2$  mediante el ciclo de Calvin-Benson. Por el contrario, las bacterias verdes (y algunas bacterias quimiolitotrofas) lo hacen mediante el ciclo del ácido carboxílico reductivo (ciclo de Arnon, anabólico), posiblemente el precursor anaeróbico del ciclo de Krebs (oxidativo y catabólico). Hay que destacar la diferencia entre el fraccionamiento isotópico de las cianobacterias cultivadas y las "naturales". Análisis detallados han mostrado que muchos tapetes microbianos (en cuya capa superior dominan las cianobacterias) actuales están enriquecidos con carbono pesado. Este hecho, sin embargo, no se debe a una vía especial de asimilación fototrofa, sino al resultado de una baja concentración de  $\text{CO}_2$  en el ambiente, característica de los hábitats hipersalinos, ya que las cianobacterias cultivadas, no sujetas a estas restricciones ambientales, presentan valores de  $\delta^{13}\text{C}$  compatibles con los obtenidos mediante la vía C3. No cabe duda de que la eliminación de la barrera de difusión por aumento en la presión ambiental de  $\text{CO}_2$ , situación que pudo darse en la atmósfera Precámbrica (estudio de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  de los estromatolitos), podría restablecer instantáneamente la carboxilación enzimática de la vía fotosintética como principal paso de discriminación del fraccionamiento isotópico.

El azufre tiene cuatro isótopos estables:  $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ , y  $^{36}\text{S}$ . El  $^{35}\text{S}$  es radiactivo y deriva del argón-40. El estándar es el azufre de un meteorito, el CDM (Canyon Diablo Meteorite Troilite, Arizona, EE.UU.). Por tanto, la proporción  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  en este caso se supone que es la existente en el espacio interplanetario. La variación de los valores de  $\delta^{34}\text{S}$  en los seres vivos se deben a los distintos procesos en los que interviene el azufre, desde las reducciones del sulfato (asimilatoria, produciendo aminoácidos, o desasimilatoria, produciendo  $\text{H}_2\text{S}$ ), hasta las oxidaciones del  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{S}^0$  en las bacterias fotosintéticas y quimiolitotrofas. Las diferen-

tes vías metabólicas producen distintas discriminaciones isotópicas.

El nitrógeno tiene dos isótopos estables,  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  (existe también un isótopo radiactivo, pero es extremadamente raro). Debido a que la proporción de  $^{15}\text{N}$  en el aire es constante (0,366 %), ésta se utiliza como estándar para la determinación de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . El nitrógeno es un elemento escaso en la Tierra; se encuentra solamente en la atmósfera, como gas ( $\text{N}_2$ ), y en la superficie del planeta, fundamentalmente formando parte de compuestos orgánicos, amonio y nitrato. Estas diversas formas del nitrógeno son interconvertibles. La mayor parte de estos cambios químicos los realizan organismos vivos, principalmente los microorganismos. Prácticamente, todas las moléculas de nitrógeno gaseoso de nuestra atmósfera actual han formado parte de algún organismo vivo. Las reacciones biológicas (asimilación, nitrificación y desnitrificación) controlan la dinámica de los cambios o ciclo del nitrógeno. Estas reacciones dan como resultado, por lo general, un empobrecimiento en  $^{15}\text{N}$  del producto respecto del sustrato.

El hidrógeno tiene dos isótopos estables: protio ( $^1\text{H}$ ) y deuterio ( $^2\text{H}$ , D), y un isótopo radiactivo, tritio ( $^3\text{H}$ , T). Como el agua es el reservorio dominante del hidrógeno en la Tierra, las variaciones isotópicas de las rocas sedimentarias, ígneas y metamórficas reflejan la proporción isotópica del agua con la cual estuvieron en contacto durante su formación. La distribución D/H (expresado como  $\delta\text{D}$ ) en diversas muestras geológicas utiliza como referencia el SMOW (*Standard Mean Ocean Water*). En el caso del oxígeno, el estándar es también el agua de mar.

### Algunas aplicaciones del fraccionamiento isotópico

Los isótopos se han empleado como "trazadores", que nos permite seguir la pista de los elementos C, S, N, O, H, en las plantas, suelos, agua o atmósfera. Generalmente, sus aplicaciones se han centrado en estudios de ecología (ciclos biogeoquímicos, cadenas tróficas, contaminantes) y paleontología. El estudio isotópico de restos fosilizados, en rocas sedimentarias, permite utilizarlo como posible "biomarcador" para la detección de vida antigua. Más recientemente, se ha utilizado como herramienta en el diagnóstico médico, bien de enfermedades infecciosas o enfermedades metabólicas. Sin embargo, a pesar de ser una técnica que no supone daño para el paciente, todavía no se emplea en la práctica diaria, y generalmente está en fase de experimentación. A continuación

se describen algunas de estas aplicaciones.

**Estudios de contaminación.** Las actividades industriales y agrícolas han tenido como resultado la dispersión de contaminantes virtualmente en todas las partes de la atmósfera, hidrosfera, pedosfera y biosfera. El análisis de la abundancia de los isótopos estables en los materiales naturales orgánicos e inorgánicos constituye una herramienta útil para la determinación del origen e historia de un material presente en un ambiente. Específicamente, se puede emplear en el estudio de la contaminación de nitrógeno por abonos, contaminación fecal de las aguas subterráneas, identificación de compuestos contaminantes de azufre y nitrógeno en la atmósfera, y su posterior precipitación en forma de lluvia a los ambientes acuáticos. Por último, y entre otros muchos, puede utilizarse para la estimación de la contaminación de los sedimentos por derivados del petróleo.

La mayor parte del nitrógeno de la biosfera y hidrosfera proviene de la fijación del nitrógeno atmosférico por microorganismos, aunque en algunos lugares el nitrógeno es consecuencia de la deposición antropogénica. Los abonos industriales se producen utilizando la síntesis química de Haber, en la cual se convierte nitrógeno atmosférico en amonio, por lo que esta molécula conserva las características isotópicas del nitrógeno de aire. Valores aproximados a  $10\text{‰}$  de  $\delta^{15}\text{N}$  en los suelos es indicativo de la aplicación de abonos sintéticos.

**Cambios climáticos.** El registro del  $\text{CO}_2$  atmosférico de hace siglos o milenios proviene de testigos o muestras de hielo recogidos de los glaciares. El último y más importante de estos estudios es el realizado con un muestreo de 2,9 km de profundidad del hielo que cubre el gran lago Vostok, en la Antártida. De éste y otros estudios similares se deduce que la concentración de dióxido de carbono no ha sido constante a través del tiempo, intercalándose períodos de mayor y menor concentración. La concentración de  $\text{CO}_2$  ha incrementado en un 12 % en los últimos 35 años (hasta alcanzar las 360 ppm actuales), debido posiblemente a la actividad industrial humana. Los cambios atmosféricos de  $\text{CO}_2$  parecen depender de su capacidad de captación por el mar. Durante los períodos calientes, la circulación oceánica está gobernada por la salinidad. La superficie ecuatorial caliente se mueve hacia el Atlántico norte, liberando calor a la atmósfera, y posteriormente las aguas frías se hunden retornando al Pacífico. Cambios en el sistema de circulación durante los períodos fríos pueden variar la alcalinidad del océano, aumen-

tando la productividad en latitudes altas, incrementando la captación oceánica de CO<sub>2</sub> y produciendo, por tanto, una disminución de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub>.

La historia atmosférica del metano también puede ser reconstruida por medidas del aire atrapado en los testigos de hielo. El elevado aumento de CH<sub>4</sub> entre la era preindustrial y la actual es debida al aumento antropogénico de la producción de metano por los rumiantes, plantaciones de arroz, procesos industriales e incendio de grandes cantidades de biomasa. La reconstrucción de la abundancia histórica de los gases atmosféricos en diferentes escalas de tiempo pasado permitirá, en la mayor parte de los casos, entender las implicaciones climáticas del reciente aumento de estos gases por la actividad de nuestra especie.

### Identificación de bacterias y de su papel en el ambiente.

Los isótopos estables han sido utilizados para identificar microorganismos que están activamente implicados en un proceso metabólico específico, bajo condiciones similares a las que ocurren en los ambientes naturales. Como ejemplo, se estudiaron las bacterias metilótroficas, que pueden utilizar moléculas de un sólo carbono, C1 (es decir, que no tienen uniones carbono-carbono) como única fuente de energía y carbono. El crecimiento de la bacteria metilótropa *Methylobacterium extorquens* con <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH (99 % <sup>13</sup>C-metanol), aumenta la densidad relativa del DNA respecto a *M. extorquens* en presencia de <sup>12</sup>CH<sub>3</sub>OH, en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Resultados similares se han obtenido con *Methylomicrobium album* en presencia de <sup>12</sup>CH<sub>4</sub> y <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>. Esta característica permite distinguir los microorganismos activos metabólicamente en una muestra ambiental en función del sustrato presente en el medio. Las fracciones de <sup>12</sup>C-DNA y <sup>13</sup>C-DNA recogidas de suelos expuestos a metanol <sup>12</sup>C y <sup>13</sup>C, respectivamente, fueron utilizadas como moldes para la PCR. Se empleó un gen específico de la subunidad pequeña del rRNA de bacterias, arqueas y eucariotas como cebador. La amplificación del <sup>13</sup>C-DNA del suelo expuesto a <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH mostró que sólo las bacterias estaban implicadas en la asimilación del metanol. El análisis filogenético de la secuencia 16S del rRNA amplificado, puso de manifiesto dos líneas distintas de bacterias que asimilan metanol: el subgrupo α de las proteobacterias y la división *Acidobacterium*. Este resultado fue inesperado, ya que el metanol puede ser metabolizado y asimilado por un amplio rango de microorganismos que incluyen Gram-negativos, Gram-positivos y algunas levaduras. El análisis paralelo de la secuencia del gen *mxnA*, que codifica la subuni-

dad a de la metanol deshidrogenasa encontrada en las bacterias metilótroficas Gram-negativas, corroboran los datos obtenidos con 16S rRNA, lo que indica que los metilótroficos Gram-negativos activos del suelo del bosque están restringidos al subgrupo α de las proteobacterias.

**Cadenas tróficas.** Los isótopos estables pueden constituir una herramienta muy útil para el estudio de los flujos de energía en las cadenas alimenticias. La composición isotópica del carbono de los animales depende de la ingesta. En general, existe un ligero incremento (0,5 a 1 ‰) en el animal respecto a su dieta. Algunos de los procesos que contribuyen a este enriquecimiento son: (i) pérdida preferencial de <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> en la respiración; (ii) captación selectiva de compuestos <sup>13</sup>C durante la digestión; (iii) fraccionamiento metabólico durante la formación de distintos tipos de tejidos (pelo > cerebro > músculo > hígado > adiposo). Esta transferencia conservativa de la composición isotópica (< 10/100) del animal respecto a la dieta, por tanto, se puede emplear como trazador de la red trófica en sistemas donde existan diferencias en los valores de δ <sup>13</sup>C, tales como plantas C3 o C4 o sistemas marinos respecto a terrestres. Se estima que existe un enriquecimiento de aproximadamente el 1,1 ‰ por nivel trófico.

A diferencia del carbono, el nitrógeno ha sido menos estudiado. Sin embargo, también se ha observado un enriquecimiento del <sup>15</sup>N (3,2 ‰) en el animal respecto de su dieta. Este aumento puede deberse a la excreción preferente de <sup>14</sup>N. Se estima que el enriquecimiento de <sup>15</sup>N es del 3 ‰ por nivel trófico. En el caso del <sup>34</sup>S no parece haber un incremento en el animal respecto a la dieta, a lo largo de los distintos niveles tróficos.

**Diets fósiles.** La composición de isótopos estables de los alimentos y fluidos ingeridos por los animales influyen de forma manifiesta en la composición isotópica de los tejidos que sintetiza. Sin embargo, la relación exacta entre la composición isotópica de los materiales ingeridos y un tejido o componente molecular del animal es bastante complejo, ya que depende del estado nutricional, del recambio intrínseco de un tejido o de las vías biosintéticas implicadas. Para el estudio isotópico de la paleodieta se escogen los isótopos de carbono y nitrógeno de los constituyentes fosilizados del colágeno. Para los isótopos de carbono y oxígeno, los minerales biogénicos, la hidroxiapatita de los huesos y dientes, y el CaCO<sub>3</sub> de la cáscara de los huevos de aves y reptiles. La composición isotópica del colágeno del hueso reflejaría la dieta media ingerida a lo largo de la vida del animal (debido a

la remodelación constante del tejido óseo, que presenta mayor intensidad durante las fases de desarrollo del individuo). La proteína en la dentina y esmalte reflejaría únicamente la composición isotópica de la dieta durante la formación del diente, en una etapa temprana de la vida del individuo. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  del colágeno animal es el reflejo de la composición isotópica de las plantas, base de la cadena alimentaria en un ecosistema. Las plantas varían en su composición isotópica en respuesta a factores fisiológicos y ambientales.

El interés de la investigación de la paleodieta se ha centrado en la determinación en la proporción de plantas C3 o C4 en la dieta de los homínidos y herbívoros acompañantes en diferentes periodos. Este estudio permite entender la dieta de animales extintos. Por ejemplo, en el Pleistoceno tardío, los mastodontes de la costa este de los EE.UU. tenían una dieta formada íntegramente por plantas C3, mientras que los mamuts de la misma zona ingerían una proporción considerable de plantas C4.

La proporción entre plantas C4 y C3 en una región es sensible a la temperatura y humedad, de tal manera que el estudio de la composición isotópica permite estimar cuantitativamente los cambios paleoclimáticos. Por ejemplo, la  $\delta^{13}\text{C}$  del colágeno del bisonte varía desde un  $-7\text{‰}$  actual hasta un  $-19\text{‰}$  hace 10.000 años. Este resultado parece estar relacionado con los cambios de la flora, de clima frío y húmedo, característica del Pleistoceno tardío, a condiciones más secas en el Holoceno. Las  $\delta^{13}\text{C}$  del colágeno de un animal depredador y su presa no varían significativamente. Se han realizado estudios de  $\delta^{15}\text{N}$  entre los animales herbívoros y carnívoros terrestres para calibrar el grado de consumo de alimentos animales en los humanos. De ellos se deduce que el Neandertal era principalmente carnívoro, si se comparan los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del colágeno con herbívoros y carnívoros conocidos. Tradicionalmente, el estudio de la paleodieta de un organismo se ha relacionado con los dientes y, en su conjunto, el aparato masticador. Con el estudio del fraccionamiento isotópico se ahonda en el conocimiento de la dieta del organismo fosilizado, no solamente en si eran herbívoros o carnívoros, sino en qué tipo de plantas o animales basaban su dieta, o, incluso su "posición" en la cadena trófica.

**Diagnóstico clínico.** Diversas enfermedades infecciosas humanas, de plantas o de animales, están causadas por agentes etiológicos desconocidos o incultivables (o ambos). *Helicobacter pylori*, identificado como el agente etiológico de la gastritis humana, cuya persistencia puede conducir a la

ulceración y cáncer gástrico, se aisló por primera vez en 1982. Es un patógeno que infecta crónicamente al 50 % de la población humana mundial. El adenocarcinoma gástrico ocupa el lugar 14 entre las causas de muerte en el mundo y, con el aumento de la edad de la población mundial, se cree que el 2.010 alcanzará el octavo. Los factores de virulencia incluyen una citotoxina y una potente enzima, la ureasa. Esta última crea un microambiente alcalino que permite el desarrollo del microorganismo a pesar de la acidez del estómago. Tradicionalmente, la detección de *H. pylori* se ha realizado por un método invasivo, mediante una biopsia del tejido, a partir del cual se inoculaba en placas de medio de cultivo selectivos como el agar Skirrow o Tayer Martin, donde se realizaban las pruebas de la oxidasa, catalasa y ureasa. La ureasa hidroliza la urea a amonio, agua y  $\text{CO}_2$ . Otros métodos alternativos no invasivos incluyen el test de respiración de la urea- $^{13}\text{C}$  y test serológico con anticuerpos. El test de la urea- $^{13}\text{C}$  consiste en administrar oralmente (como bebida) una solución de ácido cítrico 10 minutos antes de la administración de la urea- $^{13}\text{C}$ . La tasa  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  se midió en muestras de aliento cogidas a los 10, 20 30, 60 min después de la administración de urea- $^{13}\text{C}$ .

**Astrobiología e historia de la Tierra.** El estudio del meteorito marciano ALH84001, que es del tipo SNC (véase Guerrero y Berlanga, **Actualidad SEM** [29] pp. 14-20), contiene un tipo de carbono orgánico asociado con los minerales de piroxeno del meteorito, que incluye hidrocarburos policíclicos y otras moléculas orgánicas de elevado peso molecular (querógenos) con un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de  $-15\text{‰}$ . Todas estas moléculas orgánicas podrían ser de origen biológico. Sin embargo, este valor es similar a la materia orgánica de los meteoritos carbonáceos, y por tanto algunos científicos interpretan que este material cayó previamente en Marte y no es consecuencia de un proceso biológico. La cantidad de materia que entra en la Tierra procedente del espacio interplanetario es considerable; se calcula que cada día impactan sobre nuestro planeta un total de meteoritos cuyo peso conjunto superaría las 20 toneladas.

Los estudios del fraccionamiento isotópico, especialmente del carbono y azufre, en relación con la antigüedad de la vida, son un tema recurrente en las revistas más destacadas. Periódicamente se publican estudios sobre la discriminación isotópica de la materia (supuestamente) pre-biológica de una de las rocas más antiguas que se conocen: las de la formación de Issua, en Groenlandia, de hace algo menos de 3.900 millones de años. Inmediatamente después de la

publicación, el significado de los datos expuestos, o su validez experimental, son puestos en duda por otros investigadores. En este campo, como en el del significado de los restos que se encuentran en los meteoritos SNC, la polémica y la incertidumbre va a durar todavía algunos años.

### Coda

Si miramos la tabla periódica de los elementos, arriba, casi a la derecha, veremos tres símbolos seguidos, C, N, O, e inmediatamente debajo otros dos, P y S. Podríamos llamar a esta curiosa agrupación "el quinteto de la vida". Los procesos bioquímicos de los principales elementos en los que se basa la vida implican un fraccionamiento isotópico. La evidencia de este fraccionamiento lo encontramos en la materia orgánica fosilizada (querógenos) presente en las rocas; el estudio de las mismas pone de manifiesto procesos biológicos esenciales como la fijación de CO<sub>2</sub> o la reducción de sulfato. Los isótopos estables proporcionan una base experimental para inferir el establecimiento de la vida sobre la Tierra, la reconstrucción secuencial de la invención de los diferentes procesos metabólicos, la evolución de distintas microbiotas, faunas y floras. El conjunto de los ciclos biogeoquímicos observados en el mundo contemporáneo es el resultado de la evolución de 3.500 millones de años de historia "viva" de la Tierra.

El espacio interestelar (que nos parece vacío) rebosa material orgánico e inorgánico. Se calcula que en el volumen determinado por un mero parsec (es decir, un parsec cúbico) hay suficiente materia para formar 200 Tierras. Recordemos que un parsec es aproximadamente 3.000.000.000.000.000.000 cm. (Sí, el lector ha contado bien, hay 18 ceros; o sea, "solamente" unos 3 años-luz.) Con esta enorme cantidad de materia, en la aún más enorme inmensidad del espacio, pueden formarse miles de millones de estrellas y planetas. Y, efectivamente, se forman, transforman y destruyen. Desde el punto de vista cósmico, la Tierra es sólo un pequeño planeta que ocupa el tercer lugar en orden de distancia de su estrella, el Sol, quien a su vez es una estrella mediana de una galaxia mediana, situada en un lugar del espacio intergaláctico. El origen y desarrollo de la Tierra, así como la evolución de la vida sobre ella, han sido fenómenos contingentes que pudieron ocurrir o no ocurrir, y, dado que ocurrieron, que pudieron haberse dado de una manera o de otra. Una única línea de acontecimientos, la que efectivamente ocurrió, ha dado

origen a la Tierra, a la vida, a nuestra especie, tal como las conocemos. A pesar de la certeza de la vida, como una continuidad necesaria de las leyes de la física, y de su muy posible ubicuidad, podríamos preguntarnos si en algún otro lugar del universo, en esa inmensidad cósmica, hace ya mucho tiempo, o ahora, o bien en el futuro, han podido darse exactamente los mismos fenómenos vitales que se han producido en nuestro planeta. Si es verdad que los científicos interpretan el mundo, los filósofos explican las causas últimas, pero sólo los poetas lo comprenden, tal vez podamos entender las palabras de Góngora que describen, con muy contados versos, los cambios y destino de las partes de una dama:

No sólo en plata o viola troncada  
se vuelva, mas tú y ello juntamente  
en tierra, en humo, en polvo, en sombra, en nada.

### BIBLIOGRAFÍA

- De Duve, C (1994) *Vital Dust*. Harper Collins, New York.
- Guerrero R, Berlanga M (2000) Bacterias magnetotácticas, hoy y hace 3800 millones de años. *Actualidad SEM* (29): 14-20.
- Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (1997) *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Lajtha K, Michener RH (1994) Stable isotopes in ecology and environmental science. En *Methods in Ecology*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NH, Murrell JC (2000) Stable isotope as a tool in microbial ecology. *Nature* 403: 646-649.
- Schidlowski M, Hayes JM, Kaplan IR (1983) Isotopic inferences of ancient biochemistries: C, S, H and N. En *Earth's earliest biosphere: Its origins and evolution*. Schopf JW (Eds). Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Schidlowski M (1992) Stable carbon isotopes: possible clues to early life on Mars. *Adv. Space Res* 12: 101-110.
- Schidlowski M, Gorzawski H, Dor I (1994) Carbon isotope variations in a solar pond microbial mat: Role of environmental gradients as steering variables. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58: 2289-2298.



## **Centenario de la dotación de la primera Cátedra de Microbiología en la Universidad española**

Los estudios de Microbiología fueron instaurados en España de forma oficial hace 100 años (véase **Actualidad SEM** [29] 22-24). Un Real Decreto de 31 de julio de 1900 dotaba para las enseñanzas de Doctorado, en la Facultad de Farmacia de Madrid, una Cátedra denominada "**Microbiología, técnica bacteriológica y preparación de sueros medicinales**". De esta Cátedra se ocupó en 1902 D. Francisco de Castro y Pascual como Profesor Auxiliar interino, pasando en 1910 a Catedrático.

En el preámbulo del citado Real Decreto se decía que la Microbiología comprendía "estudios modernísimos". Tenía razón el Sr. Ministro Antonio García Alix al hacer esta afirmación, ya que la Microbiología es una Ciencia joven, a pesar de que la vida microbiana ha acompañado al hombre desde su existencia. Esta ciencia era una materia nueva que despertaba admiración ya que, en esta época, se creía que a través de ella se resolverían tanto cuestiones científicas como sociales relacionadas con la patología, la terapéutica y la higiene.

El Departamento de Microbiología II ha conmemorado esta efeméride con dos reuniones, el Seminario Internacional Complutense "Genómica, proteómica y biomedicina" y la 3ª Reunión del grupo de Microbiología Molecular de la SEM, que fue precedida de una sesión académica celebrada el 12 de julio de 2000. Esta sesión fue presidida en nombre del Excmo. y Magco. Sr. Rector de la UCM por el Vicerrector de investigación D. Agustín Zapata y el Excmo. Sr. Decano de la Facultad de Farmacia D. Benito del Castillo, junto con los Excmos. e Ilmos. Sres. y Sras: D. César Nombela, D. Julio Rodríguez Villanueva, Dª Rosa Basante, D. José Enrique Hours, D. Juan Antonio Leal, D. Rafael Rotger y Dª Mª Ángeles Mosso.

En esta sesión intervinieron destacados microbiólogos que disertaron sobre la evolución de la Microbiología, en sus distintos aspectos, a lo largo de estos cien años. El Dr. Fernando Baquero habló sobre "Un siglo de Microbiología sanitaria en España". A continuación tres profesores que han pertenecido a este Departamento, los catedráticos Juan Jofre, Miguel Sánchez y José Martínez Peinado, hablaron de los avances a lo largo del siglo XX de tres ramas de la Microbiología, la Virología, la Inmunología, actualmente una nueva ciencia, y la Microbiología industrial, que ya empezaban de manera incipien-



Mesa presidencial del acto académico, vista parcial de izquierda a derecha: Drs. César Nombela, Rosa Basante, J. Antonio Leal y Mª Ángeles Mosso

te a principios de siglo. Estas materias ya estaban incluidas en el primer programa de las enseñanzas de la Cátedra en 1902.

Estamos en el año 2000: se inicia un nuevo siglo y la Microbiología tiene planteados nuevos retos de los que nos habló el profesor César Nombela, Catedrático del Departamento.

La celebración de este aniversario constituyó un pretexto para reavivar la memoria y sacar de ella a quienes dedicaron su esfuerzo a la enseñanza de la Microbiología y rendir un homenaje a todas las personas que, en este siglo, han cumplido su misión en la Cátedra de Microbiología y luego en el Departamento.

En este acto se presentó un libro escrito por la profesora Dª Mª Ángeles Mosso que refleja la evolución de la Cátedra desde su dotación hasta el momento actual, titulado "Un siglo de Microbiología en la Universidad española" y prologado por el profesor D. Julio Rodríguez Villanueva. Los capítulos del libro siguen la trayectoria de los profesores que han llevado a cabo su labor docente e investigadora a través de los años y está dedicado a todos ellos. El Departamento de Microbiología II posee en su archivo valiosos documentos antiguos que han sido publicados por primera vez.

En este libro también han colaborado los profesores Rafael Rotger en la maquetación y diseño de la cubierta y Mª del Carmen de la Rosa en la revisión del texto. La edición ha sido subvencionada por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, la Fundación Ramón Areces y la Comunidad Autónoma de Madrid.

Esta publicación pretende que sus páginas contribuyan a entroncar el pasado con el presente y sirvan de estímulo a los más jóvenes que van a ser los continuadores y responsables del desarrollo de la Microbiología con el deseo de que en el futuro unan la inteligencia con el corazón en beneficio de esta Ciencia y de la Humanidad.

**Mª Ángeles Mosso Romeo**

Profesora Titular del Departamento de Microbiología II