

## 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 eucarias 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 metilótrofos 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.

