

## La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida

Ricardo Guerrero y Mercedes Berlanga\*

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

**B**reve es el fruto de la juventud, no dura más que el diario intervalo de la luz del sol sobre la tierra; y cuando ha pasado la primavera de la vida, ciertamente es mejor la muerte que vivir, puesto que muchos son los males que invaden el corazón, recitaba Mimnermos, poeta elegíaco griego del s. VII a.C. Pocas cosas que han cautivado tan poderosamente la imaginación humana como la idea de vivir más tiempo. Pero, por extraño que parezca, el envejecimiento y la muerte, que son el destino último de los humanos, no eran necesarios en los albores de la vida, y no lo fueron durante cientos de millones de años. La clásica definición de un ser vivo como aquél que "nace, crece, se reproduce y muere" no puede aplicarse de la misma manera a los organismos procariotas que a los eucariotas.

En una célula procariota en división, el DNA es arrastrado por la membrana a la que está unido a medida que ésta crece, hasta que la célula se divide para formar dos células idénticas a la progenitora. Siempre que el entorno lo permita, los procariotas pueden crecer y dividirse sin envejecer. Aunque hay variaciones del modelo general, la división celular típica de las bacterias se produce por "fisión binaria" y da dos células equivalentes. La división celular de las bacterias que forman pedúnculos y yemas (p. ej. *Caulobacter*, *Hyphomicrobium*, etc.) implica la formación de una nueva célula hija más pequeña, sin que la célula "madre" pierda su propia identidad una vez completado el proceso de división. La diferencia entre estas bacterias y las "convencionales" (que en tiempos fueron llamadas "eubacterias", lo que hacía referencia sólo a aquellas que tenían una morfología bien definida), no sólo es la formación de yemas o pedúnculos, sino también la formación de una nueva pared celular a partir de un punto determinado ("crecimiento polar"), en vez de producirse por toda la célula ("crecimiento intercalar"), como lo hacen las bacterias que se reproducen por "bipartición" o fisión binaria.

### Muerte celular

**U**na consecuencia importante del crecimiento polar de las bacterias es que las estructuras citoplasmáticas, como algunas membranas internas, no participan en el proceso de división celular, lo que permite la formación de estructuras

más complejas que las células que se dividen por fisión binaria. Algunas de las consecuencias adicionales del crecimiento polar son el envejecimiento y la muerte: (i) Envejecimiento, dado que sobre la célula madre sólo puede formarse un determinado número de yemas. Al igual que ocurre en las levaduras, donde cada yema deja una "cicatriz" sobre la superficie de la célula madre, lo que impide que se vuelva a formar otra en el mismo lugar; de esta manera, cuando toda la superficie está cubierta por esas "señales del parto", la levadura es incapaz de dividirse de nuevo. (ii) Y, como consecuencia, la mortalidad de las células. Con el crecimiento intercalar, las células, en principio, no mueren. Obviamente, como toda forma de vida, las bacterias pueden "morir" por hambre (ausencia de nutrientes), calor (alta temperatura), alta concentración de sal, desecación o deshidratación, etc.

Las líneas celulares constituyen un ejemplo de la "inmortalidad" de las células eucariotas en los animales. Las células de Henrietta Lacks (línea celular HeLa, células cancerosas de útero) cumplen ahora medio siglo. Estas células fueron aisladas por George O. Gey antes de la muerte de la paciente en el hospital de la universidad John Hopkins de Baltimore en 1951 (Gey *et al.*, 1952), y continúan en la actualidad multiplicándose en los laboratorios de todo el mundo. Antes de 1950, varios equipos de investigadores habían logrado cultivar otras células animales, pero todas las células dejaban de multiplicarse *in vitro* y morían al cabo de veinte a cincuenta divisiones. Las células tumorales de Henrietta superaron espectacularmente esa restricción biológica. Gracias al tumor de esta mujer, se descubrió que las células cancerosas se caracterizan precisamente por su capacidad de dividirse indefinidamente. Hoy en día, toneladas de células de HeLa crecen en diversos laboratorios de todo el mundo, desde luego en mucha mayor cantidad que todas las células que tenía el cuerpo de la pobre Henrietta.

En la naturaleza, la carencia de nutrientes y la exposición a otros factores abióticos adversos constituyen la norma, más que la excepción. La disponibilidad de comida para las bacterias en los océanos es sólo una fracción de miligramo por litro; en agua dulce es de 6 a 10 µg/L; en el suelo, 0,4 g/100 g). Aunque los aspectos cuantitativos sean desconocidos, es probable que las bacterias

patógenas también experimenten algún tipo de privación de nutrientes mientras colonizan el huésped -la respuesta de la bacteria a la ausencia de nutrientes también provoca una resistencia a otro tipo de estrés ambiental. Las bacterias suelen dividirse a una tasa inferior a su capacidad máxima; en aguas marinas lo hacen cada 200 días; cada 20 días en el suelo de un bosque; *Escherichia coli* tiene un tiempo de generación de 5 a 20 h en el cuerpo humano, ya que aun en el intestino, donde la concentración de alimentos se espera que sea considerable, resultan habituales las condiciones de abundancia y hambruna (*feast and famine*) y la competencia con el resto de la microbiota. De hecho, en algunas bacterias patógenas como *Yersinia enterocolitica*, la inanición es aparentemente el desencadenante de la expresión de factores de virulencia.

### Estrategias de supervivencia de los microorganismos

Los microorganismos se encuentran generalmente en un medio hostil, por lo que parece razonable que hayan desarrollado estrategias de supervivencia, sistemas de defensa para hacer frente a las condiciones adversas y mecanismos de control activos que faciliten el reajuste de la célula a nuevas situaciones. El coste de mantenimiento debe reducirse al máximo y utilizarse en conservar el equilibrio osmótico, el potencial de membrana, la renovación de los componentes celulares esenciales, etc. La energía necesaria para estos cambios debe ser suministrada por el metabolismo endógeno a partir de constituyentes celulares (tales como proteínas o RNA) y polímeros de reserva. Una célula lucha hasta el final por seguir funcionando, resistiéndose a la muerte; intenta reaccionar contra las fuerzas que la destruirían. Las células microbianas alternan dos estados morfológicos que constituyen una especialización funcional. Un estado "activo" de crecimiento y un estado "de espera" (*stand-by*). Estos dos estados les permite crecer cuando las condiciones son óptimas y permanecer "dormidas" a la espera de nuevas condiciones favorables. Esta alternancia está ampliamente extendida en la naturaleza y, aunque la respuesta a un ambiente adverso varía entre las especies, las estrategias utilizadas se podrían dividir en dos grandes grupos: las de las bacterias diferenciadas y las de las no diferenciadas. En el primer caso (*Bacillus*, *Myxococcus*, etc.) se produce una marcada alteración de la ultraestructura de la bacteria, con la formación de endosporas, mixosporas, cistos, etc. *Escherichia* y *Pseudomonas* serían ejemplos del segundo grupo.

En las bacterias que no forman estructuras diferenciadas, las respuestas de resistencia al estrés consisten en la reducción del tamaño, la condensación del citoplasma, la alteración de la composición de las envueltas celulares, la expresión diferencial de programas genéticos, etc.

### Estrategias de supervivencia en las células no diferenciadas

En los medios acuáticos oligotróficos está ampliamente extendida la alternancia entre células en estado planctónico y las mismas células en estado béntico y sésil, formando biopelículas (*biofilms*). Una biopelícula es una asociación compleja de microorganismos, constituida por una o varias especies, unidos a una superficie y embebidos en una matriz de polímeros extracelulares de origen microbiano. La adhesión de los microorganismos desencadena la expresión de factores s, que favorecen la activación de un gran número de genes. Fenotípicamente estas células sésiles son distintas de cuando son planctónicas. La formación de la biopelícula es un fenómeno de percepción de quórum (*quorum-sensing*). Generalmente cada célula secreta pequeñas cantidades de una "molécula de comunicación" (p. ej. acilhomoserina lactona). Cuando se agrega un número suficiente de bacterias (es decir, cuando se ha alcanzado un determinado nivel de densidad poblacional), la concentración de esta sustancia en el medio aumenta, con lo que se activan diferentes genes de cada célula de la población. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* modificadas en el laboratorio, a las que se ha eliminado el gen de una lactona, son incapaces de formar biopelículas. Las bacterias en el interior de la biopelícula forman una comunidad funcional coordinada. De hecho, las biopelículas se asemejarían a los tejidos formados por células eucariotas en su cooperatividad, y en que están "protegidas" de las variaciones bruscas de las condiciones ambientales mediante el mantenimiento de una "homeostasis primitiva" dentro de la matriz de exopolímeros. Estos polímeros retienen la humedad y los nutrientes, y permiten la formación de microambientes dentro de la matriz, que distribuyen los organismos en función de las condiciones abióticas óptimas o permisivas imperantes.

Es importante considerar el valor de esta estrategia en la Tierra primitiva. En los primeros ecosistemas acuáticos las bacterias eran atraídas hacia los nutrientes que se concentraban de forma natural sobre las superficies. El agrupamiento, en ausencia de depredación, hacía que las bacterias estuvieran protegidas de la deshidratación, radia-

ción ultravioleta, dispersión por el movimiento del agua, etc. La selección positiva de las biopelículas en los ecosistemas actuales se pone de manifiesto por el predominio de este modo de crecimiento –células "inmovilizadas" en una matriz– en todos aquellos ecosistemas que lo permiten. Muchas células planctónicas son de pequeño tamaño ("ultramicrobacterias", de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro) y se encuentran en un estado fisiológico aletargado o "durmiente". Las mismas células en una biopelícula son mayores, y tienen una vida activa. La vida planctónica constituye fundamentalmente la forma de dispersión, y la sésil la de reproducción (Costerton *et al.*, 1995).

### Mecanismos moleculares de resistencia en las células no diferenciadas

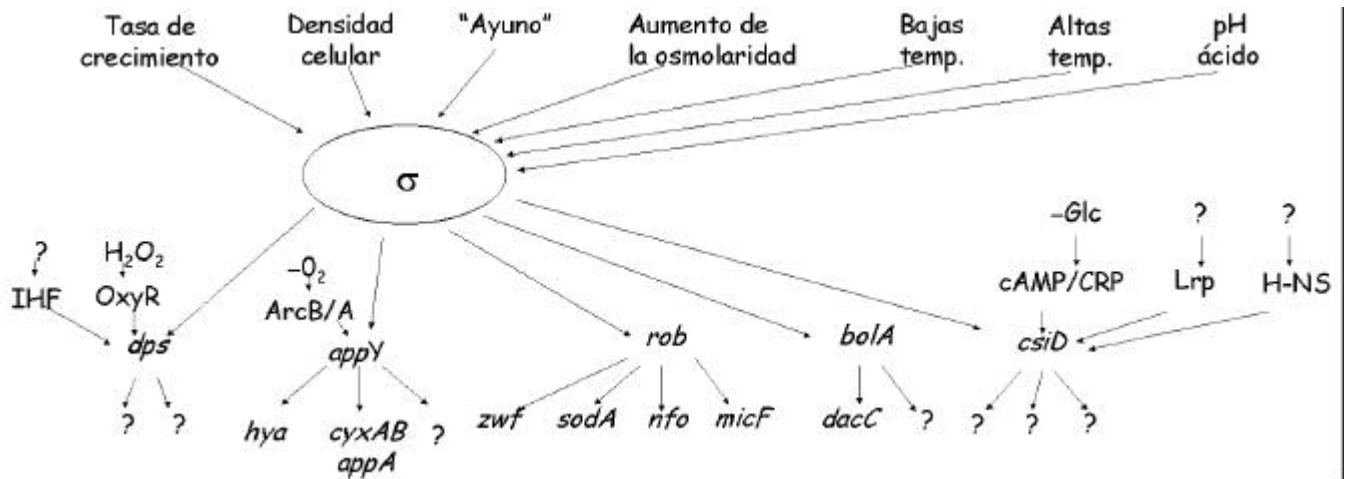
Las células procariotas no diferenciadas responden a la limitación de un determinado nutriente mediante la síntesis de sistemas de transporte de alta afinidad para ese nutriente y mediante la expresión de un transportador y la utilización de otros sistemas que sean capaces de utilizar fuentes alternativas más abundantes. Sin embargo estas respuestas suelen ser insuficientes para asegurar la supervivencia, y necesitan degradar macromoléculas intracelulares y polímeros de reserva, tales como el glucógeno o los poli-b-hidroxialcanoatos (PHA). La acumulación de polímeros podría parecer un error metabólico, porque aparta del pool celular metabolitos necesarios para el crecimiento. Pero, en realidad, lo que hace es evitar el aumento de la presión osmótica interna y desarrollar la capacidad de previsión del futuro (*time-binding*), ya que el microorganismo se anticipa a unas posibles condiciones adversas del medio. Los microorganismos acumulan diferentes sustancias cuando existe un exceso de recursos en su entorno, una cantidad superior a la que necesitaría para crecer. Posteriormente, las sustancias de reserva son "consumidas" para mantener las funciones mínimas de la célula cuando la fuente externa de energía disminuye.

Esta estrategia de previsión de las condiciones futuras podría constituir una ventaja selectiva muy importante para la evolución y el mantenimiento de la vida en la Tierra. Cuando las células crecen a tasas específicas ( $\mu$ ) inferiores del máximo, la cantidad de RNA presente es superior al que necesitarían para llevar a cabo los procesos metabólicos. Este exceso de la capacidad de síntesis de proteínas prepara a las células para responder de forma rápida a una situación "imprevista" de abundancia de nutrientes. De forma adicional, este RNA en exceso puede servir como polí-

mero de reserva. La renovación (*turnover*) del RNA más abundante, el RNA ribosómico (rRNA), libera nucleótidos que o bien sirven para la síntesis de nuevo RNA (presumiblemente mRNA), o bien se degradan y sirven como fuente de energía. En *E. coli*, aproximadamente del 20-30% del RNA total es degradado durante las cuatro primeras horas de ausencia de fuente de carbono. Trascurrido este período, la tasa de degradación disminuye, pasando a ser de un 10% durante las 20 h siguientes. La muerte celular producida por la ausencia de fuente de carbono parece estar relacionada con la degradación total de los ribosomas (McCann *et al.*, 1992).

La presencia de polímeros de reserva tales como los PHA no impide la degradación del RNA, pero aumenta la capacidad de supervivencia de la bacteria porque los PHA son catabolizados para producir energía, mientras que los ribonucleótidos liberados se emplean para la síntesis de nuevo RNA. Las proteínas de los ribosomas parece que se asocian a la membrana celular para protegerla de la degradación, y al mismo tiempo están disponibles para la formación de nuevos ribosomas cuando se sintetice nuevo rRNA. La degradación de proteínas también es significativa durante la ausencia de nutrientes. Como en el caso del RNA, los aminoácidos libres producidos en la degradación pueden ser o bien reutilizados para la síntesis o bien degradados para producir energía. La concentración absoluta de constituyentes celulares no determina la longevidad; la clave de la supervivencia en situación de inanición depende de la capacidad de regular la tasa de degradación de las macromoléculas (McCann *et al.*, 1992).

Los factores  $\sigma$  controlan la expresión génica de determinados promotores en situaciones de estrés. Estos factores  $\sigma$  son proteínas que se unen a la RNA polimerasa y reconocen diferentes secuencias de promotores. La expresión de determinadas proteínas no sólo proporciona protección frente a la ausencia de nutrientes sino también frente a otras situaciones de estrés. BOLA es una proteína que regula la expresión de diferentes genes; el producto de uno de estos genes, DacA (D-alanina carboxipeptidasa), aumenta las uniones cruzadas del peptidoglicano, lo que refuerza la pared celular de las bacterias en inanición. Las proteínas codificadas por el operón *otsBA* (más conocida por *pexA*) estimulan la biosíntesis de trealosa, que parece estabilizar la membrana citoplasmática y protege frente al estrés osmótico. Durante la inanición también se incrementa el estrés oxidativo. En esta situación, se sintetizan proteínas que destruyen los agentes oxidantes, (como es el caso de las hidroxidrasas I y II



**Fig. 1.** Esquema de la regulación global en situación de estrés en *Escherichia coli*, en el que se muestra los factores que determinan la activación del factor  $\sigma$  y cómo éste desencadena una cascada de activación de diferentes genes ("reguladores secundarios"), que a su vez actúan sobre otros. En ocasiones, los reguladores secundarios pueden activarse directamente al responder a una situación estresante determinada, como la presencia de agentes oxidantes. (Adaptado de Prokaryotic Gene Expression, S. Baumberg [ed.], 1998, Oxford University Press.)

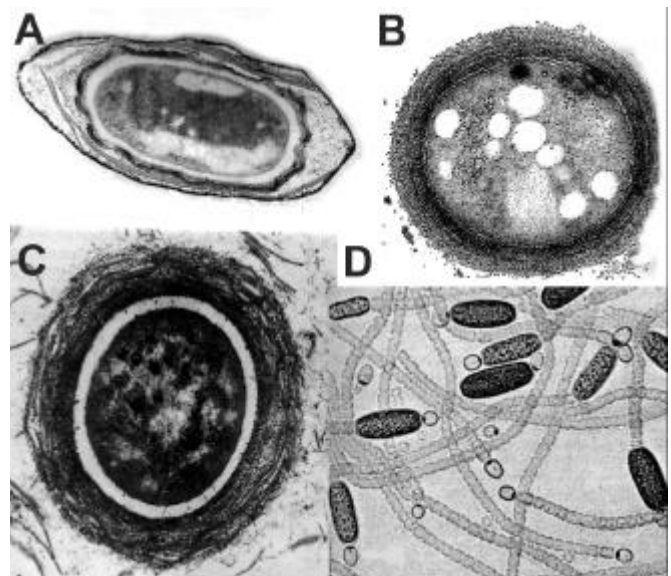
-KatG y KatE, respectivamente-, que actúan eliminando el  $H_2O_2$ , y proteínas que reparan los daños producidos por esos agentes oxidantes. La exonucleasa III (XthA) y AidB están implicadas en la reparación del DNA. PexB es otra de estas proteínas que parecen estar implicadas en la inducción de proteínas adicionales que también protegerían al DNA contra el estrés oxidativo. Las proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, Hsp), o chaperoninas, como DnaK y GroEL, etc., serían responsables de mantener una correcta conformación de las proteínas (Fig.1; Matin, 2000.)

principales: actúan como agentes de dispersión, debido a su pequeño tamaño (como es el caso de *B. anthracis*), y son las formas de supervivencia en condiciones adversas (calor, desecación). La producción de esporas (esporulación) forma parte del ciclo vital de las bacterias que la presentan, y no son consecuencia de la exposición inmediata a una situación crítica, como todavía dicen algunos libros. La esporulación comienza normalmente cuando cesa el crecimiento vegetativo debido al agotamiento de nutrientes. Suele suceder en la última etapa del crecimiento exponencial de la

**Estrategias de supervivencia en las células diferenciadas**

En condiciones ambientales adversas, o en el estado tardío de la fase exponencial, diversas bacterias desarrollan una vía de diferenciación controlada, tras la cual se produce una marcada alteración de la estructura celular (Fig. 2). Se pueden formar endosporas (p. ej. en *Bacillus* o *Clostridium*), mixosporas (p. ej. en *Myxococcus*), cistes (p. ej. en *Azotobacter*) o acinetos (p. ej. en la cianobacteria *Anabaena*, donde los acinetos se sitúan normalmente adyacentes a los heterocistes). Estas formas alternativas comparten características comunes, como un protoplasma denso, capas celulares adicionales, resistencia a la radiación ultravioleta y a la desecación, y metabolismo quiescente ("vida latente").

La producción de esporas, en general, es un fenómeno extendido entre los microorganismos. Las endosporas, en particular, son casi exclusivas de las numerosas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Las esporas tienen dos funciones



**Fig. 2.** Formas de resistencia bacteriana a las condiciones de vida adversas. A) Endospora. B) Mixospora [Brock Biology of Microorganisms 9ª Ed., 2000, Prentice-Hall, pp. 93 y 496]. C) Ciste. D) Acinetos [The Prokaryotes, 2ª Ed., Vol. I, Springer-Verlag, pp. 213 y 327].

población. Un cultivo continuo de *B. megaterium*, por ejemplo, puede mantenerse sin esporular si se mantienen las condiciones estables en el quimios-tato.

La esporulación en *Bacillus* spp. es un proceso complejo de diferenciación celular en el que intervienen unos 200 genes y tarda aproximadamente 8 horas. Primero se duplica el DNA, después se forma un filamento axial de material nuclear, y la membrana citoplasmática produce un plegamiento interno, que engloba parte del DNA y origina el septo asimétrico de la preespora. La membrana citoplasmática continúa creciendo y rodea a la espora inmadura con una segunda membrana. Entre ambas membranas se forma el córtex (capa de peptidoglicano modificado). En la espora madura, el protoplasma de la espora contiene dipicolinato cálcico, rodeado por el córtex y por una cubierta proteica constituida por cisteína y aminoácidos hidrofóbicos. Una endospora podría considerarse, por tanto, el resultado de una división por bipartición en la que la célula "hija" que sobrevive lleva consigo el cadáver de su "hermana", que no llegó a término, y al que llamamos exosporio.

Las endosporas resisten el proceso de ebullición. La temperatura de 100°C no inactiva las endosporas, y son necesarias temperaturas más altas para destruirlas. El desarrollo de la termorresistencia se debe a la incorporación masiva de Ca<sup>2+</sup> por la célula esporulante y a la síntesis en gran cantidad de ácido dipicolínico. El dipicolinato se encuentra en forma de quelato de calcio, y se localiza fundamentalmente en el protoplasma. Las endosporas, además, son muy resistentes a muchas sustancias químicas utilizadas en la higienización de instalaciones industriales y hospitalarias. Las endosporas son las formas de vida más resistentes conocidas, con la posible excepción de los priones. Los procesos que conducen a su destrucción completa (esterilización en autoclave, glutaraldehído o formaldehído) deben ser aplicados concienzuda y exhaustivamente. Después de un ciclo de esterilización, debemos asegurarnos que todo el contenido del autoclave ha sido sometido a la temperatura y tiempo requeridos. Para controlarlo, el procedimiento más eficaz es observar la posible supervivencia de esporas de un *Bacillus* especialmente resistente, *B. stearothermophilus*. La resistencia térmica de las endosporas varía considerablemente según la especie y parece depender de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. De tal manera que *Bacillus subtilis*, con un óptimo de crecimiento de 37°C, es más sensible al tratamiento térmico que *B. stearothermophilus*, con un

óptimo de 55°C. En la industria alimentaria y hospitales, la aplicación de una temperatura y un tiempo de exposición determinado es esencial para asegurar que un alimento –conservas en lata–, o material quirúrgico o médico, esté libre de microorganismos (incluidas las endosporas).

### Longevidad procariótica

Ya hemos visto que los microorganismos disponen de diferentes mecanismos para hacer frente a un medio hostil. Pero, ¿cuántos meses o años puede una bacteria (célula vegetativa o formas de resistencia) permanecer como bellas durmientes en espera de que el príncipe (condiciones óptimas para el crecimiento) las despierte? Al estado fisiológico de estos organismos de "vida latente" se le ha denominado anabiosis o criptobiosis.

A lo largo de los últimos 80 años, han aparecido diferentes publicaciones sobre organismos que vuelven a la vida activa después de un periodo de tiempo en estado latente. Kennedy *et al.* (1994) han hecho una magnífica revisión sobre el tema. Durante mucho tiempo, los datos sobre posible reanimación de bacterias antiguas eran tomados con suspicacia o considerados con incredulidad. De hecho, los primeros investigadores en el campo, Gallipe (en 1921), Lipman (en 1928), Lieske (en 1931), etc., fueron muy criticados, precisamente porque afirmaban que la longevidad de la vida podría ser de cientos de millones de años, idea revolucionaria para la época (Kennedy *et al.*, 1994). En concreto, Gallipe declaró haber resucitado microorganismos de meteoritos, reabriendo el debate de la panespermia iniciado por Svante Arrhenius en 1908 –quien, por cierto, basaba su idea en la asunción de que las esporas podían viajar por el espacio interestelar–. En 1954, Jacotot y Virat publicaron en *Ann. Inst. Pasteur* un artículo que ahora tendría tremenda actualidad; su título, "*La longevité des spores de B. anthracis (premier vaccin de Pasteur)*". A partir de 1990, se "acepta" que la vida potencialmente puede mantenerse latente durante millones de años, siempre y cuando se cumplan una serie de requisitos. Aun así, es lógico mantener cierto escepticismo sobre los resultados presentados hasta que no se compruebe su reproducibilidad. Para hacer plausibles (aunque no seguras) las observaciones sobre la preservación de la vida, se deberían cumplir algunas premisas, como son: (i) la determinación fidedigna de la edad geológica de la muestra donde se ha encontrado el microorganismo, (ii) la demostración de los pasos seguidos para tener la certeza, o una alta probabilidad, de no contaminación por bacterias modernas (ubicuas), durante el

muestreo o posterior manipulación, y (iii) la comprobación de que el microorganismo (o material genético) no haya "entrado" después de la formación del depósito (ámbar o cristal de sal, por ejemplo). Para evitar este posible problema se debe observar detenidamente la muestra y comprobar que no tiene fisuras, cambios en la cristalización, etc. Aparte de por la antigüedad de la roca donde se encuentran, la edad de los microorganismos "activados" puede determinarse mediante la "datación genética", suponiendo una tasa constante de mutación. Se ha estimado que el rango de cambio de aminoácidos es de 0,1 a 10 por 10<sup>6</sup> años. La mayor parte de la información sobre los microorganismos no recae sobre el DNA, sino sobre el RNA 16S (para los procariotas; para los eucariotas, 18S).

La Tabla 1 muestra algunos de los microorganismos preservados de muestras con más de 1.000 años de antigüedad.

En 1962, Peter Sneath (que a la sazón trabajaba en el National Institute of Medical Research, en Mill Hill, Londres) dio un punto de referencia para establecer la longevidad de las endosporas. Sabía que una suspensión de esporas de *B. anthracis* preparada por Pasteur en 1888 era viable todavía en 1956, y que en una lata de conservas de 118 años se habían encontrado esporas de un microorganismo termófilo. En los herbarios de los Kew Gardens de Londres existía una colección de plantas desecadas, algunas de las cuales habían sido recogidas y preparadas en el s. XVII. Sneath encontró esporas viables en plantas recolectadas en 1640. Representó una gráfica de supervivencia y, a partir de datos publicados sobre el número de *Bacillus* que se encuentran en el suelo, predijo que una tonelada de suelo seco conservaría unas cuantas esporas viables incluso pasados 1000 años. Los ensayos fueron realizados rigurosamente y no ofrecen dudas sobre su repetibilidad. Por otra parte, en otra excelente revisión, Potts (1994) describe cómo algunas bacterias, comprendidas las que forman esporas, pueden permanecer en un estado criptobiótico –desecadas– durante

varios millones de años. Nicholson *et al.* (2000) resumen los avances recientes de cómo las endosporas resisten la inactivación por diferentes situaciones de estrés impuestas por ambientes terrestres y extraterrestres. La desecación juega un papel determinante en la ecofisiología de las comunidades bacterianas dentro de las rocas, en el suelo, en el polvo e incluso en la piel de los animales y humanos, donde puede ser un mecanismo de transmisión de enfermedades –p. ej., fiebre Q por *Coxiella burnetii*, o carbunco, por las endosporas de *B. anthracis*–.

Un argumento en contra de la preservación longeva de la vida se basaba en la observación de muestras de DNA antiguo extraídas de especímenes de los museos o de descubrimientos arqueológicos, en el que sólo 1% del DNA se estimaba no degradado. Si el DNA se rompe con facilidad, ¿cómo podrá un microorganismo sobrevivir durante millones de años? El DNA de estos especímenes se extraía a partir de muestras de tejidos muertos, pero ¿qué pasa con el DNA de los microorganismos reanimados que continúan "vivos" hasta la actualidad? Hay razones para creer que el DNA bacteriano puede "sobrevivir" más tiempo que el de los eucariotas, basándose en la especial composición química y estructura de las esporas. Sus hélices de DNA están intercaladas y estabilizadas con sales orgánicas y dipicolinato cálcico. Su genóforo circular y único está saturado con pequeñas proteínas que provocan un cambio conformacional en la estructura del DNA. Estos múltiples mecanismos de resistencia protegen del daño hidrolítico y oxidativo al DNA y, en conjunto, a toda la espora (Cano *et al.*, 1994; Gerhartdt, 1998). Otro punto a tener en cuenta es el origen de las muestras, y la duda razonable de si los microorganismos aislados son antiguos o contemporáneos. Los microorganismos han sido frecuentemente aislados de muestras recogidas de sitios "inaccesibles", como suelo de centenares de metros de profundidad, bloques de sal enterrados o piedras de templos egipcios. Según se pensaba, la probabilidad de que un microorganismo pene-

**Tabla 1.** Microorganismos preservados (posiblemente) durante largos períodos de tiempo.

Edad estimada (años)	Microorganismo	Origen de la muestra	Referencia
650 × 10 <sup>4</sup>	Diversos	Rocas	Lipman (1931)*
650 × 10 <sup>4</sup>	<i>Bacillus circulans</i>	Salmueras	Dombrowski (1960)*
25-40 × 10 <sup>4</sup>	<i>Bacillus sphaericus</i>	Abeja en ámbar (abdomen)	Cano & Borucki (1995)
25-40 × 10 <sup>4</sup>	<i>Staphylococcus succinus</i>	Ámbar	Lambert <i>et al.</i> (1998)
120 × 10 <sup>4</sup>	Diversos	Ámbar	Greenblatt <i>et al.</i> (1999)
11-40 × 10 <sup>4</sup>	Diversos	Lago Vostok	Karl <i>et al.</i> (1999)
250 × 10 <sup>6</sup>	<i>Bacillus marismortui</i>	Cristal de sal	Vreeland <i>et al.</i> (2000)

\* Citada en Kennedy *et al.* (1994)

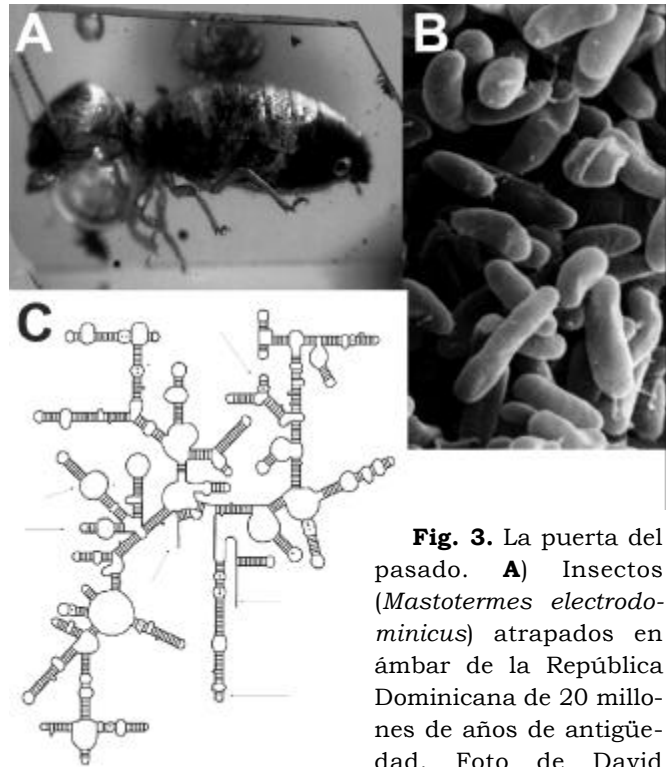
trara o llegara a las zonas profundas era muy pequeña. Nadie creía que la vida fuera posible a grandes profundidades, debido a las elevadas temperaturas, a la enorme presión y a la escasez de nutrientes. Sin embargo, esta situación ha cambiado; se han encontrado microorganismos en testigos (*cores*) de rocas profundas, tomando siempre las medidas necesarias para evitar la contaminación con microorganismos contemporáneos ubicuos. Se han encontrado bacterias quimiolitotrofas estrictas en profundidades de hasta 2.800 m en rocas sedimentarias y de 5.300 m en acuíferos de rocas ígneas, donde las temperaturas pueden estar entre 75°C y 90°C y hay agua líquida a una gran presión (Guerrero, 1998; Pedersen, 2000).

### Límite de la vida en células diferenciadas y no diferenciadas

En este artículo se ha hablado de la tenacidad de la vida procariótica, de su lucha por no morir o de su capacidad de recuperarse después de pasar mucho tiempo en estado latente. ¿Pero cuánto tiempo exactamente? Las publicaciones sobre la longevidad de las endosporas indican su viabilidad, es decir la capacidad de germinar y desarrollarse como células vegetativas (germinación) durante varias décadas como mínimo, y probablemente durante mucho más tiempo. En 1981 se colocó en un medio de cultivo una suspensión de esporas de *Clostridium acetivum* preparada en 1947, y en menos de 12 h de incubación ya se observaba crecimiento. El análisis microbiológico de restos arqueológicos romanos hallados en el Reino Unido, con unos 2000 años de antigüedad, permitieron descubrir un gran número de esporas viables de *Thermoactinomyces*. Finalmente, en 1995, Raúl Cano, de la California Polytechnic State University, publicó en Science el todavía discutido trabajo de la "resurrección" de esporas bacterianas del intestino de una abeja atrapada en ámbar de la República Dominicana, cuya edad se estimaba de 25 a 40 millones de años (Cano y Borucki, 1995).

La mayoría de los trabajos posteriores sobre resurrección de esporas se dedican a los microorganismos hallados en ámbar. El ámbar está constituido por una mezcla compleja de compuestos de terpenos, ácidos, alcoholes y azúcares, secretado por las células del parénquima de diversas plantas. En el caso del ámbar dominicano (yacimientos de Jorge Caridad) se trata de la leguminosa *Hymenea portera* (localmente llamada "algarroba"). En otros casos, se trata de resinas de gimnospermas. Estas resinas se han utilizado como preservantes como mínimo desde el 5.000 a.C.

Durante siglos, los egipcios las utilizaron para empapar las telas que envolvían los cadáveres. Los componentes de la resina inhibían la descomposición y ayudaban en el proceso de momificación. En la Grecia clásica, y todavía ahora, los griegos añadían unas gotas de resina a un tipo vino (denominado "retsina"), para detener la fermentación y evitar el deterioro debido a la proliferación de microorganismos. En la actualidad, el ámbar presenta un renovado interés científico por su capacidad de preservar organismos y material genético de tiempos muy lejanos. Como hemos dicho, Cano y Borucki (1995) pretenden haber reavivado una espora de *Bacillus sphaericus* encontrada en el abdomen de una abeja atrapada en el ámbar miocénico. Más recientemente, Greenblatt *et al.* (1999) hacen una descripción de la diversidad de microorganismos aislados del ámbar (véase la Tabla 1). Los organismos atrapados en el ámbar constituyen una ventana de estudio de las relaciones simbióticas primitivas que



**Fig. 3.** La puerta del pasado. **A)** Insectos (*Mastotermes electrodominicus*) atrapados en ámbar de la República Dominicana de 20 millones de años de antigüedad. Foto de David Grimaldi [cubierta de

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY 3 (4), Diciembre 2000]. **B)** Microorganismos (*Bacillus* sp.) aislados y "resucitados" a partir del abdomen de los insectos fosilizados en el ámbar [Brock Biology of Microorganisms 9ª Ed., p. 56]. **C)** La molécula de 16S rRNA, utilizada en la construcción de árboles filogenéticos. Las flechas indican las posiciones en las que las suelen diferir las bacterias (eubacterias) [Microbiología 4ª Ed., Prescott *et al.* 1999, Interamericana, p. 421].

contribuirá significativamente a entender la evolución (Fig. 3).

La tenacidad de la vida de nuevo se ha puesto de manifiesto con el trabajo de Vreeland *et al.* (2000), que describe el aislamiento y cultivo de una bacteria halotolerante de un cristal de sal con una antigüedad de 250 millones de años. El análisis de esta cepa la "emparenta" con *Bacillus marismortui*, aislada de una botella cerrada y almacenada durante 57 años que contenía agua del mar Muerto. En los cristales de sal no se han encontrado formas de resistencia tales como esporas. ¡Se trata de la activación de una célula vegetativa! De ser cierto, se convertiría en el ser vivo conocido que más tiempo ha permanecido vivo sobre la Tierra. Podemos preguntarnos cómo es posible que los biopolímeros bacterianos permanezcan intactos durante millones de años, si estas bacterias son lo suficientemente activas para repararlos, o qué energía utilizan para este fin. Pero, por ahora, todo ello constituye un misterio.

Los estudios de recuperación de microorganismos antiguos representan el inicio de un nuevo campo de investigación de la longevidad. ¿Cuánto tiempo vive un microorganismo? ¿Cuál es el límite máximo? Por ahora sólo, sabemos que los límites son superiores a los que se creía previamente. Cuando la afirmación sobre la increíble longevidad de las esporas o células vegetativas esté sustentada por la repetición de los resultados en laboratorios independientes, eso significará que las endosporas pueden permanecer, en determinadas condiciones, viables indefinidamente. Algunos procariontes, por consiguiente, resultarían prácticamente inmortales. La formación de esporas representa una estrategia con la que la célula escapa temporalmente a unas condiciones adversas, como la privación de nutrientes, la limitación de agua, o la temperatura elevada, mediante un estadio durmiente. Además, las esporas pueden "desplazarse" (pasivamente) por la acción del viento, del agua o de otros seres vivos, lo que les ofrece la posibilidad de llegar a un ambiente distinto, favorable para la germinación. Las esporas representan una forma celular, y una estrategia de supervivencia, que contribuyen a evitar la muerte, a desplazarse a lugares nuevos y a permanecer vivas (aunque durmientes) durante mucho tiempo. Una bacteria esporuladora no puede predecir cuánto tiempo o en qué ambiente permanecerá en estado aletargado. Pero haciéndolo, "preparándose para lo peor", las bacterias que esporulan parecen escapar durante un tiempo indefinido a lo que parecía una norma general en los seres vivos, la limitación temporal de la vida, el fenómeno inescapable de la muerte.

## Bibliografía

- Cano RJ, Borucki MK, Higby-Schweitzer M, Poinar HN, Poinar GO, Pollard KJ (1994) *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2164-2167.
- Cano RJ, Borucki MK (1995) Revival and identification of bacterial spores in 25 to 40 million year old Dominican amber. *Science* 268: 1060-1064.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Biofilm bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- Gerhardt P (1998) Survival of ancient bacteria desiccated within amber: believe it or not? *ASM News* 64: 68-69.
- Gey GO, Koffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12: 264-265.
- Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ (1999) Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microb. Ecol.* 38: 58-68.
- Guerrero R (1998) Crucial crisis in biology: life in the deep biosphere. *Internatl. Microbiol.* 1: 285-294.
- Karl DM, Bird DF, Björkman K, Houlihan T, Schackelford R, Tupas L (1999) Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science* 286: 2144-2147.
- Kennedy MJ, Reader SL, Swierczynski LM (1994) Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life. *Microbiology* 140: 2513-2529.
- Lambert LH, Cox T, Mitchel K, Rosselló-Mora R, Del Cueto C, Dodge DE, Orkand P, Cano RJ (1998) *Staphylococcus succinus*, sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int. J. System. Bacteriol.* 48: 511-518.
- Matin A (2000) Bacterial starvation. En Lederberg J (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, 2a ed. Academic Press, pp. 394-403.
- McCann MP, Kidwell J, Matin A (1992) Microbial starvation survival, genetics. En Lederberg J (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, 1a ed. Academic Press, pp. 159-170.
- Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 548-572.
- Pedersen K (2000) Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol. Letters* 185: 9-16.
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58: 755-805.
- Sneath PHA (1962) Longevity of microorganisms. *Nature* 195: 643-646.
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Power DW (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407: 897-900.