
editorial

IX

Los avances de la Microbiología

En estas alturas de finales de siglo no hace falta insistir sobre el que para entender los microorganismos, los científicos dependen de la bioquímica y de la biología molecular, siendo al mismo tiempo digno de reconocimiento cómo de forma consciente los biólogos moleculares aprecian la extraordinaria diversidad de los microorganismos como fuente de excelentes estudios y causa de importantes cuestiones, a las que es preciso contestar. La Microbiología demanda también conocimientos de fisiología, genética, biología de poblaciones, ecología, e, incluso, sobre evolución, de tal forma que exige la continua expansión de los conocimientos de los que la practican. Para los que llevamos décadas dedicados a la especialidad es altamente gratificante ver el interés que han ido despertando estas ciencias y apreciar los estímulos que se reciben, fruto de los grandes maestros de la microbiología, muchos de ellos desaparecidos en los últimos tiempos, como de los continuos y trascendentales avances científicos que se logran en este campo.

Como escribía, recientemente, en una pequeña publicación sobre la Microbiología, desde hace años soy un dedicado lector de artículos y de obras modernas de Biología y, especialmente, de los relacionados con la Microbiología y considero necesario subrayar que mi curiosidad por el mundo microbiano y especialmente por los organismos procarionticos ha ido creciendo sin cesar. Por esta razón me parece oportuno recordar cómo, en la introducción de la obra del siempre recordado Roger Y. Stanier y colaboradores de la Universidad de California, aparecida con el título «The Microbial World» y que nosotros hemos traducido en varias versiones, se podía leer: «Hace unos cien años, Pasteur puso de manifiesto el papel de los microorganismos en la Naturaleza y su importancia para el bienestar de la Humanidad. Pero es preciso reconocer que sus sucesores, más relacionados con el segundo aspecto que con el primero, hicieron girar la microbiología hacia un campo floreciente de ciencias aplicadas que fue evolucionando de forma completamente aislada del resto de la biología. Es preciso, sin embargo, reconocer que, cuando apareció la primera edición de «El Mundo de

los Microbios», este largo aislamiento iba llegando a su fin. Y, recordaba Roger Y. Stanier, nuestra obra tenía la finalidad de acelerar el cambio, presentando la Microbiología dentro del marco de los conceptos y de los hechos de la biología general». *Nosotros podríamos añadir cómo la biología, en las últimas épocas, ha sufrido una increíble y, en parte, sorprendente, revolución, en la que las bacterias y los virus, después también las levaduras y algunos hongos filamentosos, se han constituido en los objetos principales de estudio a través de los cuales se fueron descubriendo, en sucesivas etapas, las bases moleculares de la función celular. Por otro lado, sentar las bases del aislamiento y caracterización de los seres microscópicos unicelulares ha constituido un récord, alcanzando unos niveles ciertamente inimaginables en la primera mitad de nuestro siglo. En poco más de una década, el estudio del papel desempeñado por las bacterias y los virus como agentes infecciosos centró el interés microbiológico de aquella época, sin olvidar que el tratar de establecer el papel fundamental que desempeñan los microorganismos en los ciclos biológicamente importantes de la Naturaleza fue tarea ardua y compleja, emprendida por algunos importantes microbiólogos, principalmente del ámbito europeo, a medida que avanzaba nuestro siglo, tarea trascendente y protagonista que pasó sin tardar mucho como labor fundamental de las grandes figuras de la microbiología americana tanto de los centros de investigación y los departamentos universitarios como de la industria, principalmente de carácter farmacéutico. Llegado este momento, es preciso subrayar cómo, con el paso del tiempo, se fue observando que los microorganismos presentan una amplia diversidad biológica y que no pocos grupos están especializados en la consecución de transformaciones químicas que, de hecho, no pueden llevar a cabo ni las plantas ni los animales. Esto es lo que nos hace reconocer cómo, en los últimos tiempos, se han adjudicado a los microorganismos un protagonismo y una función clave en la renovación de la materia en nuestro planeta.*

En nuestros días, un gran número de obras de Microbiología, o relacionadas con ella, muestran la importancia de los microorganismos, tanto por sus propiedades bioquímicas como por su diversidad fisiológica y morfológica. A decir verdad, la famosa Escuela de Delft, encabezada por Beijerinck, Kluyver y Van Niel, ha demostrado una fuerza decisiva para el diseño y la aplicación de nuevos métodos de gran utilidad para el aislamiento y caracterización de nuevos microorganismos de la naturaleza, poniendo a punto técnicas basadas en la selectividad y en los cultivos de enriquecimiento, la aplicación en micro escala de la selección natural que ha sido fundamental para el conocimiento

de sus diversas funciones fisiológicas. A este respecto, me interesa recordar la frase que Mortimer P. Starr, de la Universidad de California y editor principal de la conocida obra «The Prokaryotes», subraya en el prólogo de la misma, que «la fisiología, la bioquímica y la ecología de los microbios constituyen los aspectos más atractivos para los científicos».

*La evolución de los estudios con microorganismos en los últimos años ha sido impresionante, marcando, en cierto modo, las pautas de los avances biológicos. Actualmente, se estudian los problemas más difíciles y complejos del crecimiento y de la división celular utilizando microorganismos, especialmente bacterias y levaduras. Las células de muchos de estos seres crecen individualizadas, separándose después de la división celular, lo que facilita, y por ello resulta sencillo, cultivar y aislar organismos unicelulares en condiciones bien definidas. Desde otro punto de vista, interesa reconocer el hecho de que, a diferencia de lo que ocurre con las células o tejidos de organismos superiores, que requieren una variedad de factores de crecimiento y medios complejos, muchos de los seres unicelulares crecen en un medio simple y bien definido, y se prestan a toda clase de estudios y manipulaciones de laboratorio. Por todas estas razones, en las últimas décadas, los esfuerzos de los científicos se han centrado mayormente en unos pocos tipos de bacterias y levaduras, situándose, claramente en vanguardia *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y organismos afines caracterizados por su simplicidad, facilidad de cultivo y carencia de patogeneidad, razón por la que se han situado como los seres vivos más estudiados en la actualidad, si se exceptúa al hombre. Por lo que se refiere al *E. coli*, basta recordar la afirmación del Premio Nobel James D. Watson al considerarlo como el organismo por excelencia de la moderna Biología Molecular, ciencia a la que ya ha proporcionado copiosos frutos. Si nos referimos a otras ramas biológicas como puede ser la Biotecnología, es preciso subrayar que una de sus principales facetas, la ingeniería genética, se ha desarrollado básicamente gracias a estudios realizados con microorganismos que se cultivan y crecen fácilmente en grandes tanques de fermentación, sin demasiadas exigencias nutricionales, sin olvidar que presentan una gran versatilidad para la utilización de muy variados y diversos substratos, aspecto éste de notable importancia en biotecnología.*

Desde otro punto de vista, los avances logrados en citogenética de las levaduras han hecho que este grupo pase a ocupar un lugar importante en los actuales estudios de ingeniería genética, dada la facilidad con que hoy se realiza toda clase de manipulaciones genéticas y clonaciones moleculares. Pero existe otro grupo de microorganismos, los virus, que ofrecen también un interés biológico grande dentro de la

biología molecular y la moderna biotecnología, sobre todo al actuar como vectores de clonación en numerosos experimentos de ingeniería genética. De hecho los virus, y más concretamente, los bacteriófagos, han sido utilizados para llevar a cabo la amplificación genética en los trabajos de manipulación genética. Los métodos modernos de análisis de secuencias nucleotídicas permiten ahora resolver series completas de nucleótidos de cromosomas de distintas clases de fagos, facilitando así el formidable desarrollo de la moderna ingeniería genética.

Refiriéndonos a la microbiología, es interesante subrayar la importancia del desarrollo de las colecciones de microorganismos, dado el enorme interés que poseen con fines científicos e industriales. La conservación de microorganismos es un compromiso difícil pero necesario, y ahora, de cara a la biotecnología, de la mayor importancia, ya que, frecuentemente, en las colecciones microbianas hay que manejar especies portadoras de vectores, plásmidos o virus de gran valor, que pueden plantear algunos problemas. El uso creciente de los microorganismos para la producción de sustancias de interés industrial sólo puede tener éxito si se dispone de cultivos fiables y auténticos y, por ello, existe una conciencia cada vez más firme de que las colecciones proporcionan recursos y servicios que son una decisiva aportación al desarrollo de la biotecnología. La red internacional de colecciones de microorganismos (en la que está integrada la Colección Española de Cultivos Tipo, la CECT, con sede en el departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia) puede ahorrar a los biotecnólogos una enorme cantidad de trabajo y de recursos económicos que será preciso evaluar adecuadamente, ya que en estas colecciones siempre resulta posible encontrar el microorganismo que cumpla las exigencias deseadas para desarrollar un trabajo específico. Por otra parte, basta ver el formidable desarrollo alcanzado por las colecciones internacionales de microorganismos y de otros tipos de células, especialmente por la American Type Culture Collection (ATCC), para apreciar en todo su valor las dimensiones alcanzadas y, con ello, valorar la colaboración que las colecciones prestan al moderno desarrollo de la Biología Molecular y, de forma más concreta, a la moderna Biotecnología.

Se ha de tener presente que las últimas décadas han sido testigo de una increíble revolución en nuestro modo de entender la estructura y la forma de trabajar de la maquinaria genética de las células vivas. Aunque las implicaciones teóricas de estos estudios se hicieron enseguida aparentes para los biólogos y los químicos, los posibles beneficios prácticos de estos conocimientos con relación a la medicina, la agricultura y la industria, sólo han resultado evidentes en los últimos años. La

ingeniería genética es una nueva tecnología que está revolucionando el estudio de la biología, por lo que existe una gran expectación en cuanto a su impacto futuro. Las principales consecuencias de la aplicación de la ingeniería genética están produciendo su efecto en la industria farmacéutica y en la química, así como en la de la alimentación. Sin embargo, la principal y más directa beneficiaria es la biomedicina, seguida de la agricultura en su doble faceta, animal y vegetal. Las biotecnologías se han beneficiado, sobre todo, de las técnicas del DNA recombinante, aplicadas a la microbiología industrial, la ingeniería genética se ha desarrollado, sobre todo, a base de estudios realizados con microorganismos. Los progresos de la biología molecular, el establecimiento de mapas genéticos de cepas microbianas de interés industrial, el desarrollo de la ingeniería genética en bacterias y levaduras y el gran avance en el conocimiento de las rutas biosintéticas que conducen a la producción de metabolitos de interés profesional o biomédico, permiten establecer métodos racionales para la obtención y selección de mutantes denominados superproductores.

Los descubrimientos que han llevado a poder acoplar genes de organismos que normalmente no se intercambian información genética y a introducirlos en microorganismos en los que estos genes foráneos pueden ser clonados y finalmente expresados, constituyen una de las series más profundas e importantes de descubrimientos científicos de la moderna era de la Ciencia. La aplicación de estos nuevos conocimientos ha de tener un enorme efecto sobre la vida y los seres vivos y para la solución de problemas que hoy ni siquiera se vislumbran. Obviamente, los conceptos derivados del estudio de la célula bacteriana han incrementado notablemente nuestras posibilidades de estudiar las propiedades de las células eucarióticas.

Un estudio actual de la Microbiología forzosamente nos obligaría a recordar la evolución y el desarrollo de esta rama de la Biología a lo largo de los últimos cien años, comenzando por la caracterización de los microorganismos, principalmente las bacterias, y su papel como agentes causantes de las enfermedades que con mayor insistencia han afectado al hombre, sin olvidar el papel que desempeñan los microbios en el medio ambiente y posteriormente, ya bien entrado el siglo actual, en la utilización de las células microbianas, mayormente bacterias y levaduras, como modelos de los progresos de la vida y el uso de microorganismos a nivel industrial, con sus amplias posibilidades de aplicaciones biotecnológicas. La reciente aparición de enfermedades serias mayormente originadas por virus (SIDA y hepatitis), sin olvidar los graves trastornos causados por los protozoos (caso de la malaria), cuando

*se considera ya superada la fase de las enfermedades infecciosas, ha hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) tuviera que reconsiderar posiciones y se viera obligada a establecer nuevas perspectivas en la lucha contra las enfermedades. Algunos ejemplos resultan altamente ilustrativos, como es el caso de las infecciones respiratorias, causa de la muerte de cuatro millones de personas según la OMS, a lo que se ha de añadir el incremento del desarrollo de las resistencias bacterianas a los antibióticos que en algunas áreas del mundo supera al 50% de los casos. El mejor ejemplo es el *Streptococcus pneumoniae*, resistente a la penicilina y a otros antibióticos, razón por la que la búsqueda de nuevos compuestos que eludan esas resistencias no sólo es importante, es necesario, algo que se ha abordado en la Sociedad Americana de Microbiología en su reciente reunión de San Diego. Es ampliamente conocido que la utilización de antibióticos de forma indiscriminada está dando lugar a la aparición de resistencias que los hace insensibles frente a un buen número de infecciones. De hecho, los investigadores clínicos, y a la cabeza Julian Davies, manifiestan su preocupación, e incluso su alarma, ante las dificultades para combatir las infecciones bacteriológicas causa de no pocas enfermedades antiguas y recientes.*

Y al referirnos a la resistencia a los antibióticos, forzosamente se ha de tener presente el caso de la tuberculosis. Recordando a la OMS y a otros organismos responsables del estado sanitario de los países, se considera que el problema global de la tuberculosis es enorme, pudiendo adquirir proporciones mayores en un próximo futuro. Se puede afirmar que, en la actualidad, entre adultos, la tuberculosis es la primera causa de muerte a nivel mundial a causa de un único agente infeccioso. De hecho, se calcula que si el control global de la tuberculosis permanece a nivel de los datos de 1990, no menos de 30 millones de personas pueden morir por tuberculosis en el año 2000. No obstante, a causa de lo inadecuado de los informes facilitados por no pocos países en desarrollo, se considera que no resulta fácil presentar datos más precisos sobre la incidencia de la enfermedad así como sobre la mortalidad.

De mayor importancia es la resistencia a las drogas empleadas hasta hace poco en la lucha contra la tuberculosis. Se reconoce que los casos de resistencia primaria y adquirida están cobrando una creciente importancia en los países industrializados. La información sobre resistencias múltiples, particularmente al menos a la isoniacida y a la rifampicina, ha sido aportada en los Estados Unidos, ocurriendo no pocos casos en enfermos contagiados de SIDA. Los datos referidos a otros países varían según las circunstancias y el momento en que se reportan los datos pero, a pesar de ello, no deja de ser cierto que la multirresistencia se incrementa a medida que pasa el tiempo, en no pocos países.

Nos interesa mencionar algunos de los aspectos más interesantes relacionados con la Microbiología en España. Algunos autores han publicado en las décadas pasadas una breve historia de la microbiología desarrollada en los años treinta y cuarenta en nuestro país que habrá que recordar, aunque más nos gustaría desarrollar aspectos relacionados con nuestras vivencias microbiológicas, analizando el desarrollo a nivel del CSIC y, sobre todo, lo ocurrido en las dos últimas décadas en los departamentos de Microbiología de la Universidad española, sin olvidar, por supuesto, el formidable desarrollo de la microbiología industrial relacionada con la producción de antibióticos. De otro lado, también consideraríamos pertinente recordar lo ocurrido en el formidable desarrollo de los Servicios de Microbiología de los grandes Hospitales en los Centros de la Seguridad Social, con un análisis suficientemente amplio de los objetivos y perspectivas de la Microbiología española, campo en el que forzosamente han de incidir las numerosas acciones de la Sociedad Española de Microbiología, hoy afortunadamente potenciada y estimulada hacia los más altos horizontes en el nivel internacional, así como por la nueva Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica que se muestra también activa en los sectores médicos y clínicos.

*Nuestro material de estudio en los últimos años han sido fundamentalmente las levaduras, las que se han constituido en el material de experimentación biológico casi ideal; nos adelantamos a subrayar que la aplicación de las técnicas de clonación que permiten la manipulación genética, han convertido a *S. cerevisiae* en el sistema experimental más versátil disponible hasta el momento para el estudio de la organización molecular de las células eucarióticas. Además, esta levadura reúne una serie de características que la sitúan en vanguardia de la investigación genética: Puede crecer tanto en estado haploide como diploide, siendo posible identificar fácilmente mutantes, aislarlos de los cultivos haploides, y ensayarlos enfrentándolos a otras células en estado haploide.*

Las levadura mencionada crece de forma rápida, incluso en medios de composición casi definida. Su desarrollo en medio líquido permite la obtención de gran cantidad de células y grandes volúmenes de cultivo, pero si se desea, puede crecer sobre placas de medio sólido, lo que permite realizar análisis clonal y aislar mutantes nutricionales. Pero estos sistemas celulares presentan otra propiedad importante y casi definitiva, y es que los cuatro productos celulares haploides de la meiosis están contenidos en un asca, facilitando con ello el análisis de todos los recombinantes de un único acontecimiento meiótico, algo que presenta

un extraordinario valor para hacer mapas de recombinación en levaduras. De hecho, si el análisis genético en levaduras se caracteriza por su sencillez y elegancia, Saccharomyces cerevisiae es, sin duda, uno de los microorganismos más atractivos para realizar estudios de manipulación genética en Microbiología.

La levadura está considerada actualmente como un organismo de amplio uso entre los que utilizan la tecnología eficientemente tanto en Saccharomyces cerevisiae como en E. coli, han facilitado el libre intercambio de genes entre E. coli y la levadura. Además, aunque la bacteria es más adecuada para construir genotecas, muchos de los genes de la levadura funcionan de manera comparable en E. coli y este hecho ha facilitado mucho su aislamiento. De hecho, miembros seleccionados de estas librerías genómicas pueden ser probados directamente en la levadura utilizando un vector lanzadera. De gran importancia, por último, es el hecho de que bajo condiciones selectivas apropiadas, el genoma de Saccharomyces puede integrar DNA transfectado, integración que tiene lugar en el sitio homólogo del genoma de la levadura. La levadura es, por ahora, el único organismo eucariótico en el que el DNA transfectado puede ser persuadido para que se recombine en el sitio homólogo del genoma del hospedador. Por otra parte, la posibilidad que ofrece Saccharomyces de aislar mutantes mitocondriales, ha hecho que este microorganismo sea realmente atractivo para el estudio de la genética molecular.

La Biología molecular ha inspirado desde hace tiempo al estudio detallado de los mecanismos que gobiernan el funcionamiento de los genes dado que, en última instancia, la expresión génica es la base de todas las actividades celulares. Precisamente, la introducción de una serie de técnicas de clonación molecular que propician el aislamiento, caracterización y manipulación de secuencias génicas, en conjunción con las técnicas genéticas clásicas, ha proporcionado gran información sobre genes de muchos organismos diferentes. Este hecho ofrece grandes esperanzas para el estudio de los procesos biológicos fundamentales. Pero aún se puede decir algo más: Las cepas de levadura se encuentran bien caracterizadas desde el punto de vista genético y se dispone de mapas genéticos detallados de S. cerevisiae y de Schizosaccharomyces pombe, precisamente los dos tipos de células con las que más hemos trabajado.

La aplicación de las nuevas metodologías de la biología molecular en la manipulación de genes clonados ha abierto formidables posibilidades para profundizar tanto en la caracterización de secuencias particulares como en el análisis de los mecanismos que controlan la

expresión génica en Saccharomyces, lo que ha conducido a algunas conclusiones generales acerca de los patrones de control que operan en este organismo.

En los últimos años se han depositado grandes esperanzas sobre la levadura, especialmente en el área de la biotecnología. No obstante, a pesar de que en algunos casos es posible la expresión directa en Saccharomyces de material genético procedente de otros sistemas biológicos, la principal limitación que presenta la expresión funcional de genes foráneos parece ser de incapacidad que presenta la maquinaria biosintética y de elaboración de la levadura, para reconocer de forma eficiente las señales que controlan dicha expresión. Esto se traduce, en no pocos casos, en un bajo nivel de transcripción a partir de promotores heterólogos, en una elaboración incorrecta de los RNA mensajeros o en la secreción ineficiente de los productos formados. El mejor conocimiento de las secuencias que controlan la expresión de los genes homólogos ha permitido, sin embargo, la construcción de estructuras híbridas facilitando el que las levaduras puedan actuar de forma más eficiente sobre la síntesis de moléculas biológicamente activas, a partir de genes heterólogos.

A la vista de lo expuesto, queda patente el hecho de que Saccharomyces cerevisiae es un organismo especialmente bien dotado para llevar adelante el análisis de las funciones celulares. La facilidad y el rigor de su análisis genético permite al investigador aplicar el poder de la genética molecular a una amplia variedad de procesos bioquímicos y citológicos. Se confía en que muchos de los procesos revelados en la levadura puedan proporcionar información útil sobre algunos de los mecanismos que operan en una gama más amplia de organismos eucarióticos. Algunas semejanzas entre los procesos que tienen lugar en levaduras y aquéllos de células de plantas o animales, pueden indicar vías experimentales útiles para abordar el análisis genético de estos últimos organismos.

Julio R. Villanueva