

LA MICROBIOLOGÍA COMO CIENCIA

Aspectos históricos y comentarios de actualidad.

Basado en “*Biology of the Prokaryotes*” (1999). Lengeler, J.W.; Drews, G. and Schlegel, H.G. Blackwell Science.

La definición clásica de la Microbiología como “la ciencia que trata de los organismos cuyo tamaño es demasiado pequeño para ser observados a simple vista” es intelectualmente corta y puramente metodológica, y refleja claramente las limitaciones humanas para desentrañar la realidad natural. La tecnología es a la vez la principal herramienta para el conocimiento y el principal factor limitante, pues los hechos naturales no han sido “diseñados” teleológicamente para que el hombre los comprenda. En otras palabras, y aunque nos pese, la Naturaleza no está construida empleando escalas humanas. Esto se refleja en la falta de homogeneidad estructural de los organismos tradicionalmente estudiados en Microbiología. Toda la Biología podría abordarse tomando a los microorganismos como excusa y esto, aunque sirva para dar importancia al trabajo con microorganismos, impone serias restricciones prácticas para el trabajo diario del microbiólogo. Está claramente demostrado que los microbios sirven de banco de prueba para la elaboración y aplicación de todas las teorías y tecnologías biológicas, y la inmediatez con que puede pasarse de la bioquímica a la biología celular y a la genética utilizando microorganismos es quizás la razón por la cual hay tantos biólogos trabajando y estudiando microorganismos, desde los más diversos puntos de vista.

Resulta difícil imaginar que el microbiólogo pueda acumular el conocimiento necesario para saber todo de todos los microorganismos (como representantes de los seres vivos en general), por lo que se impone una aproximación más “humilde” al trabajo con microorganismos, para individualmente aportar pequeñas piezas al *puzzle* de lo biológico. La tecnología para manipular poblaciones enormes de seres vivos en un espacio controlado por el investigador es, en mi opinión, la gran aportación de la Microbiología a la metodología de investigación biológica en general, y quizás el mejor elemento de cohesión interna de la Microbiología como ciencia. La base teórica, imaginación, intuición, razonamiento práctico, capacidad de comunicación y habilidad manual para llevar a cabo estudios y experimentos no siempre están juntos en la misma persona, por lo cual las aproximaciones multidisciplinarias son, en Microbiología, imprescindibles.

Muchos descubrimientos importantes son a veces puramente accidentales y tienen lugar cuando se trabaja en áreas muy alejadas de aquella en la que se está investigando. E. Buchner descubrió la fermentación en extractos de levadura cuando, haciendo estudios inmunológicos, añadió azúcar a un extracto para conservarlo. A. Fleming descubrió accidentalmente la penicilina cuando su placa de estafilococos se contaminó con *Penicillium*. F. Griffith descubrió la transformación cuando trabajaba en la epidemiología de los neumococos. Por tanto, el azar juega también un importante papel en la investigación en general, y en la microbiología en particular. Muchos descubrimientos se llevan a cabo en varios sitios diferentes y no relacionados, y muchos investigadores individuales cooperaron en la

solución de un mismo problema, por lo que la distribución de honores y méritos no deja de ser frecuentemente injusta. Personajes trascendentales como Pasteur, Cohn, Beijerinck, Winogradsky o Koch, contribuyeron a muchos aspectos diferentes del conocimiento microbiológico y se encuentran en la base de la estructura microbiológica actual.

Los microbios como problema conceptual.

Las enfermedades fueron consideradas durante mucho tiempo un castigo divino, sin causa directamente objetiva. En la Europa renacentista, **Girolano Fracastorius** (1478-1553), médico y poeta veronés, llegó a la conclusión de que las infecciones se debían a la transmisión de contagios, cuerpos diminutos que están vivos y siempre producen la misma enfermedad, no sólo en el hombre y los animales sino también en las plantas y, acertadamente, calificó a la sífilis como el “mal francés”. Sus ideas son más llamativas si consideramos que los microorganismos todavía permanecían ocultos y, por tanto, la “Teoría Microbiana de la Enfermedad” se debe a un pensador que nunca había visto un microbio.

La Microbiología no comenzaría a desarrollarse hasta que **A. van Leeuwenhoek** (1632-1723) describiera sus “bestezuelas” y “criaturillas” (“beesjes”, “cleijne schepsels”), empleando sus cuidadosamente contruidos microscopios y comunicando sus resultados a la *Royal Society* de Londres. Pero sus observaciones sólo causaron gran impacto cuando se desarrollaron técnicas microscópicas más avanzadas, más de un siglo después. Las primeras microfotografías fueron presentadas por **Robert Koch** hacia 1876 y obtenidas con un objetivo de inmersión en agua. Los objetivos de inmersión en aceite fueron introducidos por **Ernst Abbe** y **Carl Zeiss** hacia 1878, los microscopios de luz ultravioleta fueron desarrollados por **J. E. Barnard** en 1919 y la tecnología de contraste de fases desarrollada por **F. Zernike** no se comercializó hasta 1940. El microscopio electrónico fue desarrollado en Bélgica y Alemania por **L. Marton** y **E. Ruska** respectivamente hacia 1936.

La repercusión de las observaciones de A. van Leeuwenhoek fue notable en los ambientes del pensamiento teórico. La posibilidad de ver organismos menores que los gusanos y las algas estimuló la investigación enormemente. La aparición de la vida a partir de los materiales inanimados, **abiogénesis** o **generación espontánea**, dominaba el pensamiento desde la época de los pensadores griegos, y se aplicaba a todo tipo de organismos, desde peces a gusanos, moscas y sus larvas y finalmente alcanzó a las recién descubiertas y más pequeñas, las bacterias. La transmisión de enfermedades por contacto era una posibilidad sugerida pero no demostrada hasta finales del siglo XIX y muchos eruditos habían planteado experimentos que intentaban soportar o descartar la abiogénesis. Esta búsqueda animó en gran medida el desarrollo de la Microbiología. En 1665, **Francesco Redi** (1626-1697) demostró que los gusanos que se producían en la carne eran las larvas de moscas, que no aparecían si se protegía la carne con una gasa, lo cual impedía a las moscas depositar allí los huevos.

Pero los microorganismos, fundamentalmente bacterias, eran mucho menores y no se podía ver claramente si procedían de otros antecesores o aparecían de la materia inerte. El inglés **J.T. Needham** (1713-1781) y sus seguidores defendían que las moléculas inertes podían reagruparse *per se* para dar lugar a la aparición de microorganismos. **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799) era contrario a esta idea y realizó una serie de experimentos, a mitad del siglo XVIII, que demostraron que la presencia de microorganismos en los extractos puede evitarse si se hierven y se mantienen luego herméticamente cerradas.

Los trabajos de físicos y químicos como **J. Priestley**, **E. Cavendish** y **A. Lavoisier** establecieron las bases de la química de los gases. Uno de ellos, el oxígeno, era esencial para la vida de los animales. Se propuso entonces que el calentamiento hacía desaparecer el oxígeno de los extractos, y que la entrada de aire nuevo provocaba la aparición de los microorganismos al aportar el oxígeno necesario para el crecimiento, pero no porque llevase microorganismos. **F. Schulze** y **T. Schwann**

demonstraron hacia 1837 que infusiones hervidas de materiales orgánicos permanecían estériles si el aire que se dejaba entrar en el recipiente que las contenía se hacía pasar previamente a través de soluciones fuertemente ácidas o alcalinas o metal fundido. Hacia 1859, **Schröder y von Dusch**, pasaron aire a través de un algodón a un frasco que contenía un caldo previamente hervido y comprobaron que así se evitaba la aparición de microorganismos en el extracto. Fue el químico **Louis Pasteur** (1822-1895) quien, hacia 1860, consiguió terminar definitivamente con la controversia sobre la generación espontánea de los microorganismos. Pasteur demostró, mediante aspiración a través de un filtro de algodón, que en el aire se podían encontrar unos corpúsculos organizados, visibles al microscopio y similares a los microorganismos encontrados en los caldos. Realizó también un experimento conceptualmente simple: matraces de largo cuello curvado (“cuello de cisne”) podían conservar estériles las infusiones que contenían siempre que el cuello del matraz se mantuviese intacto. Si se rompía el cuello, en el caldo aparecían rápidamente microorganismos. Con ello demostró que los organismos aparecidos en materiales putrefactos procedían de los cuerpos organizados del aire. En la misma línea, **J. Tyndall** (1820-1893) comprobó que algunos extractos eran fáciles de esterilizar por ebullición corta, mientras que otros no se esterilizaban ni con ebulliciones prolongadas. Sugirió que ciertas bacterias tenían dos fases vitales, una termosensible y otra termorresistente y propuso el método de esterilización por calentamiento discontinuo (“tindalización”). Posteriormente, **F. Cohn** descubrió que bacterias del heno eran capaces de producir formas quiescentes, observables al microscopio, las endosporas, muy resistentes al calor. Estos experimentos desacreditaron la idea de la generación espontánea y sentaron las bases de la esterilización, la asepsia, los medios de cultivo y la conservación de alimentos.

Es curioso destacar que muchos años después, en la década de los 50, los experimentos de **Stanley Miller** sobre creación de moléculas orgánicas en condiciones prebióticas, las teorías de la inseminación cósmica, y las modernas ideas de evolución prebiótica permiten en cierta forma revitalizar la vieja idea de la abiogénesis, con un enfoque un tanto diferente. Hay quien opina que los pensadores griegos estaban ya en lo cierto.

Cultivar y estudiar los microorganismos.

Los primeros medios para el cultivo de microorganismos eran líquidos. Incluso Pasteur usaba infusiones. Se dió cuenta de que las levaduras, como las otras plantas, estaban compuestas por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y otros elementos menores, y tanto las bacterias como las levaduras crecían bien en soluciones de sales, azúcar, y lisados de levadura. Las diluciones seriadas para el aislamiento de bacterias en cultivo puro fueron introducidas por **Joseph Lister** en 1873 pero, comprensiblemente, este procedimiento no dio resultado en manos de otros investigadores, por lo que la aparición de medios sólidos resultó ser un avance extraordinario. Ya se habían usado sustratos sólidos como excrementos, fragmentos de zanahoria o patata para cultivar mohos. En 1868, **O. Brefeld** empleó medios solidificados con gelatina para estudiar el ciclo de vida de *Empusa muscae*. Koch usaba medios solidificados con gelatina, quizás por estar habituado a su uso para las emulsiones fotográficas. La idea de usar el agar-agar para solidificar los medios debe atribuirse a **Fanny Hesse** (la mujer de **Walter Hesse**, colaborador de Koch) que lo usaba habitualmente en la preparación de mermeladas, y el cultivo en medios solidificados con agar se asentó definitivamente cuando se introdujeron las placas de **Richard Petri** en 1887. A partir de ahí, comenzaron a desarrollarse medios específicos, de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, etc., que permitieron aislar microorganismos patógenos y del suelo. Posteriormente, **McIntosh y Fildes** desarrollaron el cultivo de anaerobios.

Todos estos avances, con la certeza de tratar con cultivos puros, permitieron reconocer muchas de las características que hacen, particularmente de las bacterias, un grupo amplio, nuevo e independiente de organismos. Esta originalidad, sin embargo, había sido ya anunciada por algunos de los primeros investigadores que las estudiaron. En 1786, **O. F. Muller** había publicado un estudio sobre los microorganismos de aguas dulces y saladas en el que describía más de 350 especies.

Las originales actividades de las bacterias vinieron a explicar fenómenos muy llamativos, quizás uno de los más espectaculares fuera el de los famosos milagros de conversión de hostias en sangre, desde que en la Edad Media la Iglesia había introducido estos elementos en el culto. En 1823, una comisión científica de la Universidad de Padua, dirigida por **Bartolomé Bizio**, determinó que las manchas sanguinolentas observadas en estos “milagros” correspondían a los cuerpos “fúngicos” de un organismo al que denominó entonces *Serratia marcescens*. Otros describieron situaciones similares producidas por *Monas prodigiosa*, en realidad la misma bacteria, *Serratia*. Las pigmentaciones, películas y surgimientos repentinos en hábitats acuáticos habían atraído siempre a los naturalistas. El naturalista alemán **C. G. Ehrenberg** describió a las actuales *Thiospirillum jenense* y *Chromatium okenii* en 1838, después de observar las manchas coloreadas producidas por estos organismos en los ríos cerca de Jena. El mismo autor describió a *Gallionella ferruginea*, bacteria productora del ocre. El botánico suizo **M. Perty** describió especies de bacterias purpúreas (rojas), denominación acuñada luego por el danés **E. Warming**.

Entre 1853 y 1877, **F. Cohn** publicó sus trabajos sobre estructura de las bacterias que sentaron las bases de la morfología bacteriana. Reconoció a las bacterias como grupo especial, asignándolas al reino vegetal, con reproducción por fisión binaria y metabolismo especializado. Adoptó la nomenclatura linneana y desarrolló uno de los primeros esquemas de organización sistemática útiles en bacteriología. Además estudió las endosporas, describiendo *Bacillus subtilis*, el “bacilo del heno”, y otorgó a la formación de endosporas importancia taxonómica. En aquel tiempo se discutía sobre el carácter **pleomórfico** o **monomórfico** de las bacterias, por comparación con los ciclos fúngicos. Las bacterias presentarían características morfológicas variables, y cada estado o forma sería capaz de producir enfermedades diferentes, con metabolismo también diferente. Lister y otros defendían esta postura, mientras que Pasteur, Cohn y Koch propugnaban la estabilidad o monomorfismo de cada especie, con una constancia de caracteres que se revelaba claramente al trabajar con cultivos puros. La aceptación del monomorfismo llevó mucho tiempo, y chocó luego con la observación de mutantes y con el descubrimiento de nuevas especies con ciclos de vida complejos. La estructura celular de las bacterias fue objeto de intensos estudios, descubriéndose las inclusiones citoplásmicas, los flagelos, la pared celular,... y también fenómenos de comportamiento o **tactismos** de atracción o repulsión a la luz, el oxígeno o las sustancias químicas. Con sus estudios sobre quimiotactismo, **W. Pfeffer** (1884-1888) llegó a sugerir conceptos sobre la estructura sensorial de las células bacterianas (y de todos los organismos en general), como la transducción de señales, adaptación sensorial, los umbrales de respuesta, la permeabilidad selectiva, etc. que todavía hoy resultan acertados.

Microorganismos y enfermedad.

La teoría microbiana de la enfermedad no fue demostrada hasta finales del siglo XIX, pero muchas pruebas apuntaban a los microorganismos como agentes causantes de las infecciones. En 1762 el médico alemán **Marcus Antonius von Plenciz** publicó en Viena un libro (“*Opera medico-physica*”) en el que proponía que cada enfermedad era debida a una “semilla” (*seminium*) específica. Mencionaba incluso la putrefacción de las frutas y la transferencia del cuevo para iniciar la fermentación de la masa del pan. Sus ideas no resultaron bien acogidas en un tiempo en que todo lo pequeño eran gusanos (“vermes”). También en el siglo XVIII, **J. Hunter** demostró la transmisión de la gonorrea, inyectándose el pus de un enfermo. Por desgracia para él y para la ciencia, al mismo tiempo que la gonorrea se infectó también la sífilis. En 1813 se demostró que ciertos hongos eran los causantes de enfermedades en el trigo y en el centeno. En la Viena de 1840, **Ignaz Semmelweis** observó que las damas de clase alta que daban a luz en el hospital eran más propensas a contraer fiebres puerperales que las señoras de clase baja que acudían al mismo hospital o que eran atendidas por comadronas en su casa. Semmelweis llegó a la conclusión de que la infección se transmitía debido a que las damas de alcurnia tenían el privilegio de ser atendidas por los estudiantes de medicina, que pasaban directamente de las salas de disección a las zonas de obstetricia, y llevaban contaminaciones procedentes de los cadáveres diseccionados. Las mujeres de clase baja no tenían este honor, pero tampoco se enfrentaban a este tipo de contagio. Estas observaciones le llevaron a proponer una sencilla

solución hoy común en la práctica clínica: lavarse las manos. En 1855 el médico inglés **John Snow**, sin conocer el agente causal del cólera, realizó el famoso estudio epidemiológico con el que demostró que la epidemia de cólera en Londres estaba asociada a la distribución de agua de beber por una de las compañías suministradoras.

Desde 1850, Louis Pasteur había proporcionado suficientes evidencias sobre la especificidad de las fermentaciones y los organismos causantes, y asumió que las enfermedades debían estar causadas por microorganismos concretos. Aunque no era médico ni veterinario, se dedicó a investigar las causas de diferentes enfermedades, no sólo las “patologías” del vino y la cerveza, sino incluso las de los gusanos de seda y las aves. En su mismo laboratorio, **C. Chamberland** comenzó a usar el autoclave y la esterilización de soluciones a través de filtros de porcelana.

En 1860, Lister, influido por los descubrimientos de Pasteur sobre la omnipresencia de los microorganismos, supuso que éstos podían contaminar las heridas de la misma manera que contaminaban los medios de cultivo e introdujo las técnicas quirúrgicas asépticas (esterilización del instrumental, vendajes, pulverización de desinfectantes), reduciéndose así en gran medida las infecciones postoperatorias.

En 1875, experimentos realizados en no más de cinco semanas, permitieron a R. Koch (basándose en experiencias previas de **A. Pollender** y **C. J. Davaine**) aislar e identificar al bacilo *Bacillus anthracis*, causante del carbunco en animales. Demostró también la transmisibilidad de la enfermedad de animales enfermos a sanos y permitió la formulación de los famosos “**Postulados de Koch**”, elaborados por **E. Klebs** y **F. Loeffler**. Todo este trabajo vino a confirmar a los microorganismos como causantes específicos de enfermedades y a establecer definitivamente la metodología microbiológica, con lo que la ciencia de la Microbiología quedó finalmente forjada. Quedaron además formadas dos poderosas escuelas de investigación en Microbiología. La escuela francesa, alrededor de Pasteur, con **Roux, Chamberland, Joubert, Yersin, Metchnikoff** y otros, que se dedicó a estudiar experimentalmente los procesos infecciosos y las reacciones de defensa frente a las infecciones, lo que dió origen a la inmunología experimental de la cual el Instituto Pasteur es pionero. La escuela alemana, por su parte, encabezada por Koch, con **Behring, Loeffler, Pfeiffer, Kitasato, Welch, Ehrlich**, se centró en el aislamiento, cultivo y caracterización de las infecciones en humanos, llegando a descubrir los agentes causales de la tuberculosis (**Koch**, 1882), el cólera (**Koch**, 1883), la difteria (**Klebs**, 1883, **Loeffler**, 1884), la neumonía (**Fraenckel**, 1886), la meningitis (**Weischselbaum**, 1887), el tétanos (**Kitasato**, 1889) y la peste (**Yersin** y **Kitasato**, 1894).

También las enfermedades microbianas de las plantas fueron objeto de estudio. En 1845, **M. J. Berkeley** había demostrado que el mildiú de la patata estaba causado por un hongo, responsable de la plaga de la patata en Irlanda, una catástrofe que influyó notablemente en la historia irlandesa (y universal). Las royas, cornezuelos, etc. fueron reconocidas desde épocas antiguas. En 1878 el botánico americano **T. J. Burril** describió una bacteria en los tejidos enfermos de perales con mildiú, a la que denominó *Micrococcus amylovorus*. En 1888 el también americano **Erwin F. Smith** (a quien se dedicó el nombre *Erwinia*) describió varias bacterias de plantas y se atrevió a generalizar que había tantas infecciones bacterianas en plantas como en animales. Entre otras, describió la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como causante de las agallas tumorales en dicotiledóneas.

Simultáneamente a la identificación de los microorganismos causantes de las enfermedades se inició la lucha contra ellos. Los inicios de la inmunología se remontan a los años finales del siglo XVIII, cuando **Edward Jenner** “vacunó” contra la viruela utilizando pústulas de viruela bovina. Sería Pasteur quien adoptase el término **vacuna** en honor a Jenner, para denominar a la protección que la inoculación con bacterias atenuadas confería a las gallinas con las que hacía demostraciones públicas (científicas, quiero decir). Pasteur y sus colaboradores prepararon vacunas contra el cólera aviar, el carbunco o la rabia. Vacunas contra otras enfermedades fueron elaboradas por la escuela de Koch (fiebre tifoidea, cólera). La acción protectora de las vacunas estimuló los estudios sobre los mecanismos inmunológicos, y se descubrió la fagocitosis y la inmunidad celular (**Metchnikoff**, 1884),

la acción de los anticuerpos como antitoxinas (**H. Büchner, E. von Behring, S. Kitasato**) que dio paso al reconocimiento de la inmunidad humoral. A principios del siglo XX se empezó a configurar una estructura del sistema inmune que no sólo respondía a la infección, sino que servía también para distinguir entre lo propio y lo ajeno, en el que la inmunidad humoral y la celular se complementan y relacionan.

Los efectos inhibitorios o antagonismos entre diferentes microorganismos se habían observado desde los primeros momentos de cultivarse en el laboratorio, pero se pensó que eran debidos a la competición por los nutrientes. La búsqueda de sustancias con toxicidad selectiva, que no perjudicasen al hospedador, obtuvo su primer éxito cuando **P. Ehrlich** presentó el *Salvarsan*, efectivo contra la sífilis. Otros compuestos con metales fueron luego usados con mayor o menor eficacia, aunque en general con desagradables efectos secundarios. Las sulfamidas, con el *Prontosil* a la cabeza, parecían iniciar una nueva etapa, pero fue el descubrimiento de la penicilina por **A. Fleming** y su caracterización por **H. Florey** y **E. Chain**, lo que determinó un cambio radical en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Quizás Fleming no fue el primero en observar la acción inhibitoria de *Penicillium* sobre bacterias, pero sí el que decididamente promovió y publicó el uso de los caldos de crecimiento del hongo para tratar enfermedades infecciosas. La lista de antibióticos se fue incrementando indefinidamente, bien por producción natural o manipulada *in vitro*, pero la continua aparición de enfermedades nuevas o reactivación de otras dormidas y la extensión de resistencias múltiples codificadas en plásmidos ha venido a reclamar más juicio en la utilización de los antibióticos, ha conducido a una búsqueda constante y al empleo de las más sofisticadas químicas y biosíntesis combinatorias en la obtención de nuevas moléculas con posibles actividades antimicrobianas.

Los microorganismos son metabólicamente muy activos y variados.

Los productos derivados de la actividad metabólica de los microorganismos han sido conocidos y disfrutados desde hace miles de años. La ciencia subyacente a la preparación de cerveza, vino, queso, encurtidos, etc. ha tenido mucho de artesanía, y el conocimiento de sus fundamentos a servido a veces para quitarles encanto.

En 1837 varios autores (**F. T. Kützing, C. Cagniard-Latour** y **T. Schwann**) sugirieron que la producción de alcohol en las fermentaciones se debía a la acción de organismos vivos. Esta idea chocó con la opinión de químicos reputados de la época, como **F. Wöhler, J. Berzelius** y **J. Liebig**. Éstos afirmaban que todo eran procesos químicos catalizados. El propio Liebig escribió un libelo sin firma ridiculizando la opinión de los “vitalistas”. Sin embargo, el trabajo de Pasteur vendría a confirmar las teorías vitalistas, asociando cada fermentación con la actividad de microorganismos específicos (1857-1861). Pasteur se refirió a los agentes causantes de las fermentaciones como “células vivas” o “fermentos”, haciendo ambas expresiones equivalentes. En 1858, un estudiante de Liebig, **Moritz Traube**, sin rechazar la idea de Pasteur, consideró que los fermentos eran las proteínas contenidas dentro de las células, y la palabra “enzima” fue propuesta por **W. F. Kühne** en 1878. Se describieron después las bioconversiones de otros sustratos carbonados en el laboratorio de **E. F. Hoppe-Seyler** en Estrasburgo, realizándose mediciones de los gases producidos, y **Theodor Escherich** describió *Bacterium coli commune* en 1885, que luego sería renombrada en honor suyo.

El fisiólogo vegetal ruso **S. N. Winogradsky** describió el metabolismo quimiolitotrófico en 1887, trabajando con la bacteria del azufre *Beggiatoa*. La asimilación litoautotrófica del CO₂ se debe también a los estudios de Winogradsky con bacterias nitrificantes, y W. Pfeffer introdujo el término “autotrofia” para referirse a los organismos que derivan su carbono orgánico del CO₂. El modo de vida quimiolitotrófico, las sucesiones metabólicas en el uso de compuestos inorgánicos y orgánicos, la aerobiosis y anaerobiosis, se estudiaron con medios de enriquecimiento y los primeros ecosistemas simulados como la “columna de Winogradsky”, que permitió aislar organismos con metabolismos energéticos muy variados. Estos trabajos y los de **Beijerinck**, que aisló especies de *Rhizobium* de los

nódulos de leguminosas y estudió el metabolismo fototrófico, la fijación de nitrógeno, etc., permitieron sentar las bases de la ecología microbiana y la participación de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos.

Los estudios metabólicos permitieron conocer muchos detalles sobre la utilización de compuestos o la liberación de productos, lo que permitió acumular evidencias sobre la existencia de las enzimas y, en cierta forma, unificar las ideas vitalistas con las avitalistas: los procesos de conversión de sustancias en la Naturaleza ocurren por la acción de los (micro)organismos por estar dotados de los catalizadores químicos (enzimas) adecuados para ello. Las diferentes fermentaciones y la variedad de procesos impulsaron a **Albert J. Kluyver** y **H. J. L. Donker** (1926) a proponer como concepto general la existencia de un **gradiente energético** que conduce los procesos de oxidación-reducción observados en el metabolismo energético. Los microorganismos, las bacterias y levaduras en particular, sirvieron para elucidar la mayoría de los procesos metabólicos (catabólicos o anabólicos) que ocurren en todos los organismos e iniciar el análisis de mecanismos regulatorios y de transmisión de información, que culminarían posteriormente con el desarrollo de la genética molecular.

La regulación metabólica, entendida inicialmente como adaptación a las condiciones del medio de cultivo, fue ya notificada por Pasteur en 1857, cuando demostró que *Penicillium glaucum* usaba sólo la forma dextrógira y no la levógira del ácido tartárico. También se detectó el hecho de que la producción de enzimas despolimerizantes del almidón desaparecía si el organismo se cultivaba en presencia de glucosa. La represión catabólica estaba ya anunciada cuando los investigadores de la época (W. Pfeffer) se preguntaban qué ocurriría cuando el organismo podía optar por más de una forma de fuente de carbono, nitrógeno u otros elementos. Las adaptaciones observadas al cambiar el medio de cultivo, entendidas de forma un tanto vaga como variaciones de la actividad enzimática, fueron abordadas por **H. Karström** en Helsinki en 1930 al estudiar la utilización de xilosa en *Bacterium aerogenes* e hizo la generalización de que las enzimas para el uso de sustratos generales como la glucosa, el ácido pirúvico, el ácido succínico o el ácido láctico eran siempre constitutivas, mientras que las que permitían el uso de azúcares raros eran adaptativas. Se estudiaron muchas actividades enzimáticas, pero el significado de muchos de los resultados obtenidos no llegó a comprenderse hasta que en los años 50-60 se impuso el modelo del operón.

Los modelos regulatorios comenzaron a hacerse explícitos con los trabajos de **Jacques Monod**, que trabajó con protozoos primero y con *E. coli* y *Bacillus* después. Monod acuñó el término **diauxia** para el tipo de crecimiento con dos sustratos alternativos, y después de 1952, junto a **M. Cohn**, introdujo términos como “enzimas inducibles”, “inductor externo” o “inductor gratuito”. Los modelos de **inducción-represión** se difundieron en los años 50 basándose en el trabajo de Monod y en los mutantes constitutivos para la utilización de lactosa de **G. Cohen-Bazire** y **H. Jolit**. La definición de operón procede de **François Jacob** (1960) y su grupo que, con fagos lambda atenuados, complementaron los estudios de Monod. La regulación del metabolismo al nivel de la actividad enzimática se descubrió en enzimas de *E. coli*, que no funcionaban cuando se acumulaban los productos de su actividad; **R. Yates** y **A. B. Pardee** dilucidaron los mecanismos de inhibición por retroalimentación cuando estudiaban la síntesis de derivados de pirimidinas (1956). El concepto de la **regulación alostérica** de la actividad enzimática se debe a **Monod, J. Wyman** y **J. Changeux** (1965).

Los virus.

A finales del siglo XIX, la Microbiología había tomado cuerpo como ciencia de los organismos pequeños, casi invisibles, pero ya había conseguido aislarlos, cultivarlos y verlos al microscopio. Era cuestión de tiempo llegar a identificar al microorganismo causante de cada enfermedad. Pero todavía quedaba por descubrirse un grupo de organismos de gran importancia: los virus.

En 1882, **Dimitry Ivanowsky** descubrió que el jugo de los extractos de plantas de tabaco que padecían la enfermedad del mosaico, era capaz de transmitir la enfermedad a plantas sanas, incluso si

tales jugos se filtraban a través de los filtros de porcelana inventados por C. Chamberland. En 1898, sin conocer exactamente el trabajo de Ivanowsky, **M. Beijerinck** definió al agente causante de la enfermedad del tabaco como un “*contagium vivum fluidum*”, diferente de los conocidos hasta entonces y en 1900 demostró que ese agente sólo se replicaba en células vivas. También en 1900, **Loeffler y Frosch** establecieron que el agente causante de la glosopeda del ganado también era un agente filtrable. **Peyton Rous**, en 1911, descubrió la capacidad de filtrados acelulares para producir sarcomas en animales, con lo que se inició la relación de la microbiología con el cáncer.

Los bacteriófagos fueron descubiertos por **F. Twort** y **Félix d’Herelle**, que observó las placas de lisis en céspedes bacterianos. Entre 1929 y 1936, **F. M. Burnet** describió las fases del ciclo de vida de los bacteriófagos. La **lisogenia** fue descubierta simultáneamente por **J. Bordet, M. Ciuca** y **E. Gildemeister**, en 1921 y otros investigadores ayudaron a definirla como un estado de latencia de la infección viral, que sería definitivamente aclarado por **A. Lwoff** hacia 1945. En 1951, **Esther M. Lederberg** descubrió que la cepa más usada de *E. coli*, la K12, contenía un fago atenuado, al que denominó **lambda**. La mayoría de las cepas actuales derivadas de K12 han sido curadas del fago. Mientras tanto, los virus habían empezado a cultivarse en huevos embrionados (**Copeman**, 1899) o en tejidos celulares (**F. Parker** y **R. N. Nye**, a mediados de los años 20). En 1951, **Max Theiller** comprobó que pasos sucesivos por embrión de pollo atenuaban al virus de la fiebre amarilla, lo que posibilitó la producción de una vacuna.

En 1935, **Wendel M. Stanley** cristalizó el virus del mosaico del tabaco, comprobando que estaba formado por proteína y desencadenando un debate teórico sobre el carácter de los virus como seres vivos o estructuras inanimadas. Posteriormente se comprobó que el TMV estaba formado también por ARN. Los fagos lambda y P1 sirvieron para descubrir los fenómenos de modificación-restricción (**L. Bertani, J. Weigle**, 1953; **Werner Arber**, 1959-1968), lo que permitiría posteriormente el desarrollo de la ingeniería genética. La virología actual es una ciencia de moda, después de la pandemia de SIDA, y de los estallidos de infecciones como Ébola. El uso de virus desarmados promete ser una herramienta de primer orden en la modificación del genoma y la terapia génica.

La genética microbiana.

Los microorganismos se han encontrado siempre en primera línea de investigación genética. A principios de siglo **H. de Vries, Carl Erich Correns** y **Erich von Tschermak** redescubrieron los trabajos de **G. J. Mendel** y pusieron a la herencia al frente de la investigación biológica. **Charles Darwin** había propuesto su teoría evolucionista y de selección natural. Tras unas conferencias de H. de Vries en Amsterdam en 1900, en las que empleó los términos “mutación” y “mutante”, M. Beijerinck propuso que algunas de las formas variables en las que a veces se presentaban las bacterias podían ser consideradas como **mutantes** y sugirió que los microbios podrían ser útiles en el estudio de las leyes de la herencia, la variabilidad y la competencia entre especies. El carácter de los genes como unidades genéticas básicas fue definiéndose a partir de los trabajos en organismos superiores, y se consideró que las modificaciones o mutaciones podían estar “dirigidas” en beneficio de la especie. Cuando ya **F. Griffith**, en 1928 había comprobado, mediante experimentos *in vivo*, la existencia de transformación bacteriana en los neumococos y se habían realizado algunos experimentos de apareamiento en *E. coli*, **Salvador Luria** y **Max Delbrück** realizaron su famoso “experimento de fluctuación” con *E. coli* y el fago T1 (1943), apoyado por los experimentos de **H. Newcombe** y los de replica en placa de **J. Lederberg**, que demostraron que las mutaciones ocurren al azar y la selección ocurre posteriormente, no de forma lamarkiana como algunos opinaban. Estos experimentos supusieron un paso decisivo en la aceptación de las teorías evolutivas. **O. T. Avery, C. M. MacLeod** y **M. McCarty**, en 1944, habían demostrado, en sus experimentos de transformación de neumococos, que el material genético es el ADN. A partir de entonces, los estudios de estructura del ADN, los de regulación de la expresión génica, conjugación, lisogenia, la ingeniería genética y su desarrollo posterior han dado a los microorganismos un papel relevante en la creación de la genética molecular que hoy conocemos.

Las bacterias (y arqueas) como grupo independiente de organismos.

El repaso histórico precedente deja palpablemente claro que el estudio de las bacterias, con su diversidad metabólica, estructural y de comportamiento, provocaron un fuerte impacto en las ciencias biológicas, y causaron gran número de problemas a la organización linneana de los grupos de seres vivos. No es de extrañar, por tanto, que su posición taxonómica en el conjunto de los seres vivos fuese controvertida durante muchos años. Ya se ha mencionado que **F. Cohn** fue quizás el primero en reconocer la peculiaridad como grupo de estos organismos y, aunque con dificultades, se atrevió a darles una categoría especial dentro del grupo de las plantas. Reconoció la relación entre las cianobacterias (esquizofíceas, “algas de fisión”) y las otras bacterias (esquizomicetos, “hongos de fisión”) y las combinó con el término esquizofitas, “plantas de fisión”. Cuando **Darwin** propuso su teoría evolucionista, no es de extrañar que bacteriólogos de la época fueran de los primeros en librarse de prejuicios míticos y aceptar la idea de que unas especies proceden de otras. Aunque las bacterias resultaban morfológicamente menos abordables que las plantas o los animales, algunos intentaron buscar ya métodos naturales para clasificarlas y relacionarlas entre sí. En 1909, **S. Orla-Jensen** presentó en Copenhage un trabajo (“Las líneas principales del sistema bacteriano natural”) en el que decididamente consideraba a las bacterias quimiolitotróficas como las más primitivas. Los árboles filogenéticos tardarían en llegar, pero la semilla estaba plantada. Los virus, recién descubiertos, no vinieron sino a complicar las cosas.

Posteriormente, **A. J. Kluyver**, **C. B. van Niel** y **R. Y. Stanier** (1936-1941) intentaron dibujar un primer sistema de clasificación natural, atendiendo a los caracteres morfológicos, únicos disponibles en la época. En 1937, **Edward Chatton** (y luego **R. G. E. Murray**, 1968) propuso los términos “**procariótico**” y “**eucariótico**” para designar a los organismos carentes o poseedores de estructura nuclear delimitada por membranas. La **Taxonomía Numérica** promovida por **P. H. A. Sneath** desde los años 50 intentó dar una estructura más objetiva a la taxonomía, empleando multitud de caracteres de todo tipo y evaluando el conjunto con tratamientos de ordenador. El conocimiento fisiológico, molecular, y estructural acumulado en esos años permitió abordar esa tarea de “objetivación” de la Sistemática. **Robert H. Whittaker** (junto con **L. Margulis**) impusieron después su esquema de clasificación de cinco reinos: los *Monera*, *Protoctista*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia*, en los cuales los microorganismos se repartían en los tres primeros grupos. El concepto y organización volvería a cambiar cuando en 1977 **Carl Woese** propuso la formación de tres reinos (ahora “Dominios”): *Archaeobacteria*, *Eubacteria* y *Eukarya*. Para ello empleó la nueva tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos y aceptó la capacidad filogenéticamente informativa de las proteínas y los ARN ribosómicos como **cronómetros moleculares**, ya propuesta por **Zukerkandl** y **Pauling** en los años 60. El ARN ribosómico cumple los requerimientos para ser considerado un cronómetro molecular, pues es una macromolécula en apariencia muy antigua evolutivamente, presente en todos los seres vivos, moderadamente conservada en grandes distancias filogenéticas y sin evidencia cierta de que haya estado sometida a transferencia interespecífica. El ARN ribosómico 16S (18S para eucariotas) parece el más adecuado por su tamaño intermedio y manejable. Estas ideas pueden ser modificadas según se van conociendo más y más genomas completos.

La posibilidad de acceder a la secuencia de los genes de los ARNs ribosómicos de diferentes organismos, incluso ya a través de Internet, y la comparación de esas secuencias ha revolucionado muchos conceptos de la Biología moderna. Lo que hasta hace poco tiempo eran mundos tan alejados como los de Procariotas y Eucariotas, ha dejado ya de ser cierto. Los Procariotas se separan ahora en dos líneas claramente divergentes, el Dominio *Bacteria* y el Dominio *Archaea*, formando el Dominio *Eukarya* una línea separada. Posiblemente las Arqueas se parecen más a los Eucariotas que a las propias *Bacteria*.

En el dominio *Bacteria* (eubacterias), se distinguen al menos 12 líneas filogenéticas con categoría de reinos o *Phyla* (19 según otras fuentes). Hay algunas correspondencias con los grupos taxonómicos establecidos según criterios fenotípicos (espiroquetas, cianobacterias). Pero, la mayor

parte de las líneas filogenéticas reúnen a especies fenotípicamente diversas, lo que reafirma la pobreza de los marcadores fenotípicos como marcadores filogenéticos. Los primeros doce *Phyla* o reinos en el **Dominio *Bacteria*** son:

Proteobacterias (Bacterias púrpuras), con cinco subdivisiones: **alfa, beta, gamma, delta y épsilon**.

Cianobacterias.

Bacterias Gram positivas (con grupos de alto y bajo contenido de G+C)

Clamidas.

Planctomyces y relacionados.

Bacteroides/*Cytophaga*.

Bacterias verdes del azufre.

Espiroquetas.

Deinococcus y relacionados

Bacterias verdes no del azufre o grupo ***Chloroflexus***.

***Thermotoga*.**

Aquifex /Hydrogenobacter

Además de estos doce grupos se han descrito otros siete *Phyla* de **Bacteria** (**Lengeler, 1999**):

***Fibrobacter*.**

***Fusobacterium*.**

***Leptospirillum*.**

Verrucomicrobiales.

Sinergistas.

***Acidobacterium*.**

Thermodesulfobacterium

Dentro del Dominio ***Archaea*** se incluyen dos reinos o *Phyla* reales, **Euryarchaeota** (arqueas metanógenas, halófilas, y termófilas reductoras de azufre) y **Crenarchaeota** (arqueas termófilas e hipertermófilas que metabolizan compuestos de azufre, y otras recién descubiertas), además de un reino “virtual”, los **Korarchaeota** que sólo existen como ARNr 16S huérfanos, ya que pertenecen a organismos que no se han podido aislar.

Los **virus** y **viroides** quedan fuera de las clasificaciones taxonómicas pues carecen de estructura celular y metabolismo propio aunque, desde luego, se las han arreglado para prosperar a costa de sus hospedadores. Son, probablemente, lo más cercano al famoso y metafísico “gen egoísta” de **R. Dawkins**.

Por conservadora que quiera ser, la Taxonomía permite un constante cambio, en función de los nuevos datos que aparecen o reinterpretaciones de datos anteriores. Una visión pragmática de la clasificación llevó a la publicación del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, cuya primera edición, iniciada en 1984 y terminada en 1989 contenía, en cuatro volúmenes, un ordenamiento fenotípico de los grupos de Procariotas, atendiendo a caracteres metabólicos, morfológicos y de utilidad práctica (médica, agrícola, tecnológica, etc.). La segunda edición, a punto de aparecer (**Prescott, 1999**) estará organizada de acuerdo a las actuales ideas filogenéticas y cambiará bastante la estructura del que se considera *de facto* el manual de clasificación e identificación de procariotas. La nueva edición constará de cinco volúmenes, y estará organizada en 30 secciones. Por acuerdo internacional se obliga a mantener los nombres de especies válidamente descritas, pero la posición taxonómica exacta de las especies pertenecientes a ciertos géneros muy establecidos puede variar enormemente.

La situación de la taxonomía en los otros microorganismos (hongos, algas, protozoos) no es tan dinámica como en los procariotas. Los hongos verdaderos se dividen en cuatro grupos más o menos

reales: los **Ascomicetos**, **Mastigomicetos**, **Zigomicetos** y **Basidiomicetos**; los **Deuteromicetos** son un grupo artificial de hongos cuyo sistema de reproducción sexual no se ha identificado. Los **Hongos mucosos** (**Acasiomicetos** y **Mixomicetos**) están a medio camino entre los hongos y los protozoos. Las **algas**, tanto macroscópicas como microscópicas suelen estudiarse como componentes de los vegetales. Los **protozoos**, hasta hace poco tiempo se estudiaban en los cursos de Microbiología, pero son ahora, por su tendencia a vivir como parásitos, objeto de estudio de la Parasitología.

Al mencionar los progresos y tendencias de la taxonomía actual, **E. Stackebrandt**, **B. Tindall**, **W. Ludwig** y **M. Goodfellow** concluyen en “The Biology of the Prokaryotes” (Lengeler, 1999): “Los rangos taxonómicos son sobre todo unidades subjetivas que facilitan la comunicación y permiten elaborar un sistema práctico que sirva a los usuarios. El objetivo final de la sistemática microbiana es poner en relación la taxonomía con la evolución mediante el establecimiento de homologías reales a nivel genómico. Sin embargo, hasta que se consiga alcanzar este objetivo tan ambicioso, las orientaciones y regulaciones no deben ser tan estrictas como para quedar fuera del alcance de la práctica diaria real en los diferentes campos de la microbiología aplicada, como por ejemplo en las instituciones médicas, las agencias medioambientales y las industrias biotecnológicas”.

¿Hasta dónde llega la Microbiología?

El campo de estudio de la Microbiología es, en realidad, toda la Biología. Si los microorganismos pueden presentarse en tantas formas, lugares y metabolismos diferentes, es fácil asumir que los microbiólogos (para pesar de algunos) no tengan reparos en introducirse en cualquier actividad relacionada con las ciencias biológicas. La patogénesis vegetal y animal, la biotecnología, la medicina, el ejército, incluso el mercado de valores, tienen puntos de contacto con los microorganismos. Al fin y al cabo, forman parte de cada una de nuestras células, y nunca nos podremos desentender completamente de ellos.

En Norwich, UK, verano de 1999.