

**INTERÉS APLICADO DE UNA
GLICOPROTEÍNA SECRETADA POR UNA
NUEVA ESPECIE BACTERIANA**

Discurso leído en el acto de recepción del
Académico numerario

Dr. Jesús Guinea Sánchez
celebrado el día 13 de marzo de 2000

Barcelona
2000

*L'Acadèmia no es fa solidària de
les opinions que s'exponen en les
publicacions de les que és responsable
l'autor.*

**Excelentísimo Señor Presidente,
Muy Ilustres Señores Académicos,
Señoras, Señores:**

Es relativamente frecuente, que detrás de un premio, una medalla, un reconocimiento, se encuentre un grupo de amigos. Este es el caso, y por ello, quiero señalar y expresar mi agradecimiento a los componentes de esta Real Academia al elegirme para figurar entre ellos como Miembro de una entidad que constituye y representa para la clase farmacéutica un fin que culmina su vida profesional.

Por varias razones y, aunque no es una reflexión original, siempre he suscrito la actitud de aquellas personas poco proclives al acopio de títulos y reconocimientos. Sin embargo, debo manifestar que en esta ocasión, el apoyo y la amistad, poco frecuentes, mostradas por las personas integrantes de esta Institución han inducido mi decidida incorporación a esta Academia. Este agradecimiento es secuencial, en primer lugar, hacia los muy ilustres académicos que han apoyado inicialmente mi candidatura, doctores Ylla-Catalá, Taxonera y Parés y, más tarde, a todos los miembros de la junta que, con su voto favorable han consolidado su confianza hacia mi persona al creer que mi labor entre ellos puede ser útil y digna de una tradición tan honrosa. Todos ellos están en mi pensamiento.

Permitidme, que ahora dedique un recuerdo a aquellas personas que, con sus enseñanzas han contribuido a mi formación académica. De mis años de estudiante quiero destacar, entre un grupo irrepitible de profesores, auténticos maestros, a D. Santiago Alcobé, Oriol de Bolós, Arturo Caballero, D. Ramón Margalef, D. Antonio Prevosti y D. Francisco Ponz.

*Dipòsit legal: B-6762-2000
IMPREMTA FARRÉ, S.L. – Aragó, 362, entresol 2º - Barcelona.*

No debo ni puedo olvidar, en este momento, a dos personas que reforzaron mi inclinación hacia la microbiología: D. Ramón Parés y D. Amadeo Foz. Con Ramón Parés inicié mis primeros pasos en el auténtico conocimiento de la microbiología. Con su desbordante optimismo y su conocimiento enciclopédico de la microbiología, no resultaba difícil entusiasmarse en los distintos aspectos de esta disciplina. Más allá de sus actividades docentes e investigadoras, se adivinaba en su persona una sutil aura de alegría contagiosa y una gran personalidad de universitario, humanista y científico. Aunque especializado en su campo, siempre ha superado el marco de su asignatura y en todo momento ha prestado una atención constante y cordial hacia cualquier inquietud intelectual. Por ello, no debe sorprender que su presencia en la Universidad haya sido un estímulo para todos los que le conocen. En tiempos en los que las relaciones profesor-alumno solían basarse en el distanciamiento y en la subordinación, los discípulos de Parés tenían en él a un compañero. Se entiende pues, que se viera rodeado de personas de muy distinta mentalidad y actividades profesionales diversas.

Mi encuentro con Amadeo Foz se produjo a través de una estancia programada, durante seis meses, en su departamento del Hospital del Mar. Se trataba de efectuar un estudio de las actividades antimicrobianas de nuevos nitrofuranos. El resultado práctico se tradujo en una colaboración que se prolongó durante seis años. Junto a él me familiaricé en el conocimiento de la bacteriología clínica. Durante las mañanas Foz desempeñaba su actividad profesional en el Hospital Clínico. Era el bacteriólogo de confianza de D. Agustín Pedro-Pons. Por las tardes se encontraba en el desaparecido pabellón García Tornel, del también llamado hospital de infecciosos, antiguo lazareto de Barcelona. En la misma planta se ubicaba el departamento de Bioquímica dirigido por el Dr. J. Gras, mientras que en la planta inferior desarrollaban sus actividades los doctores Solé Durall y Sánchez-Lucas. Era un centro de referencia y consultas para los clínicos de cualquier punto de la península. Gran maestro,

poseía una capacidad de autocrítica muy desarrollada. Las matizaciones y rectificaciones eran frecuentes en sus charlas y clases. Eran el resultado de una búsqueda continuada de información y replanteamiento de los problemas.

En esta breve introducción sería injusto olvidar mis años de estancia en la industria farmacéutica. Fueron años intensos y positivos, que me permitieron conocer a personas como Montserrat Martí y Tomás Vilarroya de probada calidad humana y profesional. Era el final de la década de los sesenta y, ya comenzaba la transformación de laboratorios locales, generalmente de tamaño medio, en cabezas de puente de empresas multinacionales.

Finalmente deseo dar testimonio de agradecimiento a todos mis compañeros de facultad. Por su acogida, por sus consejos y por su amistad. Algunos, desafortunadamente ya no están entre nosotros.

El contenido de este discurso está relacionado con una parte importante de la labor investigadora iniciada en el año 1985, en la unidad de microbiología de la facultad de Farmacia. Contiene una reflexión sobre aspectos que, partiendo de la taxonomía bacteriana, se extiende hacia campos aplicados, relacionados con la búsqueda de las posibilidades que presenta una molécula de origen bacteriano, en el marco de los preparados farmacéuticos y cosméticos. Es una síntesis de una línea de investigación, que como suele suceder, no se encuentra exenta de limitaciones y fracasos.

ÍNDICE

Introducción.....	9
El material extramural secretado por <i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	13
Glicoproteínas estructurales en procariotas: La lámina S.....	15
Glicoproteínas distintas a la lámina S.....	23
Glicoproteínas celulares.....	28
Estudio del significado biológico de la glicoproteína secretada por <i>P. antarctica</i> NF3.....	31
Interacciones entre la glicoproteína de <i>P. antarctica</i> y liposomas.....	36
Autoensamblaje de la glicoproteína.....	40
Capacidad envolvente de liposomas.....	47
Ecosistemas acuáticos extremos: fuentes de una microbiota de interés aplicado.....	53
Bibliografía.....	71

Pseudoalteromonas antarctica NF3:
NUEVA ESPECIE BACTERIANA.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la microbiota procedente de aguas y sedimentos de origen antártico ha aportado unos resultados que confirman la presencia de una interesante diversidad microbiana. Paralelamente, se ha evidenciado un vacío de conocimientos, similar al de otros ecosistemas acuáticos, sobre todo, si la información disponible se compara con la existente sobre ecosistemas microbianos terrestres.

Cabe destacar, que las descripciones de ciertos grupos microbianos quedan reducidos, en ocasiones, a los datos aportados por un solo grupo de investigadores, entre otras razones, por la dificultad que representa el acceso hasta los distintos hábitats que albergan a estas poblaciones microbianas. En este sentido, resultan clarificadoras las opiniones que, a este respecto, formularon Paul Baumann y Linda Baumann (1). De acuerdo a estos especialistas, durante muchos años, la mayoría de los microbiólogos que disponían de oportunidades para investigar ecosistemas de acceso difícil, no estudiaban separadamente a los microorganismos, su interés se centraba en el control de sus actividades en cuanto eran elementos pertenecientes a un sistema más complejo. Se medían parámetros de la comunidad: ciclo del nitrógeno, relación autótrofos/heterótrofos, productores primarios, etc.

En otros casos, parece oportuno indicar, que el interés hacia el estudio de este mundo microbiano, menos conocido, ha surgido de la inquietud investigadora de microbiólogos especializados en otros grupos de microorganismos aislados mediante técnicas habituales bien establecidas. Tal circunstancia ha dado lugar a errores metodológicos graves, que, en ocasiones, provocan la eliminación involuntaria de una microbiota incapaz de crecer en los medios convencionales destinados al desarrollo de especies bacterianas de origen clínico o de otros hábitats telúricos. La confusión existente entre las necesidades o requerimientos salinos y la tolerancia al NaCl es un ejemplo común.

Si aceptamos que estas incorrecciones experimentales se han realizado involuntariamente durante muchos años, no es sorprendente que en los estudios de identificación de aislamientos bacterianos de origen marino, se valorasen como básicos otros aspectos tradicionales de la taxonomía bacteriana, como las relaciones con el oxígeno, la coloración de Gram, morfología, etc., y en cambio, no se considerasen parámetros tan importantes como aquellos que estudian las auténticas coordenadas ambientales (2,3).

A través de la experiencia adquirida a lo largo de estos años coincidimos con P. Baumann (1), acerca de los modelos bacterianos más frecuentes adaptados a ecosistemas marinos. Se trataría preferentemente de bacterias Gram negativas, bacilares o curvadas y no esporuladas. Un grupo mayoritario estaría representado por bacterias no fermentativas, *Alcaligenes*, *Alteromonas* y *Pseudomonas* serían géneros representativos. Un segundo grupo minoritario estaría conformado por los representantes que tuviesen un metabolismo aeróbico facultativo. *Photobacterium* y *Beneckea*, serían ejemplos de referencia.

Entre los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de una serie de muestras de origen antártico, destacaré a cinco de ellos, que, con un perfil taxonómico idéntico, constituyen una nueva especie bacteriana, auténtica protagonista de este discurso. Las muestras que dieron lugar a esta nueva descripción fueron obtenidas por Josefina Castellví (4), y proceden fundamentalmente de dos zonas, a partir de lodos acumulados en la salida de un glaciar (Inlet Admiralty Bay, Isla del Rey Jorge) y de las cercanías de la Base española "Juan Carlos I", ubicada al sureste de Bahía Sur, en la isla Livingston (62°39'46" S y 60° 23'20"), en todos los casos son zonas geográficas que corresponden a la Shetland del Sur.

El estudio taxonómico riguroso de estos biotipos ha permitido establecer que su perfil cumple con la descripción del género *Pseudoalteromonas* (5). En efecto, si revisamos el modelo de flagelación, su porcentaje de G+C, la hidrólisis de la gelatina, su incapacidad de utilizar el DL Malato, D-Sorbitol, y el m-hidroxibenzoato, puede afirmarse con seguridad que los biotipos aislados con estas características son representantes de este género bacteriano de reciente creación (Figura 1).



FIGURA 1. Tinción negativa de células de *Pseudoalteromonas antarctica*, a partir de un cultivo líquido después de 24 h de incubación a 15 °C, (barra = 0,7 µm).

Como otras especies de *Pseudoalteromonas* tiene requerimientos de sodio, pero a distintos niveles, porque las especies descritas hasta ahora crecen a partir de 100mM de NaCl, con óptimos entre 125 y 600mM. Esta nueva especie sólo precisa una concentración del orden de 17mM. Pero, veamos cuál es el origen del género *Pseudoalteromonas*.

En 1972, P. Baumann describió un nuevo género bacteriano al que denominó *Alteromonas* (6) con la finalidad de separar aquellas bacterias fenotípicamente similares a *Pseudomonas* pero, con un G+C, claramente inferior. El estudio profundo de este género, basado en técnicas moleculares, dió lugar a una escisión de *Alteromonas* y a la descripción de un nuevo género, *Pseudoalteromonas*, que incluye a todas las especies de *Alteromonas* descritas hasta ahora, excepto *A. Macleodii*, que de acuerdo a Gauthier (5), debe conservar la denominación genérica original.

La separación de las distintas especies de *Pseudoalteromonas* en base a su diferenciación fenotípica es problemática. Ivanova y col (7) sostienen esta idea al comprobar la proximidad genética entre las especies conocidas. Desde 1993, Akagawa, especialista en este grupo, recomienda la necesidad del uso de metodología genética y quimiotaxonómica para alcanzar con claridad una identificación a nivel de especie (8).

En nuestro caso, y con independencia de los parámetros imprescindibles señalados, el análisis de los ácidos grasos, según los procedimientos e interpretaciones de Matsui, en 1991, (9) y Svetasher (10) en 1995, y el perfil de las proteínas totales confirman plenamente su inclusión a nivel de *Pseudoalteromonas*. Los ensayos de hibridación DNA/DNA revelaron que nuestros biotipos eran distintos a *P.haloplanktis* subsp.*haloplanktis* y *P.atlantica*., que son las dos especies

fenotípicamente más próximas. La similaridad entre ellos y la cepa tipo está comprendida entre el 20% y 22%, valores significativamente distantes para considerarse miembros de una nueva especie(11). Asimismo se llevaron a cabo análisis de las secuencias del RNA 16S (12). Paradójicamente, aunque los valores de similaridad de la secuencia son elevados, son bajos si se consideran los porcentajes de similaridad a nivel intragenérico. El estudio taxonómico de estos aislamientos bacterianos ha representado el hallazgo de una nueva especie que hemos denominado atendiendo a su origen, *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 (11), y cuya cepa tipo es *P.antarctica* NF3 CECT 4664.

EL MATERIAL EXTRAMURAL SECRETADO POR *Pseudoalteromonas antarctica* NF3

Si bien el estudio taxonómico comentado ha dado lugar al hallazgo de una nueva especie bacteriana, no podemos considerar resuelto el estudio de la función desempeñada por el singular material extramural abundantemente secretado por esta bacteria al medio de cultivo (13) (Figura 2).

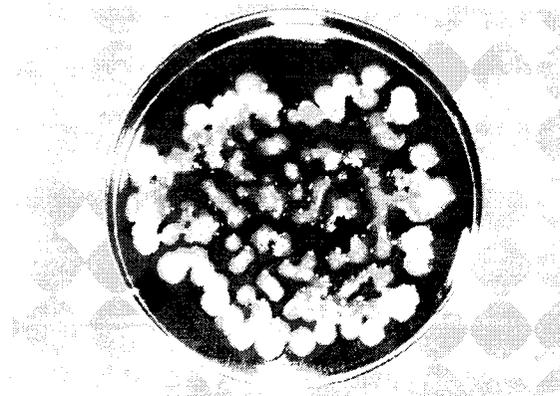


FIGURA 2. Morfología colonial típica de *Pseudoalteromonas antarctica* (NF3), en TSA durante diez días a 15°C.

La descripción inicial de este exopolímero ha supuesto la apertura de varias líneas que corresponden a otros tantos especialistas en campos relativamente alejados de la microbiología.

En efecto los materiales extramurales acumulados por *P.antarctica*, presentan aspectos muy interesantes entre los integrantes del **dominio*** Bacteria.

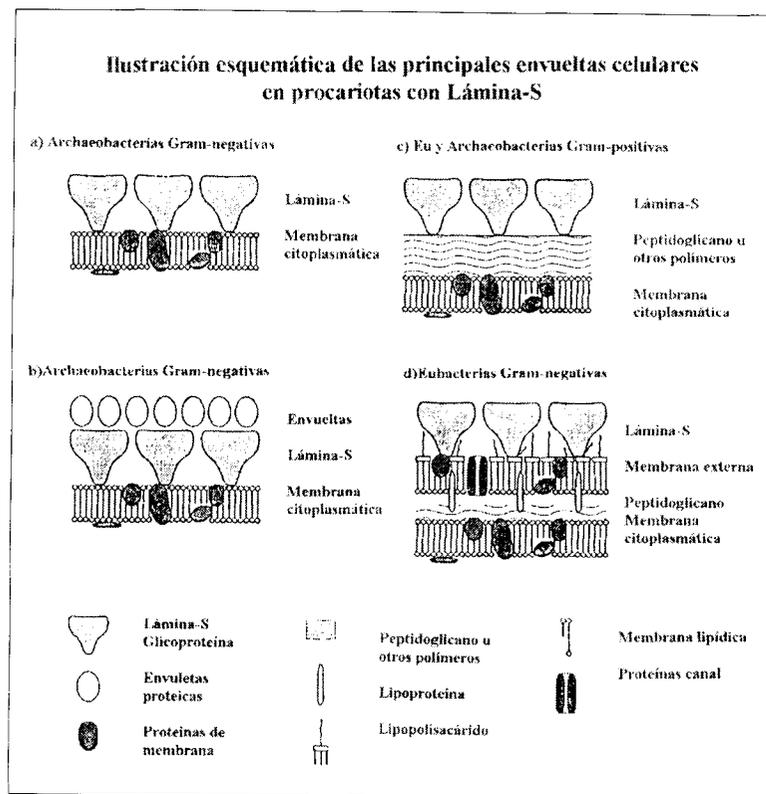


FIGURA 3. Ilustración esquemática de la arquitectura molecular de las principales envueltas de la célula procariota.

***dominio:** Nivel taxonómico superior que refleja diferencias evolutivas profundas. Se reconocen tres dominios: Archaea, Bacteria y Eucarya.

El primer aviso surgió al advertir el aspecto mucoso de las colonias desarrolladas indistintamente sobre medios convencionales, como el Trypticase Soy Agar (TSA) o medios mínimos constituidos por glucosa como única fuente de carbono y energía (13). El análisis del exopolímero manifestó la presencia de una proteína glicosilada. Tradicionalmente, la presencia de glicoproteínas en las envueltas de los procariotas se consideraba prácticamente inexistente, aunque, a partir de 1991, Messner comprueba que forman parte de algunos componentes estructurales (14).

Pero para proporcionar una coherencia histórica al contenido de este discurso, considero oportuno que la información subsiguiente se estructure en los apartados siguientes: glicoproteínas estructurales en procariotas, la lámina S ó RS, glicoproteínas no estructurales, caracterización del exopolímero de *P.antarctica* (NF3), interacción con los liposomas y otros aspectos aplicados y ecológicos.

GLICOPROTEÍNAS ESTRUCTURALES EN PROCARIOTAS: LA LÁMINA S

En la organización de las envueltas celulares de las bacterias, la lámina S representa una de las estructuras menos conocidas (Figura 3).

Se trata de una membrana externa, cuya ultraestructura observada al microscopio electrónico mediante sombreado metálico, se muestra en forma de una red cristalina que puede ser cuadrada, hexagonal u oblicua. (Figura 4). Las unidades morfológicas están compuestas de hexámeros, tetrámeros ó dímeros. En las arqueobacterias se suele presentar una simetría hexagonal (Figura 5).

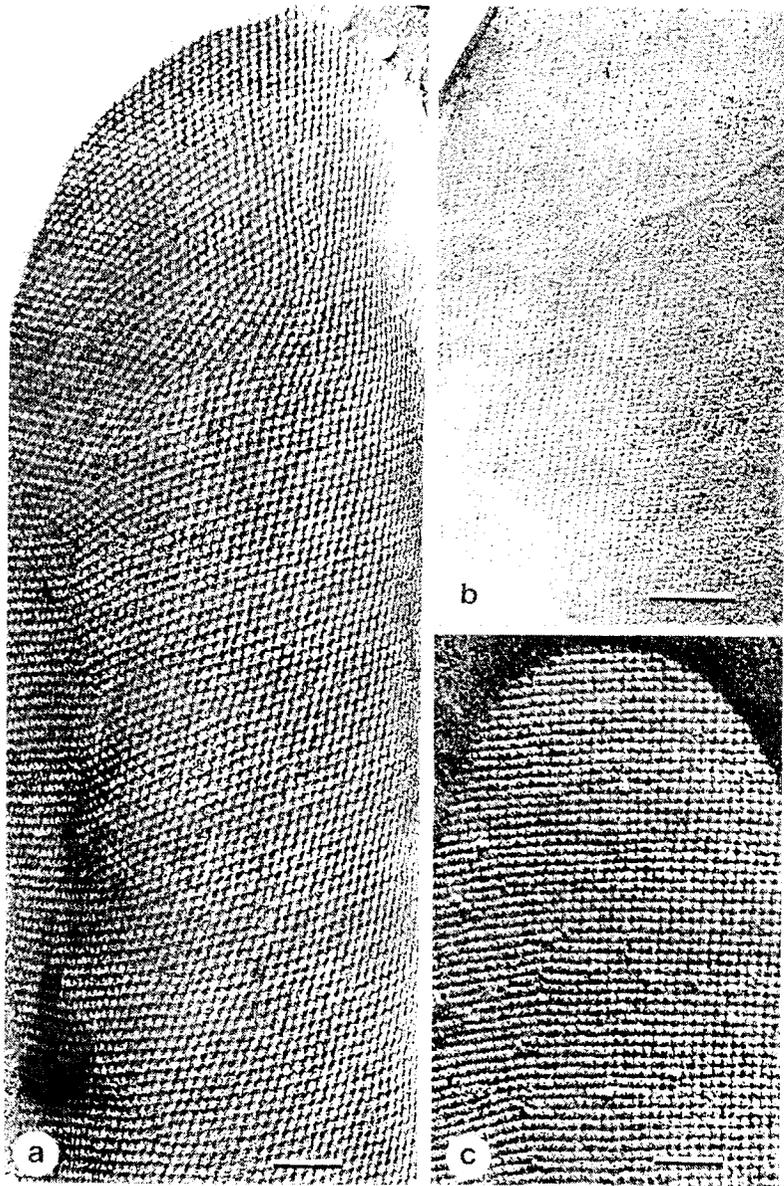


FIGURA 4. Micrografía electrónica de preparaciones correspondientes a células intactas (a) *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (hexagonal), (b) *Bacillus stearothermophilus* (oblicua), (c) *Desulfotomaculum nigrificans* (cuadrada). (barra = 100 nm).

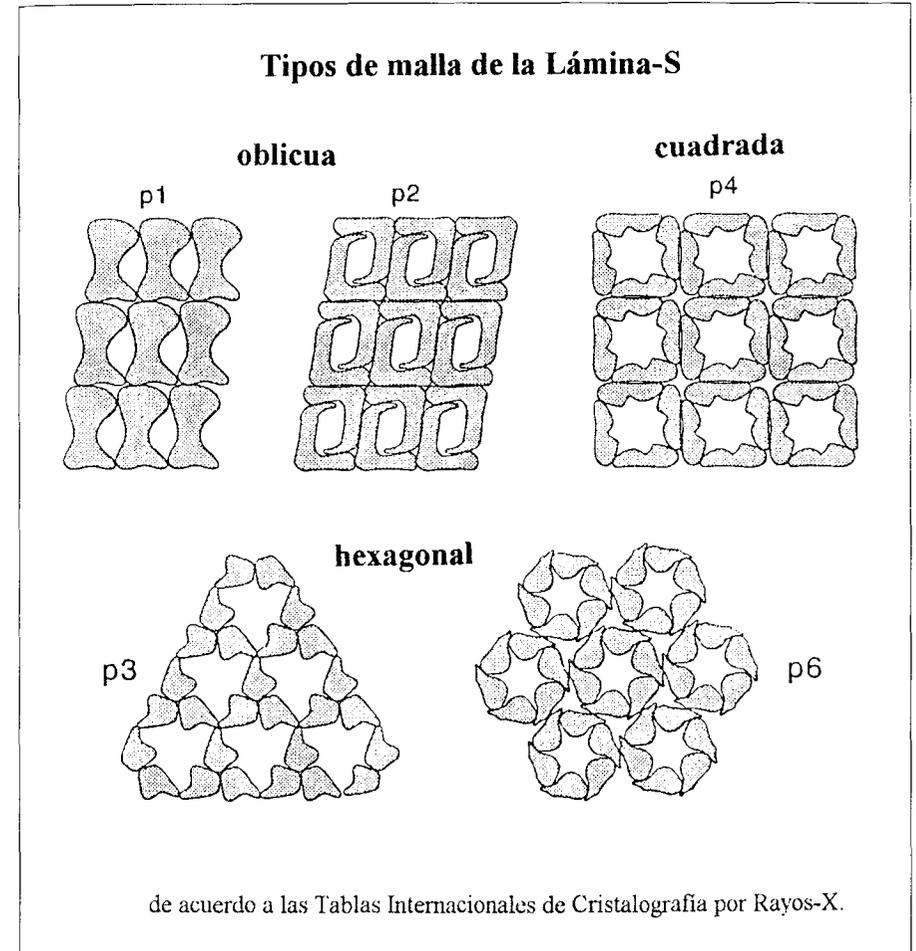


FIGURA 5. Ilustración esquemática de los tipos de lámina S. Las unidades celulares están compuestas de mono-, di-, tri-, o hexámeros.

Bajo el punto de vista histórico, debe señalarse que los primeros datos que hacen referencia a la lámina S, corresponden a comienzos de la década de los cincuenta, cuando Murray puso a punto técnicas de sombreado que permitían su observación.

Sobre esta base, Houwinck, en 1953, ya advirtió de la existencia de un monoestrato macromolecular en fragmentos de la envuelta celular de especies de *Spirillum* (15). Más tarde, en 1963, el propio Murray describe el uso de técnicas de tinción negativa destinadas a la visualización de la lámina S en especies de *Aquaspirillum* (16).

La lámina S se ha detectado en un número importante de especies pertenecientes a la mayoría de los grupos bacterianos. En el caso de las arqueobacterias, la lámina S puede ser la única capa u organización que cubre la membrana citoplasmática. Sin embargo, en procariotas del **dominio** Bacteria, ya sean Gram positivas o Gram negativas, esta estructura, en ocasiones está constituida por varios estratos que pueden alcanzar un apreciable grosor. Por otra parte, en las descripciones usuales de la lámina S, se afirma que suele estar constituida por una molécula proteica-base que se enlaza con algunos hidratos de carbono.

Asimismo, se ha constatado que las moléculas aisladas de esta estructura son capaces de autoensamblarse, es decir, pueden reconstruirse y formar láminas similares o idénticas a las que se forman cuando envuelven las células. En cierto modo, podría pensarse que las láminas S serían membranas primitivas formadas exclusivamente por proteínas o glicoproteínas. Es coherente, pues, que las proteínas que constituyen estas láminas sean resistentes a los enzimas proteolíticos y a los agentes desnaturizantes de proteínas. Es probable que la glicosilación, modificación covalente de la molécula proteica, desempeñe un papel importante como estabilizador de la estructura molecular. Al tratarse de moléculas relativamente evolucionadas, se comprende que, hasta la mitad de la década de los setenta, se sostuviera que la presencia de proteínas glicosiladas quedase restringida a los organismos eucariotas (17).

Mescher y Strominger, en 1976, describen detalladamente la glicoproteína de la lámina S perteneciente a una arqueobacteria, *Halobacterium salinarum* (18). Estos hallazgos constituyen el punto de partida para que varios investigadores interesados en estas moléculas localizadas indistintamente en bacterias del **dominio** Archaea y Bacteria, profundizasen en su conocimiento. Para algunos, su hallazgo o detección, sólo es fruto de la pericia del investigador. La mayoría de los especialistas sugiere que su presencia es constante en las bacterias de vida libre, pero bajo condiciones de laboratorio, en cultivo, al desaparecer la presión selectiva correspondiente a su ecosistema de origen, pierden la lámina S, sobre todo al transferirse a un medio de cultivo líquido. Bajo este enfoque sería una estructura no esencial para la integridad estructural de la célula o al menos para su crecimiento y viabilidad en un ambiente de laboratorio.

Parece evidente que la mayoría de las láminas S de las arqueobacterias están glicosiladas. En cambio, entre las eubacterias, las proteínas glicosiladas sólo se localizan en algunos grupos. Su presencia se constata en la familia Baciláceas y algunos representantes de *Lactobacillus* sp. En general, las arqueobacterias contienen la fracción glicano formada por cadenas cortas de azúcares, normalmente hasta diez, aunque Lechner y Wieland, en 1989, describen un glicano sulfatado, de mayor longitud, en *Halobacterium halobium* (19).

Normalmente, la mayoría de las cadenas glicano se unen a la cadena de polipéptido mediante puentes de nitrógeno a través del aminoácido asparagina. Son frecuentes las uniones glucosa-asparagina, N-acetil-galactosa-asparagina, ramnosa-asparagina y entre la treonina y la fracción glicano. En las eubacterias, la fracción glicano de las láminas S suele estar constituida por cadenas más largas, de holo o heteropolisacáridos, que forman bloques repetitivos. Las glicoproteínas en las láminas de las eubacterias suelen abundar en enlaces de oxígeno, en detrimento

de los enlaces a través de nitrógeno. Las uniones más usuales se establecen entre tirosina-glucosa o tirosina-galactosa.

Como he comentado, las láminas S constituyen sistemas de autoensamblaje. La energía y la información para su ensamblaje está contenida en los monómeros proteicos que normalmente están asociados entre ellos de una forma no covalente y con los componentes internos de la célula mediante una combinación de enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Como normalmente sus proteínas tienen un elevado contenido de aminoácidos no polares, las interacciones hidrofóbicas pueden contribuir a la estabilidad de esta estructura. Otras láminas S se encuentran estabilizadas por cationes divalentes a través de aminoácidos ácidos. Lógicamente la estrategia de su aislamiento es función de su estabilidad. En el caso de *Azotobacter vinelandii*, la lámina S pudo aislarse mediante el lavado de las células con agua destilada (20). En otros casos, como sucede con varias eubacterias, los componentes de la lámina S pueden solubilizarse a bajas concentraciones de urea o cloruro de guanidina. Con el empleo de estas técnicas se puede extraer esta estructura, normalmente disociada en forma de sus componentes monoméricos. Las láminas intactas de bacterias y arqueobacterias suelen ser resistentes a detergentes no iónicos como el Triton X-100. Hay casos singulares que demuestran su estabilidad, como sucede con *Deinococcus radiodurans*, cuya lámina S solamente se disocia con un 2% de dodecilsulfato sódico a 60° C (21). Para el caso de una arqueobacteria, *Thermoproteus tenax*, sólo se alcanza su disgregación a temperatura de ebullición y obviamente en presencia de SDS (22).

Respecto a la biosíntesis de la fracción glicano de la lámina S es imprescindible citar la revisión de Sumper y Wieland, aparecida en 1995 (23) con *Halobacterium halobium*.. Estos autores identifican a una sola transferasa comprometida en la

transferencia glicosídica. König (24) detectó en *Methanotermus fervidus*, la presencia de nucleótidos activados para monosacáridos y para oligosacáridos. Respecto a los transportadores lipídicos, se ha señalado la presencia del undecaprenol y dolicoles de once y doce unidades isoprénicas (17). Debe señalarse, asimismo, que en una eubacteria como *Bacillus alvei* se ha detectado la existencia de nucleótidos activados para oligosacáridos y dolicoles de C55, como intermediarios de la vía biosintética de la glicoproteína de la lámina S.

Respecto al reconocimiento de los genes codificadores de las glicoproteínas de la lámina S debe comentarse que se han clonado y seleccionado para el caso de las arqueobacterias halófilas *H. halobium*, *H. volcanii* y la bacteria metanogénica, *M. fervidus*. En cambio, es escasa la información que se posee para el **dominio** Bacteria.

Los estudios de adsorción de las proteínas glicosiladas de la lámina S en células enteras han mostrado que pueden unirse indistintamente a una gran variedad de materiales hidrofílicos, e hidrofóbicos, cargados positiva o negativamente. Es el caso del distinto poder de fijación de *Bacillus stearothermophilus* PV72. En las poblaciones celulares provistas de lámina S su capacidad fijadora a distintos sustratos y estabilidad a distintos ambientes es mayor que en el caso de las poblaciones carentes de esta estructura. En general, la información actual señala que la lámina S es un sistema muy eficaz de interacción respecto a partículas y materiales de distinta naturaleza física, favoreciendo la adherencia de células a superficies sólidas.

Otra situación presumiblemente controlable por la lámina S es la derivada de su estructura isospórica, de tal forma que al constituir una red homogénea alrededor de la célula puede

controlar la salida de exoproteínas o quizás prevenir su liberación (25), de tal forma, que en hábitats acuosos muy diluidos, la presencia de esta red cristalina puede representar una ventaja selectiva. Con este enfoque, Graham y col (26) comentan que la existencia de la lámina S en las bacterias Gram positivas podría suponer la configuración de un compartimento exterior a la membrana citoplasmática, análogo al espacio periplasmático de las bacterias Gram negativas (27). Esto mismo sucedería con la lámina S de las arqueobacterias, carentes de pared celular rígida. Esta afirmación está fundamentada en los estudios de esta estructura a ME, en la arqueobacteria *Thermoproteus tenax*. En ella, aparecen por su cara interna unas protusiones que alcanzan a la membrana citoplasmática (28). Estas zonas de anclaje facilitarían la estabilidad de un espacio de 24 nm entre membrana y lámina S.

Asimismo, es escasa la información disponible sobre la función biológica que pueda desempeñar la fracción glicano de las glicoproteínas de la lámina S. Únicamente se disponen datos concluyentes que conciernen a su papel en el mantenimiento y estabilidad de la morfología de halobacterias y metanobacterias (29). En efecto, la pérdida del enlace entre la fracción glicano-aminoácido (Glc-Asn) desencadena la transformación o el paso de forma bacilar hasta forma esférica. Esta situación no puede verificarse en las eubacterias porque la compleja estructura física de su pared impide observar estas alteraciones, aunque es posible que la presencia de glicoproteínas confiera una ventaja selectiva en eubacterias carentes de lipopolisacáridos u otros compuestos que contengan glúcidos, como es el caso de cápsulas, glicocáliz y ácidos teicoicos.

Sin embargo, se sospecha que la presencia de láminas S ó RS es más frecuente de lo que se creía hace unos años. Paralelamente, se acepta que su participación debe ser mayor en otras responsabilidades celulares si se considera el coste metabólico

que supone su síntesis. Actualmente, se plantea que su estructura en red pueda actuar excluyendo y separando sistemas enzimáticos desfavorables como muramidasa y proteasas. La lámina S puede funcionar como armadura protectora evitando la acción de bacterias depredadoras como *Bdellovibrio* (30). En cambio, no está claro si actúa con la misma eficacia frente a determinados protozoos.

GLICOPROTEÍNAS DISTINTAS A LA LÁMINA S

Con independencia a los comentarios señalados sobre la lámina S, debemos citar aquellos casos en los que se han detectado glicoproteínas localizadas en otros lugares de la célula bacteriana (Tabla 1).

Uno de ellos es la propia membrana citoplasmática. Este es el caso de *T.acidophilum* (31), que posee hasta un 32 % (peso/volumen) de proteínas ligadas a una fracción glucídica muy ramificada, abundante en restos manosa unidas por enlaces alfa 1-2. Pero, asimismo, se cita la presencia de glicoproteínas en membranas de eubacterias como en *Micrococcus luteus* y *Myxococcus xanthus*. La glicoproteína de la última especie tiene un peso molecular aproximado de 74.000 Daltons, con un 13.5% de contenido glucídico. La fracción glicano está compuesta en su mayoría de azúcares neutros, con pequeñas fracciones de hexosaminas y ácidos urónicos.

Por otra parte, entre las glicoproteínas procariotas más estudiadas cabe destacar a los denominados celulosomas o subunidades degradadoras de celulosa de *Clostridium thermocellum*. Esta bacteria produce una celulasa termoestable muy activa asociada a un complejo de elevado peso molecular denominado celulosoma. Los celulosomas se encuentran en la superficie celular que está revestida con la malla de

glicoproteína que forma la lámina S. Este complejo degradador de celulosa se ha detectado también en *Bacteroides cellulosolvens*. En ocasiones, los celulosomas se encuentran libres en el medio de cultivo de estas especies bacterianas. La analítica, centrada en el estudio de las fracciones glicano, detecta un contenido glucídico que oscila entre el 5% y 7% (p/v). Los enlaces covalentes entre ambas fracciones se establecen a través de puentes de oxígeno entre los residuos de galactofuranosa y treonina, prolina y serina. Como sucede en otros casos, no existe una evidencia directa que aclare la misión desempeñada por la estructura oligosacárida de la glicoproteína (32).

Las flagelinas figuran entre las glicoproteínas inicialmente descritas en la célula bacteriana. En general, en las arqueobacterias la flagelina suele contener componentes glucídicos sulfatados, unidos vía glucosa a la asparagina mediante un enlace de nitrógeno. Asimismo se ha descrito con rigor la naturaleza glicosilada de las flagelinas de varios representantes de las eubacterias. Me refiero a especies de *Azospirillum* y *Campylobacter* (33).

Entre las glicoproteínas secretadas al medio, conviene establecer dos criterios prácticos: a) no se han detectado en el caso de las arqueobacterias y b) las eubacterias que acumulan glicoproteínas, en la mayoría de los casos son sustancias provistas de actividad enzimática. Se trata, pues, de moléculas de considerable importancia aplicada.

ORGANISMOS

TIPO DE LIGANDO

Glicoproteínas en lámina S

Archaeobacteria

Halobacterium halobium (salinarium)

Glc-Asn

GalNAc-Asn, Gal-thr

Methanothermus fervidus

GalNAc-Asn

Methanosaeta soehngenii

Rha-Asn

Thermococcus stetteri

N.D.

Archaeoglobus fulgidus

N.D.

Sulfurococcus mirabilis

N.D.

Eubacterias Gram-positivas

Bacillus stearothermophilus

Rha-Ash

Bacillus thermoaerophilus

O-glicano

Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus

Gal-Tyr

Clostridium sp

N.D.

Desulfotomaculum nigrificans

N.D.

Lactobacillus buchneri

Glc-Ser

Corynebacterium glutamicum

N.D.

Eubacterias Gram-negativas

Aquaspirillum sinusum

N.D.

Glicoproteínas no constituyentes de lámina S

(a) Glicoproteínas asociadas a membrana

Archaeobacteria

Thermoplasma acidophilus

GlcNAc-Asn

Eubacterias

Micrococcus luteus

N.D.

Bacteriodes nodosus

N.D.

Myxococcus xanthus

N.D.

Clostridium thermocellum

Gal-Thr

Bacteriodes cellulosolvens

Gal-Thr/(Ser)

Borrelia burgdorferi

N.D.

(b) Glicoproteínas asociadas a la superficie (pili)

Archaeobacteria

<i>Halobacterium halobium</i>	Glc-Asn
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	N.D.
<i>Sulfolobus shibatae</i>	N.D.
<i>Thermoplasma volcanium</i>	N.D.
<i>Methanospirillum hungatei</i>	N.D.
<i>Methanothermus fervidus</i>	N.D.

Eubacterias

<i>Streptococcus salivarius</i>	N.D.
<i>Spirochaeta aurantia</i>	N.D.
<i>Azospirillum brasilense</i>	N.D.
<i>Campylobacter coli</i>	N.D.
<i>Neisseria meningitidis</i>	2,4-diacetamido-2,4,6-tricoxyhexosa-Ser

(c) Glicoproteínas secretadas

Eubacterias

<i>Cellulomonas sp.</i>	N.D.
<i>Streptomyces lividans</i>	Man/GalThr
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	N.D.
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Man-Ser/Thr
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	Man-Thr
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , antígeno 55-Kda	N.D.

(d) Glicoproteínas celulares

Eubacterias

<i>Bacillus megaterium</i> , factor PG-1	N.D.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	N.D.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N.D.
<i>Streptococcus sanguis</i>	GlcNA-Asn
<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>	GlcNAC?-Asn

Abreviaturas: Asn, asparagina; Thr, treonina; Ser, serina; Tyr, tirosina; Glc, glucosa; Gal, galactosa; Man, manosa; Rha, ramnosa, N.D., no determinado.

TABLA 1. Detección y distribución de glicoproteínas en organismos procariontes.

Hace aproximadamente unos veinte años que se han caracterizado celulasas extracelulares procedentes de una especie de *Cellulomonas*. Entre ellas destaca la presencia de dos enzimas, la celulasa A y la celulasa B, claramente identificadas como glicoproteínas al responder positivamente a la reacción de Schiff y por su retención en columnas de concanavalina A sepharosa. Warren y col. hallaron enzimas de la misma naturaleza en otra especie de *Cellulomonas*, *C.fimi*. Se trata de una glucanasa y una xylanasa que, obviamente, reaccionan al reactivo de Schiff y se unen a la concanavalina. La fracción glucídica de estas enzimas abunda en manosa, que se une mediante puentes de oxígeno a la treonina. En este mismo sentido, se han obtenido glicoproteínas provistas de actividad xilanásica en medios filtrados procedentes de *Streptomyces lividans* (34).

En *Flavobacterium meningosepticum* (35) se ha aislado una acetilglucosaminidasa de función desconocida. La porción glucosídica, bien determinada, contiene residuos manosa terminales, que se enlazan mediante puentes de oxígeno a serina o treonina.

En cambio, destacaremos a dos glicoproteínas secretadas por *Corynebacterium sepedonicum* y *Mycobacterium tuberculosis* carentes de actividad enzimática (36). En el primer caso, se trata de una glicoproteína fitotóxica, con una porción glucídica que abunda en residuos de manosa y glucosa. La unión entre proteína y glicano se consigue mediante puentes de oxígeno entre la treonina y la manosa. Desde 1995 se ha señalado la existencia de una glicoproteína de 45 kDaltons en los filtrados de *M. tuberculosis* (37).

GLICOPROTEÍNAS CELULARES

Es claro que no hay localizaciones topográficas para las glicoproteínas citoplasmáticas de las células procariotas. Las publicaciones sobre glicoproteínas celulares son relativamente numerosas. Probablemente las más divulgadas corresponden a las proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* (38), que, para varias subespecies, se ha demostrado claramente su naturaleza. En cambio, no se ha conseguido demostrar que la toxina cristalina de *B.thuringiensis* subsp. *Israelensis* responda a una estructura química de naturaleza glicoproteica. Otras glicoproteínas celulares relevantes son las que se han identificado como autolisinas en *Clostridium acetobutylicum* que actúan sobre la pared celular y son ineficaces sobre proteínas, DNA y RNA. Su producción se controla a partir de DNA cromosómico. En el mismo sentido, Kawamura y Shockman mostraron que la autolisina de *Streptococcus faecium* es una glicoproteína que por cromatografía se resuelve en tres bandas positivas a la reacción tintorial de Schiff (39). Independientemente, se han citado glicoproteínas con actividad antitumoral a partir del extracto del contenido celular de la cepa *Su* de *Streptococcus pyogenes*.

Pero retornando al modelo de *P.antarctica* NF3, señalaremos que la síntesis de su polímero ocurre paralelamente a su crecimiento y su producción, expresada en peso seco y en un medio mineral, es del orden de 1 g de polímero/ g de célula. La naturaleza glicoproteica del mismo quedó definida mediante tinción de Schiff y otros métodos de detección específicos (Glico Track™ K-050). Posteriormente, se llevó a cabo el análisis cuantitativo de la fracción proteica y de la fracción glucídica de la misma. La hidrólisis de la fracción proteica reveló la presencia de 16 aminoácidos distintos (Tabla 2).

	Nombre	Mg AA/100g muestra	% AA
1	ASP	1704.76	11.56
2	GLU	1697.75	11.52
3	SER	858.70	5.82
4	GLY	820.79	5.57
5	HIS	248.29	1.68
6	ARG	525.52	3.56
7	THR	1837.76	12.46
8	ALA	2100.79	14.25
9	PRO	830.96	5.64
10	TYR	531.29	3.60
11	VAL	919.89	6.24
12	MET	273.54	1.86
13	ILE	569.19	3.86
14	LEU	891.76	6.05
15	PHE	301.84	2.05
16	LYS	630.89	4.28

TABLA 2.Relación de aminoácidos detectados en la fracción proteica de la glicoproteína de *P. antarctica* (NF3). Resultados expresados en porcentajes y en mg de aa/100 g de muestra.

El análisis de la fracción glucídica manifestó que ésta contiene predominantemente glucosa, además de pequeñas cantidades de galactosa, N-acetilglucosamina y N-actilgalactosamina. La relación molar de glucosa:galactosa:N-acetilglucosamina:N-acetilgalactosamina fue de 1:0.14:0.18:0.33. La determinación del peso molecular de la fracción proteica del exopolímero se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Como resultado de la electroforesis se separaron dos fracciones proteicas mayoritarias de Rf 0.17 y 0.64 respectivamente. El cálculo del peso molecular sobre la recta de regresión obtenida al representar el log₁₀ del peso molecular de las proteínas estandar, incluidas en la electroforesis, respecto a su Rg, ha dado

lugar a unos valores de 98kDa y 32 kDa para las fracciones proteicas.

La utilización de la técnica de microscopía de fuerza iónica, dió lugar a imágenes en las que se puede observar que la muestra analizada está compuesta de unidades repetitivas, separadas, de forma y tamaño homogéneo, con un diámetro de 14-15 nm y una altura de 0.6-0.7 nm. Es interesante tener en cuenta que la disgregación en subunidades se aprecia al observar soluciones del exopolímero purificado, de una concentración igual o inferior a 0.1 mg/ml. Por encima de esta concentración se observa la formación de un agregado compacto.

Al considerar las posibilidades presuntivamente interesantes que, bajo el punto de vista aplicado presentaba esta molécula, decidimos llevar a cabo otros análisis destinados a completar su perfil: me refiero a la evaluación de su toxicidad aguda y el ensayo de genotoxicidad de Ames. Para el primer caso se aplicó el procedimiento abreviado de Lorke, consistente en la administración por vía endovenosa de dosis de 10, 100 y 500 mgrs/Kg dispersados en agua estéril apirógena a poblaciones de ratones Swiss CD-1 de 30 gr. A los once días de su administración, la supervivencia era del 100% en todas las dosis aplicadas.

El ensayo de Ames destinado a la detección de la capacidad genotóxica de esta molécula, muestra que el producto ensayado no induce la reversión de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98, TA100 y TA 102 (40).

ESTUDIO DEL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA GLICOPROTEÍNA SECRETADA POR *P.antarctica* NF3

A raíz de estos resultados nos planteamos la posible interpretación de la función que pudiera desarrollar este exopolímero, ciertamente singular, si atendemos a dos parámetros: su naturaleza y la cantidad producida o acumulada. Pensamos que teníamos una probabilidad elevada de acierto al considerar que la bacteria, desconocida hasta ahora, habría permanecido en aquel lugar, incluida entre los hielos de un glaciar, durante centenares o millares de años. Su singular taxonomía refuerza esta hipótesis.

Por ello, es coherente que interpretásemos que la abundante e insólita cantidad de glicoproteína acumulada alrededor del cuerpo celular de este microorganismo reforzaba la idea de una posible finalidad relacionada con el mantenimiento de su propia viabilidad, que, como ya hemos señalado, es una bacteria carente de elementos específicos de resistencia. Así pues, relacionamos a la glicoproteína procariota con otras glicoproteínas exclusivas de algunos vertebrados, como es el caso de algunos peces adaptados a zonas polares. En este caso, estas moléculas glicoproteicas poseen un claro efecto crioprotector, de tal forma que permiten a estos vertebrados mantener una actividad metabólica normal en entornos caracterizados por sus bajas temperaturas (-0,5 -2,3 C°).

Si se cumpliera este modelo, habría que recordar una vez más el principio de la bioquímica unitaria de Van Niel: la naturaleza diseña moléculas y vías metabólicas similares para llevar a cabo las mismas funciones.

Este planteamiento se confirmó con el análisis de nuestra glicoproteína, llevado a cabo en colaboración con el Prof. Rubinsky de Berkeley. Efectivamente, se demostró que el exopolímero secretado por *P. antarctica* está comprometido en la modificación de los cristales de hielo, propiedad, que hasta ahora, se creía reservada a las glicoproteínas de peces. Es más, las concentraciones de proteína bacteriana capaces de modificar los cristales de hielo son similares a la de las glicoproteínas de peces. Asimismo, el propio Rubinsky ha constatado la capacidad de esta molécula para disminuir el punto de congelación, aunque en órdenes de magnitud inferiores. Pese a estos resultados, no se puede establecer un modelo evolutivo convergente entre las glicoproteínas de organismos procariotas y eucariotas. No es riguroso, entre otras razones, porque el nivel actual de conocimientos sobre proteínas y glicoproteínas anticongelantes es relativamente escaso.

Los primeros hallazgos parten de Scholander y col. (41) que, en 1954, demostraron la supervivencia de algunos peces de la costa del Labrador en aguas marinas a temperaturas bajas, del orden de $-1,9^{\circ}\text{C}$ y en presencia de cristales de hielo. A pesar del hallazgo, estos investigadores no pudieron averiguar la naturaleza química del producto responsable de este comportamiento, llamándole “soluto anticongelante”. Más tarde, en el año 1969, De Vries y Wolhlschlag publican en *Science* (42) que habían conseguido el aislamiento del “soluto anticongelante” a partir de la sangre de un nototénido. Se trataba de una macromolécula proteínica con un peso molecular entre 2,5 y 35 kDa. Eran glicoproteínas con un tripéptido repetitivo (al-al-thr) y un disacárido fijado al oxígeno del hidroxilo residual de la treonina. La denominación recibida para estas macromoléculas fue la de glicoproteínas anticongelantes (AFGP). Estos mismos autores, en 1982, comprobaron la existencia de estas glicoproteínas en otros peces como el bacalao, habitual de aguas septentrionales. Posteriormente, fueron identificados compuestos proteicos con propiedades

anticongelantes pero carentes de grupos prostéticos. Estos compuestos se han denominado polipéptidos anticongelantes o AFP y han sido denominados tipos I, II, III y IV en orden a su descubrimiento.

Las AFP de tipo I, fueron identificadas por Duman y De Vries en 1976 en el pez platija *Pseudopleuronectes americanus* (43). Es un grupo de proteínas, con siete compuestos activos, ricos en alanina (60%) y un peso molecular entre 3,3 y 4,5 kDa. Son proteínas anfifílicas y en sus alfa hélices se proyecta, por un lado, aminoácidos hidrofílicos, mientras que, en el opuesto, se encuentran los hidrofóbicos. Las AFP de tipo II se han descrito en trabajos publicados entre 1986 y 1990 por los grupos de Hew y col. respectivamente (44). Tienen un peso molecular superior al tipo I del orden de 14 kDa. y una estructura en β con cinco puentes disulfuro. Son proteínas abundantes en cisteína. Se han aislado de *Hemitripterus americanus* o cuervo de mar. Otras proteínas similares al tipo II se han aislado también del arenque y de algunos insectos. Kao y col. en 1986 aislaron por vez primera un tipo de AFP al que denominaron clase III, procedente del *Macrozoarces americanus*, perteneciente a la familia de los zoáridos. Son proteínas que tienen un peso molecular entre 5 y 6.7 kDa. No son ricas en alanina ni se aprecian residuos de cisteína, tampoco se aprecian estructuras secundarias. En los zoáridos de la Antártida se han encontrado proteínas de la clase III (45). A comienzos de 1997 se ha descrito una nueva clase de glicoproteínas, la clase IV, aislada del plasma de *Myxocephalus octodecimspinosus* (46).

La síntesis de anticongelantes conlleva una adaptación paralela a nivel renal que, en otras especies, se manifiesta por la ausencia de glomérulos, de tal modo que la orina no se produce por filtración sino mediante un proceso de secreción continua. De esta forma se evita una síntesis permanente de anticongelante, con el consiguiente ahorro del gasto metabólico. Una segunda

roturas celulares y la capacidad de almacenamiento de agua que sufren los tejidos, a causa de la formación de grandes cristales de hielo, en productos de textura compacta, como es el caso de las carnes. Las proteínas anticongelantes pueden evitar recristalizaciones, ayudando al mantenimiento de la textura impidiendo el aspecto granuloso de algunos alimentos congelados (48).

En el mundo farmacéutico, el empleo útil de glicoproteínas se constata en la preservación celular bajo condiciones de hipoxia. Tras episodios graves, como embolias e IAM, aparece un periodo de tiempo crítico en el que se desencadenan graves lesiones celulares a causa de una ausencia anómala de oxígeno. Datos preliminares, sugieren que las glicoproteínas anticongelantes pueden actuar protegiendo a las células de una hipoxia aguda. Finalmente, en la tecnología de la reproducción se han recogido distintas experiencias que confirman la utilidad de estas moléculas. Son ejemplos divulgados, el incremento de la viabilidad de los oocitos de cerdo, almacenados indistintamente a temperaturas hipotérmicas y criogénicas. Lo mismo sucede con oocitos bovinos, mantenidos a temperaturas hipotérmicas, y el espermatozoide equino, sometido a un rápido enfriamiento y un mantenimiento posterior a temperaturas criogénicas (49).

INTERACCIONES ENTRE LA GLICOPROTEÍNA DE *P.antarctica* Y LIPOSOMAS

Un aspecto interesante, derivado de las propiedades de la glicoproteína secretada por *P.antarctica* NF3, es el que se deriva de su interacción con los componentes de la membrana de los liposomas de fosfatidilcolina (PC). Este interés se fundamentó en dos hallazgos experimentales concretos. El primero, descrito

por de la Maza y col., en 1998 (50), se refiere a la visualización, a través de microscopía electrónica, de cortes obtenidos por criofractura de liposomas preparados con una mezcla de glicoproteína. En esta situación, aparecen unas estructuras resultantes de la absorción o fijación de la glicoproteína a la bicapa que forma la membrana del liposoma. El recubrimiento completo se consigue con una relación PC/GP de 9/1. Cantidades superiores de glicoproteína proporcionan una estructura multicapa (51). En segundo lugar, los mismos autores han detectado un incremento de la estabilidad de estos liposomas recubiertos al someterse a la acción del dodecilsulfato sódico.

Estos resultados confirman las perspectivas en el uso aplicado de la glicoproteína de *P.antarctica* en la modificación de los liposomas que, por otra parte, han experimentado una constante evolución desde hace aproximadamente veinticinco años. Es indudable que estas vesículas atrajeron el interés de la industria farmacéutica y cosmética. Como es sabido, la idea inicial, más entusiasta que real, proclamó que mediante los liposomas se conseguiría una forma de estuchar en un vehículo, un producto activo, que sería liberado en el lugar deseado. Pero, como pudo constatar en la década de los setenta, los liposomas inyectados por vía endovenosa no conseguían alcanzar los blancos esperados. Sin embargo, aunque los primeros liposomas incumplían el modelo de Ehrlich, resultaron útiles al aportar numerosos datos que incrementaban sus posibilidades aplicadas. La inclusión de medicamentos de una forma estable en liposomas permitiría una administración lenta a una velocidad regulada gracias al comportamiento controlado de estas pequeñas estructuras semejantes a células formadas por fosfolípidos naturales.

D.Papahadjopoulos y col. (52) estudiaron con rigor las propiedades de la permeabilidad, el efecto de la presión

osmótica y el estado de organización de los liposomas en función de la temperatura. Estos especialistas pudieron establecer que los liposomas más estables eran aquellos que poseían carga negativa, con cadenas de hidrocarburos saturados más largos y con un contenido en colesterol del orden del 30% (53). Además, pueden retener sustratos muy versátiles. De hecho, se han podido estuchar centenares de productos en el pequeño compartimento acuoso de los liposomas e incluso, intercalarse entre los componentes de su propia membrana.

Sin embargo, tras el diseño y perfeccionamiento de distintas clases de liposomas por bioquímicos y biofísicos, lo cierto, es que los ensayos farmacológicos mostraron severos obstáculos que desmantelaban el modelo de la bala mágica de Ehrlich. La primera noticia descorazonadora fue la constatación de su destrucción en un medio hostil, como el torrente circulatorio. Los elementos formes y el plasma, a fin de cuentas, el medio a través del cual los liposomas viajan hacia su blanco, desestabilizan y destruyen en pocos minutos a estas vesículas creadas por el hombre.

Este grave problema que afecta al funcionalismo liposómico se solventó parcialmente, como se ha comentado, al proteger la membrana liposómica con colesterol (53). De esta forma se conseguía una mayor resistencia a las proteínas plasmáticas, alcanzándose una estabilidad relativamente interesante, en la que estos nuevos liposomas se mantenían estables durante algunas horas. Pero aún existía otro obstáculo pendiente de superación. Los liposomas introducidos por vía endovenosa eran reconocidos y destruidos con rapidez por elementos del SRE. Los macrófagos integrantes del sistema mononuclear fagocítico, (células de Kupffer, macrófagos alveolares del pulmón, macrófagos de la piel, de los ganglios linfáticos y del bazo, microglía del SNC, etc), están perfectamente preparados para extraer cuerpos extraños del torrente circulatorio y tejidos, y

niveles pese a que los liposomas tienen una apariencia normal, no tardan en ser eliminados por estos elementos celulares tan eficaces.

Ante esta situación, los especialistas en este campo diseñaron estrategias interesantes. Una de ellas, muy ingeniosa, consistía en inyectar, en primer lugar, dosis masivas de liposomas vacíos, que, a modo de señuelo, obviamente serían neutralizados por los macrófagos. Así se conseguiría la posible llegada hasta el objetivo esperado de una segunda remesa de liposomas que, en esta ocasión, contendrían el fármaco adecuado. Sería un diseño semejante al que se utiliza con la administración simultánea de ácido clavulánico y amoxicilina. Como es sabido, el primero, dada su mayor afinidad, se combina con las β -lactamasas, dejando paso libre a la amoxicilina que puede impactar contra el blanco específico (PBP) de la pared bacteriana.

Basándose en estos avances sobre el comportamiento de los liposomas en el torrente circulatorio, se planteó, años más tarde, el empleo del SRE como sistema adecuado para concentrar determinados fármacos y actuar así como un mecanismo "depot", de tal manera que, encapsulando agentes antiinfecciosos y antiparásitos de toxicidad elevada, se podrían tratar episodios infecciosos intracelulares severos. De esta forma se evitaría parcialmente su efecto al quedar incluidos en los macrófagos. Así se podrían tratar algunas infecciones parasitarias, víricas, bacterianas y micosis profundas. Es el caso descrito por G.L. Berestein con la anfotericina B, que en 1989, consiguió salvar a varios pacientes estuchando liposomas con este antibiótico antifúngico (54). De una forma semejante, sucedió con la doxorrubicina, molécula específica de la quimioterapia anticancerosa. Convenientemente modificada y administrada en forma de liposomas, G. Storm, en 1988, consiguió una liberación controlada, de tal forma que se vertía lentamente a la sangre, pero también por las células del sistema

retículo endotelial, al ser absorbida por los macrófagos. A finales de los ochenta, la elaboración de los liposomas experimenta otro paso adelante. En esta ocasión, el cambio consiste en la modificación de los liposomas combinando su membrana con grupos de carbohidratos. En 1991, Allen, Papahadjopoulos y Garbizon (52) conseguían crear liposomas cercanos a los eritrocitos, que evitarían al SRE durante varios días. Desarrollos posteriores han conseguido estabilizar la cubierta liposómica, constituyendo los liposomas "stealth" o liposomas furtivos, mucho más estables, hasta el extremo de circular en pacientes durante una semana.

Estos hallazgos permiten disponer de liposomas cuya vida media es muy variable, entre algunos minutos y algunas horas, según el tamaño y carga. Si se trata de liposomas "stealth", la vida media se incrementa sesenta veces. Incluso después de 48 horas, pueden encontrarse en sangre hasta un 20% de ellos.

AUTOENSAMBLAJE DE LA GLICOPROTEÍNA

En hábitats naturales, sobre todo acuáticos, es frecuente observar que los polímeros de origen microbiano se estructuran generalmente como películas unidas a las células. En nuestro caso y atendiendo al origen de esta molécula, es una aclaración obvia. Pero además, es frecuente que se produzcan autoensamblajes espontáneos durante la formación de fases específicas tales como películas, membranas, vesículas y micelas. Este comportamiento indica que las subunidades de esta glicoproteína están programadas con la información necesaria para asociarse sin margen de error y formar estructuras supramoleculares adecuadas para llevar a cabo una función determinada (55).

De la Maza y col. (56) en 1997, han comprobado este fenómeno asociativo, observando directamente a la glicoproteína a través de microscopía electrónica de transmisión, confirmando que las estructuras lamelares no sonicadas probablemente estaban constituidas por tres subunidades entrelazadas entre sí y estabilizadas por fuerzas de tipo hidrofóbico.

Los estudios de las propiedades de la glicoproteína en medio acuoso se llevaron a cabo a distintas concentraciones, a efectos de correlacionar estas propiedades con el autoensamblaje de este compuesto en agua. Con esta finalidad, se realizaron controles sistemáticos de la variación de la tensión superficial y del estado de la glicoproteína, empleando dispersiones que contenían un rango de esta molécula comprendida entre 0.05mg/ml a 0.5 mg/ml en agua. La variación de la tensión superficial respecto a la concentración variable de la glicoproteína se expresa en la Figura 6.

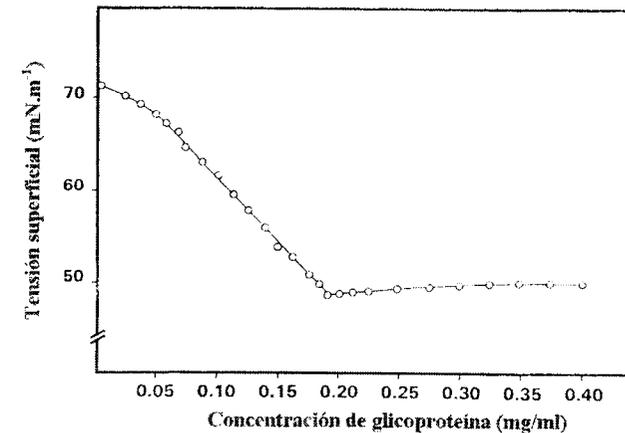


FIGURA 6. Variación de la tensión superficial de una dispersión acuosa de glicoproteína de *P. antarctica*, respecto a distintas concentraciones de la misma expresadas en mg/ml.

En ella se observa que cantidades crecientes de glicoproteína producen un descenso acusado de la tensión superficial de las dispersiones acuosas investigadas. A partir de una concentración aproximada de 0.20 mg/ml, los valores observados de la tensión superficial no se alteran aunque se incremente la concentración de glicoproteína. Este comportamiento señala que este compuesto tiene propiedades tensioactivas a muy bajas concentraciones.

El cambio súbito en la curva de los valores de tensión superficial, a concentraciones de glicoproteína próximas a 0.20 mg/ml, sugiere la existencia de dos estados de agregación de este compuesto, obviamente en función de su concentración en agua.

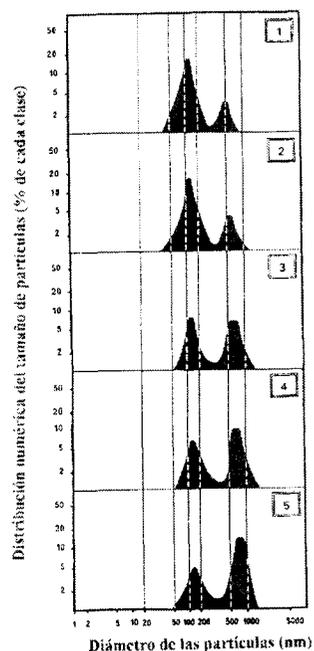


FIGURA 7. Curvas de distribución del tamaño de partículas, expresadas en función del diámetro de las mismas (nm). La dispersión corresponde a cinco concentraciones de glicoproteína en agua (1) 0,10 mg/ml, (2) 0,15 mg/ml, (3) 0,20 mg/ml, (4) 0,25 mg/ml, (5) 0,30 mg/ml.

En la Figura 7, se muestran las curvas de distribución del tamaño de partículas a cinco concentraciones de glicoproteína en agua (1) 0,10 mg/ml, (2) 0,15 mg/ml, (3) 0,20 mg/ml, (4) 0,25 mg/ml (5) 0,30 mg/ml. En todos los casos, las curvas han mostrado una distribución bimodal. Cantidades crecientes de glicoproteína producen un descenso progresivo del número de partículas, que corresponden al tamaño inferior y un aumento concomitante de las partículas de mayor tamaño. La concentración de 0,20 mg/ml corresponde aproximadamente a una dispersión en la que se produce un equilibrio en el número de partículas de las mismas dimensiones. En la Figura 8 se expresa la variación del promedio del tamaño de partículas respecto a su concentración.

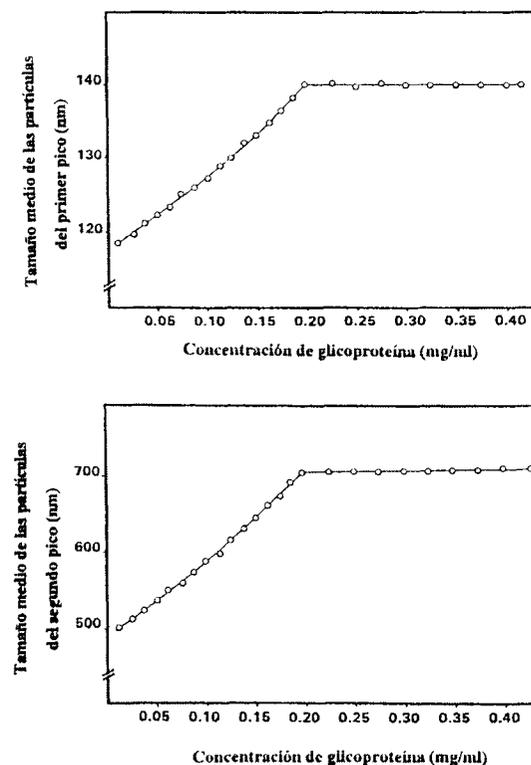


FIGURA 8. Variación del tamaño medio de las partículas correspondientes, (A) al primer pico y (B), al segundo pico de las curvas de distribución del tamaño mostradas en la Fig.7; respecto a la concentración de glicoproteína expresada en mg/ml..

El tamaño medio de las partículas de los dos agregados aumenta a medida que se incrementa la concentración de glicoproteína en agua, en el primer caso entre 120-140 nm y en el segundo entre 500-700 nm. Entre ambos casos el nivel máximo en el tamaño se consigue a 0,20 mg/ml de agua. Con el aumento de las cantidades de glicoproteína se produce un incremento de la proporción de agregados grandes con respecto a los pequeños, aunque el promedio de los dos permanece constante y es independiente de la concentración de glicoproteína en agua. A partir de estos resultados, se puede asumir que una concentración de glicoproteína de 0,20 mg/ml está correlacionada con un cambio drástico en las propiedades físico-químicas y de agregación de estas dispersiones y, por consiguiente, con las propiedades de ensamblaje de este compuesto en agua.

Para dilucidar la hipótesis de agregación de este compuesto en agua, de la Maza y col., en 1998, investigaron el comportamiento de la glicoproteína a dos niveles: por encima y por debajo respectivamente a 0,20 mg/ml (0,10 y 0,30 mg/ml de agua). Para este fin se recurrió a la observación a MET y el estudio de las imágenes digitalizadas (56). La información recogida corresponde a la observación de la glicoproteína dispersada en agua, en un caso, y convenientemente sometida a sonicación en el mismo medio, en otro. Las dispersiones no sonicadas han mostrado en todos los casos la coexistencia de dos estructuras distintas: agregados concéntricos multilamelares (agregados grandes) y partículas unilamelares pequeñas. De acuerdo a datos anteriores, la proporción de agregados pequeños era más abundante a bajas concentraciones de glicoproteína. La sonicación de estas dispersiones reveló que cada lamela de los agregados iniciales plurilamelares estaba construida a partir de varias subunidades, mientras que las partículas unilamelares no manifestaban esta estructura desglosada en subunidades. En la Figura 9, se muestran los promedios de distancia interlamelar de agregados grandes no sonicados. Son del orden de 24 nm. En

cambio, en las mismas dispersiones sonicadas, la distancia oscila entre 7-8 nm.

De la observación de este comportamiento, puede asumirse que cada lamela de los agregados grandes estaba formada por tres subunidades enrolladas, estructuralmente estabilizadas. La transformación de Fourier de las imágenes digitalizadas de MET mostró que las muestras de las dispersiones no sonicadas presentaban un comportamiento anisótropo; en cambio, las muestras sonicadas presentaban una distribución isotropa. Es evidente, pues, que la sonicación conduce a una distribución homogénea sin una ordenación estructural preferente.

Por otra parte y a efectos de completar la configuración de estos agregados de glicoproteína, se estudió la posibilidad de que estas estructuras mantuvieran un volumen interno hermético. Los resultados mostraron que los colorantes ensayados, carboxifluoraceína y piramina no quedaban retenidos, de modo que este modelo de autoensamblaje involucra la formación de estructuras abiertas.

CAPACIDAD ENVOLVENTE DE LIPOSOMAS

Era un aspecto crucial porque, si se demostrara su capacidad de revestimiento, podrían plantearse aspectos aplicados interesantes. Para ello, era necesario visualizar esta posibilidad a nivel de microscopía electrónica y, en segundo lugar, verificar si fuera posible, cambios en las propiedades de los liposomas, presuntivamente alterados o transformados por la glicoproteína. Para elucidar cómo estas estructuras revisten y protegen a las esferas liposómicas de PC, se decidió estudiar y observar mediante MET, con técnicas de criofractura, muestras de liposomas tratadas con glicoproteína (57). En la Figura 10 se detallan diversos aspectos. Las micrografías 1 y 2 corresponden a imágenes de liposomas externamente revestidos. Las cuatro micrografías restantes se refieren a liposomas preparados en presencia de glicoproteínas. En los dos casos, la proporción en peso de PC:GP es del orden 8:2. En la micrografía 1 se detecta a través de una discontinuidad de la superficie la capa de glicoproteína envolvente que rodea al liposoma.

La misma imagen aumentada muestra que esta lámina envolvente de glicoproteína está constituida por una estructura plurilamelar que envuelve herméticamente la superficie de la esfera liposómica. En las micrografías 3 y 4 se revela que la estructura que cubre al liposoma, en esta ocasión, tratada previamente con glicoproteína, la fosfatidilcolina muestra un aspecto similar. En una visión ampliada de los tipos de liposomas se puede apreciar indistintamente que la cubierta de glicoproteína responde a una estructura pluriestratificada.

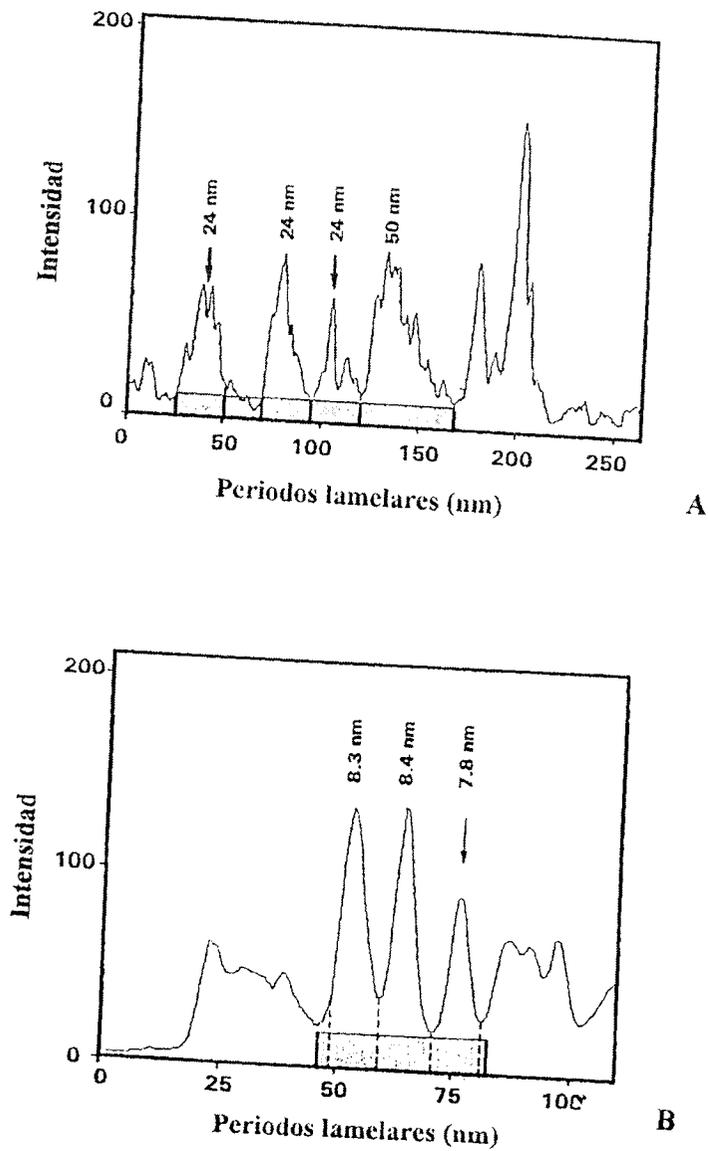


FIGURA 9. Perfiles de imágenes digitalizadas de agregados grandes de proteínas obtenidas a MET. En A, se expresan los periodos lamelares correspondientes a muestras no sonicadas. En la imagen B se presenta la misma muestra sonicada.

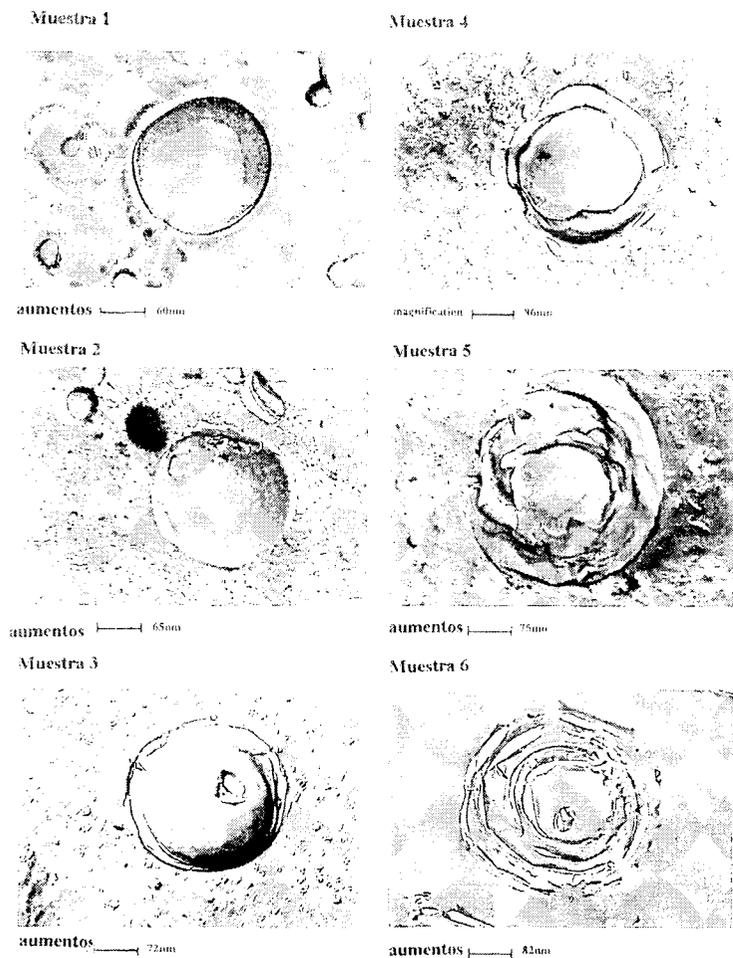


FIGURA 10. Micrografías de liposomas formados en presencia de cantidades crecientes de glicoproteína. La concentración de la bicapa lipídica permanece constante (5,0 mM). La muestra 1 presenta un liposoma puro y las muestras 2,3,4,5 y 6 presentan los agregados liposoma /glicoproteína, en una proporción de peso PC:GP 9:1, 8:2,7:3,5:5, y 5:5 respectivamente (imágenes obtenidas por criofractura).

Para estudiar con detalle la estructura pluriestratificada de la lámina de glicoproteína envolvente, se llevó a cabo un estudio del análisis de imagen de las micrografías 2 y 5 de la figura anterior. El perfil de la micrografía 2 muestra que la estructura pluriestratificada tiene un grosor del orden de 25 nm, concordante con el tamaño medido en experiencias anteriores. El periodo de la distancia media de la estructura multicapa, conformada por nueve láminas era alrededor de 2,3 nm. Estos valores se repiten para el caso del segundo modelo liposómico (micrografía 5) aunque, en su estructuración, se detectan cinco láminas. La comparación de los dos perfiles muestra, pues, una estructura similar para los dos tipos de liposomas, aunque el número de láminas externas que cubren los liposomas preparados en presencia de glicoproteína era prácticamente la mitad de la que se había observado para liposomas recubiertos externamente (56).

Pero, como se ha señalado, era necesario llevar a cabo un segundo ensayo comparativo que mostrase alguna alteración diferencial en el comportamiento de liposomas PC, liposomas tratados con glicoproteína después de su elaboración y liposomas preparados en presencia de glicoproteína. En la Figura 11 se muestran con claridad los cambios porcentuales medidos a través de un espectrofotómetro de luz dispersa (static light scattering, SLS) respecto a la concentración de detergente SDS. El incremento de dodecilsulfato es concomitante con un descenso de los valores de SLS, hasta alcanzarse la completa solubilización del liposoma, a pesar de la presencia de estructuras envolventes. Sin embargo, no hay duda que la cantidad de detergente necesaria para producir el mismo efecto solubilizador es distinta para cada modelo de liposoma, destacando la estabilidad de aquellos que se han preparado conformándose en presencia de glicoproteína. Los ensayos paralelos llevados a cabo con otros detergentes, como el T_{X-100} , consolidan el efecto protector de estas estructuras plurilamelares de glicoproteína, que cubren la membrana liposómica. El efecto,

es similar, aunque aparecen variaciones dependientes de las características físico-químicas de cada surfactante, de tal modo que la misma relación PC:GP manifiesta una protección ligeramente inferior a la observada ante detergentes aniónicos (51,56).

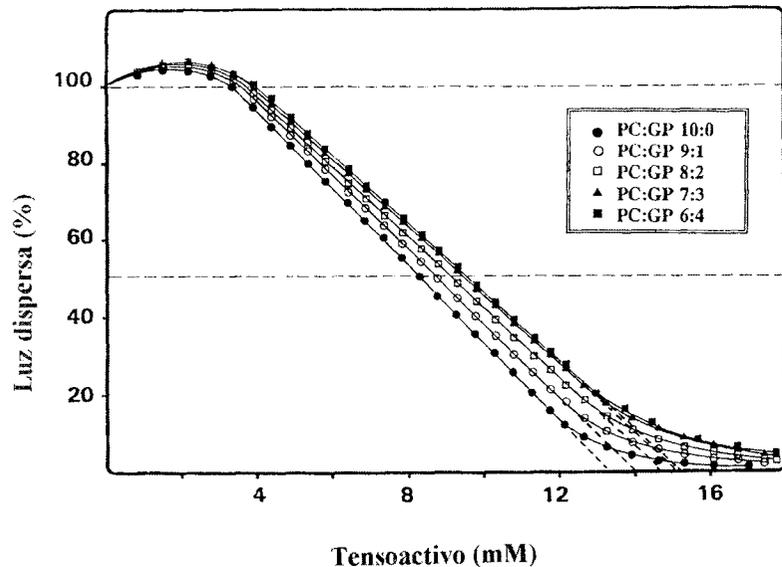


FIGURA 11. Cambios porcentuales en luz dispersa de liposomas puros (●), liposomas externamente recubiertos con GP (○), y aquellos preparados en presencia de GP (◻), frente a la acción de SDS (proporción peso PC:GP 8:2). La concentración de PC en los liposomas era 5,0 mM.

En el panorama experimental de la glicoproteína secretada por *P. antarctica* existen aspectos que no han respondido a los planteamientos previstos. Como conocíamos su capacidad autoensamblante y de revestimiento de estructuras e incluso células, como se ha verificado con espermatozoides, se planteó

la posibilidad de que dicha glicoproteína pudiera revestir la estructura de algunos virus. Si así sucediese, cabría esperar que los ligandos víricos quedasen bloqueados y, por consiguiente, impidiesen su unión a los receptores de las células diana, anulándose de esta forma su capacidad infectiva.

La adherencia de los virus a las células diana, constituye la primera fase de replicación de un virus. Es una etapa mediada por la interacción de una proteína vírica de adherencia y el receptor correspondiente de la superficie celular. El bloqueo de esta unión es el objetivo de nuevos fármacos antivíricos (58). De hecho, se ha demostrado la capacidad inhibitoria de algunos polímeros, como el sulfato de dextrano, poli-L-lisinas, heparina o péptidos N-acilados, que impide la adsorción de determinados virus, como el herpes simple, o el virus de la inmunodeficiencia humana. En este sentido Boyd y col., han presentado, en 1997, el descubrimiento de la cyanovirina N, una proteína extraída de una cianobacteria, *Nostoc ellipsosporum*, capaz de inactivar el virus HIV por bloqueo de la glicoproteína gp 120 de la superficie del virus (59).

A partir de esta estrategia experimental, E. Mercadé, (comunicación personal) abordó las posibilidades bloqueantes de la glicoproteína sobre el adenovirus 5 (Ad5), virus de la familia Adenoviridae, de estructura icosaédrica, carente de envuelta lipídica; y sobre el virus herpes simple (VHS), de la familia Herpesviridae, con envuelta lipídica.

Para el primer paso, Mercadé utilizó como soporte la línea celular NP18, derivada de un tumor de páncreas humano. Es una línea celular sensible a la infección por adenovirus. Los niveles de glicoproteína corresponden a unas concentraciones de 0.8, 0.08 y 0.008 mg/ml. El adenovirus empleado (Ad5) es un virus recombinante portador del gen de la β -galactosidasa, expresada

bajo el control del promotor CMV del citomegalovirus (Ad.CMB- β gal), a una concentración de 10^9 ufp/ml. Es un modelo que representa una región de su genoma deleccionado y, por consiguiente, no se replica en células normales, pero no queda alterada su capacidad de unión y entrada en el interior de las células y dirigir su genoma al núcleo donde permanece en forma episomal y expresa el gen insertado. Es un sistema muy sencillo, que permite determinar fácilmente si se han producido las etapas de adsorción y entrada del virus, ya que se puede visualizar la expresión del gen β -galactosidasa mediante tinción X-Gal. Los ensayos realizados hasta el momento no permiten concluir que, al poner en contacto el adenovirus con la glicoproteína de *P. antarctica*, se produzca una interacción que se manifieste por una disminución de la efectividad del adenovirus frente las células NP18.

En el segundo caso, se procedió al estudio de la interacción de la glicoproteína de *P. antarctica* respecto a un virus provisto de doble envuelta, como es el caso del herpes humano 1 (VHS) (60). En el desarrollo experimental, se ha empleado como soporte la línea celular VERO, de morfología epitelial, derivada del mono *Cercopithecus aethiops*, muy sensible a la infección por el virus herpes simple. La cepa vírica procedente de una muestra obtenida a partir de un paciente afectado de un herpes labial, internado en el hospital Valle de Hebrón de Barcelona. Como es conocido, se trata de un virus de importancia clínica, responsable de episodios severos, como faringitis herpética, queratitis herpética, eczema, herpes genital, proctitis por VHS, meningitis y encefalitis, pudiendo permanecer en estado latente después de una primera infección. Actualmente se han detectado cepas resistentes al aciclovir. La glicoproteína, estéril, liofilizada y suspendida en el medio adecuado para el crecimiento celular, se ha ensayado a niveles de: 4.0, 1, 0.5, 0.1 mg/ml en una serie y de 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 mg/ml. A estos rangos de concentraciones no se aprecia un efecto inhibitorio sobre el grado de infectividad del virus Herpes Humano I. Únicamente y de una forma puntual, sin

poder estandarizarse, se han observado bloqueos erráticos en la expresión vírica. Asimismo, cuando la glicoproteína se mezcla directamente con la suspensión del virus previamente preparada, se ha detectado un número inferior de focos infectivos, aunque, hasta el momento, no se ha podido determinar una relación dosis respuesta repetible y rigurosa.

ECOSISTEMAS ACUÁTICOS EXTREMOS: FUENTES DE UNA MICROBIOTA DE INTERÉS APLICADO.

La consideración de los resultados y medidas comentadas invitan a una reflexión que nos devuelve a los primeros pasajes de este discurso. ¿Qué posibilidades de supervivencia y a caso de multiplicación posee un organismo sometido a unas condiciones ambientales inferiores a la congelación?. Es evidente que el mantenimiento de un organismo a unas temperaturas inferiores a la congelación supone una situación aparentemente singular, que precisa interpretarse de acuerdo a unos modelos biológicos específicos. En 1998, Psenner, R y col., señalan la presencia de organismos, que, aún en el periodo menos frío, permanecen en ambientes inferiores a -20°C (61). Existen datos, aparecidos en 1993, en los que Abyzov demostró la existencia de microorganismos viables retenidos en el hielo desde hace mil años en una situación de anabiosis (62).

Con todo, debe reconocerse la existencia de varias clases de hielo, algunas alejadas de la idea del hielo convencional. Por ejemplo, el hielo antártico no debe considerarse ligado permanentemente al sustrato terrestre, en ocasiones se desprende en forma de grandes bloques que pueden alcanzar distancias considerables al desplazarse a la deriva, o bien, tras un breve recorrido, fijarse al suelo. En esta situación, el hielo puede

almacenar una rica variedad de microbiota e, incluso, algas macroscópicas y crustáceos, porque a elevadas concentraciones salinas, se establecen unas condiciones que facilitan la existencia de un medio líquido intersticial. Isachenko, en 1951, afirma que en 1886 Frankel ya advertía de la presencia de bacterias en el hielo, aunque no precisaba cuál podría ser el mecanismo que permitiese sobrevivir en estas circunstancias a un número indeterminado de microorganismos (63).

Las prospecciones de distintas muestras de hielo señalan la presencia de microorganismos en el 20% de las mismas, si los estratos estudiados están comprendidos entre 0 y 100 metros. A mayor profundidad, entre 200 y 300 metros, solamente el 14% de las muestras albergan microorganismos viables. Esta disminución se comprueba al estudiar estratos comprendidos entre 330 y 1500 metros. Solamente un 6% de las muestras contiene microorganismos. Finalmente sólo se detecta un 3% de microorganismos viables en las muestras tomadas entre 1500 y 2405 metros de profundidad. En todos los casos, el tamaño de la muestra se recomienda que alcance un volumen comprendido entre 50 y 200 ml, porque alícuotas de 1-2 ml pueden encontrarse exentas de microorganismos. La diversidad microbiana hallada es importante y aunque la mayoría de las bacterias son cocos y bacilos, también se han detectado actinomicetos y fragmentos fúngicos. Algunas cepas acumulan pigmentos, particularmente melaninas. Estos pigmentos desempeñan un importante papel en microorganismos sometidos a un estrés ambiental, al estar provistos de radicales libres estables y mecanismos de óxido-reducción reversibles.

En este contexto, es importante señalar que se pueden conseguir reactivaciones de microorganismos que han permanecido en una situación de cripticidad durante miles y, para algunos autores, millones de años, mantenidos en esta situación gracias a las

bajas temperaturas y a la protección que el hielo les ha proporcionado frente a factores ambientales destructivos.

Como he comentado, el hielo es un sistema óptimo de protección, del que se han aislado, entre otras, las siguientes especies bacterianas formadoras de endosporas, *Bacillus megaterium*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. firmus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. popillae*, *Clostridium aurantibutyricum* y *Clostridium tertium*. Del grupo actinomicetal se han detectado tres géneros, *Nocardia*, *Nocardiopsis* y *Streptomyces*. Se ha descrito una especie nueva, *Nocardiopsis antarcticus* que procede de una muestra tomada a unos 85 metros de profundidad que corresponde a un estrato de unos 2200 años de antigüedad (64). Este hallazgo sugiere que el hielo puede contener especies extinguidas o prácticamente suprimidas por otros competidores más potentes. En general, la composición de la población microbiana retenida en el hielo no experimenta cambios significativos a medida que los glaciares avanzan hacia los límites del continente. Sin embargo, las superficies del glaciar se contaminan con bacterias albergadas en animales costeros y comunidades de plantas. No debe sorprender, pues, que en la superficie de los glaciares se detecten bacterias propias de aves como *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*.

Otra situación es la que corresponde al hielo que se ha internado en el mar. En estas circunstancias, es un sistema heterogéneo claro que comprende fases líquidas, sólidas y gaseosas. El hielo del mar es en realidad otra entidad natural y debe considerarse como una biocenosis distinta. Las capas de hielo que contactan con el aire se encuentran sujetas a fluctuaciones de temperatura tan oscilantes como las que se dan entre 0 y -40°C. La superficie interior está habitada por algas bentónicas y su fauna, también bentónica, está dominada por artrópodos y poliquetos. En la

superficie se suelen detectar algas verdes como *Chlamydomonas* y *Ancyclonema*. En 1984, Grossi comprobó que la concentración bacteriana detectable en los hielos libres se incrementa a medida que aumenta la concentración de diatomeas en la parte iluminada. Una tercera parte de las bacterias eran epífitos de *Nitzschia frigida*. Se trata, pues, de auténticas biocenosis, hábitats específicos con una interdependencia entre procariotas y eucariotas (65).

Pero las posibilidades de supervivencia de microorganismos en ambientes extremos, se extienden a otros modelos ciertamente curiosos. Me refiero al de los seres vivos endolíticos.

Es un sistema que, en principio, se describió para organismos terrestres, aunque posteriormente se ha comprobado su validez en ambientes sumergidos. El grupo investigador de referencia está dirigido por E. I. Friedmann de la universidad de Florida (66). El modelo endolítico es un mecanismo de adaptación que permite la supervivencia de líquenes, clorofíceas, levaduras, hongos filamentosos e incluso bacterias quimio-organotrofas en el pequeño espacio aéreo que proporcionan algunas rocas. Fredmann distingue dos modelos fundamentales de organismos endolíticos: kasmioendolíticos, si colonizan, como en el caso de los líquenes, grietas o fisuras de las rocas, y los criptoendolíticos, si habitan en pequeñas cavidades que existen en algunas rocas enteras o desmenuzadas de textura porosa. Si los colonizadores criptoendolíticos son organismos primarios fotosintéticos, sólo podrían situarse en el interior de las rocas translúcidas. De esta forma y a escasos centímetros de la superficie, reciben la energía luminosa necesaria. Se puede, pues, hablar de un nanoclima capaz de mantener organismos procariotas y eucariotas habitantes de cavidades microscópicas que han sido facilitadas por la estructura de la roca. Obviamente las características de las roca son fundamentales para permitir el acceso a estas comunidades trogloditas. En este sentido, importa

poco su naturaleza química- los microorganismos no penetran mediante la solubilización de la roca- y sí su estructura física: porosidad, color y transparencia. Sólo las rocas con grietas y poros facilitan el asentamiento de diversas poblaciones microbianas, alcanzándose incluso una distribución zonal en función de sus posibilidades fisiológicas (67).

Nuestro interés hacia este modelo surgió ante la detección de bacterias incluidas en los pequeños poros de un sedimento tomado en el mar de Weddell, a cuarenta metros de profundidad. El sedimento fue recogido en el año 1984, en un punto cuyas coordenadas corresponden a 63° 34' de latitud Sur y 56° 25' de longitud Oeste, a 0,4 millas de la costa. En todo momento se han mantenido a -35°C. La composición del sedimento, constituido mayoritariamente por elementos oscuros, correspondía a la de un silicato policatiónico que formaría parte de una labradorita degenerada. Entre sus componentes abundan elementos dotados de una textura porosa que alternan con otros constituidos por cristales de SiO₂. La materia orgánica expresada en carbono orgánico, del orden de 0,55%, permite el mantenimiento de una determinada microbiota.

La demostración del crecimiento de las bacterias relacionadas con estos granos de sedimento se fundamentó inicialmente en un procedimiento experimental muy sencillo, consistente en la colocación de 10 mg de granos de sedimento- cada grano posee aproximadamente un milímetro de diámetro- en una membrana filtrante de acetato de celulosa de tres micras de diámetro. Las partículas se lavan con cincuenta ml de Ringer estéril y, tras la filtración, que retiene sólo los granos de sedimento, se traslada hasta la superficie de una placa de petri que contiene agar-triptona-soja. A los cuatro días de incubación a 15°C, algunos granos de sedimento retenidos en la membrana presentan un desarrollo bacteriano fácilmente identificable, hasta el extremo de quedar incluidos en el centro de una colonia bacteriana.

Curiosamente la situación de las colonias presentaba en todos los casos una desviación significativa hacia los granos de sedimento de naturaleza porosa.

La consolidación de nuestra hipótesis se reforzó con la preparación de las muestras de sedimento para microscopía electrónica. La observación periódica de los granos de sedimento incubados a tiempos distintos mostraba un aumento progresivo de células bacterianas, que, durante las primeras horas, se localizaban únicamente entre las grietas de los granos de sedimento (Figura 12). A tiempos que corresponden a incubaciones prolongadas, del orden de 30-40 horas, las imágenes señalaban un aumento progresivo de células bacterianas, que forman verdaderos tapices que acaban englobando al grano de sedimento (68).

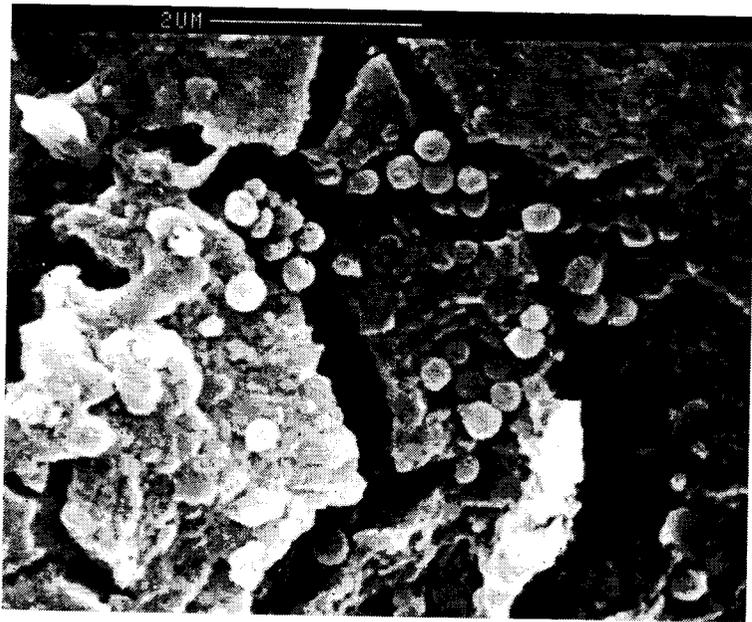


FIGURA 12. Modelo criptoendolítico. Bacterias endolíticas desarrolladas sobre un grano de sedimento. Durante los primeros días de incubación, las bacterias se localizan únicamente entre las grietas de los granos de sedimento. Barra: 2 μm .

El comportamiento endolítico de estas bacterias se garantizó al comprobar su desarrollo a partir de granos de sedimento esterilizados exteriormente con uvr y también mediante la observación directa en microscopía electrónica de barrido de las bacterias ubicadas en el interior de granos de sedimento cuidadosamente fragmentados. Con fracturas resueltas en dos unidades, se ha podido ubicar bacterias en una situación de cripticidad. Entre las bacterias detectadas, la población mayoritaria correspondía a un género identificado como *Planococcus*. Todas las bacterias aisladas no están provistas de endosporas u otros dispositivos estructurales aparentes que proporcionen una especial resistencia. Es un comportamiento intrigante, que mantiene la viabilidad de la microbiota integrada en estos granos de sedimento. En nuestro caso, a lo largo de 15 años de almacenamiento a -35°C , se han mantenido el mismo número de bacterias, 5000 ufc/g de sedimento.

Es claro que el modelo criptoendolítico es una forma de organización que representa la solución de viabilidad de algunos microorganismos en ambientes extremos. Es una forma de vivir que ha pasado inadvertida durante muchos años. Curiosamente, este singular ecosistema permite llevar a cabo una actividad metabólica mediante una combinación adecuada de temperatura y humedad. En este sentido, el grupo de Imre Friedmann ha señalado una curiosa convergencia morfológica y fisiológica entre ciertas algas endolíticas de la Antártida y otras aisladas de lugares tan tórridos como el Negev o el Sinaí. Se trata de organismos adaptados a temperaturas externas (altas o bajas) y una escasa biodisponibilidad de agua.

En cambio, los factores que controlan la distribución de bacterias en el mar libre, aunque complejos, se han estudiado con mayor intensidad respecto a las bacterias retenidas en el hielo. En ciertos momentos, los niveles celulares bacterianos que pueden encontrarse en el agua de mar oscilan entre 10^4 y 10^5

bacterias por mililitro (69). Parece claro que estas bacterias pueden alcanzar distancias considerables y, en determinadas ocasiones, lograr auténticas ofertas de otros hábitats muy favorables. Los sustratos físicos que actúan pues, como soporte pueden incluir superficies animadas e inanimadas. Entre los grupos bacterianos que figuran en los censos recientes cabe señalar la presencia de algunos que, hasta hace sólo unos años, se consideraban exclusivos de ambientes terrestres. Nos referimos a las actinomicetales, aunque el número relativo de las mismas es bajo.

Los hábitats marinos próximos a las costas antárticas, de donde proceden las muestras estudiadas, presentan una singularidad reconocida. Con anterioridad a los años ochenta, se sustentaba que los flujos energéticos en estos hábitats eran relativamente escasos y la cadena trófica estaba constituida básicamente por pocos eslabones. Se reconocía la existencia de un fitoplancton de un tamaño medio superior a los 35 μm , que constituía la base alimenticia para seres vivos más complejos, como aves, ballenas, etc. Sin embargo, en años posteriores, concretamente a partir de 1982, se reconoció que la cadena trófica anteriormente descrita era más compleja y había que admitir la existencia de otros organismos, herbívoros unos, depredadores otros, entre los que se reconocían copépodos, ostrácodos, etc. En definitiva, componentes de una cadena trófica compleja, que se inicia a partir de elementos microscópicos como las bacterias (70). Estos hallazgos se han consolidado al comprobar la existencia de complejidades estructurales y fisiológicas, con descripciones de mecanismos más sutiles, con ciertos fenómenos de antibiosis, limitaciones de crecimiento a causa de la presencia de trazas de elementos o vitaminas, materia orgánica disuelta, bacterias quimiolitotrofas o controles de población por virus pelágicos.

En este ambiente antártico hay que reconocer, además, la presencia de contrastes estacionales importantes que afectan al

fotoperíodo. En estas circunstancias, la productividad anual de buena parte de los hábitats marinos está dominada por fenómenos de un resurgimiento súbito de la actividad biológica en función de las estaciones anuales. Debe señalarse la singularidad de las actividades tróficas en esta zona de la Tierra, que puede estructurarse de acuerdo a cuatro fases caracterizadas por la fluctuación de la productividad. Al iniciarse la primavera, -octubre-noviembre- comienza una auténtica explosión poblacional de fitoplancton. Estas poblaciones están constituidas básicamente por células autótrofas, con una envergadura promedio superior a las 20 μm , principalmente diatomeas, que obviamente, utilizan una fuente de energía fotónica. Durante este período, se detectan concentraciones elevadas de nutrientes nitrogenados, que son incorporados a la biomasa en forma de nitratos. Al comienzo de esta fase primaveral, hay poca utilización de estos sustratos y la liberación de materia orgánica corpusculada está dominada por la migración y suave descenso de las algas desde la zona eufótica.

Con el comienzo del verano austral, -diciembre-enero-, el krill y otros representantes del macrozooplancton consumen buena parte de las algas acumuladas, y surge de nuevo un almacenamiento de materia orgánica corpusculada, dominada fundamentalmente por elementos fecales del krill. En estas circunstancias, el incremento de algas se equilibra a causa de un cociente entre consumo y producción próxima a la unidad. Las concentraciones de nutrientes se mantienen durante este período. En cambio, al finalizar en verano y entre los meses de enero y marzo, aparece un nuevo proceso caracterizado por la presencia de algas de un tamaño inferior a 20 μm , protozoos y bacterias heterótrofas. Aunque la exportación de materia orgánica corpusculada es inferior a la del período inicial del verano, no quiere decir que una de las características de esta fase consista en un incremento de heterótrofos consumidores de materia orgánica acumulada. Hay pues, un descenso claro de algas y un incremento de la biodisponibilidad de nitrógeno. En invierno, la

cadena alimentaria queda dominada por bacterias heterótrofas y quimiolitotrofas. Los organismos quimiolitotrofos crecen a expensas de residuos inorgánicos acumulados. La población total desciende y la materia orgánica disponible es indetectable. Este modelo, como ya hemos comentado, es más representativo de las costas y zonas terminales de glaciares. En el océano abierto, este ecosistema está caracterizado por una reserva inferior de algas, y tasas bajas de producción y exportación de partículas.

Una consecuencia de la fluctuación comentada en las biocenosis costeras es la adaptación a períodos alternativos de abundancia y penuria. Ante esta situación, hay que considerar que los organismos preparados para superar estas circunstancias necesitan mantener su integridad celular a niveles muy bajos de nutrientes, pero sin perder la capacidad para responder de una forma rápida y competitiva frente a cambios desfavorables, como autólisis, depredación, parasitismos, etc. Ante estas perspectivas, los organismos que no pueden crecer utilizan diversas estrategias. Baross y Morita (71) comentaban en 1978 que una de las consecuencias más detectables es la que afecta a cambios en el tamaño celular y su morfología. Estos autores han descrito disminuciones muy significativas del tamaño celular en organismos sometidos a un ayuno de nutrientes. Así, organismos con un tamaño cercano a 1,5 μm pueden estabilizarse a un tamaño de 0,4 μm .

Otra estrategia, bastante común es la que está relacionada con cambios morfológicos, siendo frecuentes las transformaciones que llevan a organismos bacilares hasta formas isodiamétricas. Según Andersson, parece ser que los protozoos depredadores de bacterias consumen preferentemente bacilos de gran tamaño. Generalizando, se podría comprender que algunos representantes bacterianos presentarían un tamaño reducido,

completamente distinto al presentado en medios de cultivo de laboratorio (72).

Estas estrategias permiten comprender que ciertos organismos consigan estabilizaciones muy prolongadas que les mantengan en circunstancias mediales muy desfavorables. Es probable que algunos puedan conseguir un equilibrio en su mantenimiento en unas condiciones de bajo consumo, a expensas únicamente de materiales procedentes de la muerte celular de distintos componentes de la biocenosis. Con todo, deben considerarse las limitaciones que presentan los estudios llevados a cabo con modelos bacterianos estudiados en el laboratorio. Son aproximaciones que posiblemente sólo representan de una forma parcial el auténtico comportamiento que tiene lugar en los puntos reales.

En 1981, Hodson señaló que las comunidades bacterianas antárticas presentaban una temperatura óptima de asimilación respecto a una variedad de sustratos orgánicos, en un rango comprendido entre 0 y 2°C (73). Con estos resultados podría entenderse que el desarrollo bacteriano estaba limitado a temperaturas propias de bacterias psicrófilas. Sin embargo, y como contraste, Hanson y col., en 1983, concluyeron que a temperaturas más elevadas, entre 0 y 15 °C, se incrementa considerablemente el crecimiento de comunidades propias de la Antártida.

Estas diferencias en cuanto a la comprensión definitiva de los modelos bacterianos que puedan desarrollarse en función de la temperatura, reflejan una variabilidad zonal, y en cualquier caso, la predominancia de los modelos psicrófilo o psicrotrófico es una cuestión abierta, porque siguen elaborándose propuestas respecto a las distinciones claras entre los dos modelos, Inniss (74), Morita (75). Lo cierto es que no son términos útiles para

referirse a unos hechos ecológicos particulares. Probablemente, los psicrotrofos son característicos de hábitats fríos, en donde la temperatura fluctúa estacionalmente, es decir, son funcionales a un rango de temperaturas más amplio. Los psicrofílos suelen localizarse con mayor frecuencia en hábitats acuáticos, donde las situaciones térmicas son más estables. Ello no quiere decir que en lagos permanentemente fríos, con una temperatura máxima de 5° C, o mares con temperaturas polares (máximas de -1°C), puede suceder que los organismos dominantes sean psicrotrofos en lugar de psicrofílos (75). Sin embargo, hay un riesgo derivado de una excesiva simplificación, porque la temperatura es una variable más, junto a otros factores, como la disponibilidad de agua y nutrientes, que influyen en la distribución de psicrofílos y psicrotrofos en un ambiente determinado. Una situación distinta es la que se produce en zonas antárticas interiores, auténticos desiertos helados y carentes de nutrientes, que sólo pueden estar colonizadas por algunos organismos, como sucede con ciertas levaduras descritas por Vishniac (76) y por nosotros (77).

Pero, como ya hemos señalado, existen además, otras variables distintas al factor temperatura, que influyen notablemente en la productividad en zonas en que las concentraciones de nitrógeno y fósforo son suficientemente elevadas para permitir una biomasa más importante. Probablemente, una de las hipótesis que se ha formulado con mayor frecuencia en los últimos años es la que se refiere a las limitaciones de crecimiento ocasionadas por la carencia de hierro (78). Debido a que esta clase de experimentación no es rigurosa a nivel de laboratorio, a causa de la elevada probabilidad de contaminaciones con trazas de hierro, se consideró oportuno llevar a cabo una operación de fertilización experimental con hierro en el océano abierto, concretamente en el Pacífico Ecuatorial. Este elemento fue añadido a una superficie de 64 Km², correctamente balizada, hasta alcanzar una concentración cien veces superior a la ambiental. La respuesta biológica al hierro fue

sorprendentemente rápida, comprobándose que la eficacia fotosintética aumentó a las 24 horas y, prácticamente, al tercer día se triplicó la concentración de clorofila y la productividad primaria. Este incremento de los organismos fotosintéticos produjo una pequeña, aunque detectable, disminución del CO₂ de las aguas superficiales. Estos resultados recientes ayudan a comprender la oscilación de las poblaciones de la microbiota oceánica.

En este sentido, durante la pasada década se han producido avances interesantes en la comprensión de algunos procesos correspondientes al polo Sur. Por ejemplo, se han abordado con relativo éxito algunos detalles que afectan a la microbiota heterótrofa, pero los datos cuantitativos de las tasas de productividad y de los mecanismos interrelacionados es evidente que requieren una metodología más rigurosa. Sin embargo, las perspectivas son brillantes, porque varios datos sobre ciclos biológicos de las zonas polares se han obtenido mediante satélites y sistemas autónomos equipados con sensores químicos y ópticos.

Por otra parte, no hay duda que los microorganismos del ambiente antártico constituyen un objetivo importante para el estudio taxonómico y para la obtención de nuevos productos de origen microbiano. Pero es evidente que, para descubrir nuevos productos de interés aplicado, resulta imprescindible el conocimiento y la comprensión de la microbiota productora (79).

Históricamente, el estudio de los productos naturales se ha dirigido hacia el conocimiento de las vías biosintéticas en vegetales y microorganismos telúricos. El estudio de las bacterias marinas se intensifica a finales de los años sesenta. Los resultados obtenidos durante los últimos años han sido positivos

para el aislamiento de nuevos fármacos. Parece que realmente hay microorganismos exclusivamente marinos. Ante tantas moléculas nuevas, muchas líneas de investigación están motivadas sobre ejemplos significativamente positivas; la bryostatina y el didemnin-B, son casos concretos. La primera es una lactona con una clara actividad anticancerígena e inmunoestimuladora. Los ensayos clínicos efectuados con esta molécula han mostrado regresiones significativas de episodios tipo linfoma, (salvo en los casos de linfoma de Hodgkin), melanoma y cáncer de cérvix. Sin embargo, su dosificación debe controlarse de una forma irreprochable dada su elevada toxicidad. El didemnin-B es asimismo un anticancerígeno. Es un depsipéptido con probada eficacia frente a determinados tipos de linfoma, aunque, como en el caso anterior, presenta efectos secundarios importantes.

Una consecuencia práctica de este largo proceso de prospección de nuevas moléculas es el mejor conocimiento de las bacterias marinas y, por consiguiente, se ha precisado el estudio de aquellos factores específicos necesarios para la producción de estas sustancias. En la Tabla 3 se especifican algunas moléculas obtenidas recientemente a partir de bacterias de origen marino. Como puede constatar, el origen de nuevos aislamientos está involucrado a fenómenos de mutualismos muy sutiles entre bacterias y espongiarios, bacterias y corales, bacterias e hidrozooos. En muchos casos pueden pasar desapercibidos en los muestreos de agua de mar (79).

Cepa productora	Origen	Actividad biomédica
<u>Actinomicetales</u>		
<i>Chainia purpurogena</i>	Sedimento	Antibiótico, anticancerígeno
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	Sedimento	Antibiótico
<i>Streptomyces griseus</i>	Sedimento	Antibiótico
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	Sedimento	Anticancerígeno
Maduromiceto	Sedimento	Antibiótico
<i>Streptomyces sp.</i>	Sedimento	Antibiótico
Actinomiceto	Sedimento	Antibiótico
Actinomiceto	Sedimento	Sin actividad señalada
Actinomiceto	Coral gorgoniano	Anticancerígeno, antibiótico
<i>Streptomyces sp.</i>	Medusa	Antibiótico, antiinflamatorio
<i>Streptomyces sp.</i>	Esponja	Antibiótico
<u>Bacterias no-actinomicetales</u>		
<i>Pseudomonas bromontilis (Alteromonas sp.)</i>	Alga	Antibiótico
<i>Chromobacterium sp.</i>	Agua de mar	Antibiótico
<i>Pseudomonas</i>	Agua de mar	Antibiótico
<i>Beneckea gazogenes (Vibrio)</i>	Marisma	Sin actividad señalada
<i>Alteromonas rubra</i>	No señalada	Broncodilatador
No identificada	Agua de mar	Sin actividad señalada
Especie gram-positiva no identificada	Sedimento	Anticancerígeno, antiviral
<i>Alteromonas sp.</i>	Esponja	Anticancerígeno
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	Sedimento	Anticancerígeno
<i>Vibrio anguillarum</i>	Pescado	Sin actividad señalada
<i>Alteromonas sp.</i>	Agua de mar	Inhibidor enzimático
<i>Alteromonas sp.</i>	Esponja	Antimicrobiano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ascidiario	Antimicrobiano
Especie gram-positiva no identificada	Sedimento	Anticancerígeno
<i>Thermococcus</i>	Hidrotermal	Antifúngico
<i>Bacillus</i>	Sedimento	Anticancerígeno
<i>Alteromonas luteoviolacea</i>	Agua de mar	Sin actividad señalada

TABLA 3. Moléculas obtenidas a partir de bacterias procedentes de biocenosis marinas (Jensen y Fenical)

Reflexionando sobre estos hechos, cabe preguntarse: ¿Los microorganismos de hábitats marinos representan especies únicas o son meras bacterias terrestres adaptadas?. En un ecosistema tan extenso y heterogéneo como el que corresponde al ambiente marino, se pueden localizar bacterias propias de ambientes hipotérmicos y otras adaptadas a zonas extremadamente frías. Además, existen dificultades añadidas, porque la producción de metabolitos secundarios interesantes puede efectuarse por más de una cepa; y compuestos distintos pueden acumularse por una misma cepa en condiciones culturales distintas. Esta observación se complica si se considera que pueden hallarse sustancias distintas provistas de actividad biológica, que han sido producidas por microorganismos similares adaptados a áreas geográficas muy alejadas. En general, los microorganismos aislados de ambientes marinos poseen características comunes respecto a los microorganismos de origen terrestre, aunque obviamente suelen presentar requerimientos fisiológicos distintos (80).

Las perspectivas que consideran el hallazgo de nuevas moléculas a partir de organismos procariotas quedarían incompletas si no se considerasen las posibilidades de los miembros pertenecientes al dominio Archaea. En efecto, desde el comienzo de la década de los noventa puede hablarse de una biotecnología sustentada en la utilización de estos organismos procariotas. Como es sabido, las arqueobacterias suelen colonizar nichos ecológicos muy específicos, normalmente distintos al resto de microorganismos. Se trata de reliquias evolutivas de las primeras formas de vida. Actualmente habitan ambientes extremos caracterizados por: altas temperaturas, valores de pH inasequibles a la mayoría de los restantes seres vivos, elevadas salinidades y anaerobiosis. D.A. Cowan (81) ha señalado el interés que representa el conocimiento profundo de las arqueobacterias. El estudio aplicado de estos microorganismos ha dado lugar a numerosas patentes.

Entre los hallazgos consolidados cabe señalar el uso de arqueobacterias en la producción de elevadas cantidades de poli- β -hidroxibutirato y poli- β -hidroxivalerato. Estos copolímeros se manufacturan por empresas importantes, que han considerado su explotación como una alternativa válida a la producción de otros plásticos. Bien es cierto que, en el caso de *Haloferax mediterranei*, los niveles de producción oscilan alrededor de 0.3g. de biopolímeros por gramo de peso seco y aunque su rendimiento es inferior al obtenido por otros microorganismos del dominio Bacteria, como es el caso de *Alcaligenes eutrophus*, el empleo de las arqueobacterias ofrece algunas ventajas claras. Entre ellas debe subrayarse el ambiente hipersalino en el que se mantienen que, obviamente, evita posibilidades de contaminación. Además, sus condiciones de crecimiento son muy ventajosas en zonas geográficas con clima y concentración salina adecuadas. Estas propiedades, junto al bajo coste de producción, su lisis espontánea en agua, que facilita la liberación del polímero intracelular y su considerable estabilidad genómica, han convertido estas arqueobacterias hálófilas en unos sistemas de producción prácticamente perfectos.

La aplicación clínica de la topoisomerasa II de *Halobacterium* ha sido descrita por Forterre en 1989. Con ella se puede evaluar la efectividad de fármacos antitumorales activos frente a las topoisomerasas II de las células eucariotas. Al poseer una sensibilidad idéntica, su uso facilita la prospección de nuevas moléculas provistas de actividad citostática. Más sorprendente ha resultado el empleo de una proteína de 84kD de *Halobacterium halobium*, que al poseer epítomos análogos a la proteína humana *c-myc*, producida por un oncogen y, hallada en el suero de algunos pacientes afectados de cáncer, permite establecer diagnósticos anticipados y rápidos de procesos tumorales.

Entre las arqueobacterias más difundidas destacan las metanógenas. Con su pequeño genoma, que no alcanza la mitad de *E.coli*, desarrollan un metabolismo que implica la reducción

del CO₂, con coenzimas propios y característicos, que utilizan como donadores de electrones al hidrógeno, acetato, butirato o formiato, según sus representantes. A parte de la tradicional producción de biogas a partir de materiales de bajo costo, presentan otras posibilidades interesantes ligadas a su especial perfil bioquímico. Es el caso del uso de las hidrogenasas metanogénicas y de los enzimas específicos de la vía reductora del CO₂ (82).

Al finalizar este discurso, permitidme subrayar una de las características más positivas que genera una línea de investigación abierta y compleja como la narrada. Quiero referirme a las personas interesadas e incluso entusiasmadas en los distintos aspectos surgidos tras el descubrimiento de un ser vivo. Microbiólogos, bioquímicos, biofísicos, médicos, químicos y empresarios, ligados a distintas facultades, CSIC y laboratorios farmacéuticos están trabajando desde sus respectivas especialidades. Para todos ellos, mi admiración, afecto y respeto.

He concluído.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baumann P and Baumann L. The marine gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel (Eds). *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. 2. 1302-1331. Springer-Verlag, Berlin. 1981.
2. Baumann P and Baumann L. Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckeia* and *Photobacterium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 39-61. 1977.
3. Baumann L, Baumann P, Mandel M and Allen RD. Taxonomy of aerobic marine bacteria. *J. Bacteriol.* 110: 402-429. 1972.
4. Llarch A, Logan NA, Castellvi J, Prieto J and Guinea J. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* sp. From geothermal environments on Deception Island, South Shetland archipelago. *Microbial Ecology*. 34: 58-65. 1997.
5. Gauthier G, Gauthier M and Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunits rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov. and proposal of Twelve New Species Combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45.n.4:755-761. 1995.
6. Baumann, P, Gauthier M J and Baumann L. Genus *Alteromonas*. In: Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MP, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW, Pfenning N, Sneath PHA, Staley JT, Lapage SP, Lautrop H, Ciston J, Niven CF (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 1. 343-352. 1984.
7. Ivanova EP, Kiprianova EA, Mikhailov VV, Levanova GF, Garagulya AD, Gorhskova NM, Yumoto N and Yoshikava S. Characterization and identification of marine *Alteromonas nigrifaciens* strains and emendation of the description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 223-228. 1996.
8. Akagawa-Matsushita, Koga Y and Yamasato K. DNA relatedness among non pigmented species of *Alteromonas* and synonymy of *Alteromonas haloplanktis* (Zo Bell and Upham 1944). Reichelt and Baumann 1973 and *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 500-503. 1990.
9. Matsui Y, Suzuki, S, Suzuki T and Takama K. Phospholipid and fatty acid composition of *Alteromonas putrefaciens* and *Alteromonas haloplanktis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 12: 51-53. 1991.
10. Svetashev VL, Vysotskii MV, Ivanova EP and Mikhailov. Cellular fatty acids of *Alteromonas* species. *Sys. Appl. Microbiol.* 18: 37-43. 1995.

11. Bozal N, Tudela E, Roselló Mora R, Lalucat J and Guinea J. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov. Isolated from Antarctic coastal environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 2: 345-351.1997.
12. Springer N, Ludwig W, Amann R, Schmidt HJ, Gorth HD and Sleytr KH. Occurrence of fragmented 16s rRNA in and obligated bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc. Natl. Acad. Science USA.* 90: 9892-9895.1993.
13. Bozal N, Manresa A, Castellví J and Guinea J. A new bacterial strain of Antarctica, *Alteromonas* sp. that produces a heteropolymer slime. *Polar Biol.* 14: 561-567.1994.
14. Messner P, Sleytr UB. Bacterial surface layer glycoproteins. *Glycobiology.* 1: 545-551. 1991.
15. Houwinck AL. A macromolecular monolayer in de cell wall of a *Spirillum* sp. *Bioch Biophys Acta.* 10: 360-366. 1953.
16. Murray RGE. On the cell wall structure of *Spirillum serpens*. *Can.J.Microbiol.* 9: 381-392.1963.
17. Kobata A. En "Biology of Carbohydrates", (Ginsburg V, Robbins PW, eds) vol 2 87-161. Wiley Sons. 1984.
18. Mescher MF, Strominger JL. Purification and characterization of a procaryotic glycoprotein from de cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J.Biol.Chem.* 251: 2005-2014. 1976.
19. Lecher J, Wieland F. Structure and biosynthesis of procaryotic glycoproteins. *Annu.Rev.Biochem.* 58: 173-194. 1989.
20. Bingle WH, Doran JL, Page WJ. Characterization of the surface layer protein from *Azotobacter vinelandii*. *Can.J.Microbiol.* 32: 112-120. 1986.
21. Baumeister W, Karrenberg F, Rachel R, Engel A, Heggler B, Ten, Saxton WO. The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R₁). Estructural and chemical characterization. *Eu.J.Biochem.* 125: 535-544. 1982.
22. König H, Setter KO. Studies on archaeobacterial S-layer. *Syst.Appl.Microbiol.* 7: 300-309. 1986.
23. Sumper M, Wieland F. Bacterial glycoproteins. "Glicoproteins" (Montreuil J, Vliegthart JFG, Schachter H, eds.).455-473. Eslevier 1995.
24. König H, Hartmann E, Kärcher U. Pathways and principles of the biosynthesis of methanobacterial cell wall polymers. *Syst.Annl.Microbiol.* 16: 510-517. 1994.
25. Sára M, Sleytr UB. Molecular-sieving through S-layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *J.Bacteriol.* 169. 4092-98. 1987.
26. Graham LL, Beveridge, Nanninga N. Periplasmic space and the concepte of periplasma. *Trends Bioch Sci.* 16: 328-329. 1991.
27. Breitwieser A, Gruber K, Sleytr UB. Evidence for an S-layer protein pool in the peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J.Bacteriol.* 174: 8008-15. 1992.
28. Messner P, Pum D, Sára M et al. Ultrastructure of the cell envelope of the archaeobacteria *Thermoproteus tenax* and *Thermoproteus neutrophilus*. *J.Bacteriol.* 166: 1046-1054. 1986.
29. Pum D, Messner P, Sleytr. Role of the S-layer in morphogenesis and cell division of the archaeobacterium *Methanocorpusculum sinense*. *J.Bacteriol.* 173: 6865-6873. 1991.
30. Koval SF, Hyness SH. Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J.Bacteriol.* 173: 2244-2249. 1991.
31. Yang LL, Hang A. Purification and partial characterization of a procaryotic glycoprotein from the plasma membrane of *Thermoplasma acidophilum*. *Bioch Biophys Acta.* 556: 265-77. 1979.
32. Lamed R, Bayer EA. Cellulosome concept: Exocellular/endocellular enzyme reactor for efficient binding and cellulolysis. En Aubert JP, Beguin P, Millet J et al de FEMS Symposium 43. "Biochemistry and genetics of cellulose Degradation". *Academic press.* N.Y.101-106. 1998.
33. Wieland F, Sumper PG. *Halobacterium flagellins* are sulfated glycoproteins. *J Biol Chem.* 260: 15180-5. 1985.
34. Ong E, Kilburn DG, Miller Jr et al. *Streptomyces lividans* glycosilates the linker region of a β -1-4glycanase from *Cellulomonas fimi*. *J.Bacteriol.* 176: 999-1008. 1994.
35. Plummer JR, Tarentino, AL, Hauer CR Novel specific o-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. *J.Biol.Chem* 270: 13192-13196.1995
36. Fifist T, Costopoulos C, Radford S, Bacic A, Wood P R. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect.Immun.* 59: 800-807. 1991.
37. Dobos K M, Swiderek K, Khoo K H, Brennan P J, Belisle J T. Evidence for glycosylation sites on the 45-Kilodaltons glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:2846-2853. 1995
38. Bulla Jr L A, Kramer J, Davidson L I. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130 375-383. 1977.
39. Kawamura T, Shockman G D. Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuranoyldrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem* 258: 9514-9521. 1983.
40. Maron D D, Ames B N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215. 1983.

41. Schlandler P F, Flaff W, Hock R, Irving L. Studies on the physiology frozen plants and animals in the Artic. *J. Cell Comp. Physiol* 42, suppl 1: 1-56. 1953.
42. De Vries A L, Wohlschlag D E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science* 163: 1074-1075. 1969.
43. Duman J G, De Vries A L. Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Com. Biochem Physiol*.53 B: 375-380. 1976.
44. Hew C L, Joshi D, Wang N C, Kao M H, Ananthanaryanan. Structures of shortorn sculpin antifreeze activity polypeptides. *Eur. J. Biochem.*, 151: 167-172. 1985.
45. Kao Mh, Fletcher G L, Wang NC, Hew CL. The relationship between molecular weight and antifreeze polypeptide activity in marine fish. *Can. J Zool.* 64: 578-582. 1986.
46. Deng G L, Andrews D W, Laursen R A. Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein from the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *FEBS Letters*. 402:17-20. 1977.
47. Rubinsky B, Arav A, De Vries A L. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology*. 29:69-79.1992.
48. Rubinsky B, Arav A, Fletcher G L. Hypothermic protection a fundamental property of "antifreeze" proteins. *Biochem. And Biophys. Research Communications*. 18: 2, 566-571.1991.
49. De Vries A L. Biological antifreezes and survival in freezing environments. En "*Animals and Environmental Fitness*" (Ed. By Gilles R.) pp.583-607. Pergamon Ed. 1980.
50. de la Maza A, Parra J L, Congregado F, Bozal N, Guinea J. Interaction of the glycoprotein excreted by *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 with phosphatidilcholine liposomes. *Colloids and Surfaces*. 137: 181-188. 1998.
51. de la Maza A, Parra J L, Sabés M, Congregado F, Bozal N, Guinea J. Glycoprotein excreted by *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 as a coating protective agent of liposomes against sodium dodecylsulfate. *Langmuir*. 14: 1, 42-48. 1998.
52. Papahadjopoulos D, Allen T, Garbizon A. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics, tissue and antitumor therapeutic efficacy. *Proc.Nat. Acad. Sci.*88: 11460-11464. 1991.
53. Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Bioch.J.* 186:591-598. 1980.
54. López-Berestein G. Liposomal amphotericin B in antimicrobial therapy (G. Gregoriadis, ed.). "*Liposomes as drug carriers: recent trends and progress*". J. Willey 345-352. 1988.
55. Kupcü S, Sára M, Sleytr U B. Liposomes coated with crystalline bacterial cell surface proteins (S-layers) as immobilization structures for macromolecules. *Bioch Biophys Acta*. 1235. 263-269. 1995.
56. de la Maza A, Parra J L, López O, Congregado F, Bozal N, Guinea J. Assembly propertis of a glycoprotein produced by *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *J. Colloid Interface Science*. 192: 286-293. 1997.
57. de la Maza A, Codech L, López O, Parra J L, Sabés M, Guinea J. Ability of the exopolymer excreted by *Pseudoalteromonas antarctica* NF3, to coat liposomes and to protect these structures against octyl glucoside. *J. Biomat.Sci.Polymer End*. 10: 557-572.1999.
58. Jeon K, Katsuraya K, Kaneko Y, Mimura T, Uryu T. Studies on interaction mechanism of sulfated polysachaccarides as on AIDS drug by NRM. *Macromolecules*.30: 7. 1997-2001.1997.
59. Boyd M R, Gustafson K R, Mc Mahon J B, Shoemaker R H, O'Keefe B R, Mori T, Gulakowski R J, Wu L, Rivera M Y, Laurencot C M, Currens M J, Cardellina J H, Buckheit R W, Nava P I, Pannel L K, Sowder L E, Henderson L E. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds surface envelope glycoprotein gp 120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47: 7, 1521-1530. 1997.
60. Yang Y W, Yang J C. Inhibitory effect of polionic compounds on the adsorption of Herpes-simplex virus type 1. *Antiviral Chemistry. & Chemotherapy*. 8: 1, 32-37- 1997.
61. Psenner R, Sattler B. Life at the freezing point. *Science*. 280: 2073 2074. 1998.
62. Abyzov S S, Mitskevich Y N. Microflora of the antarctic continental and marine ice (with regard to the problem of using icebergs as resources of fresh) *Microbiology*. 62: 582-593. 1993.
63. Isachenko B L., Selected works Izd. An SSSR. Moskow. 1: 93-95. 1951.
64. Abyzov S S, Bobin N E, Koudryashov B B. Microbiological flora as function of ice depth in central Antarctica. En R Halmquist (Ed) *Life Sciences and Space Research* 17: 99-103. Pergamon Press. 1979.
65. Grossi S M G, Kottmeier S T, Sullivan C W. Sea ice microbial Communities: III Seasonal abundance of microalgae and associate bacteria, Mc Murdo Sound, Antartida. *Microbial Ecology*. 10: 231-234. 1984.
66. Friedmann E. Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert. *Science*. 215: 1045-1053. 1982.
67. Guinea J. Microorganismos endolíticos: modelos de adaptación a la supervivencia en ambientes extremos. *Microbiología 1990*. (Casadesús J y Ruiz Berraquero F. Eds) Pub. Univ. Sevilla. 1990.

68. Castellví J, Fontarnau R, Guinea J. Ecosistemas microbianos antárticos. *Investigación y Ciencia*. 185: 54-60. 1992.
69. Sieburt J Mc N. *Bacterial habitats in the Antarctic environment. Symposium on Marine Microbiology* C H Oppenheimer. 533-548. Springfield 1963.
70. Azam F, Ammerman J W, Cooper N. Bacterioplankton distrutional patterns and metabolic activities in the Scotia Sea. *Antarctic Journal of the United States*. 164-165. 1981.
71. Baross J A, Morita R Y. Microbial life at low temperatures ecological aspects.(D.J. Kushner ed) "*Microbial life in extreme environment*". 9-57 Academic Press.1978.
72. Andersson A, Larsson U, Hagstron A. Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Marine Ecology progress Series*.33:51-57. 1986.
73. Hodson R R, Azam A F, Carlucci J A, Furham J A, Karl D M, Holm-Hansen O. Microbial uptake of dissolved organic matter in Mc Murdo Sound, Antarctica. *Marine Biology*. 61: 89-94.1981
74. Innis W E. Interaction of temperature and psychrophilic microorganisms. *Annual Review of Microbiology*. 29 :445-465. 1975
75. Morita R Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 29: 144-167 1975
76. Vishniac H., Klínger J. Yeast in the Antarctic deserts. En:*Perspectives in Microbial Ecology*(F. Meguar and M.Gantar eds) pp:46-51. Ljubljana: Slovene Society for Microbiology. 1986
77. Montes M J, Belloch C, Galiana M, García M D, Andrés C, Ferrer S, Torres-Rodríguez J M, Guinea J. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp nov. *Syst. Appl. Microbiol*. 22: 106-112. 1999.
78. Carpenter S R, Chisholm S V, Krebs CH J, Schinder D W, Wright R F. Ecosystems Experiments. *Science* 269: 324-327.1995
79. Faulkner D J. Marine natural products. *Natural Prod. Research*.10:497-539. 1993
80. Austin B. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *J.Appl. Bacteriol*. 67: 461-470. 1989.
81. Cowan AD. Biotechnology of the Archaea. *Tibtech* . 10: 315-323. 1992
82. De Long E F., Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl.Acad.Sci-USA*. 89:5685-5689. 1992.

Barcelona, Abril de 1999

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

del Académico numerario
Muy Ilustre Prof. Dr.Ramón Parés Farrás

**Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimos e Ilustrísimos Señores,
Señoras y Señores:**

Debo empezar pidiendo excusas, porque no podré evitar que mi discurso, contestación al de ingreso del Prof. Jesús Guinea Sánchez, que acabamos de escuchar, esté hilvanado en la trama de otro que no corresponde ahora, ni tiene por qué darse en otra ocasión, que es el de mi propia historia académica y universitaria. Confío en que ustedes mismos lleguen a convenir que, en mi caso, separarlos hubiera sido artificioso y vano.

Guinea empezó a trabajar conmigo a fines de los años cincuenta. Sólo ocho años mayor que él, y en una etapa todavía muy temprana de mi trayectoria vital, es comprensible que lo viera, sobre todo, como un compañero al que había inspirado desinteresada confianza y amistad, al igual que me había ocurrido a mí. Era la época en que se configuraba mi definitiva vinculación a la Microbiología, tras la extraordinaria impresión que me produjo el 3er Congreso Internacional de Bioquímica de Bruselas en 1955, y después de haber leído repetidas veces el célebre discurso de A.J. Kluver y C.B. Van Niel sobre la contribución de los microbios a la Biología, publicado en 1956, y que, como más tarde podría comprobar, marcaría en todo el mundo a tantos microbiólogos de mi generación. Hasta esta época, yo había trabajado, sobre todo, en varios temas de citología y bioquímica de levaduras.

A mi entorno, era común ver a la Bacteriología más que nada como una técnica y una cocina peculiares, eso sí, de aplicaciones extraordinariamente útiles para el hombre. Algunos aspectos más generales, como las bacterias quimiosintéticas

oxidadoras del azufre o bien las fijadoras de nitrógeno elemental, interesaban especialmente a los fisiólogos vegetales. Bajo la influencia de las nuevas ideas, derivadas principalmente de las fuentes antes referidas, llegué al convencimiento de que nuestro conocimiento de los microbios se estaba ensanchando prodigiosamente. Había que hacer algo y, en este contexto, me pareció natural que a Guinea le pudiera gustar ayudarme a intentarlo.

No obstante, la época a que me estoy refiriendo era también la edad de oro de los antibióticos y quimioterápicos de síntesis, con su enorme repercusión sanitaria e industrial. Todavía sonaban vigorosos los ecos de las hoy casi legendarias visitas a España de Fleming y de Waksman. Muy cerca de aquí tenemos el austero monumento a Fleming que hace memoria de su paso por Barcelona. En mi recuerdo, no puedo dejar de vincular ambas a los profesores y antiguos colegas Florencio Bustinza y Eliseo Gastón de Iriarte, este último primer poseedor de la medalla n.º 1 de nuestra Academia y al que, pasados los años, el Dr. Guinea sucedería en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Gracias a la confianza que había depositado en mí el Prof. José Pascual Vila, forjador de la gran escuela de químicos orgánicos de Barcelona, pude participar en una Ayuda a la investigación de la Fundación Juan March, que se le concedió en 1958 para un periodo de cuatro años. Sin duda, una oportunidad extraordinaria en aquella época y, por añadidura, ello constituyó la circunstancia adecuada para que Guinea pudiera incorporarse a un programa de investigación en la Universidad. El tema era la prospección de nuevos antibacterianos de síntesis, y constituyó la base de los trabajos que nos introducirían tanto en el campo de la microbiología hospitalaria como en el de la industria farmacéutica. En el primer caso, sería decisiva para Guinea la relación que estableciera con el Dr. Amadeo Foz y su grupo del

Hospital del Mar, la cual se prolongaría durante muchos años. La colaboración con la industria farmacéutica fue importante para mí mismo, como más tarde lo sería para Jesús Guinea. Tengo por seguro que ella fue la causa de que esta Real Academia decidiera incluirme entre sus miembros numerarios en 1962, sólo seis años después de su misma fundación como Real Academia de Farmacia de Barcelona, siendo todavía presidente su principal artífice, el Dr. D. Guillermo Benavent, que murió en 1963. Mi discurso de ingreso versó sobre "Prospección de quimioterápicos de síntesis de acción antibacteriana", y fue leído el 19 de abril de 1963, cuando ya era presidente el Prof. F.E. Raurich Saz, de quien conservo recuerdo de admiración y respeto, aparte de darse en él la misma circunstancia que después en mí incidiera de ser miembro a la vez de las Academias de Farmacia y de Ciencias y Artes. La contestación corrió a cargo de D. Isidro Bultó Blajot, académico fundador, que tuvo un gran papel en el desarrollo de la industria farmacéutica de nuestro país, tanto en el periodo de la autarquía como en el desarrollismo y con el que compartí una firme relación personal hasta su muerte, tan reciente todavía en nuestro recuerdo. Pues bien, ahora cabría añadir a aquella memoria, después de 38 años, la importancia de la colaboración de Jesús Guinea en todo el trabajo experimental que le servía de base, y, de hecho, él tendría que continuar en esta línea de investigación más que yo mismo en los años que seguirían, como lo atestiguan sus numerosas publicaciones sobre quinolonas de las dos últimas décadas.

En el discurso inaugural del año 1973 de esta Real Academia de Farmacia que tuve el honor de leer, ya consigné que fue en 1960 cuando inicié con Guinea y Clotet la búsqueda de un modelo apropiado para el estudio de la excreción bacteriana de aminoácidos. Sin duda, intervino la influencia del gran interés que había despertado la producción industrial de aminoácidos después del éxito de Kinoshita con el ya histórico *Micrococcus glutamicus*, así como la familiaridad que habíamos alcanzado en

la determinación microbiológica de aminoácidos, bien sea en los medios de cultivo o en materias primas de interés industrial por su contenido en ácido glutámico. A esto se debe la atención que despertó en nosotros una cepa aislada en nuestro laboratorio, la llamada cepa C3 de *Klebsiella pneumoniae* (primeramente *Citrobacter intermedium*) y el descubrimiento de un interesante fenómeno de heterogeneidad colonial que presenta con respecto a la excreción de glutamato. Sobre este tema se llegarían a desarrollar doce tesis doctorales en las décadas de los 60 y de los 70, la segunda de las cuales cronológicamente fue la de Jesús Guinea, leída en el año 1966 y que mereció premio extraordinario. Sin duda, su contribución a todas las que siguieron fue fundamental, así como sobre el propio tema central de la investigación que se resolvió con el descubrimiento y la caracterización genética y física de un nuevo plásmido, que en aquella época no dejó de ser una pequeña hazaña.

El trabajo sobre la cepa C3 originó una serie de publicaciones del Dr. Guinea, especialmente en los años setenta, y en alguna de ellas ya aparece con sus propios colaboradores que, en muchos casos, seguirán trabajando con él durante lustros en temas relacionados y en otros nuevos. Entre ellos, aún con cierta continuidad con la filosofía del tema de la cepa C3, encontramos las investigaciones sobre *Serratia* y la producción de prodigiosina, en las que se configuraría la personalidad científica de Gaspar Lorén, uno de sus discípulos más destacados.

Estamos llegando a la época en que el Dr. Guinea obtiene la plaza de profesor Agregado, adscrita al mismo Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, al cual estaba ya incorporado desde 1964, primero como Ayudante de clases prácticas y al poco tiempo como Profesor Adjunto, siguiendo abnegadamente todas las vicisitudes, propias y añadidas, que suelen acompañar el curso

del acceso al profesorado universitario, en aquella época tanto o más que ahora. En su caso, como por supuesto en el de otros, afectado por los azarosos bandazos que precedieron y acompañaron la reforma del sistema universitario español de los años setenta. Puedo dar fe que resistió bien, siempre con un alto sentido de la dignidad humana, tanto de la propia persona como de la ajena, y una responsabilidad ejemplar en el cumplimiento de sus compromisos y obligaciones. Creo que siempre ha sentido y sigue sintiendo un gran arraigo a sus orígenes vascos, a su tierra y a su familia, pero sólo deja traslucirlo a través de una espesa cortina de discreción. Dispuesto siempre a ayudar al amigo, con cierta propensión a echar la mano a quien considera desvalido o marginado, respetuoso con todo el mundo, quizás algo pronto a considerarse excluido al menor tufo de exclusivismo. Guinea se casó con Mari Castellví, geóloga e hija de un reputado médico barcelonés, una mujer de aquellas que se hacen querer y respetar a la vez, sin que uno se dé ni cuenta, ejemplo de todas las virtudes cardinales. Es justo señalarlo aquí, pues una compañera así no es precisamente un baldío en los posibles.

En 1981, el Dr. Guinea accede a Catedrático de Microbiología y pasa a cubrir la vacante de la Facultad de Farmacia. Del periodo anterior de diecisiete años, quisiera aún señalar tres aspectos, de los cuales, como de los antes referidos, creo que puedo considerarme notario de excepción. Por una parte, está su labor docente, siempre muy bien valorada por todos: la relativa a la enseñanza teórica, las prácticas, en el postgrado y la dirección de tesis. En segundo lugar, él y el Dr. José Sancho, su gran colaborador en la segunda mitad del periodo que estoy considerando, se ocupó de la proyección del trabajo del Departamento a la industria farmacéutica, con muy pocas excepciones. En algunos casos, continuando colaboraciones iniciadas por mí mismo. El éxito del trabajo realizado y el prestigio profesional es algo que nadie puede discutir. De algún modo, esto mismo propició la elección de la Facultad de

Farmacología entre otras alternativas que podían haberse tomado igualmente al acceder el Dr. Guinea a Catedrático de Microbiología. Finalmente, el tercer aspecto a que me refería lo constituyen los tres libros que editamos en común en esta época, dos de ellos conjuntamente con el Prof. Sancho y con el Prof. Jofre el tercero. Los dos primeros estaban dirigidos a los profesionales, uno sobre microbiología de aguas y otro sobre microbiología analítica. El tercero fue un intento de dar un texto amplio y general a los alumnos de Microbiología y ampliación de Microbiología de la facultad de Biología. Ciertamente, hoy son textos que han quedado un poco atrás, unos más que otros, pero que tuvieron gran difusión en su momento y que todavía podemos localizar en las estanterías de muchos despachos.

La etapa subsiguiente a la incorporación del Dr. Guinea en la Facultad de Farmacia, casi de salida, está marcada por las pruebas de idoneidad y el aluvión de concursos posteriores que, en este caso, llevarían en poco tiempo a la incorporación en su Departamento de una verdadera escuadra de titulares y catedráticos. La mayoría de ellos procedían del departamento de Microbiología de la Facultad de Biología. Un proceso paralelo ocurrió también con la Universidad Autónoma de Barcelona y en menor proporción, con la Universidad Balear. Ciertamente fue una buena tacada, pero se notaron los efectos de aquello que se dice de vestir a un santo para desnudar a otro, y así, el acceso del Dr. Guinea a la Cátedra de Farmacia fue para la Facultad de Biología una pérdida importante y sentida. En otras Universidades, estos efectos negativos se paliaron con los macrodepartamentos interfacultativos que preveía la LRU, pero esto no resultaba posible en la Universidad de Barcelona en medio del revuelo de las Divisiones que establecieron sus nuevos Estatutos. Quizás hoy todo esto ya sea sólo historia, pero, por lo que ahora nos ocupa y desde mi perspectiva, veo al Dr. Guinea enfrentado a una serie de nuevos e imprevistos problemas que, bien seguro, sólo llegaría a resolver satisfactoriamente gracias a la prudencia, buen tacto y respeto

que siempre supo mostrar. No hay que olvidar otros casos comparables menos afortunados y, por lo tanto, es justo reconocer el mérito de las buenas cualidades del Dr. Guinea.

Sin el propósito de examinar detalladamente todos y cada uno de los trabajos publicados por el Dr. Guinea y sus colaboradores desde 1981 hasta hoy, permítanme Uds. que haga algunas consideraciones acerca de algunos de ellos, pues la ocasión es demasiado tentadora para evitarlos, conformándome con una simple contabilidad. No voy a insistir sobre las investigaciones relativas a la prodigiosina y a las quinolonas, a las que ya me he referido. En 1986 y luego en 1991, Guinea y sus colaboradores tienen dos publicaciones sobre bacterias libres que presentan *R-bodies* o cuerpos refringentes, que en cierto modo constituyen una continuación de los estudios que a fines de los años setenta había realizado yo mismo con J.Lalucat y el Prof. H.G.Schlegel, y de los cuales justamente, entre otras publicaciones, hay un artículo en el nº 21 de la Revista de esta Real Academia de Farmacia. En la década de los ochenta, Guinea y sus colaboradores también publican diversos trabajos relativos a polisacáridos extracelulares y a tensioactivos de origen bacteriano, los cuales pueden tener también sus raíces en otros anteriores y coetáneos llevados a cabo en la Facultad de Biología, con M A. Manresa protagonista en uno y otro caso. Lo curioso es que, pasado 1981, estos temas se prosigan en los dos laboratorios, el de Farmacia y el de Biología, con tal independencia. No creo que esto fuera precisamente bueno, pero hay que reconocer que, cuando los grupos de trabajo empiezan a ser grandes y separados físicamente, es algo más que frecuente. No puedo dejar de citar un seminario, que hace ya algunos años nos dio una celebridad en el campo de las espiroquetas. Tuve la oportunidad de sorprenderla al poderle mostrar unos cultivos en fase exponencial de crecimiento de varias especies de este tipo de bacterias, que ella creía que no se habían podido cultivar nunca. Lo más grave para mí fue verme forzado a precisar que lo habíamos conseguido gracias a una técnica desarrollada por

otro investigador de su propio laboratorio en una conocida Universidad de Estados Unidos. Sin llegar a tal extremo, hay que saber resignarse y aceptar que estas cosas ocurren.

Con los estudios sobre las bacterias procedentes de muestras de la Antártida, ya entramos en el tema que el Dr. Guinea ha elegido para su discurso de ingreso en esta Real Academia de Farmacia de Cataluña, que hemos tenido el placer de escuchar. El punto de partida lo constituyen las muestras procedentes de la Antártida, tomadas por Pepita Castellví, tan vinculada a las últimas expediciones españolas. Se trata de la hermana de su esposa, también bióloga y de brillante historial en microbiología marina, a la que en su día tuve la satisfacción de dirigir su tesis doctoral sobre el alga *Skeletonema costatum*. Como hemos visto, el estudio de estas muestras permitió al Dr. Guinea llegar a la identificación, entre otras bacterias, de la nueva especie *Pseudoalteromonas antarctica*, que, como él ha señalado, viene a ser el auténtico protagonista de su discurso. Descubrir una nueva especie siempre produce una gran satisfacción, sobre todo cuando se lleva dentro el verdadero espíritu naturalista, que en el microbiólogo se acrecienta por el convencimiento de que la diversidad bacteriana es todavía poco conocida, debido a las limitaciones de nuestra propia técnica y que la capacidad de las bacterias para podernos dar una nueva sorpresa es aparentemente inagotable.

La producción del heteropolímero por *Pseudoalteromonas antarctica*, como hemos podido apreciar, ha abierto varias líneas de investigación verdaderamente prometedoras. La naturaleza presuntamente glicoproteica establece la posibilidad de relacionarlo con otras moléculas, como las glicoproteínas crioprotectoras de peces, y, en general, con los anticongelantes naturales, lo cual permite suponer que puedan representar la expresión de una peculiar adaptación fisiológica. Las propiedades de esta glicoproteína de *Pseudoalteromonas*

antarctica, sugieren efectivamente la posibilidad de aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Sin duda, destacan en este sentido los efectos sobre liposomas, que el Dr. Guinea nos ha señalado. Desgraciadamente el tema es demasiado novedoso para mí y no me atrevo a lanzar ninguna valoración al respecto.

Aunque por otra razón, me ocurre casi lo mismo con respecto al tema de la Lámina S, que Guinea tan bien nos ha expuesto. Siempre lo había considerado como algo correoso, de lo que se empezó a hablar hace cincuenta años, y que nunca se ha podido tomar como cuestión resuelta. Debo confesar, con cierta vergüenza, que más de una vez al leer lámina S me venían a la cabeza los canales de Marte de G.V. Schiaparelli o la atmósfera de Titán de J. Comas y Solá a pesar de que, en este último caso y después de bastantes lustros, se le haya tenido que dar la razón. Después de lo que acabamos de oír sobre la lámina S, ahora estoy dispuesto a rectificar.

Está claro que los interesantes trabajos del Dr. Guinea y sus colaboradores, publicados en la última década, no tienen nada que ver con los míos propios, ni con los realizados por otros en el departamento de Microbiología de la Facultad de Biología. Son el resultado del pleno desarrollo y madurez de un proceso que se inició en 1981, y del cual el nuevo académico ha sido el factor determinante. Como es lógico y natural, habrán influido también otras causas en este proceso, difíciles de precisar para mí, si bien pienso que entre ellas estará la misma voluntad mantenida en atender, lo mejor posible, los objetivos específicos de la investigación y la enseñanza de la microbiología en la Facultad de Farmacia. A pesar de todo, siempre se han mantenido ciertos rasgos de parentesco con los vecinos de la Facultad de Biología, de lo cual creo que unos y otros nos sentimos honrados. Así sorprende el paralelismo y la coincidencia en el tiempo de los estudios de la glicoproteína a un lado y del lipoglucano de *Bifidobacterium* en el otro, con un

desconocimiento recíproco prácticamente total de lo que se estaba haciendo. Un tema como el de las bacterias olvidadas de la naturaleza ha estado periódicamente de moda, y ahora lo está. Pues bien, es difícil excluir su influencia, tanto en los organismos endolíticos en un caso, como en los de los tapetes microbianos en el otro.

La última parte del discurso del Dr. Guinea es una panorámica sugestiva del tema de las bacterias del hielo y de las endolíticas a que nos acabamos de referir, con el posible interés de las bacterias olvidadas de los hábitats marinos y en especial de las zonas polares, como fuentes de nuevos productos de aplicación farmacéutica. Por supuesto que estoy de acuerdo con él en que se puedan cosechar importantes logros siguiendo este camino, y le animo sinceramente a proseguir en esta línea, seguro de que él mismo y sus colaboradores podrán alcanzar más de uno.

Me doy cuenta de que, a pesar del tiempo que llevo empleado en mi parlamento, he insistido poco en lo que considero uno de los méritos más importantes del Dr. Guinea. Me refiero a su obra como profesor y maestro. Me alivia pensar que este aspecto es bien conocido y aceptado por todos. Sin embargo, antes de terminar mi discurso, no me importa remacharlo, porque, a mi modo de ver, se trata de algo fuera de lo corriente, y que a estas alturas ya habrá dejado huella profunda y permanente en toda una generación de farmacéuticos.

Felicito de corazón a Jesús Guinea por lo que este acto significa de justo reconocimiento. También felicito a la Real Academia de Farmacia de Cataluña por haber acogido en su seno a un nuevo académico de número de su probada valía e indiscutible mérito profesional. Personalmente, no puedo dejar de sentirme orgulloso de mi complicidad, como liebre en su carrera

universitaria y como vector activo, y no pasivo, de su pasión por el microbio.

He dicho.

28 de Setiembre de 1999