

# ECOLOGIA MICROBIANA EN AMBIENTES HIPOGEOS: UTILIZACIÓN DE FUENTES DE CARBONO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

M.A. González-del Valle, L. Laiz, A. Ortiz-Martínez y C. Sáiz-Jiménez

*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC,  
Apartado 1052, 41080 Sevilla, España  
e-mail: saiz@irnase.csic.es*

## RESUMEN

En los últimos años se ha dedicado especial atención a los problemas de biodeterioro derivados del crecimiento de microorganismos en ambientes hipogeos. Una de las características de este tipo de ambientes es su baja temperatura, más o menos constante, que no llegan a superar los 20°C. Este hecho plantea un problema metodológico, pues los aislamientos de bacterias suelen llevarse a cabo a una temperatura de 28°C, diferente de las habituales en ambientes hipogeos. Cabe esperar que la temperatura óptima de aislamiento se encuentre en el rango de temperatura del hábitat estudiado. En este trabajo, se ha abordado el problema metodológico, determinando las temperaturas de crecimiento óptimo y los perfiles metabólicos a distintas temperaturas de cultivo, de una serie de bacterias aisladas a distintas temperaturas de cuevas con pinturas rupestres, situadas en la cornisa Cantábrica (norte de España).

**Palabras clave:** Bacterias, cuevas, pinturas rupestres, temperatura de crecimiento, Biolog.

## INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipogeos se caracterizan por tener temperaturas relativamente bajas y constantes a lo largo del año, así como una elevada humedad relativa, condiciones distintas a las existentes en la superficie (Laiz *et al.*, 1999; 2000). En las últimas décadas, este tipo de ambientes, del que forman parte las cuevas con pinturas rupestres, necrópolis y catacumbas, han sufrido el efecto del turismo de masas. Un sistema de visitas indiscriminadas modifica el microclima, debido al aumento de temperatura y CO<sub>2</sub> producido por los visitantes. A ello se suman los problemas generados por los sistemas de iluminación artificial, que permiten la colonización de microorganismos fotótrofos (Bruno y Albertano, 1999; Albertano *et al.*, 2000). Una adecuada gestión del patrimonio cultural tiende a reducir los efectos antropogénicos

mediante el control de visitas, de forma que no alteren significativamente el microclima.

El estudio del efecto de la temperatura sobre la utilización de fuentes de carbono por parte de microorganismos de ambientes hipogeos es uno de los aspectos de la ecología microbiana que interesa tanto al microbiólogo como al gestor de un bien cultural, ya que permite aumentar el conocimiento sobre la capacidad de adaptación de los microorganismos a este tipo de ecosistemas y su comportamiento metabólico. Ello incide particularmente en los aspectos de conservación de pinturas rupestres, murales y frescos (Rölleke *et al.*, 1996; Hoyos *et al.*, 1998; Cañaveras *et al.*, 1999).

## El sistema Biolog

Para realizar este estudio se ha empleado el sistema Biolog, inicialmente desarrollado para la identificación rápida de bacterias patógenas relacionadas con la microbiología clínica. Sin embargo, este sistema también se mostró como una herramienta adecuada para otro tipo de aplicaciones de interés en ecología microbiana.

El sistema Biolog se basa en una microplaca con 96 pocillos, que contienen 95 fuentes de carbono diferentes y un pocillo blanco (A1) que únicamente contiene agua. Los tipos de fuentes de carbono presentes en las microplacas son: carbohidratos, ácidos carboxílicos, alcoholes, compuestos fosforilados, aminoácidos, compuestos aromáticos, compuestos bromados, aminas, amidas, ésteres y polímeros. A su vez, en todos los pocillos se encuentra un indicador de la actividad redox, violeta de tetrazolio, incoloro, que pasa de forma irreversible a formazan, de color púrpura. Este proceso se produce al llevarse a cabo la oxidación de los sustratos que dan lugar a la aparición de NADH que dona sus electrones a la cadena respiratoria. Las fuentes de carbono y el indicador, se encuentran deshidratados, en la microplaca, rehidratándose al inocular la suspensión de bacterias. La utilización de la fuente de carbono da lugar a la aparición del color púrpura.

La existencia de 95 fuentes de carbono supone que se pueden crear  $2^{95}$  patrones posibles, o lo que es lo mismo aproximadamente  $4 \times 10^{28}$  combinaciones, lo que es más que suficiente para poder ser utilizado como perfil de identificación de bacterias. El estudio de los resultados se hace mediante el software proporcionado por el fabricante, o aplicando métodos estadísticos como análisis de componentes principales (PCA), Manova, Anova, etc.

## Tipos de microplacas

Fundamentalmente existen dos tipos, las microplacas de identificación de microorganismos, y las microplacas para usos especiales.

En el primer grupo, las microplacas de identificación, se encuentran las microplacas GN2 (bacterias Gram-negativas), GP2 (bacterias Gram-positivas), AN (bacterias anaerobias), YT (levaduras) y FF (hongos filamentosos). Los tres primeros tipos y las nuevas FF, poseen 95 fuentes de carbono, algunas de ellas específicas, que junto a la base de datos que ofrece el fabricante permiten la identificación del microorganismo. Las microplacas YT, están configuradas para la realización de 94 tests de oxidación y asimilación de levaduras. De este modo las tres primeras filas de la microplaca poseen las fuentes de carbono y el indicador colorimétrico (violeta de tetrazolio) para los tests de oxidación, las 5 filas restantes poseen las fuentes de carbono para los tests de asimilación (la última fila posee dos fuentes de carbono por pocillo), que son cuantificados por turbidometría. En este caso el fabricante también incluye una base de datos para la identificación de las especies.

En el segundo grupo, de microplacas para usos especiales, existen las SFN2, SFP2 (ambas destinadas a la caracterización metabólica de hongos y actinomicetos, cuyo crecimiento se inhibe con el indicador colorimétrico), Ecoplacas (empleadas en el estudio de poblaciones), ES (específica para *Escherichia coli* y *Salmonella* sp.) y MT2 (para aplicaciones desarrolladas por el investigador). Las SFN2 y SFP2 poseen la misma composición que las GN2 y GP2, respectivamente, pero sin el indicador colorimétrico, ya que éste no es reducido por actinomicetos y hongos. En este caso se determina el crecimiento mediante la medida de la turbidez. Las Ecoplacas contienen 31 fuentes de carbono, por triplicado, por ello, son adecuadas para el estudio de comunidades bacterianas, puesto que permiten la creación de una "huella dactilar funcional", característica de cada población. Las microplacas MT2 tienen la misma composición en nutrientes y composición química que las GN2, pero no incluyen las fuentes de carbono, lo que permite que sea el usuario quien ensaye los compuestos de su interés. En ninguno de estos casos el fabricante aporta una base de datos, ya que no es aplicable.

### **Limitaciones del sistema**

Fundamentalmente son cuatro:

1. Densidad inicial del inóculo, ya que el desarrollo de color es directamente proporcional a la densidad del inóculo, así las

densidades bajas pueden producir falsos negativos y viceversa, densidades altas pueden producir falsos positivos, incluso el pocillo blanco dar reacción. En principio se puede evitar el problema de la baja densidad del inoculo con mayores periodos de incubación, pero como se verá este es otro factor limitante.

2. Tiempo de incubación, el desarrollo de color también es directamente proporcional al tiempo de incubación, así según aumenta este, aumenta el color. Este factor y el anterior, a su vez, interfieren con el siguiente.
3. Tasa de crecimiento de los microorganismos, esta se ve afectada por el inoculo y la cepa bacteriana, lo que puede conducir a largos periodos de incubación.
4. Medio de cultivo de las placas y requerimientos específicos, este es un factor relacionado con las necesidades de una determinada cepa bacteriana. Como se ha indicado, las placas del Biolog contienen el medio deshidratado, y en determinadas ocasiones este puede resultar inadecuado, de tal modo que impida el desarrollo de la bacteria, lo cual provoca la aparición de menos resultados positivos. Este factor limitante en principio podría solventarse inoculando con una alta densidad de bacterias, en estado exponencial de crecimiento, para poder ver la actividad fisiológica, sin perder de vista la primera limitación indicada.

Todas estas limitaciones están directamente relacionadas con la manipulación de los microorganismos y con la propia naturaleza de estos. Sin embargo, estas limitaciones se pueden aprovechar para el desarrollo de nuevas aplicaciones.

## **Uso de las distintas microplacas y perspectivas de nuevas aplicaciones**

El sistema Biolog posee un gran rango de posibilidades, permitiendo un elevado número de estudios, tales como la identificación de microorganismos, caracterización de estados fisiológicos de una población, distinguir poblaciones entre sí, realizar tests de toxicidad o de degradación de determinados compuestos, etc.

La relativa simplicidad del método permite combinar técnicas de microbiología clásica con métodos automatizados, como la combinación del sistema Biolog y el MPN (most probable number) (Gamo y Shoji, 1999) lo que permite estimar el número de usuarios de una misma fuente de carbono dentro de una determinada población. El desarrollo de esta técnica se basa en las limitaciones propias del sistema.

Una de las aplicaciones más frecuentes ha sido su aplicación al estudio de poblaciones microbianas en suelos (Garland, 1996; Heuer y

Smalla, 1997), ya que determinando los patrones bioquímicos de las poblaciones presentes se puede detectar la posible relación de las bacterias con las rizosferas de determinadas plantas.

Otra aplicación interesante es el estudio de la diversidad funcional (Zak *et al.*, 1994; Insam *et al.*, 1996). Este tipo de estudio permite determinar la capacidad de colonización de una población de microorganismos, o los posibles cambios de población, que se van a producir al cambiar las condiciones del entorno.

El ensayo de la degradación de compuestos tóxicos es una de las aplicaciones de las microplacas MT2 de Biolog, y permiten ensayar hasta con 95 tóxicos diferentes o con 95 poblaciones diferentes para un mismo tóxico (Gorden *et al.*, 1993; Strong-Gunderson y Palumbo, 1994; Lee *et al.*, 1995).

También es de destacar que el patrón bioquímico que surge del Biolog en la caracterización de poblaciones bacterianas puede combinarse con métodos moleculares, como ARDRA y DGGE (Smalla *et al.*, 1998), o fenotípicos (Verschuere *et al.*, 1997).

En definitiva, el sistema Biolog es muy versátil, ya que permite un gran número de aplicaciones en estudios microbiológicos. Además se perfila como una herramienta adecuada para el estudio de los biofilms, y en el caso que nos ocupa, como un sistema para el estudio de las actividades metabólicas de las poblaciones presentes en monumentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Procedencia de las cepas estudiadas

Las bacterias empleadas procedían de los muestreos realizados en las cuevas de Llonín y Tito Bustillo, en Asturias, y La Garma, en Cantabria. Todas ellas se encuentran en la cornisa Cantábrica (norte de España) y poseen importantes muestras de arte rupestre. Las dos primeras son cuevas que han sufrido un importante impacto antropogénico, mientras que la tercera se considera como una cueva "virgen". La primera, Llonín, fue empleada durante 13 años (1957-1970) para la elaboración y maduración del queso de Cabrales. La segunda, Tito Bustillo, es una cueva visitable de marzo a septiembre con un régimen de visitas de 400 personas/día, divididas en grupos de 25 personas con un tiempo de visita de 40-50 minutos. Esta cueva sufre inundaciones periódicas producidas por la crecida de un río subterráneo. La tercera cueva, La Garma, fue descubierta en noviembre de 1995, y sólo ha sido abierta para los estudios arqueológicos. De hecho hasta el muestreo, realizado en octubre de 1998, sólo había sido

visitada por 64 personas, con un tiempo total de permanencia en la cueva de 45 horas.

## Identificación

Las identificaciones se realizaron mediante el análisis de los ácidos grasos metilados de las bacterias, mediante el sistema MIDI, según los protocolos de cultivo en medio sólido y las especificaciones instrumentales recomendadas por el fabricante (Microbial Identification System, Inc., Delaware, USA). La base de datos empleada fue Sherlock Standard Aerobe Database. Para los casos en los que el índice de similitud obtenido en el sistema MIDI era inferior al 0,7 se empleó el sistema Biolog (Biolog, Inc. Hayward, California, USA), utilizándose las microplacas GN2 y GP2, y la base de datos GN2 y GP2 versión 4.0.

Las cepas bacterianas estudiadas se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1**

Identificación, procedencia y temperatura de aislamiento de las bacterias estudiadas.

Bacteria	Identificación	T° aislamiento	Cueva
LL515	<i>Arthrobacter viscosus</i>	13°C	Llonín
TBS3	<i>Bacillus halodurans</i>	28°C	Tito Bustillo
TBS21	<i>Bacillus megaterium</i>	20°C	Tito Bustillo
M613	<i>Bacillus</i> sp.	13°C	La Garma
TBS91	<i>Kocuria</i> sp.	5°C	Tito Bustillo
M612	<i>Pseudomonas putida</i>	13°C	La Garma
M637	<i>Pseudomonas</i> sp.	5°C	La Garma
LL519	<i>Sporosarcina ureae</i>	13°C	Llonín

## Microplacas y procedimiento de incubación

Las microplacas empleadas en el estudio a diferentes temperaturas fueron GN2 y Ecoplacas. Para todas las cepas estudiadas se utilizaron las placas GN2 y Ecoplacas por duplicado. Las temperaturas de incubación de las microplacas fueron 28°C, 13°C y 5°C (esta última solamente en las cepas aisladas a 5°C). Se eligieron estas temperaturas de incubación debido a que 28°C es la temperatura habitual de incubación en el laboratorio, 13°C es la temperatura de las

cuevas, y 5°C fue seleccionada para identificar posibles cepas psicrófilas.

## Obtención y análisis de los resultados

Se tomaron medidas a las 24 y 48 horas de incubación, excepto en las placas incubadas a 5°C que fueron medidas a las 72 y 96 horas. La utilización de las fuentes de carbono se determinó mediante la aparición de color en los pocillos debido a la reducción del violeta de tetrazolio, realizándose la medida a 590 nm en un lector E-Max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA). Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se corrigieron mediante la sustracción del valor de DO obtenido en el pocillo blanco (A1) del resto de los pocillos, obteniéndose de este modo la DO neta de cada pocillo (Verschuere *et al.*, 1997). Todas las medidas se realizaron por duplicado.

El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando Análisis de Componentes Principales (PCA) a los resultados mediante el programa Statistica (Kernel release 5.5, StatSoft, Inc, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las tres cuevas estudiadas se aislaron un gran número de bacterias que se incubaron a distintas temperaturas: 5, 13, 20 y 28°C. De esta serie se seleccionaron 8 cepas bacterianas aisladas a diferentes temperaturas. Dos procedían de la cueva de Llonín; *Arthrobacter viscosus* y *Sporosarcina ureae*. Tres procedían de Tito Bustillo; *Kocuria* sp., *Bacillus megaterium* y *Bacillus halodurans*. Por último, tres procedían de La Garma; *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

Para determinar si se producía un uso diferencial de fuentes de carbono de las distintas cepas en función de la temperatura de cultivo, se utilizaron las microplacas GN2 y Ecoplacas de Biolog.

Las placas GN2 poseen 95 fuentes de carbono diferentes, de las cuales 28 son carbohidratos, 24 ácidos carboxílicos, 20 aminoácidos, 2 ésteres, 5 polímeros, 2 alcoholes, 3 amidas, 3 compuestos fosforilados, 4 compuestos aromáticos, 1 compuesto bromado y 3 aminas (Garland y Mills, 1991). Las Ecoplacas son una versión modificada y reducida de la anterior, de modo que poseen sólo 31 fuentes de carbono, de las que 26 coinciden con las placas GN2 y las 5 restantes son distintas. Las 31 fuentes se pueden agrupar como en el caso anterior, según su naturaleza, en 8 carbohidratos (7 comunes con GN2), 7 ácidos carboxílicos (6 comunes con GN2), 6 aminoácidos (5 comunes con

GN2), 4 polímeros (todos comunes con GN2), 2 compuestos fosforilados (comunes con GN2), 2 compuestos aromáticos (nuevos) y 2 aminas (comunes con GN2). Como se puede apreciar, la diferencia entre ambos tipos de placas no es sólo el número sino también el tipo de fuentes. Así, en las Ecoplacas desaparecen algunas familias de compuestos. Además hay que tener en cuenta que el peso de cada fuente en el conjunto de la microplaca es mayor en las Ecoplacas, ya que en estas cada fuente supone el 3,22% del total, mientras que en las GN2 es el 1,05%. Por ello, no se debe comparar los resultados de ambos tipos de microplacas, sino que deben analizarse por separado. Evidentemente debe existir una coincidencia en los resultados obtenidos.

En las Tablas 2 y 3 se representa los grupos de fuentes de carbono presentes en los dos tipos de microplacas ensayadas y la utilización de estas por parte de las 8 bacterias seleccionadas. Se observa que a 13°C la mayoría de las bacterias utilizan un mayor número de fuentes de carbono que cuando se incuban a 28°C en microplacas GN2. Las dos bacterias aisladas a 5°C mostraron que a esa misma temperatura utilizaban un menor número de fuentes de carbono que a 13 y 28°C. Los aislados a 13°C mostraron, en todos los casos, la utilización de un elevado número de fuentes de carbono a esa temperatura. Cabe destacar que *A. viscosus* y *S. ureae* solo fueron capaces de utilizar unas pocas fuentes de carbono a 28°C. *Bacillus megaterium*, aislada a 20°C, también tuvo un comportamiento similar, mostrando una mayor eficiencia a 13°C que a 28°C.

Los resultados obtenidos en las Ecoplacas son similares a los de las placas GN2, aunque con algunas divergencias, como en el caso de *B. halodurans*, que en las Ecoplacas utilizó un mayor número de fuentes de carbono a 13°C. Sin embargo, hay que destacar que el porcentaje de fuentes empleado en las diferentes temperaturas, en este caso, es muy similar, 58% de fuentes empleadas a 13°C y 42% a 28°C, en las Ecoplacas, frente a 76% a 13°C y 92% a 28°C en las microplacas GN2, en ambos casos la diferencia entre temperaturas es de un 16%.

En general se produce una mayor utilización de fuentes de carbono a 13°C. Sin embargo, cabría preguntarse si esta capacidad de uso va acompañada de una eficiencia similar, para determinar si las bacterias aisladas a estas temperaturas están adaptadas a ellas, es decir si son psicrófilas o toleran las bajas temperaturas siendo otra su óptimo de crecimiento. Se define la eficiencia de uso, como la DO a 590 nm obtenida al utilizar una determinada fuente de carbono, mediante la transformación del violeta de tetrazolio en formazan. En la Tabla 4 se muestra un cuadro resumen de las eficiencias de uso, determinadas en función de la DO media total de la microplaca. Así se



Tabla 2: Uso de las fuentes de carbono por las 8 bacterias seleccionadas, incubadas en microplacas GN2

	Fuentes carbono Biolog	<i>Arthrobacter viscosus</i>		<i>Bacillus</i> sp		<i>Bacillus halodurans</i>		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Kocuria</i> sp			<i>Pseudomonas</i> sp			<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Sporosarcina ureae</i>	
		13°	28°	13°	28°	13°	28°	13°	28°	5°	13°	28°	5°	13°	28°	13°	28°	13°	28°
Carbohidratos	28	27	2	28	14	22	24	28	23	6	27	20	14	23	19	23	23	28	2
Ácidos carboxílicos	24	21	1	21	1	18	20	22	14	8	18	13	22	24	23	14	9	21	0
Amino ácidos	20	20	0	20	5	16	20	20	16	2	15	11	16	20	20	10	3	20	0
Esteres	2	2	1	2	1	1	2	1	1	0	2	1	2	2	2	2	2	2	0
Polimeros	5	4	2	4	5	4	5	5	3	1	5	5	2	5	4	4	3	5	1
Alcoholes	2	1	0	2	1	2	2	2	1	0	1	0	1	2	1	1	1	2	0
Amidas	3	3	0	3	1	2	3	3	3	0	2	2	2	2	3	3	3	3	0
Compuestos fosforilados	3	3	0	3	0	3	3	3	0	0	2	0	1	1	1	1	1	3	0
Compuestos aromáticos	4	4	0	4	4	3	4	4	4	2	3	0	3	3	3	3	3	4	0
Compuestos bromados	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
Aminas	3	3	0	3	0	3	3	3	0	1	3	1	1	3	2	0	0	2	0
Total de fuentes de carbono empleadas	95	89	6	91	33	75	87	92	66	21	78	54	65	86	79	62	49	90	3

Tabla 3: Uso de las fuentes de carbono por las 8 bacterias seleccionadas, incubadas en Ecoplacas

	Fuentes carbono Biolog	<i>Aerobacter viscosus</i>		<i>Bacillus</i> sp		<i>Bacillus halodurans</i>		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Kocuria</i> sp			<i>Pseudomonas</i> sp			<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Sporosarcina ureae</i>	
		13°	28°	13°	28°	13°	28°	13°	28°	5°	13°	28°	5°	13°	28°	13°	28°	13°	28°
Carbohidratos	8	7	3	7	4	7	5	7	6	5	7	8	8	7	8	7	7	8	5
Ácidos carboxílicos	2	4	0	4	1	3	1	7	6	2	4	6	7	7	7	6	4	7	1
Amino ácidos	6	5	0	2	5	5	4	6	5	6	5	6	6	6	6	0	2	5	1
Polimeros	4	3	0	3	3	3	3	4	2	0	4	4	4	4	4	3	2	4	4
Compuestos fosforilados	2	2	0	2	0	0	0	2	1	4	2	1	2	2	1	1	0	0	0
Compuestos aromáticos	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	0	0	0
Aminas	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	2	1	0	1	2	1
Total de fuentes de carbono empleadas	31	22	3	19	13	18	13	27	20	18	23	27	31	30	28	19	18	28	12

ve que las bacterias aisladas a 13°C son más eficientes utilizando las fuentes de carbono a esta temperatura, excepto *Arthrobacter viscosus* en las microplacas GN2, donde es ligeramente menos eficiente que en las Ecoplacas. Las bacterias aisladas a 5°C son mucho más eficientes a 28°C, mientras que la bacteria aislada a 28°C es más eficiente a su temperatura de aislamiento, y la aislada a 20°C lo es a 13°C.

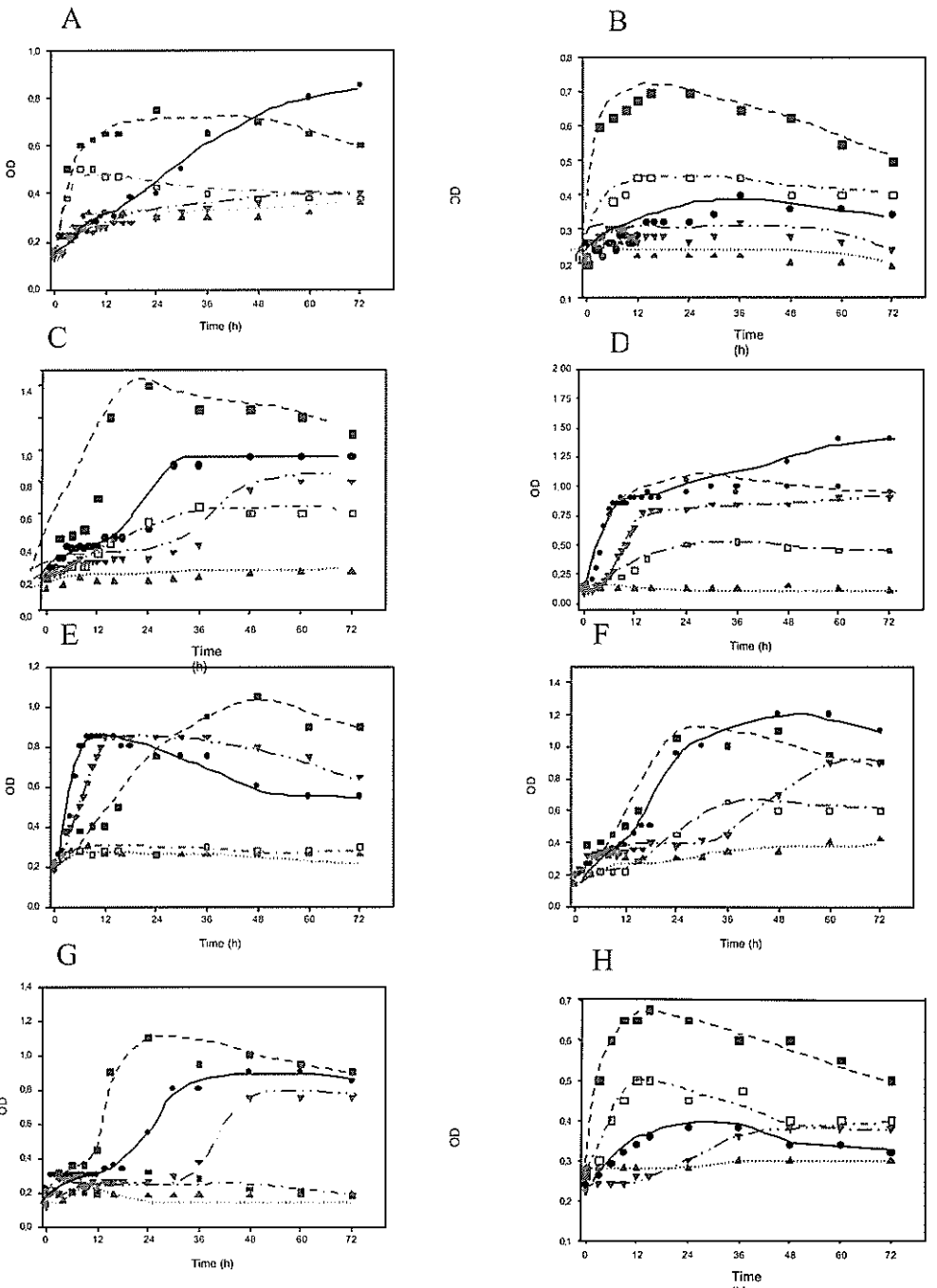
**Tabla 4**  
Eficiencia de uso de las fuentes de carbono

	GN2			Ecoplaca		
	5°C	13°C	28°C	5°C	13°C	28°C
<b>Arthrobacter viscosus</b>	-	++	+++	-	+++	+
<i>Bacillus</i> sp.	-	++	+	-	++	+
<i>Bacillus halodurans</i>	-	+	++	-	+	++
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+++	++	-	++	+
<i>Kocuria</i> sp.	+	++	+++	+	++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+	+++	++	+	+++
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+++	++	-	+++	++
<i>Sporosarcina ureae</i>	-	+++	+	-	+++	+

- no determinado; + poco eficiente; ++ eficiente; +++ muy eficiente

Se puede establecer un criterio de eficiencia/uso de fuentes de carbono, de tal modo que las bacterias aisladas a 13°C y 20°C utilizan más fuentes y lo hacen con más eficacia a 13°C. En las bacterias aisladas a 28°C y 5°C no se obtiene esta relación de un modo claro, aunque también es cierto que el número de fuentes de carbono empleadas a las distintas temperaturas es muy similar, lo que hace que se aprecien más los efectos de la variabilidad de la población bacteriana.

Según lo visto hasta ahora, cabría esperar que la mayor parte de las bacterias tuviesen su óptimo de crecimiento cerca de los 13°C, sin embargo, la obtención de las curvas de crecimiento de todas las bacterias en el rango de 5-45°C, indicó que los óptimos de crecimiento no coinciden con esta temperatura, como muestra la Figura 1. En efecto, todas las bacterias tienen el óptimo de crecimiento entre 28° y 38°C. Definir la temperatura óptima de crecimiento es complejo en algunos casos, como sucede en el caso de *Bacillus* sp., aunque también tenemos casos claros como el de *Arthrobacter viscosus*, con un



**Figura 1:** Curva de crecimiento a 5°C (□), 13°C (△), 28°C (○), 38°C (▽) y 45°C (●) de A) *Kocuria* sp (aislada a 5°C), B) *Bacillus megaterium*. (aislada a 20°C), C) *Pseudomonas putida* (aislada a 13°C), D), *Bacillus halodurans* (aislada a 28°C), E), *Bacillus* sp. (aislada a 13°C), F), *Pseudomonas* sp. (aislada a 5°C) and G), *Sporosarcina ureae* (aislada a 13°C), H), *Arthrobacter viscosus* (aislada a 13°C)

crecimiento óptimo a 38°C. Para determinar la temperatura de crecimiento óptimo, se midió el crecimiento a las 24 horas de cultivo, que es el momento en el que se realiza la medida en el sistema Biolog, tomándose de este modo las mayores pendientes de crecimiento (Tabla 5).

**Tabla 5**

Crecimiento de las bacterias a distintas temperaturas. Determinación del crecimiento de las bacterias a las 24 horas, a distintas temperaturas de incubación

	Temperatura de cultivo				
	5°C	13°C	28°C	38°C	45°C
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	++	+++	+
<i>Kocuria sp.</i>	+	+	++	+++	++
<i>Arthrobacter viscosus</i>	+/-	++	++	+++	++
<i>Sporosarcina ureae</i>	-	+	++	+++	+/-
<i>Pseudomonas putida</i>	+/-	+	++	+++	+
<i>Bacillus sp.</i>	+/-	++	+++	++	+/-
<i>Bacillus halodurans</i>	-	+	+++	++	+
<i>Bacillus megaterium</i>	-	+	+	+++	++

+++ : Crecimiento óptimo; ++ : Buen crecimiento; + : Crecimiento; +/- : Crecimiento escaso; - : No Crecimiento

A la vista de los resultados obtenidos, parece que existe una discordancia entre la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de uso de fuentes de carbono por parte de algunas de las bacterias estudiadas. Este hecho puede estar relacionado con la adaptación de las bacterias de ambientes hipogeos a las bajas temperaturas, de modo que para contrarrestar el efecto térmico recurren a la diversificación del uso de fuentes de carbono y a ser más eficaces utilizándolas.

Como conclusión, se observa que la temperatura es un factor importante en la actividad metabólica de las cepas estudiadas, ya que modifica la eficiencia y el uso de fuentes de carbono por parte de la célula. Sin embargo, a la hora de realizar aislamientos, la temperatura no parece un factor esencial, ya que en todos los casos estudiados se ha visto que todas crecen mejor entre 28 y 38°C, a pesar de su procedencia. La aplicación de análisis estadístico multifactorial a los resultados (análisis de componentes principales), viene a confirmar lo dicho hasta ahora, no aportando nueva información, en este caso.

A su vez, se ha observado que no se producen grandes diferencias en la información obtenida en las Ecoplacas y las placas GN2. Quizás la principal diferencia sea el efecto de la variabilidad metabólica sobre los resultados obtenidos, de tal modo que las Ecoplacas son más sensibles a la variabilidad, hecho que se aprecia en el análisis estadístico. En las Ecoplacas el efecto de la temperatura es más uniforme, apreciándose menos diferencias que en las microplacas GN2. De todos modos, estas diferencias no son significativas en la mayoría de los casos. Así se puede afirmar que el uso de los dos tipos de microplacas es indiferente siempre que se tenga en cuenta el efecto de la variabilidad sobre las Ecoplacas.

A modo de conclusión final, se puede afirmar que la mejor temperatura de aislamiento para microorganismos procedentes de ambientes hipogeos es de 28°C, aunque posteriormente es conveniente en otro tipo de experimentos, como por ejemplo, el estudio del efecto de la actividad metabólica de estos microorganismos sobre pinturas rupestres, capacidad de colonización de nuevas bacterias en ambientes hipogeos, etc., recurrir a las temperaturas habituales en su entorno natural, ya que es el único modo de explotar toda la potencialidad del microorganismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albertano, P., Bruno, L., D'Ottavi, D., Moscone, D., Palleschi, G. (2000) Effect of photosynthesis on pH variation in cyanobacterial biofilms from Roman catacombs. *J. Appl. Phycol.* **12**, 379-384.
- Bruno, L., Albertano, P. (1999) Photoacclimation of sciaphilous ephilitic cyanobacteria isolated from Roman hypogea. *Algal. Stud.* **94**, 89-103.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., González, I., Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, northern Spain). *Geomicrobiol. J.* **16**, 9-25.
- Gamo, M., Shoji, T. (1999) A method of profiling microbial communities based on a Most-Probable-Number assay that uses Biolog Plates and multiple sole carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4419-4424.
- Garland, J.L., Mills A.L. (1991) Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351-2359.
- Garland, J.L. (1996) Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil. Biol. Biochem.* **28**, 223-230.

- Gorden, R.W., Hazen, T.C., Fliermans, C.B. (1993) Rapid screening for bacteria capable of degrading toxic organic compounds. *J. Microbiol. Meth.* **18**, 339-347.
- Heuer, H., Smalla, K. (1997) Evaluation of community-level catabolic profiling using Biolog GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J. Microbiol. Meth.* **30**, 49-61.
- Hoyos M., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E. (1998) Microclimatic characterization of karstic cave: human impact on microenvironmental parameters of prehistoric rock art cave (Candamo cave, northern Spain) *Environ. Geol.* **33**, 231-242.
- Insam, H., Amor, K., Renner, M., Crepaz, C. (1996) Changes in Functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microb. Ecol.* **31**, 77-87.
- Laiz, L., Groth, I., González, I., Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J. Microbiol. Meth.* **36**, 129-138.
- Laiz, L., Groth, I., Schmann, P., Zezza, F., Felske, A., Hermosin., B., Saiz-Jimenez, C. (2000) Microbiology of the stalactites from grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Int. Microbiol.* **3**, 25-30.
- Lee, C., Rusell, N.J., White, G.F. (1995) Rapid screening for bacterial phenotypes capable of biodegrading anionic surfactants: development and validation of a microtitre plate method. *Microbiology* **141**, 2801-2810.
- Rölleke, S., Muyzer, G., Warnner, C., Warnner, G., Lubitz, W. (1996) Identification of bacteria in the biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W., Forney, L. (1998) Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1220-1225.
- Strong-Gunderson, J.M., Palumbo, A.V. (1994) Alternative method for rapidly screening microbial isolates for their potential to degrade volatile contaminants. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 361-366.
- Verschuere, L., Fievez, V., Van Vooren, L., Verstraete, W. (1997) The contribution of individual populations to the Biolog Pattern of model microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**, 353-362.
- Zak, J.C., Willing, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil. Biol. Biochem.* **26**, 1101-1108.