

Inv. Pesq.	45 (2)	págs. 291-296	octubre 1981
------------	--------	---------------	--------------

Identificación de las fases metabólicas en termogramas de cultivos bacterianos*

C. CASTELL, J. WAGENSBERG

Departamento de Termología. Universidad de Barcelona.
Diagonal, 645. Barcelona-28.

y

A. TEJERO y F. VALLESPINÓS

Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona.
Paseo Nacional, s/n. Barcelona-3.

Palabras clave: Microcalorimetría, fases metabólicas, bacteriología, oxígeno.

Key words: Microcalorimetry, metabolic phases, bacteriology, oxygen.

RESUMEN: En el trabajo se comenta un dispositivo experimental destinado a la medición simultánea de dos parámetros relacionados con la cinética del crecimiento de un cultivo bacteriano: termograma microcalorimétrico y evolución de la concentración de oxígeno en el medio. Los resultados obtenidos con diversas cepas bacterianas aisladas en el medio marino sugieren una interpretación metabólica general de los termogramas de cultivos bacterianos.

SUMMARY: IDENTIFICATION OF METABOLIC PHASES IN THERMOGRAMS OF BACTERIAL CULTURE. We present an experimental device specially conceived in order to measure two relevant parameters of the growing of a bacterial culture: the microcalorimetric thermogram and the evolution of the oxygen resources in the medium. The results obtained with several strains suggest a general metabolic interpretation of the microbiological thermograms.

INTRODUCCIÓN

En una serie de recientes trabajos (MONK & WADSO, 1975; WAGENSBERG *et al.*, 1978) se han propuesto primero y admitido después ciertas interpretaciones cualitativas de los termogramas microbiológicos. El punto central de la problemática planteada reside en la correcta identificación de las trayectorias metabólicas que recorre el cultivo a partir del momento en que es inoculado en un medio fresco, aspecto que interesa no sólo desde un punto de vista estrictamente fisiológico sino que además presenta implicaciones de tipo ecológico como se discutirá más adelante. El comportamiento de las cepas ensayadas, que en general es facultativo, muestra una breve etapa de metabolismo que se desarrolla con presencia de oxígeno en el medio (puede clasificarse como aerobio) precediendo una gran fase anaerobia. Este hecho invita a interpretar paralelamente las dos fases diferenciadas, que en general, muestran los termogramas.

* Recibido el 13 de noviembre de 1980.

La utilización de técnicas microcalorimétricas para la caracterización de cepas bacterianas requiere dos hipótesis de trabajo: 1) el principio de correspondencia entre la alternativa metabólica y el termograma, y 2) una mínima reproducibilidad en el comportamiento de las cepas una vez fijadas las condiciones del experimento. Para explorar la viabilidad de estos supuestos se ha diseñado un sistema capaz de medir la evolución temporal de la disipación calorífica y del consumo de oxígeno disuelto en el medio de una forma directa, simultánea, independiente y en continuo. La principal ventaja de este dispositivo reside en que los parámetros que representan las magnitudes a relacionar por la primera hipótesis se refieren a un mismo proceso (con lo que se evita tener que confiar en experiencias paralelas) y permite a su vez el control de la segunda de las hipótesis.

CUADRO 1

Condiciones de aislamiento de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo (TEJERO *et al.*, en preparación).

	CONDICIONES DE AISLAMIENTO		
	Profundidad (m)	Oxígeno (ml/l)	Posición
<i>Enterobacter</i>	0	5,8	42° 10' N 9° 20' O
<i>Pseudomonas</i> I	0	5,7	43° 10' N 9° 10' O
<i>Flavobacterium</i>	20	5,2	20° 00' N 19° 00' O
<i>Pseudomonas</i> II	1000	4,3	43° 10' N 9° 10' O
<i>Pseudomonas</i> III	1200	4,3	42° 10' N 9° 20' O

Los resultados obtenidos lo han sido en el empleo de distintas cepas bacterianas marinas aisladas en el curso de una serie de campañas oceanográficas realizadas en la zona de afloramiento del NO de África y en la plataforma de Galicia (véase cuadro 1). Dichos resultados determinan, como se verá, el verdadero alcance de las hipótesis mencionadas y ofrecen la posibilidad de un estudio preciso del proceso de adaptación de las células en ambientes de condiciones variables. Y ello en dos escalas temporales diferentes: una rápida durante el transcurso del desarrollo de la población bacteriana entre el inoculo y su virtual extinción o estabilización, y otra lenta que interesa a las variaciones sufridas tras sucesivos desarrollos idénticos en el laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

El crecimiento bacteriano se ha realizado en la célula de un microcalorímetro tipo Vian-Calvet, herméticamente cerrada, con 6 ml de medio de cultivo MH (VALLESPINÓS y TEJERO, 1977). El sistema experimental (fig. 1) es esencialmente el mismo descrito en un trabajo anterior (WAGENSBERG *et al.*, 1978) con la diferencia que en este caso se ha incorporado un analizador de oxígeno ORBISPHERE 2603 acoplado al tapón doblemente roscado de la célula calorimétrica. El extremo de la sonda, una célula polarográfica completa con electrolito y membrana, queda sumergida en el cultivo. Las pruebas realizadas

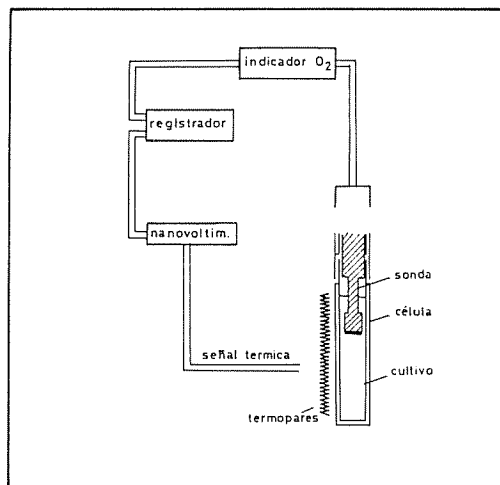


FIG. 1. Esquema del sistema experimental utilizado para la realización de las pruebas comentadas en el texto.

sin inóculo garantizan la estabilidad de la señal, con una deriva inapreciable dentro de los márgenes temporales en los que se desarrolla la experiencia, y una satisfactoria independencia de dicha señal con la disipación energética del cultivo bacteriano en crecimiento (la sonda disipa 7,1 μ w constantes y estables frente a los 300 μ w que suele alcanzar el máximo de la potencia calorífica liberada por las bacterias).

Las dos señales son por tanto la expresión de dos mediciones independientes sobre un mismo proceso biológico y debidamente amplificadas, se recogen, en continuo, en un registrador de doble canal cuya velocidad de evolución se fija en 2 cm/h.

Cada experiencia requiere la sustitución de la membrana del extremo del

sensor cuya sensibilidad depende de la tensión a la que se encuentra sometida. Ello obliga a una calibración de la señal de oxígeno previa a cada medida.

En el cuadro 1 se recogen las condiciones de aislamiento de las distintas cepas utilizadas, cuya sistemática se ha realizado según la metodología expuesta en TEJERO *et al.*, en preparación.

RESULTADOS

En la figura 2 se representan cuatro registros típicos, correspondientes a las cepas ensayadas. La línea continua es la del termograma y la discontinua indica la concentración residual de oxígeno disuelto presente en el medio. Un primer análisis de los resultados obtenidos pone de manifiesto que el agotamiento del oxígeno en el medio coincide exactamente con una paralización,

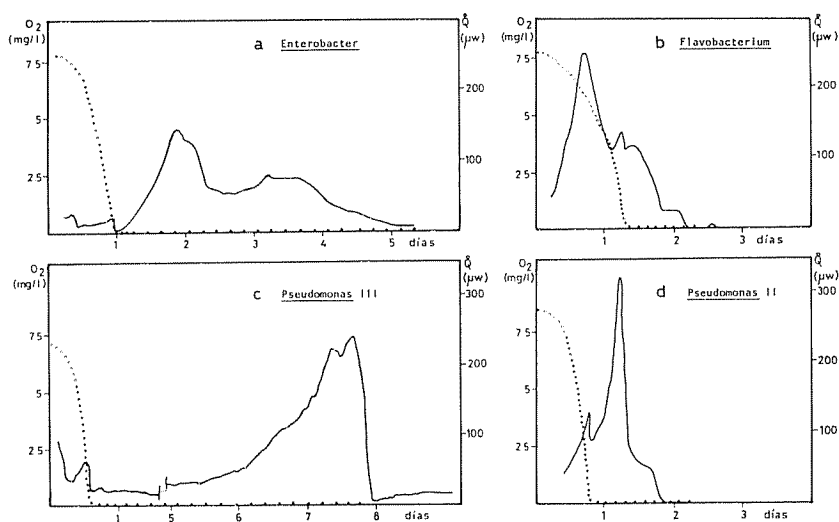


FIG. 2. Registros típicos correspondientes a cuatro de las cepas bacterianas ensayadas. El trazo en continuo representa la evolución del termograma y la línea de puntos corresponde a la concentración de oxígeno disuelto presente en el medio.

al menos temporal, de la actividad energética de la población bacteriana en el interior de la célula calorimétrica. Durante una primera fase la población bacteriana se desarrolla con metabolismo aeróbico en presencia de oxígeno. Las cepas que se adaptan a las nuevas condiciones en ausencia de oxígeno prosiguen su actividad energética hasta que interviene algún otro tipo de factor limitante (probablemente, el agotamiento de algún nutriente).

Hasta aquí los resultados confirman las sospechas adelantadas en la literatura del tema. Sin embargo, en los termogramas en los que hay una sola fase aparente, lo que puede suponer un fuerte solapamiento de fases, la interpretación no es tan directa. Los casos de las figuras 3a y 3b son muy reveladores al respecto. En la figura 3a se pone de manifiesto la simultaneidad de ambas fases. En la figura 3b aparece, en cambio, una gran fase anaerobia precedida por una breve fase de adaptación. Se trata de un caso que, sobre el termograma, pudiera ser fácilmente confundido con el de la figura 2d.

El caso de la figura 3a afecta también la reproducibilidad del comportamiento bacteriano a largo plazo, ya que corresponde a la cepa de *Flavobacterium* en una experiencia realizada seis meses después de haber obtenido ter-

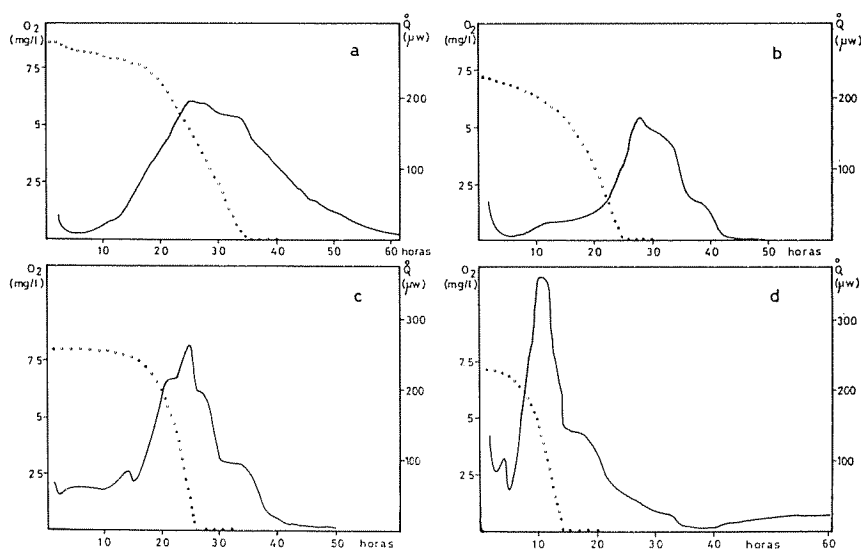


FIG. 3. a y b: termogramas atípicos, con una única fase. c y d: cultivo mixto con las cepas de *Flavobacterium* y *Pseudomonas* II, donde se evidencian las distintas estrategias energéticas. En el primer caso, la relación de inóculos es de 10^{-5} y en el segundo de 10^{-3} .

mogramas como el de la figura 2. Esta cepa que se caracteriza por presentar sorprendentes organizaciones temporales con trascendencia en ciertos procesos evolutivos (WAGENSBERG, *et al.*, 1978) ha derivado a partir de un comportamiento metabólico casi aerobio estricto en un principio.

Las figuras 3c y 3d corresponden a las primeras pruebas realizadas para estudiar la competencia entre cepas distintas de bacterias, caracterizadas por presentar perfiles térmicos muy distintos, al ser inoculadas en un mismo medio simultáneamente. Se trata con ello de explorar las posibles ventajas que proporcionan las respectivas estrategias energéticas. Para ello se han utilizado

las cepas de *Flavobacterium* y *Pseudomonas* II (véase cuadro 1); las relaciones de inóculo han sido 10^{-5} (fig. 3c) y 10^{-3} (fig. 3d). Como puede observarse, los estadios intermedios son perfectamente reconocibles con la ayuda del analizador de oxígeno.

CONCLUSIÓN

La técnica descrita, con la incorporación del sensor de oxígeno, permite el análisis de una doble cinética de gran valor para el reconocimiento y el estudio de procesos biológicos de adaptación y de organización en general (LURIE & WAGENSBERG, 1979).

BIBLIOGRAFÍA

- LURIE, D., and J. WAGENSBERG. — 1979. Non-equilibrium Thermodynamics and Biological growth and Development. *J. Theor. Biol.*, 78: 241-250.
- MONK, P. and I. WADSO. — 1975. The use of the microcalorimetry for bacterial classification. *J. appl. Bact.*, 38: 71-74.
- VALLESPINÓS, F. y A. TEJERO. — 1977. Distribución de bacterias heterótrofas en la región de afloramiento del NW de África. *Res. Exp. Cient. B/O Cornide*, 6: 151-163.
- WAGENSBERG, J.; C. CASTELL, V. TORRA, J. RODELLAR y F. VALLESPINÓS. — 1978. Estudio microcalorimétrico del metabolismo de bacterias marinas: detección de procesos rítmicos. *Inv. Pesq.*, 42: 179-188.
- WAGENSBERG, J. and J. RODELLAR. — En: *Dissipative Structures and Ecological Systems*. University of Texas Press, Austin. (En prensa.)