

Inv. Pesq.	42 (1)	Págs. 179-188	marzo, 1978
------------	--------	---------------	-------------

# Estudio microcalorimétrico del metabolismo de bacterias marinas: Detección de procesos rítmicos\*

por

J. WAGENSBERG,\*\* C. CASTEL,\*\*, V. TORRA,\*\* J. RODELLAR \*\*\*  
y F. VALLESPINÓS \*\*\*\*

## INTRODUCCIÓN

La microcalorimetría de flujo se ha revelado últimamente como una poderosa técnica para la detección de comportamientos biológicos. En este trabajo se aplica al estudio del aspecto energético del metabolismo de bacterias marinas. El interés de estas experiencias reside en primer lugar en la observación de las distintas respuestas ante unas mismas condiciones impuestas en el laboratorio. En este sentido, como se verá, la eficacia energética de la evolución de los cultivos en las condiciones experimentales muestra una «memoria» de las condiciones ambientales en las que fueron aisladas las cepas, reflejo probablemente de su información genética. Por otro lado, la organización temporal registrada en una de las cepas plantea interesantes perspectivas biológicas en el campo de la formación de estructuras disipativas espacio-temporales.

\* Recibido el 8 de marzo de 1977. Trabajo presentado a la III Reunión de calorimetría celebrada en Barcelona.

\*\* Departamento de Termología. Universidad de Barcelona.

\*\*\* E.T.S.I.C.C.P. Universidad Politécnica de Barcelona.

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

## MATERIAL Y MÉTODOS

El sistema experimental (WAGENSBERG, 1976) permite medir la disipación calorífica por bacteria viable en evoluciones isotermas ( $20 \pm 0,5^\circ$  centígrados) de los cultivos. La disipación de calor se obtiene en continuo mediante un microcalorímetro de flujo especialmente sensible y estable. Su tiempo de respuesta es lo suficientemente corto para identificar la señal de salida con la real. El número viable de bacterias se mide, a través de un banco adecuado de diluciones, sobre muestras procedentes de cultivos en evolución paralela. Los inóculos iniciales se preparan del mismo modo, mediante una serie de choques térmicos a distintas temperaturas a fin de lograr que la población inicial sea lo más homogénea posible. La célula calorimétrica, herméticamente cerrada, contiene 6,7 ml de medio MH líquido (VALLESPINÓS y TEJERO, 1977). Los registros de densidad óptica se han obtenido en continuo mediante un espectrofotómetro de doble haz VARIANT, registrándose la transmitancia a 460 nm. Cada medida tiene una duración aproximada de siete días entre la siembra y la desaparición de toda actividad calorimétrica en el cultivo.

Las cepas marinas elegidas en la experimentación fueron aisladas durante la campaña oceanográfica ATLOR VII realizada en otoño de 1975 en la región de afloramiento del NW de África. Una de ellas fue aislada a 500 metros (estación 15) y la otra a 20 metros (estación 14) de profundidad, en condiciones ambientales francamente distintas (véase MANRÍQUEZ y FRAGA, en prensa). La sistemática precisa de ambas cepas está en fase de elaboración (TEJERO y VALLESPINÓS, en prensa) pero de acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas, pueden clasificarse provisionalmente como *Vibrio* sp. y *Flavobacterium* sp., respectivamente.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos presentan dos aspectos fundamentales. Uno que confirma, en una primera etapa, la idea que ha promovido la realización de esta serie de medidas; otro, imprevisto, de gran interés ecológico, bioquímico y termodinámico.

En primer lugar, la evolución térmica en un sistema cerrado es un buen test para obtener información sobre el comportamiento de una cepa determinada. En efecto, el agotamiento del oxígeno disuelto inicial obliga, una vez rebajada su tensión parcial por debajo de un cierto punto crítico, a una adaptación de las dotaciones enzimáticas (metabolismo aeroanaerobio). La finalidad del experimento es poner de manifiesto las diferencias con respecto a la disipación de calor de dos cepas aisladas

en condiciones ambientales distintas con respecto a la reserva de oxígeno. Para ello el sistema experimental ofrece dos datos importantes: el perfil del termograma total y los puntos de disipación específica (disipación de calor por célula bacteriana, calculada a partir del termograma y del número de células viables). En el desarrollo del termograma bacteriano se presentan, por lo general, dos fases que corresponden por orden de aparición temporal, respectivamente a la fase de respiración aerobia y a la fase de respiración anaerobia. Su intensidad y localización en el tiempo proporcionan una primera información acerca de la importancia relativa de cada fase (WAGENSBERG y TORRA, 1976; MONK y WADSO, 1975); por otro lado, la disipación específica es un índice de la eficacia metabólica de un organismo vivo (SCHRÖDINGER, 1967). De acuer-

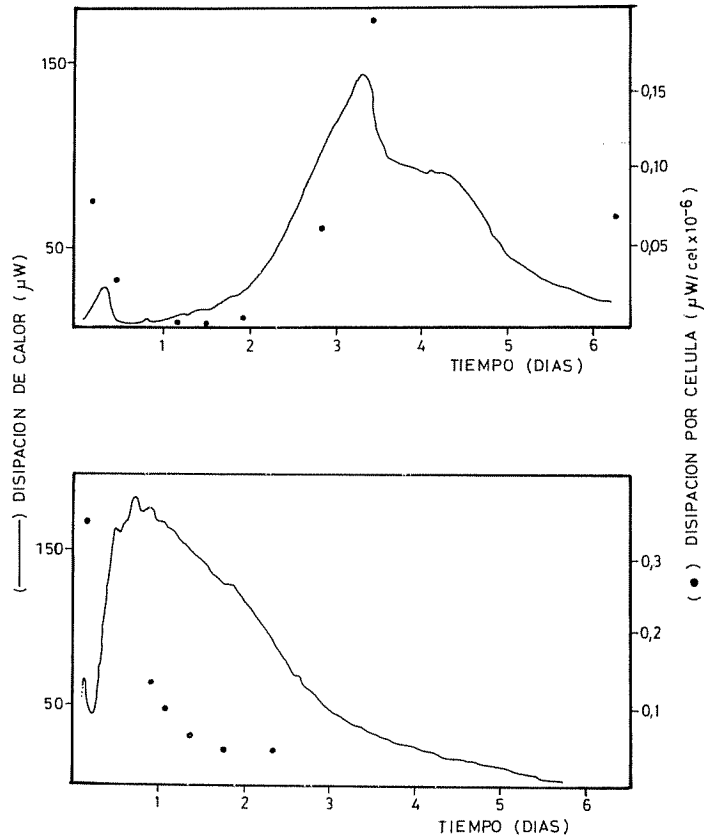


FIG. 1.— (Arriba) Termograma y disipación específica (●) de la cepa de *Flavobacterium* aislada a 20 m. Obsérvese que existe un período de diauxia entre la primera fase (aerobia) y la segunda (anaerobia). (Abajo) Termograma y disipación específica (●) de la cepa de *Vibrio* aislada a 200 m. La segunda fase es violenta e intensa y está solapada con la primera.

do con el criterio de PRIGOGINE-WIAME (PRIGOGINE-WIAME, 1946; PRIGOGINE, 1967), comprobado satisfactoriamente de forma experimental (ZOTIN y ZOTINA, 1967; ZOTIN, 1972) la aproximación al estado estacionario en condiciones ambientales constantes se realiza en la dirección de máxima eficacia. La figura 1 muestra dos registros típicos de las series realizadas con las cepas citadas. Arriba, que corresponde a *Flavobacterium*, cepa aislada en condiciones ricas en oxígeno, el termograma sigue una fase aerobia que culmina a las 9 horas; 13 horas después de realizado el inóculo finaliza la primera fase (aerobia) y se inicia una larga fase de diauxia durante la cual el número de células viables permanece prácticamente constante, fase en la que suponemos una adaptación de los sistemas enzimáticos a las nuevas condiciones ambientales de baja tensión parcial de oxígeno. A continuación comienza la segunda fase que culmina al cuarto día de iniciado el experimento. La disipación específica sigue la ley de PRIGOGINE-WIAME con una tendencia hacia la máxima eficacia durante la fase aerobia; sin embargo, durante la segunda fase

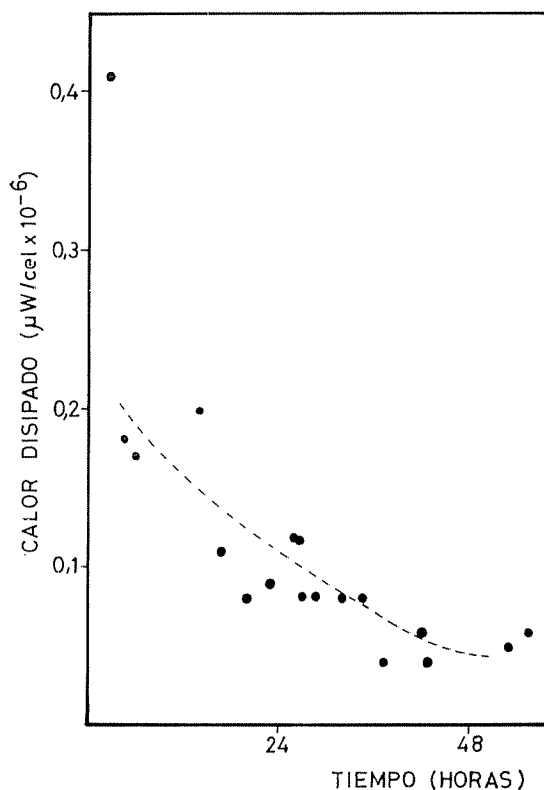


FIG. 2. — Disipación específica de *Vibrio* sobre una serie de tres inóculos independientes y preparados de idéntica forma.

el proceso se invierte y resulta realmente antieconómico para esta cepa realizar un metabolismo anaerobio.

En cambio, para la segunda cepa experimentada (*Vibrio*, abajo) el termograma muestra una breve fase aerobia que culmina a las 4,5 horas, que a su vez se solapa con una violenta e intensa segunda fase anaerobia que alcanza su máximo antes de cumplir el primer día; la disipación disminuye después paulatinamente hasta recuperar la línea de base al sexto día. La disipación cumple la ley ya citada, decreciendo continuamente hasta alcanzar la máxima eficacia en la fase de respiración anaerobia.

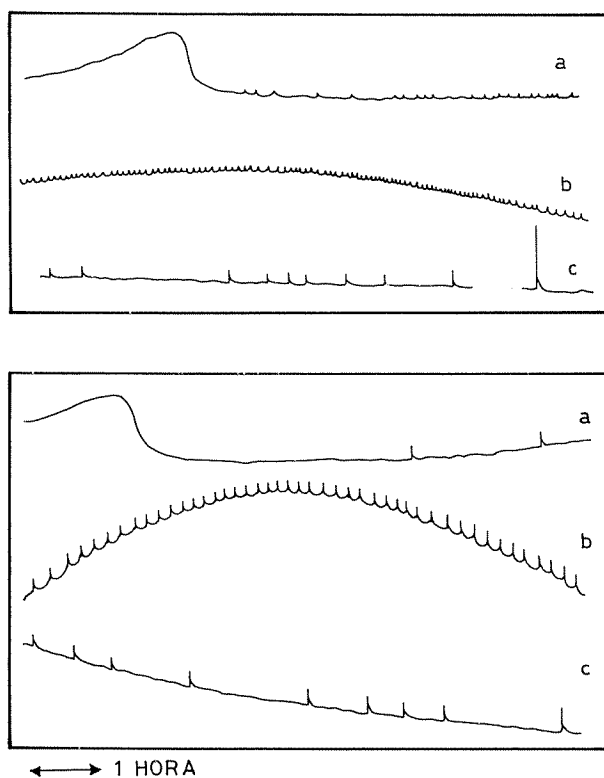


FIG. 3. — (Arriba) Tres fases del fenómeno periódico detectado en la evolución de la cepa de *Flavobacterium* sin ninguna manipulación especial en el inóculo inicial. (Abajo) Tres fases del mismo fenómeno, también con la cepa *Flavobacterium*, pero sometiendo el inóculo a una serie de choques térmicos a distintas temperaturas a fin de lograr que la población inicial sea lo más homogénea posible.

La figura 2 muestra la reproducibilidad de estos resultados correspondientes a tres medidas consecutivas independientes realizadas con la misma cepa (*Vibrio*).

El segundo aspecto que merece la pena comentarse es que los termogramas correspondientes a *Flavobacterium* muestran la presencia periódica de picos energéticos. En la figura 3 (arriba) se presentan tres segmentos del termograma que se corresponden (a) a la fase aerobia, (b) a la culminación de la fase anaerobia y (c) a la fase de extinción de actividad en el cultivo. El inóculo fue preparado sin ninguna manipulación especial. Los primeros picos aparecen poco después de haberse superado la primera fase, con períodos que oscilan entre los quince minutos y las dos horas. Sin embargo, a medida que avanza la incubación, el ritmo se va afianzando hasta alcanzar un período estacionario de unos diez minutos durante la etapa (b). Al iniciarse el descenso de la segunda fase, vuelven a espaciarse de un modo cada vez más irregular al tiempo que aumenta su intensidad. Todo ello sugiere la presencia de un proceso lo bastante importante ( $\sim 3 \mu\text{W}$ ) para ser detectado por el dispositivo calorimétrico.

El mismo fenómeno se ha observado al registrar la transmitancia de un cultivo de la misma cepa en una experiencia similar llevada a cabo en una cubeta de espectrofotómetro de 10 cm de recorrido óptico. La figura 4 representa el registro óptico de *Flavobacterium* (1), *Escherichia coli* (2) que se tomó como cepa de referencia y en la que no aparece

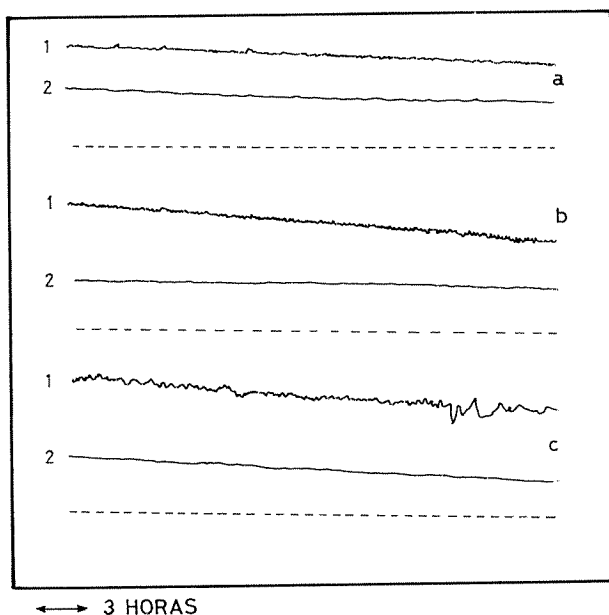


FIG. 4.—Tres fases del fenómeno periódico detectado ópticamente mediante un espectrofotómetro a 460 nm de longitud de onda; registro de *Flavobacterium* (1) comparado con el de *Escherichia coli* (2) y agua destilada (línea a trazos).

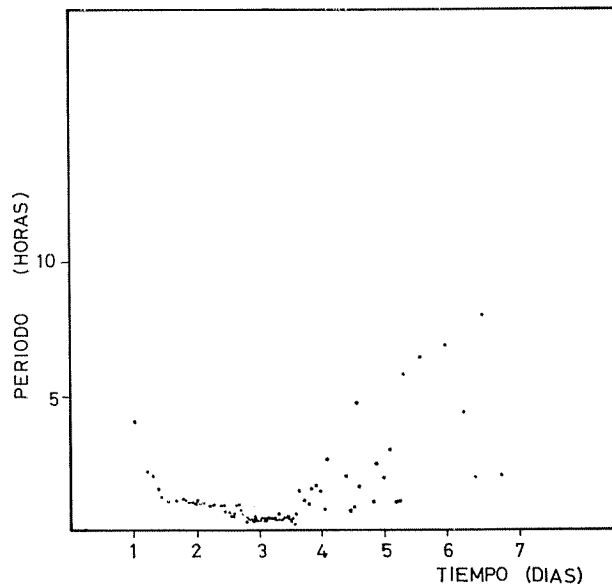


FIG. 5.—Evolución temporal del período de aparición de picos en *Flavobacterium* (experimento de la figura 3, abajo).

ningún tipo de pico y agua destilada (línea a trazos) en tres fases homólogas a las (a), (b) y (c) mencionadas para el termograma.

La figura 3 abajo muestra la repetición de la experiencia con un inóculo preparado especialmente para crear unas condiciones iniciales favorables a la sincronización del cultivo. En este caso se seleccionó mediante filtración el tamaño de las bacterias que intervienen en la primera resiembra y se sometió la última (de la que se toma el inóculo) a una sucesión de cambios bruscos de temperatura (a 30° C y a 3° C respectivamente). Con ello se consigue en efecto una mayor regularidad, un mayor espaciado y una mayor intensidad en los picos; ello implica una mayor sincronización. Tiene especial interés representar la evolución del período con el tiempo (la figura 5 recoge la información de la figura 3, abajo). De esta representación puede deducirse la forma en que progresa el proceso rítmico desde la aparición del primer pico hasta la culminación de la fase anaerobia, y su degeneración posterior.

## DISCUSIÓN

La interpretación del primer grupo de resultados parece evidente (figura 1 y 2). Las cepas estudiadas responden al crecimiento en un recin-

to cerrado de modo que reflejan la adaptación metabólica a sus condiciones de origen. El problema que se plantea en esta primera fase es el estudio del grado de generalidad de esta afirmación y debe resolverse mediante un barrido exhaustivo de cepas aisladas en ambientes distintos. No obstante, es muy sugestiva la idea de que el metabolismo energético detectado mediante técnicas microcalorimétricas responda a una adaptación de los sistemas enzimáticos bacterianos, evolucionados de acuerdo con las condiciones ambientales. Ello tiene enorme interés en el estudio ecológico de las bacterias marinas.

Con respecto al estudio del proceso rítmico, la interpretación no es tan inmediata. El primer paso es determinar qué tipo de proceso se manifiesta gracias a la sincronización. La forma de los picos es la típica de un calor de dilución, y éste a su vez puede deberse a dos causas fundamentales: lisis de las células o excreción de un metabolito; podría considerarse también la posibilidad de una degradación espontánea de energía. Lo primero podría deberse a la acción de un virus. No obstante, las pruebas realizadas no han confirmado por el momento esta hipótesis. La segunda posibilidad quizás es más atractiva y supone el calor de dilución del paso de un compuesto (producto de un conjunto de reacciones bioquímicas) a través de la membrana celular.

Existe abundante literatura acerca de oscilaciones químicas en el doble aspecto teórico-experimental (LAVENDA et al., 1971; HESS et al., 1971; LEFEVER et al., 1971; GERISCH y HESS, 1974). Un importante precedente es el trabajo de HESS et al. (1971) realizado con una suspensión de *Dictyostelium discoideum*. En él se detectan picos de la densidad óptica utilizando longitudes entre 430 y 445 nm; demuestra la relación de estos picos con la glicólisis.

En el campo de la termodinámica de los procesos irreversibles, el fenómeno constituye un ejemplo de lo que PRIGOGINE (GLASDORFF et al., 1971; NICOLIS et al., 1975) denomina «orden biológico a través de las fluctuaciones». En este caso se trata de una estructura disipativa temporal con una importante analogía bioquímica. En efecto, en el aspecto teórico LEFEVER (1971) y NICOLIS et al. (1975) han obtenido estructuras similares para las concentraciones de productos intermedios, resolviendo numéricamente las ecuaciones diferenciales de un modelo de reacciones bioquímicas. En el aspecto experimental, existe una analogía con la reacción de ZHABOTINSKI (ZHABOTINSKI, 1964; ZHABOTINSKI, 1968; GLASDORFF et al., 1971). En este caso, oscilaciones temporales en las concentraciones de  $Ce^{+1}$  y  $Ce^{+3}$  culminan, al alcanzar la máxima disipación, en una estructura disipativa espacial que también acaba por degenerar cuando, como en nuestro caso, la experiencia tiene lugar en un recinto cerrado.

Las estructuras disipativas son, en definitiva, características de esta-



dos muy alejados del equilibrio (como ocurre en la zona donde se optimiza el fenómeno de la cepa de *Flavobacterium*) y constituyen una base termodinámica para comprender la regulación y control de los procesos vitales; o dicho de otro modo, para comprender la adquisición, almacenamiento y transmisión de información en los sistemas vivos.

### AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Alberto TEJERO su colaboración en algunas fases experimentales del trabajo y a Pilar SACRISTÁN el dibujar todas las figuras.

### SUMMARY

MICROCALORIMETRIC STUDY OF THE MARINE BACTERIA METABOLISM: DETECTION OF RHYTHMICAL PROCESSES. — In order to record the heat dissipation of marine strains metabolism a specially sensitive and stable flow microcalorimeter has been need. The dissipation for viable bacteria is obtained by means of parallel experiments prepared identically. The technique reveals itself as a powerful way with regard to the direct detection of biological behaviours. We have test to strains isolated in very different environments conditions; *Vibrio* sp. at depth 500 m and *Flavobacterium*, 20 m in upwelling region NW Africa. The results are revelant regarding the energetic economy of the respectives metabolisms and they show a certain «memory» of the strains related to the genetic information. This point is therefore strongly interesting from the ecological point of view. By the other hand a time organization is detected in one of the strains (*Flavobacterium*). The global thermogram show relaxations oscilations which evolution tends to reach a constant period. We think it is a new biological example of dissipative structures in the sense of the thermodynamic of the irreversible processes.

### BIBLIOGRAFÍA

- GERISCH, G. and B. HESS. — 1974. Cyclic-AMP-controlled oscilations in suspended *Dictyostelium* cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 2118-2122.
- GLASDORFF, P. — 1971. *Structure, Stabilité et Fluctuations*. Masson. Paris.
- HESS, B. — 1971. Oscillatoria phenomena in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 237-258.
- LAVENDA, B. — 1971. Chemical instabilities and relaxation oscillations. *J. Theor. Biol.*, 32: 283-292.
- LEFEVER, R. — 1971. Chemical instabilities and sustained oscillations. *Ibidem*, 30: 267-284.
- MANRÍQUEZ, M. y F. FRAGA. Datos básicos de la campaña ATLOR VII. (En prensa).
- MONK, P. and I. WADSO. — 1975. The use of microcalorimetry for bacterial classification. *J. appl. Bact.*, 38: 71-74.

- NICOLIS, G. — 1975. *Membranes, dissipative structure and evolution*. John Wiley. Nueva York.
- PRIGOGINE, L. — 1967. Introduction to thermodynamics of irreversible processes. *Ibidem*. Nueva York.
- PRIGOGINE, I. and E. WIAME. — 1946. Biologie et thermodynamique des phénomènes irréversibles. *Experientia*, 2: 451-453.
- SCHRÖDINGER, S. — 1967. *What is Life?* Cambridge University Press.
- TEJERO, A. y F. VALLESPINÓS. — Taxonomía y grupos fisiológicos bacterianos marinos. (En prensa.)
- VALLESPINÓS, F. y A. TEJERO. — 1977. Distribución de bacterias heterótrofas en la zona de afloramiento del NW de África. *Res. Exp. Cient. B/O Cornide*, 6: 151-163.
- WAGENSBERG, J. — 1976. *Balance energético y disipación entrópica en un cultivo bacteriano*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- WAGENSBERG, J. and V. TORRA. — 1976. *Microcalorimetric study of «Citrobacter intermedium C<sub>3</sub>»*. Conférence de Thermocinétique. Cadarache.
- ZHABOTINSKI, A. M. — 1964. *Biofizika*, 2: 306.
- ZHABOTINSKI, A. M. — 1968. *J. Phys. Chem.*, 42: 1649.
- ZOTIN, A. I. — 1972. *Thermodynamics aspects in development biology*. S. Karger.
- ZOTIN, A. I. and R. S. ZOTINA. — 1967. Thermodynamics aspects of development biology. *J. Theoret. Biol.*, 17: 57-75.