

Estudio microcalorimétrico del crecimiento de Serratia sp. y su dependencia con respecto a la temperatura.

J. Bermúdez<sup>+</sup> y J. Wagensberg<sup>\*</sup>

<sup>+</sup>Departamento de Física Médica. Facultad de Medicina. Casanova 143

<sup>\*</sup>Departamento de Termología. Facultad de Física  
Universidad de Barcelona

Introducción.

La microcalorimetría es una técnica de aplicación relativamente reciente al estudio de los procesos de intercambio energético entre un sistema biológico y su entorno. Las investigaciones realizadas en diversos campos (estructura y función de macromoléculas (Privalov, 1980), metabolismo de sistemas celulares (Belaich, 1980; Kemp, 1980), etc.) ponen de manifiesto la potencia de la técnica microcalorimétrica, al combinar los resultados experimentales con los conceptos de la Termodinámica del equilibrio y de procesos irreversibles, para la elaboración de modelos fisico-matemáticos, con la ventaja de ser una técnica no destructiva y sumamente sensible.

En este trabajo se presenta un sistema experimental que permite la combinación de parámetros intensivos con las medidas calorimétricas y su aplicación a la cinética del crecimiento de las cepas bacterianas *Serratia mariorubra* IP75 en medios complejos y *Serratia marcescens* ATCC 274 en medio mínimo de glucosa.

Termoquímica del crecimiento bacteriano. (Prigogine, Defay, 1954; Luriè et al. 1979; Belaich, 1980). Los intercambios energéticos a través de los límites de un sistema están regidos por los dos principios de la Termodinámica:

(1)  $dU = Q - p dV$  (solo se intercambia trabajo de expansión)

(2)  $T dS \geq Q$  (= en proc. reversibles, > en proc. reales)

La desigualdad (2) puede expresarse también como

(3)  $T dS = Q + Q'$

siendo  $Q'$  ( $\geq 0$ ) la producción de calor en el interior del sistema, asociada a la irreversibilidad de los procesos internos y  $Q$  ( $\geq 0$ ) es el calor intercambiado con el entorno. Por tanto las variaciones de la función

de estado entropía,  $dS \geq Q / T$  pueden expresarse por

$$dS = Q / T + Q' / T = \int S_e + \int S_i$$

donde  $\int S_i$  y  $\int S_e$  no corresponden a variaciones de funciones de estado, sino que representan la producción interna de entropía y el intercambio entrópico del sistema con su entorno respectivamente ( $\int S_i > 0$  y  $\int S_e < 0$  en sistemas vivos).

La producción de entropía correspondiente a una reacción química es proporcional al avance  $d\xi$  de la misma

$$T \int S_i = \dot{Q}' = A \cdot d\xi \geq 0$$

o bien

$$T \frac{dS_i}{dt} = \frac{Q'}{dt} \equiv \dot{Q}' = A \cdot v \geq 0$$

donde  $A$  es la afinidad ( $A = -\left(\frac{\partial G}{\partial \xi}\right)_{T,P}$ ) y  $v$  la velocidad de reacción. En un sistema de  $p$  reacciones

$$T \frac{dS_i}{dt} = \sum A_p \cdot v_p \geq 0$$

La Termodinámica de los procesos irreversibles establece que  $\frac{dS_i}{dt}$  es una función monótona decreciente durante el desarrollo de los sistemas vivos (Lurié, Wagensberg, 1979) alcanzando un mínimo en el estado estacionario. Finalmente  $\frac{dS_i}{dt} = 0$  al desaparecer las ligaduras del estado estacionario y alcanzarse el estado de equilibrio termodinámico. La interpretación del término  $\frac{dS_i}{dt}$  (a partir de las variaciones de variables intensivas del sistema) junto con la combinación de medidas microcalorimétricas directas del término de intercambio  $\frac{dS_e}{dt} = \dot{Q} / T$  permite la aplicación de la Termodinámica de procesos irreversibles al estudio de la evolución de los sistemas biológicos.

La aplicación de las leyes de la Termodinámica clásica al estudio microcalorimétrico de cultivos celulares, permite la interpretación de resultados sobre la cinética de crecimiento, eficacia metabólica, etc. en distintas condiciones ambientales (medio de cultivo, temperatura, etc.). Para este fin el sistema termodinámico que consideramos es el formado por

"células + medio de cultivo"

y sus límites son las paredes rígidas de la cubeta del microcalorímetro cerrada herméticamente. En estas condiciones se trata de un sistema cerrado evolucionando a T y p constantes y por tanto los intercambios de calor a través de la cubeta del calorímetro corresponden a los cambios de entalpía

del cultivo

$$(4) \quad dH = Q_{T,P} = T \delta S_e$$

y dado que

$$dH = dG + T dS = dG + T \delta S_e + T \delta S_i$$

en nuestras condiciones experimentales  $-dG = T \delta S_i$ .

La ecuación (4) equivale a las siguientes

$$\frac{dH}{dt} = \dot{Q}_{T,P} = T \cdot \frac{\delta S_e}{dt}$$

$$(5) \quad \frac{1}{m} \frac{dH}{dt} = \frac{1}{m} \dot{Q}_{T,P} = \frac{1}{m} T \frac{\delta S_e}{dt}$$

siendo  $m$  la "biomasa" del cultivo.

Las variaciones de entalpía son consecuencia del metabolismo celular en donde están acoplados los procesos de catabolismo y anabolismo, por lo que podemos expresar la ecuación (5) como

$$(6) \quad \frac{1}{m} \dot{Q}_{T,P} = \frac{1}{m} \dot{Q}_{cat} + \frac{1}{m} \dot{Q}_{ana}$$

Dado que la producción de calor es debido, fundamentalmente, al consumo de sustrato y la actividad anabólica tiene por finalidad la producción de nueva biomasa la ecuación (6) toma la forma

$$(7) \quad \frac{1}{m} \dot{Q} = \frac{1}{m} \frac{d}{dt} [Sust.] \cdot K_c + \frac{1}{m} \frac{dm}{dt} K_a \quad (T,P)$$

siendo  $K_c$  la energía obtenida por mol de sustrato metabolizado y  $K_a$  la energía necesaria para aumentar un gramo la biomasa. De acuerdo con Belaich et al. (1968) en el estudio de sistemas microbiológicos

$$\frac{1}{m} \dot{Q}_{ana} \ll \frac{1}{m} \dot{Q}_{cat}$$

por lo tanto

$$(8) \quad \frac{1}{m} \dot{Q} \approx \frac{1}{m} \frac{d}{dt} [Sust.] \cdot K_c = A_c \cdot K_c$$

donde  $A_c$  es la actividad catabólica específica del cultivo. Las medidas calorimétricas de  $\dot{Q}(t)$ , por consiguiente, nos permiten determinar la actividad catabólica del cultivo, y su integración temporal

$$(9) \quad \int_0^t \dot{Q}(t) dt = \Delta H(t)$$

la variación de entalpía del sistema. La combinación de  $\dot{Q}(t)$  con medidas

de parámetros específicos adecuados ( $m(t)$ , [Sustrato], [prod. finales], [interm. metab.],  $[O_2]$ , etc.) permite el estudio de la cinética y eficacia metabólicas de cada cultivo.

#### Material y métodos.

1.- Sistema experimental. La respuesta del calorímetro es proporcional al valor instantáneo de  $\dot{Q}(t)$  y este índice es forzosamente inespecífico dado su carácter aditivo de todos los procesos que tienen lugar en el cultivo (ec. 6 y ss.). La figura 1 esquematiza el dispositivo experimental, diseñado para este estudio, consistente en tres sistemas que evolucionan paralelamente y en idénticas condiciones ambientales, a partir de un mismo inóculo previamente homogeneizado, lo cual reduce el riesgo de comportamientos divergentes y permite la correlación temporal de los distintos parámetros obtenidos, pudiendo con ello identificar cada fase del termograma con una estrategia metabólica determinada del cultivo.

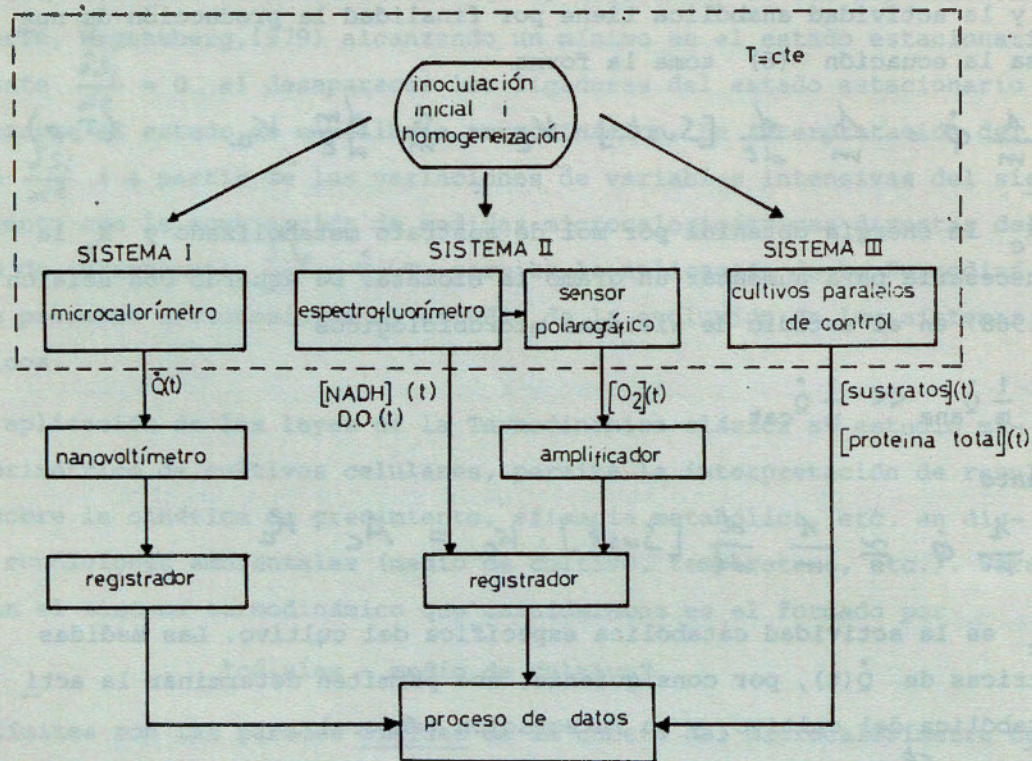


Fig. 1.- Diagrama de bloques correspondiente al sistema experimental

El sistema I proporciona la señal de potencia calorífica disipada  $Q(t)$  obtenida mediante un microcalorímetro estanco ("batch-microcalorimeter") del tipo Tian-Calvet (Calvet, 1962). El sistema II está destinado a la obtención de parámetros específicos. El cultivo se desarrolla en la cubeta termoestada y hermética de un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 3000 a la que se ha adaptado el sensor polarográfico de un medidor de  $O_2$  Orbisphere 6203. Este sistema nos permite obtener  $O_2(t)$ , la producción de biomasa a partir de la densidad óptica del cultivo (medida a 540 nm) D.O.(t) y la concentración de sustancias con espectros de absorción y emisión característicos como el NADH (340-460nm). El sistema III se utiliza para el control de sustratos y la calibración de la D.O.(t) con la producción de proteína. Todos los cultivos se desarrollan en células cerradas herméticamente, sin cámara de aire y sin posteriores agitaciones. Para garantizar la repetitividad de las distintas pruebas la preparación del inóculo inicial es idéntica en todos los casos. Una vez elegida la temperatura de cada prueba, esta se mantiene constante ( $\Delta T < .01$ ) mediante un controlador RAX.

2.- Material biológico. Las bacterias del género *Serratia* son de metabolismo facultativo. La cepa *Serratia marnorubra* IP75 se utiliza para el estudio del crecimiento en medios complejos. La cepa *Serratia marcescens* ATCC274, cuya fermentación anaerobia se especifica en la tabla I, es la utilizada para el estudio en medio mínimo de glucosa. Estas cepas se han mantenido en agar nutritivo a 40°C siendo periódicamente resembradas.

Los medios de cultivo utilizados son los siguientes:

a) medios complejos: TSB (BBL). La glucosa (2.5 g/l) es la fuente energética en la anaerobiosis.

MH. Contiene bactopectona (5 g/l), extracto de levadura (1 g/l) y  $KNO_3$  (1 g/l).

b) medio mínimo: M-911. 2 g/l de glucosa como fuente energética y  $(NH_4)_2SO_4$  como fuente de nitrógeno.

En los medios TSB y M-911 no es posible la respiración anaerobia dada la ausencia de un aceptor de electrones adecuado. El medio MH por el contrario no posee sustratos fermentables.

Tabla I.- Fermentación de la glucosa por *Serratia marcescens*.

Producto	moles	$\Delta H_0$ (kcal/mol)	$\Delta H_0$ (kcal)
glucosa	1	-302.03	-302.03
2-3 butanodiol	.64	-128.7	-82.4

acetofina	.02	?	?
etanol	.46	-68.9	-31.67
glicerol	.01	-159.8	-1.59
formiato	.48	-98.0	-46.94
acetato	.04	-116.8	-4.66
lactato	.10	-163.2	-16.32
succinato	.08	-225.7	-18.53
CO <sub>2</sub>	1.17	-98.7	-115.47

### Resultados y discusión.

#### Crecimiento en medios complejos. Identificación de fases metabólicas.

Las figuras 2a y 3a muestran los termogramas correspondientes al crecimiento de *Serratia marinarubra* IP75 en los medios MH y TSB a 28 °C. La primera fase del termograma se identifica fácilmente, a partir de la medida de O<sub>2</sub> disuelto en el medio (fig. 2b, 3b), como la fase aerobia del cultivo. Coincidiendo con el agotamiento del O<sub>2</sub> las D.O.(t) presentan una diauxia (visible en 2b) correspondiente a la separación entre los comportamientos aerobio y anaerobio.

Dado el carácter facultativo de la bacteria y la composición de los medios el metabolismo anaerobio ha de ser forzosamente distinto en ambos casos: fermentativo en TSB y respiratorio en MH utilizando NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de electrones. Sin embargo a partir de las figuras 2.a, 2.b no es posible diferenciar ambos comportamientos, lo que pone de manifiesto la necesidad de un nuevo parámetro específico.

Las figuras 2.c y 3.c muestran los registros de la fluorescencia del cultivo a 340nm - 460nm característico del NADH, evidenciando un comportamiento totalmente distinto entre la anaerobiosis respiratoria (fig 2.c) y la fermentativa (fig 3.c).

La figura 4 muestra superpuestos los anteriores parámetros, correspondientes a cultivos en medio MH y MH sin KNO<sub>3</sub>. En este último medio no es posible un metabolismo anaerobio exógeno ya que no hay ningún aceptor final de electrones adecuado. Es lógico por tanto interpretar la actividad anaerobia como una fermentación endógena, posiblemente debida a la presencia de glucógeno sintetizado en la fase aerobia. En los medios MH y TSB esta fase se encuentra superpuesta al metabolismo exógeno dando lugar al pri

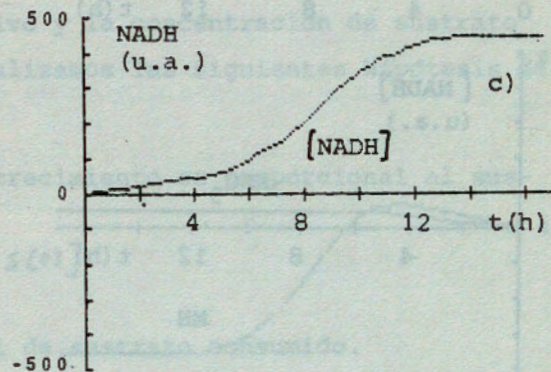
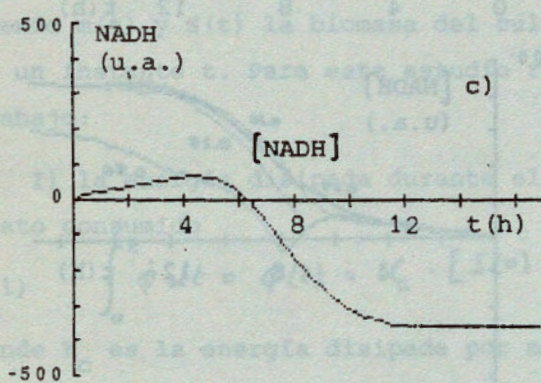
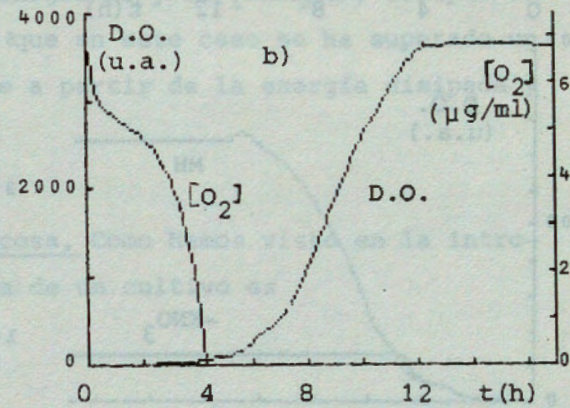
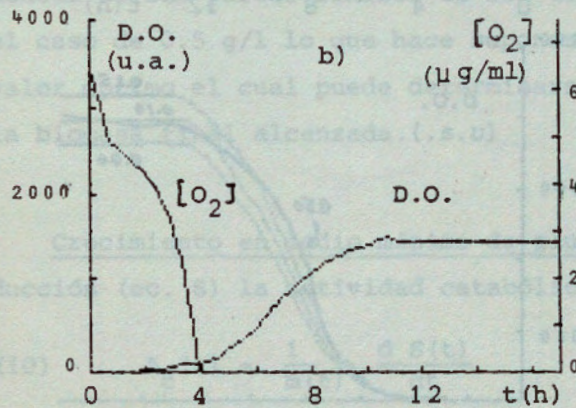
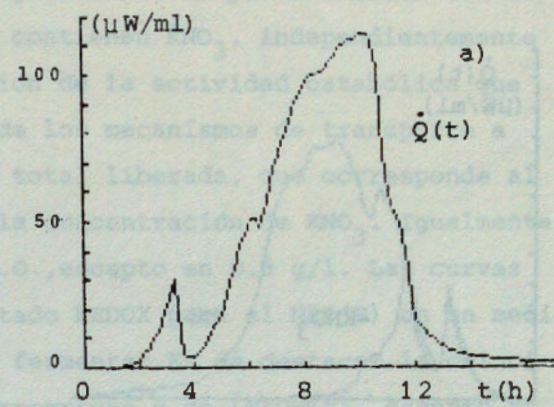
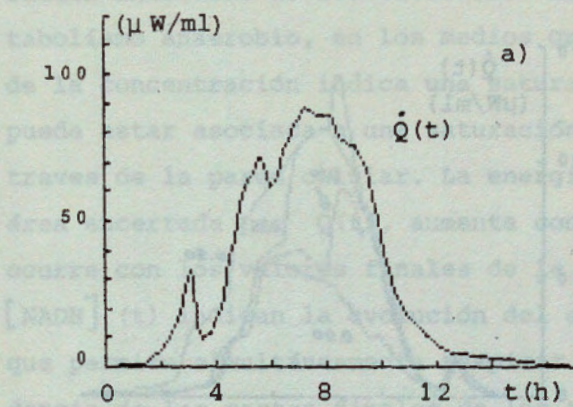


Figura 2. Crecimiento en medio MH

Figura 3. Crecimiento en medio TSB

mer máximo relativo de la parte anaerobia. En la figura 4.b se observa la diferencia del crecimiento en ambos casos. Las figuras 2, 3 y 4 demuestran que el índice  $[NADH](t)$  está directamente asociado a la actividad metabólica ya que se mantiene constante al cesar esta. Los incrementos de  $[NADH]$  asociados a la fermentación en TSB y las disminuciones asociadas a la "respiración de nitratos" en el MH concuerdan con las observadas por Harrison et al., (1969) al indicar que el  $NAD(H)$  se reducía en condiciones de baja tensión de  $O_2$  y se oxidaba al restaurarse la aerobiosis. Igualmente obser-

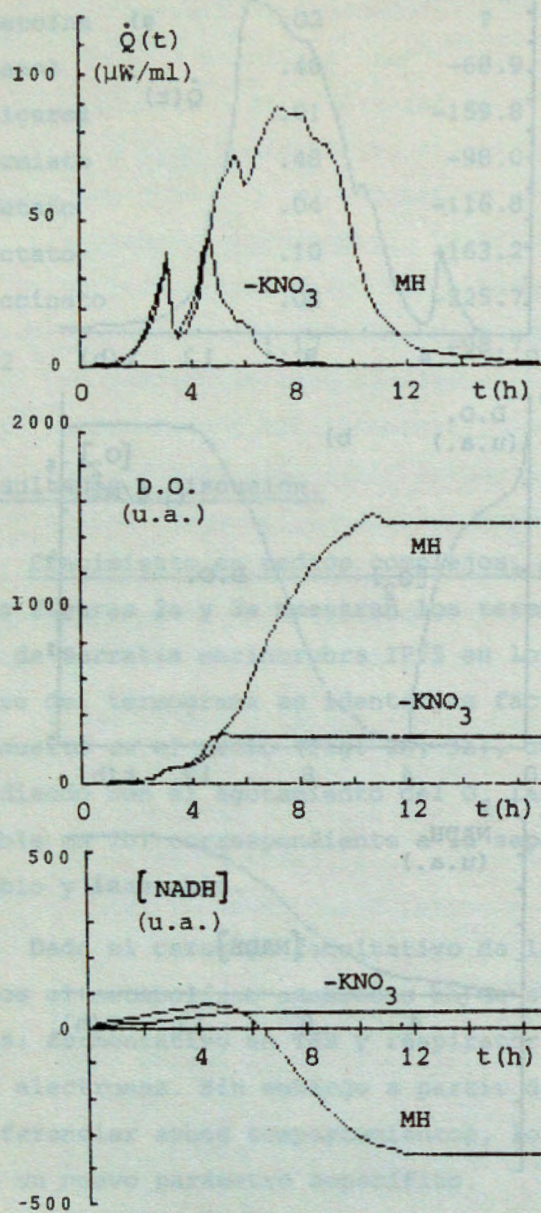


Figura 4. Crecimiento en medio MH y MH -  $\text{KNO}_3$

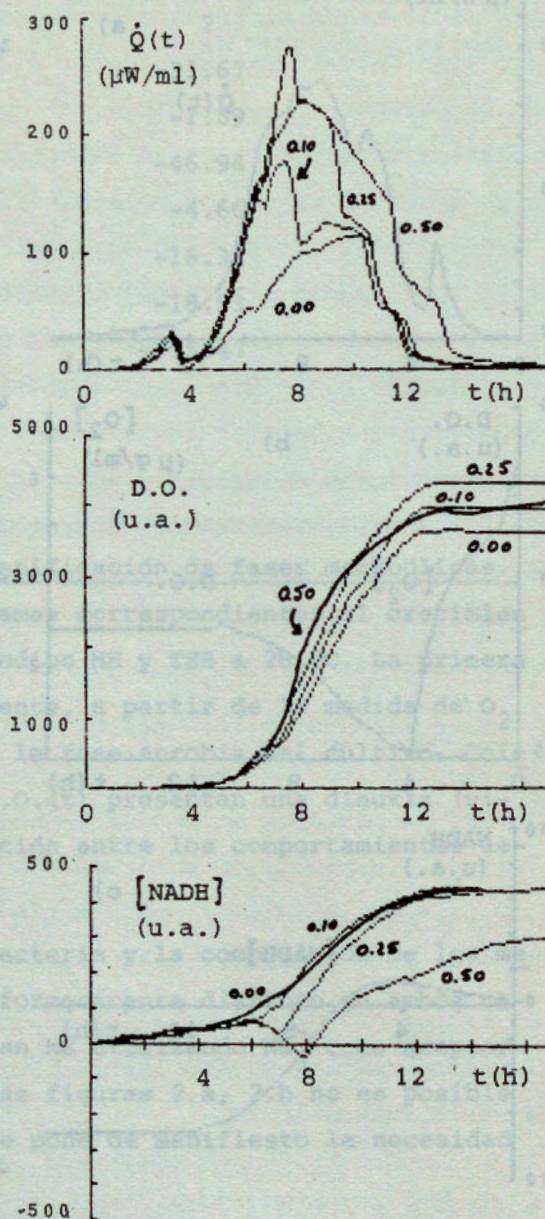


Figura 5. Crecimiento en TSB con distintas concentraciones de  $\text{KNO}_3$  (g/l)

vó un aumento de NADH al añadir un sustrato fermentable a un cultivo de una bacteria facultativa (en su caso *K. aerogenes*) en condiciones de baja tensión de  $\text{O}_2$ .

El índice  $[\text{NADH}](t)$ , medido directamente del cultivo, permite detectar distintos comportamientos en el metabolismo anaerobio y asociarlos con los intercambios de calor registrados en el termograma. En la figura 5 se muestra el estudio correspondiente al crecimiento en medio TSB al que se han añadido las concentraciones indicadas de  $\text{KNO}_3$  para permitir la respi-



ración anaerobia de los sustratos. La igualdad de la parte inicial del metabolismo anaerobio, en los medios que contienen  $\text{KNO}_3$ , independientemente de la concentración indica una saturación de la actividad catabólica que puede estar asociada a una saturación de los mecanismos de transporte a través de la pared celular. La energía total liberada, que corresponde al área encerrada por  $\dot{Q}(t)$ , aumenta con la concentración de  $\text{KNO}_3$ . Igualmente ocurre con los valores finales de la D.O., excepto en 0.5 g/l. Las curvas  $[\text{NADH}](t)$  indican la evolución del estado REDOX para el NAD(H) en un medio que permite simultáneamente respirar y fermentar. Es de destacar la coincidencia de las partes finales de los termogramas y de  $[\text{NADH}](t)$ , excepto en el caso de 0.5 g/l lo que hace suponer que en este caso se ha superado un valor óptimo el cual puede determinarse a partir de la energía disipada y la biomasa final alcanzada.

Crecimiento en medio mínimo de glucosa. Como hemos visto en la introducción (ec. 8) la actividad catabólica de un cultivo es

$$(10) \quad A_c(t) = \frac{1}{m(t)} \frac{dS(t)}{dt}$$

siendo  $m(t)$  y  $S(t)$  la biomasa del cultivo y la concentración de sustrato en un instante  $t$ . Para este estudio realizamos las siguientes hipótesis de trabajo:

I) la energía disipada durante el crecimiento es proporcional al sustrato consumido

$$(11) \quad \int_0^t \dot{\phi} dt = \phi(t) = K_c \cdot [S(0) - S(t)]$$

donde  $K_c$  es la energía disipada por mol de sustrato consumido.

II) el aumento de la biomasa es proporcional al sustrato consumido

$$(12) \quad m(t) = Y_m [S(0) - S(t)]$$

siendo  $Y_m$  la tasa de crecimiento por mol de sustrato. Aceptando la proporcionalidad entre  $m(t)$  y D.O.(t) las expresiones (10) y (12) se convierten en

$$(13.a) \quad A_c(t) = \frac{1}{D.O.(t)} \frac{dS(t)}{dt} \quad (13.b) \quad D.O.(t) = Y_D [S(0) - S(t)]$$

a falta de determinar el factor de conversión entre  $m(t)$  y D.O.(t). De (13.a) y (13.b) se deduce inmediatamente

$$(14.a) \quad K_c = \frac{\phi_{TOT}}{S(0)} \quad (14.b) \quad Y_D = \frac{D.O.(fin)}{S(0)}$$

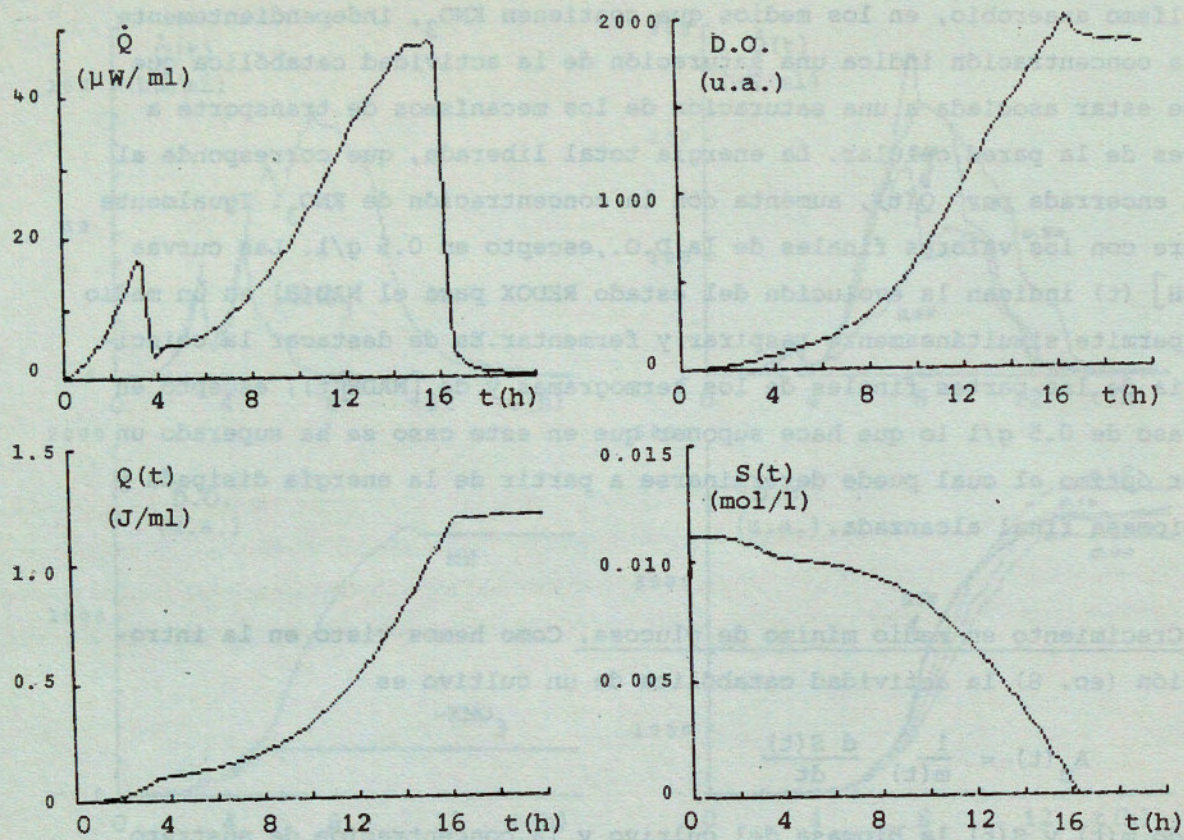


Figura 6. Crecimiento en medio mínimo de glucosa a 28 °C

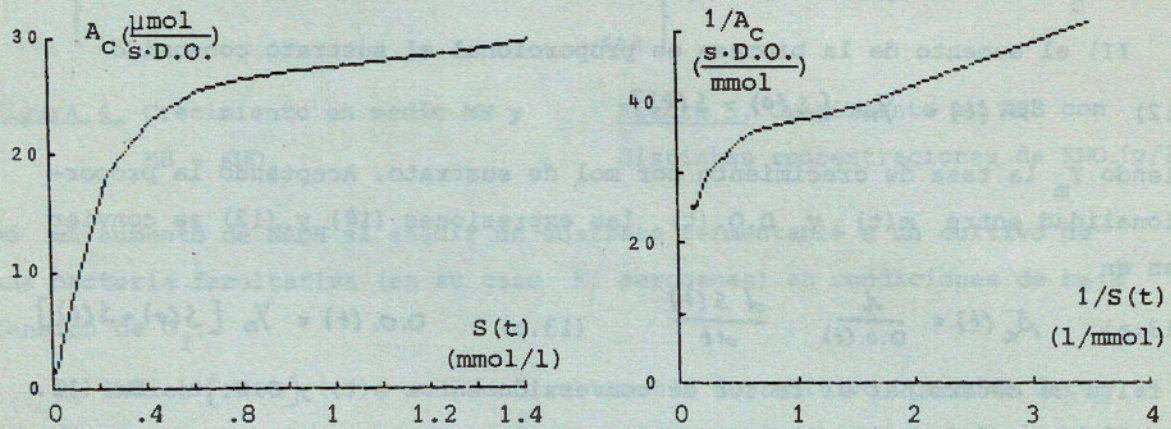


Figura 7.

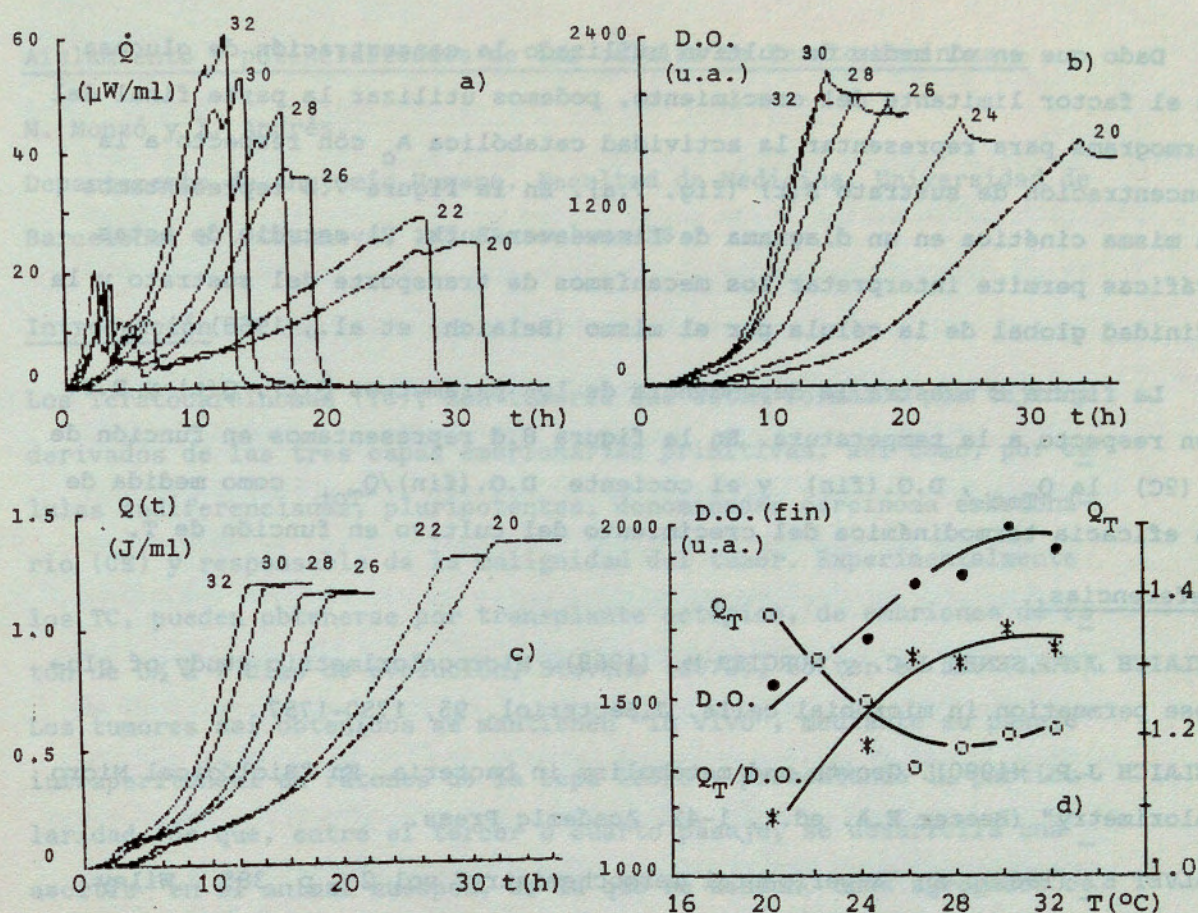


Figura 8. Dependencia del crecimiento con la temperatura:

- 8.a,b,c : cinética de las pruebas realizadas a distintas T.
- 8.d : eficacia del crecimiento en función de T.

De (10) se obtiene

$$(15) \quad \dot{\Phi} = K_c \frac{dS(t)}{dt}$$

y sustituyendo (11), (13.b) y (15) en (13.a)

$$(16) \quad A_c(t) = \frac{1}{Y_0} \cdot \frac{1}{\Phi(t)} \dot{\Phi}(t)$$

obtenemos el valor de la actividad catabólica a partir del termograma y de su integración temporal  $Q(t)$ . Combinando (11) y (14.a) obtenemos

$$(17) \quad S(t) = \frac{1}{K_c} (\Phi_{Tot} - \Phi(t))$$

la concentración de sustrato en cada instante en función de  $Q(t)$ . En la figura 6 mostramos estos parámetros para el crecimiento de *Serratia marcescens* a 28 °C.

Dado que en el medio de cultivo utilizado la concentración de glucosa es el factor limitante del crecimiento, podemos utilizar la parte final del termograma para representar la actividad catabólica  $A_c$  con respecto a la concentración de sustrato  $S(t)$  (fig. 7.a). En la figura 7.b representamos la misma cinética en un diagrama de Lineweaver-Burk. El estudio de estas gráficas permite interpretar los mecanismos de transporte del sustrato y la afinidad global de la célula por el mismo (Belaich, et al., 1968)

La figura 8 muestra la dependencia de los parámetros  $\dot{Q}(t)$ ,  $Q(t)$  y D.O. con respecto a la temperatura. En la figura 8.d representamos en función de  $T$  (°C) la  $Q_{Tot}$ , D.O.(fin) y el cociente  $D.O.(fin)/Q_{Tot}$  como medida de la eficacia termodinámica del crecimiento del cultivo en función de  $T$ .

#### Referencias.

- BELAICH J.P., SENEZ J.C. y MURGIER M. (1968). Microcalorimetric study of glucose permeation in microbial cells. *J.Bacteriol.* 95, 1750-1757
- BELAICH J.P. (1980). Growth and metabolism in bacteria. En "Biological Microcalorimetry" (Beezer E.A. ed.), 1-42. Academic Press.
- CALVET E. (1962). En "Experimental Thermochemistry" vol 2, p. 385. Wiley.
- HARRISON D.E.F., MAC LENNAN D.G. y PIRT S.J. (1969). Responses of bacteria to dissolved oxygen tension. En "Fermentation Advances" (Perlman D. ed.), p. 117-144. Academic Press.
- KEMP R.B. (1980). Microcalorimetric studies of tissue cells "in vitro". En "Biological microcalorimetry" (Beezer E.A. ed.), p.113-130. Academic Press.
- LURIE D. y WAGENSBERG J. (1979). Non-equilibrium thermodynamics and biological growth and development. *J. theor. Biol.* 78, 241-250
- PRIGOGINE I. y DEFAY R. (1954). "Chemical Thermodynamics". Longmans Green and Co.
- PRIVALOV P.L. (1980). Heat capacity studies in biology. En "Biological Microcalorimetry" (Beezer E.A. ed.), 413-452. Academic Press.