

Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y emisión de luz de dos cepas de *Vibrio harveyi*

✉ María Victoria Iglesias Rodríguez¹, Lirialis García Mesa², Eudalys Ortiz Guilarte¹, Carlos Manuel Álvarez Valcárcel³, Gladys Margarita Lugioyo Gallardo¹,
✉ Roberto Rafael Núñez Moreira¹

¹ Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), Agencia de Medio Ambiente, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Calle Loma esq. 39, Vedado, La Habana CP 10600, Cuba

² Área de Inocuidad de los Alimentos y Sanidad, Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP), Ministerio de la Industria Alimentaria.

Calle 246 No. 503 e/ 5ta. Ave. y Mar, Playa, La Habana CP 19100, Cuba

³ Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ministerio de Educación Superior, Cuba.

Calle 25 entre J e I. Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana CP 10400, Cuba.
✉ victoria@icimar.cu, robertico@icimar.cu

RESUMEN

El complejo enzimático luciferina-luciferasa de las bacterias luminiscentes es ampliamente utilizado como biosensor de la calidad ambiental, debido a que supera a otros bioensayos para el análisis de contaminantes químicos en velocidad, precisión, sensibilidad y simplicidad. En el presente trabajo se evaluó la influencia del pH y la concentración de NaCl inicial con vistas a optimizar el crecimiento microbiano y la luminiscencia de dos cepas de *Vibrio harveyi* (CBM-976 y CBM-992) aisladas de la plataforma cubana. Los cultivos mostraron amplia tolerancia a valores de pH inicial entre 6 y 10, con zonas donde se maximiza la velocidad específica de crecimiento (μ) y la luminiscencia. Los valores de pH inicial calculados a partir del modelo de los polinomios ortogonales para alcanzar la μ óptima corresponden a pH 7.76 y 8.01 para CBM-976 y CBM-992, respectivamente y la luminiscencia óptima se encontró a pH 7.47 para CBM-976 y 7.57 para CBM-992. También los aislados mostraron una amplia tolerancia a la variación de la concentración de NaCl, con máximos de μ y luminiscencia entre 3 y 4 % de NaCl. El análisis matemático demuestra que el valor óptimo de μ se alcanza a 3.63 y 3.69 % de NaCl para CBM-976 y CBM-992, respectivamente; mientras la luminiscencia óptima para CBM-976 se obtiene a 3.44 % de NaCl y para CBM-992 a 3.33 %. Estos resultados contribuyen al establecimiento de parámetros básicos para el desarrollo de un bioensayo para el monitoreo de la calidad ambiental de ecosistemas marinos.

Palabras clave: bacterias luminiscentes, optimización, calidad ambiental

ABSTRACT

Influence of pH and NaCl concentration on growth and light emission by two strains of *Vibrio harveyi*.

The luciferin-luciferase enzyme complex of luminescent bacteria is widely used as environmental quality biosensors, because it surpasses other bioassays for the analysis of chemical contaminants in speed, accuracy, sensitivity and simplicity. In this work, it was evaluated the influence of pH and initial NaCl concentration with the aim of optimizing microbial growth and luminescence of two *Vibrio harveyi* strains (CBM-976 and CBM-992) isolated from the marine Cuban shelf. The cultures showed wide tolerance to initial pH values between 6 and 10, with zones where the specific growth speed (μ) and the luminescence for both cultures are maximized. The initial pH values calculated using the orthogonal polynomials model in order to reach the optimum μ were pH 7.76 and 8.01 for CBM-976 and CBM-992, respectively, and the optimum luminescence was found at pH 7.47 for CBM-976 and 7.57 for CBM-992. The isolates also showed a wide tolerance to the variation of NaCl concentration, with μ and luminescence maxima between 3 and 4 % NaCl. The mathematical analysis shows that the μ optimal value is reached at 3.63 and 3.69 % of NaCl for CBM-976 and CBM-992, respectively; while the optimal luminescence for CBM-976 is obtained at 3.44 % of NaCl and at 3.33 % for CBM-992. These results contribute to establish the basic parameters to develop a bioassay for monitoring the environmental quality in marine ecosystems.

Keywords: luminescent bacteria, optimization, environmental quality

How to cite (Vancouver style):

Iglesias-Rodríguez MV, García-Mesa L, Ortiz-Guilarte E, Álvarez-Valcárcel CM, Lugioyo-Gallardo GM, Núñez-Moreira RR. Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y emisión de luz de dos cepas de *Vibrio harveyi*. Biotecnol Apl. 2020;37(4):4211-7.

Introducción

La emisión de luz por las bacterias luminiscentes es el resultado del sistema enzimático luciferina-luciferasa que se encuentra íntimamente relacionado con los procesos de transferencia de energía

en las células [1]. Asimismo, este fenómeno solo ocurre cuando existe determinada densidad celular, y es regulado por un sistema denominado “quorum sensing” [1].

1. Martín A, Serrano S, Santos A, Marquina D, Vázquez C. Bioluminiscencia bacteriana. Reduca (Biología) Serie Microbiol. 2010;3(5):75-86.



Publicación libre de costo para el autor
No article processing charges

Las bacterias luminiscentes presentan variadas aplicaciones en el campo de la biología molecular, la ingeniería genética, en ensayos para la producción de medicamentos y en análisis de expresión de genes, debido a la alta sensibilidad y a la ausencia de toxicidad de estos microorganismos [2, 3]. Además, una de las principales aplicaciones de las bacterias luminiscentes es como microorganismos biosensores de la calidad ambiental [4].

La reducción en la emisión de luz es proporcional a la toxicidad de la muestra y el parámetro toxicológico que mide esta disminución de la luminiscencia es la concentración efectiva (EC_{50}) que no es más que la concentración de tóxico que provoca la atenuación de la luminiscencia en un 50 % [5].

En Cuba existen muy pocos estudios dedicados a la caracterización taxonómica y la evaluación de las condiciones fisiológicas que favorezcan el proceso de emisión de luz en estos organismos. Stuart *et al.* [6] evaluaron algunas condiciones fisiológicas, así como la sensibilidad de una cepa de *Photobacterium leiognathi* frente a compuestos de amplio uso en la agricultura (pesticidas, herbicidas) y muestras ambientales. También, Delgado *et al.* [7] realizaron una caracterización fenotípica y molecular de *Vibrio harveyi* CBM-784 para su posible utilización como biosensor en la detección de contaminantes en muestras de agua y sedimentos marinos.

La detección de contaminantes ambientales con el empleo de estas bacterias es un método rápido y barato, por lo que la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y luminiscencia resultan imprescindibles para la formulación e implementación de una metodología de evaluación de toxicidad en sistemas de monitoreo de la calidad ambiental.

En general, la distribución y abundancia de bacterias luminiscentes en ecosistemas marinos depende de diversos factores como son la temperatura, la salinidad, el pH y la concentración de nutrientes [8]. Soto *et al.* [9] demostraron que la temperatura y la salinidad son factores importantes para el crecimiento y emisión de luz de estas bacterias en diferentes miembros de la familia Vibrionaceae. También, se ha comprobado que las bacterias luminiscentes no crecen a concentraciones de NaCl menores de 1 % o mayores del 7 %, y que el óptimo crecimiento de los cultivos se alcanza a concentraciones entre 2 y 4 % de NaCl [8, 10].

El pH es otro de los factores que desempeña un papel importante durante el proceso de emisión de luz de estas bacterias, ya que se ha comprobado que a valores menores de 4.5 y mayores de 10.5 se inactiva la enzima luciferasa y por tanto la luminiscencia cesa [11, 12].

Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece el ensayo de toxicidad con bacterias luminiscentes para el fortalecimiento de los programas de vigilancia de la calidad ambiental y el hecho de contar con bacterias luminiscentes aisladas de las aguas de la plataforma cubana, el trabajo tuvo como objetivo la determinación de las condiciones de pH y de concentración de NaCl iniciales para alcanzar valores óptimos de velocidad específica de crecimiento (μ) y de emisión de luz de las cepas luminiscentes de *V. harveyi* CBM-976 y *V. harveyi* CBM-992.

Materiales y métodos

Bacterias luminiscentes *Vibrio harveyi* CBM-976 y CBM-992

Las cepas luminiscentes *V. harveyi* CBM-976 y *V. harveyi* CBM-992 empleadas en este estudio fueron aisladas de la plataforma noroeste de Cuba y se encuentran depositadas en la Colección de Bacterias Marinas del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR).

Todos los experimentos fueron desarrollados a escala de zaranda, a partir de un inóculo obtenido en medio de cultivo LM (0.3 % (v/v) de glicerol, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 1 g/L de $CaCO_3$, 75 % (v/v) agua de mar y 25 % (v/v) agua destilada) propuesto por Baumann y Baumann [13] que favorecen el crecimiento y luminiscencia de estos cultivos [14], a 28 ± 1 °C [15] y a 160 rpm en zaranda orbital (Infors HT Ecotron). Luego de 12 h de cultivo, se inocularon las variantes a evaluar, a concentración celular inicial equivalente a 0.2 unidades de densidad óptica (DO) a 620 nm (en una cubeta de 1 cm de camino óptico), y se incubaron en iguales condiciones de fermentación.

Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y la emisión de luz

Para evaluar la influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de los cultivos se trabajó con el medio LM a valores de pH iniciales correspondientes a 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Solo se escogieron tres puntos de pH ácido al considerar el valor de pH ligeramente básico del agua de mar, y los valores informados en la literatura técnica para el crecimiento y la luminiscencia de estas bacterias de origen marino. A partir de la condición seleccionada de pH inicial, que maximiza la luminiscencia para cada cepa, se evaluó la influencia de la concentración de NaCl sobre el crecimiento y la luminiscencia sustituyendo el agua de mar del medio LM por agua destilada y las cantidades necesarias de NaCl para obtener concentraciones iniciales del 0; 1; 2; 3; 3,5; 4 y 5 % (p/v).

Para todas las condiciones se determinó el crecimiento microbiano expresado como unidades de DO a 620 nm y la luminiscencia como ual (unidades arbitrarias de luminiscencia), cada dos horas por un periodo de 8 h. La DO a 620 nm se determinó en un espectrofotómetro Genesys 10UV y la luminiscencia se midió en un espectrofluorímetro fijando la fuente de luz de excitación en 0 nm para evitar la interferencia de luz de la lámpara (Shimadzu RF-5301pc).

A partir de los valores de crecimiento microbiano (DO a 620 nm) de cada condición se determinaron las μ en la fase exponencial de cada cultivo, mediante el modelo de crecimiento no restringido [16].

Los valores de máxima emisión luminiscente se calcularon a partir de la integración de los espectros de emisión obtenidos entre 400 y 600 nm, mediante los programas Fluorescence Spectroscopy, Optima 2,20R2 y Origin 8.0 y fueron expresados como ual.

Los valores de μ y luminiscencia máxima calculados para las condiciones de pH inicial y concentración de NaCl inicial para cada cepa se utilizaron para optimizar las variables dependientes empleando el modelo de polinomios ortogonales. Como referencia del proceso de optimización se utilizaron los valores de

- Dikici E, Qu X, Rowe L, Millner L, Logue C, Deo SK, et al. Aequorin variants with improved bioluminescence properties. *Protein Eng Design Select.* 2009;22(4):243-8.
- Michellini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Roda B, Dolci L, Roda A. Bioluminescent reporter proteins for multicolor assays. *Minerva Biotechnol.* 2009;21(2):87.
- Deryabin D, Aleshina E. Natural and recombinant luminescent microorganisms in biotoxicity testing of mineral waters. *Appl Biochem Microbiol.* 2008;44(4):378-81.
- Onorati F, Mecozzi M. Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere.* 2004;54(5):679-87.
- Stuart M, Lugioyo GM, Martínez M, Pérez R, Álvarez C. Asociación entre la presencia de metales pesados en sedimentos marinos y la atenuación de la luminiscencia de la bacteria *Photobacterium leiognathi*. *Contrib Educ Protec Ambiental.* 2001;2:1-10.
- Delgado Gómez Y, Umaña Castro R, Solano González S, Iglesias Rodríguez MV, Ortiz Guilarte E, Alvarez Valcárcel C, et al. Phenotypic characterization and molecular identification of a luminescent marine bacterium isolated from the nw shelf of Cuba. *Biotechnia.* 2017;19(3):3-10.
- Fang H, Dong Y, Xu Z, Yuan Y, Li X, Yi B. Cultural and luminescent conditions of a marine luminous bacterium. *Mar Sci Bull.* 2008;10(1):46-53.
- Soto W, Gutierrez J, Rimmenga M, Nishiguchi MK. Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microb Ecol.* 2009;57(1):140-50.
- Srivastava VS, MacLeod RA. Nutritional requirements of some marine luminous bacteria. *Canadian J Microbiol.* 1971;17(5):703-11.
- Blum LJ. Bio-and chemi-luminescent sensors. 1st ed. Singapore: World Scientific; 1997.
- Scheerer S, Gomez F, Lloyd D. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *J Microbiol Methods.* 2006;67(2):321-9.
- Baumann P, Baumann L. The marine gram negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Benekeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A and Schlegel H, editors. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1981. p. 1302-31.
- Iglesias MV, Umaña-Castro R, García L, Ortiz E, Núñez R, Álvarez C, et al. Caracterización fenotípica y molecular, e influencia de medios de cultivo, en el crecimiento y emisión de luz de bacterias del litoral de La Habana, Cuba. *Rev Biol Trop.* 2020;68(4):1298-310.
- Ramahian N, Chandramohan D. Bacterial bioluminescence in marine pollution assessment. *Ocean Technol: Perspectives.* 1994:967-80.
- Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. 2nd ed. United Kingdom: Academic Press; 2013.

μ y luminiscencia máxima obtenidos en la condición basal del medio LM.

Análisis estadísticos

Los datos relacionados con el crecimiento de los cultivos fueron normalizados mediante una transformación logarítmica. La normalidad de los datos transformados de crecimiento y los de luminiscencia se verificó mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Bartlett. Para el procesamiento estadístico de los datos de crecimiento y luminiscencia se realizó un análisis de varianzas de clasificación simple con un coeficiente de significación del 95 % y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan [17], en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra.

La dependencia de la μ y la luminiscencia con relación al pH y la concentración de NaCl iniciales fueron ajustadas de forma independiente usando el modelo de polinomios ortogonales. La determinación del pH inicial y la concentración de NaCl inicial para alcanzar los valores óptimos de μ y luminiscencia se realizó mediante el cálculo diferencial (primera y segunda derivada) de la función obtenida para cada caso.

Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Spss v.21.0 y Excel 7.0 para Windows.

Resultados

Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados

Las cepas en general mostraron amplia tolerancia a valores de pH inicial entre 6 y 10, tratamientos en los que no se detectó la fase de latencia y se produjo un incremento de biomasa en el tiempo hasta alrededor de las 6 u 8 h según el caso (Figuras 1A y 1B). Para la cepa CBM-976 los máximos de crecimiento bacteriano se alcanzaron en las variantes de pH inicial entre 7 y 9, mientras para CBM-992 el máximo de biomasa se observó a pH inicial 9. Sin embargo, no se apreció crecimiento en los ensayos realizados a pH inicial de 2, 3 y 5 (Figuras 1A y 1B).

En cuanto a la luminiscencia de las cepas CBM-976 y CBM-992 para condiciones ácidas de cultivo (pH inicial 2, 3 y 5) no hubo emisión de luz detectable, en correspondencia con el escaso crecimiento en esas condiciones para ambos cultivos. Por el contrario, a pH inicial entre 6 y 10 se produjo un incremento en las intensidades de luz en el tiempo, con emisiones máximas a partir de las 6 h de cultivo (Figuras 1C y 1D). En particular, la mayor intensidad de luminiscencia detectada fue a pH inicial 7 con valores de 118.97 ± 5.73 ual para CBM-976 y 134.50 ± 8.59 ual para CBM-992. Asimismo, los valores de máxima luminiscencia alcanzados en los tratamientos de pH inicial 7 y 8 no difieren significativamente entre ellos y resultaron estadísticamente superiores al resto de las variantes ensayadas ($p = 0,05$ y $n = 72$) (Figuras 1C y 1D).

La figura 2 muestra la dependencia de la μ y la luminiscencia con relación al pH inicial del medio de cultivo para ambas cepas. En particular, se demuestra que la μ aumenta significativamente a medida que aumenta el pH inicial del cultivo para los tratamientos

de pH entre 5 y 7 en ambos cultivos. Para el intervalo de pH inicial entre 7 y 10 se alcanzan valores de μ similares estadísticamente y que resultan significativamente superiores con respecto a los tratamientos con pH iniciales ≤ 6 . Estos resultados evidencian que para el intervalo de pH inicial entre 7 y 10 se encuentra una zona que maximiza los valores de μ para ambos cultivos.

Por su parte, los valores de luminiscencia máxima se incrementan significativamente a partir de pH inicial 5 en ambos cultivos. Para los tratamientos de pH inicial de 7 y 8 se alcanzan los mayores valores de luminiscencia sin diferencias estadísticas entre ellos y significativamente superiores al resto de todos los pH iniciales, que sugieren una zona óptima de luminiscencia para ambas cepas (Figura 2).

Los valores de pH inicial calculados a partir del modelo de los polinomios ortogonales para alcanzar la μ óptima y la luminiscencia óptima de las cepas CBM-976 y CBM-992 aparecen en la Tabla 1. Los valores óptimos de μ se obtuvieron a pH 7.76 ± 0.15 y 8.01 ± 0.04 para CBM-976 y CBM-992, respectivamente y la luminiscencia óptima se observó a pH 7.47 ± 0.09 para CBM-976 y 7.57 ± 0.04 para CBM-992.

Para esas condiciones iniciales de pH se produce un incremento de las variables dependientes (μ y luminiscencia) para las cepas CBM-976 y CBM-992 con respecto al medio LM a pH inicial 7.0 (Tabla 1). De acuerdo al análisis matemático, las μ óptimas de ambos cultivos ascienden aproximadamente en un 10 %, mientras la luminiscencia óptima se incrementa en 8.7 y 5.6 % para CBM-976 y CBM-992, respectivamente, con relación a las condiciones basales del medio LM a pH 7.0.

Influencia de la concentración de NaCl en el crecimiento y la luminiscencia de los aislados

Los aislados mostraron una amplia tolerancia a la variación de la concentración de NaCl en el medio de cultivo, con máximos de biomasa alrededor de las 6 u 8 h para todas las condiciones ensayadas en ambas cepas (Figuras 3A y 3B). En particular, para el intervalo de NaCl ≤ 2 % no se detecta un incremento significativo de la biomasa bacteriana en el tiempo. Para las concentraciones de NaCl inicial entre 3-5 % se produce un incremento significativo de la concentración celular con respecto al tiempo, con particularidades para cada cultivo. Para la cepa CBM-976 en condiciones iniciales de NaCl de 3.5 % se evidencia un mayor crecimiento microbiano, mientras para la cepa CBM-992 el intervalo de NaCl entre 3-4 % resultó óptimo para el crecimiento sin diferencias significativas (Figuras 3A y 3B).

Por otra parte, las variaciones de concentración de NaCl en el medio de cultivo mostraron la capacidad de ambos cultivos de emitir luz solo en presencia de esta sal (Figuras 3C y 3D). Las máximas intensidades de luz se registraron alrededor de las 6 h para los valores de concentración inicial de NaCl entre 1-5 %. Asimismo, para ambos cultivos, en la variante de 3.5 % de NaCl se obtuvieron los máximos valores de luminiscencia.

El análisis de la μ y luminiscencia máxima para las cepas CBM-976 y CBM-992 con respecto a la concentración de NaCl en el medio de cultivo mostró

17. Lerch G. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. 1st ed. La Habana: Científico-Técnica; 1977.

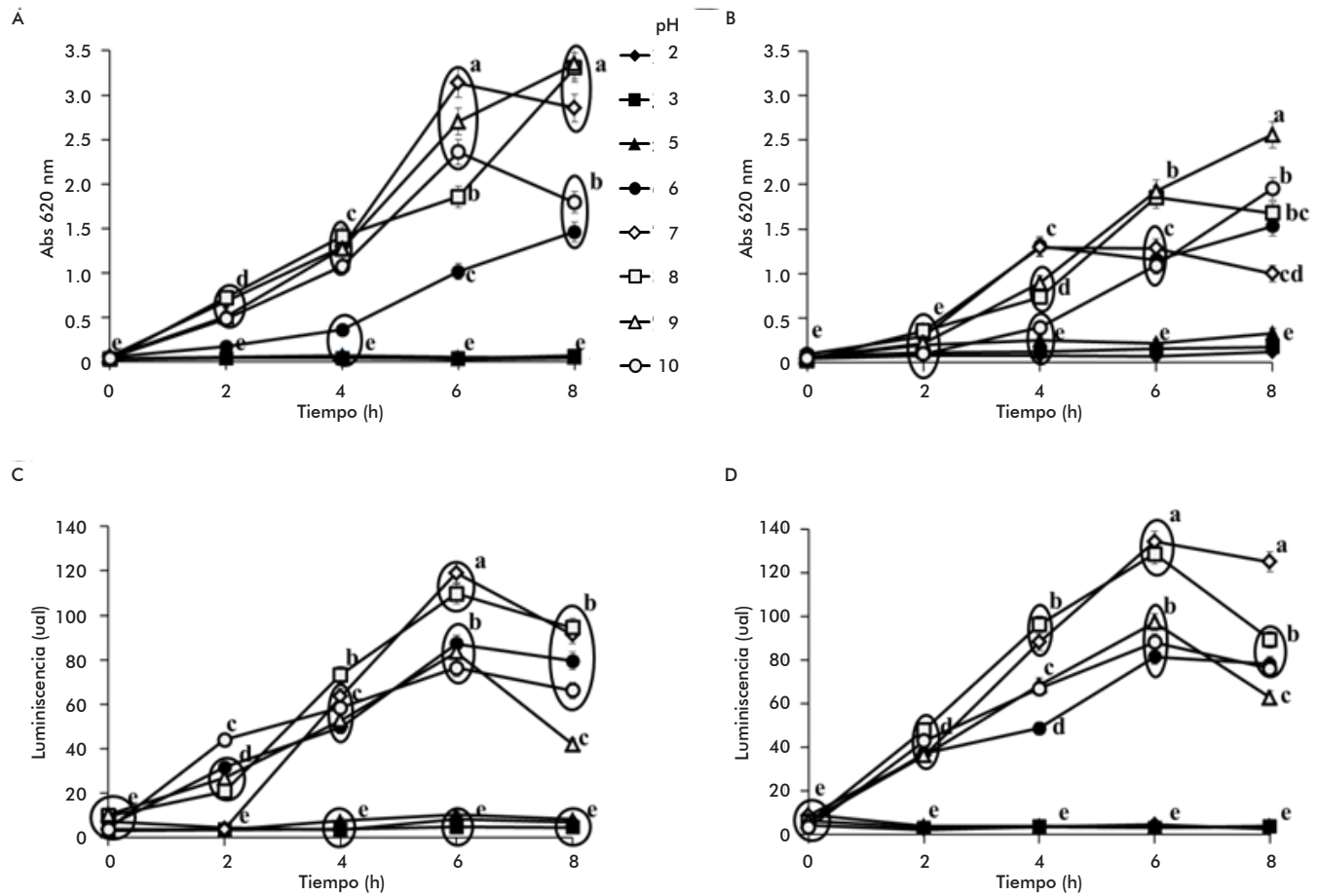


Figura 1. Influencia de la variación de pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento (Absorbancia a 620 nm, Abs 620 nm; (A y B)) y la luminiscencia (en unidades arbitrarias de luminiscencia (UAL); (C y D)) de las cepas CBM-976 (A y C) y CBM-992 (B y D), en medio de cultivo LM a 28 °C y 160 rpm. Los datos representan la media ± SD. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores (p<0,05; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori).

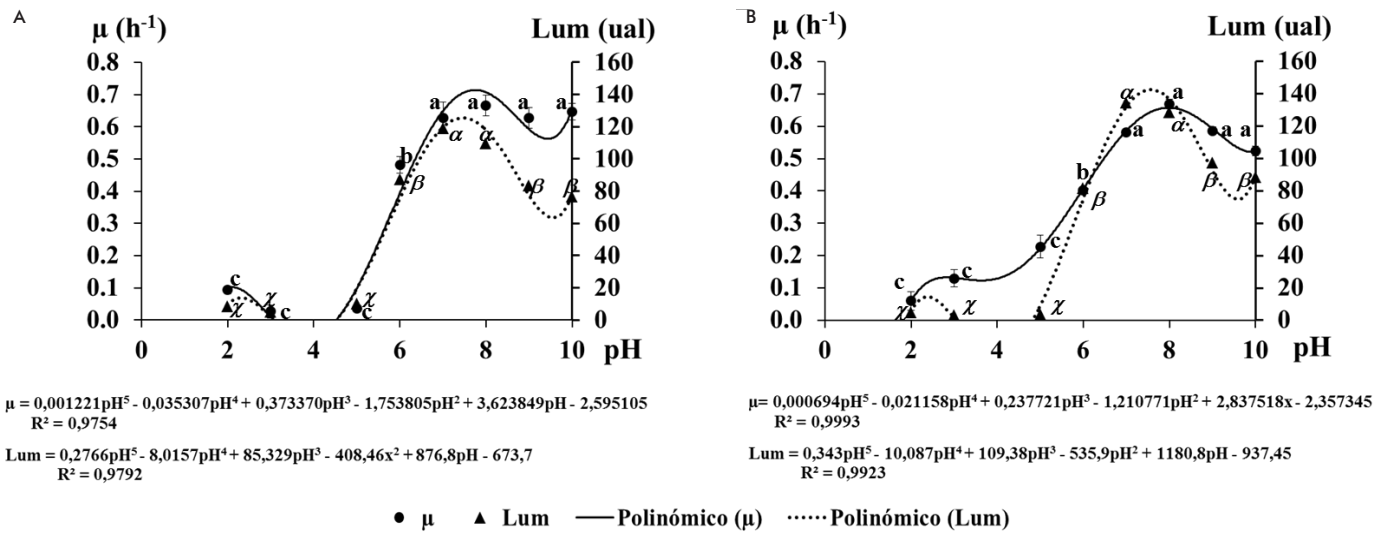


Figura 2. Ajuste polinómico de la velocidad específica de crecimiento (μ) y luminiscencia (Lum) máxima de las cepas CBM-976 (A) y CBM-992 (B) en función del pH inicial en el medio LM a 28 °C y 160 rpm. Los datos representan la media ± SD. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores (p<0,05; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori). Las curvas representan el ajuste del modelo para cada variable dependiente.

diferencias significativas (Figura 4). El valor de la μ aumenta de forma significativa a medida que se incrementa la concentración inicial de NaCl, con valores similares estadísticamente para los tratamientos entre 3 y 4 % de NaCl inicial en el cultivo de CBM-976, mientras para CBM-992 resultaron similares las μ obtenidas entre 3 y 5 % (Figura 4).

También los valores de luminiscencia máxima se incrementaron significativamente a medida que aumentó la concentración inicial de NaCl hasta el 3.5 % para ambos cultivos. Para esa concentración se alcanzan valores de luminiscencia significativamente superiores al resto de los tratamientos (Figura 4).

A partir de la función obtenida para cada variable dependiente (Figura 4) y utilizando el análisis matemático se obtuvieron los valores de NaCl inicial para alcanzar los valores óptimos de μ y luminiscencia de las cepas CBM-976 y CBM-992, que difieren con respecto a las condiciones de cultivo basales del medio LM (Tabla 2).

El análisis matemático demuestra que el valor óptimo de la μ se alcanza a 3.63 ± 0.10 y 3.69 ± 0.09 % de NaCl para CBM-976 y CBM-992, respectivamente; mientras la luminiscencia óptima se obtiene a concentraciones de NaCl de 3.44 ± 0.12 y 3.33 ± 0.24 % para CBM-976 y CBM-992, respectivamente (Tabla 2).

Según el modelo de los polinomios ortogonales para las condiciones de concentración inicial de NaCl

Tabla 1. Valores de pH inicial, velocidad específica de crecimiento (μ) y luminiscencia (Lum) de las cepas CBM-976 y CBM-992 para las condiciones de cultivo basal (LM, pH 7.0) y óptimas (medio LM, pH μ óptima o pH Lum óptima) a escala de zaranda, a 28 ± 1 °C y 160 rpm

Cepas	μ_{LM} (h^{-1})	pH μ óptima	μ óptima (h^{-1})	Lum _{LM} (ual)	pH Lum óptima	Lum _{óptima} (ual)
CBM-976	0.63	7.76	0.72 (112.5 %*)	118.97	7.47	126.29 (108.7 %*)
CBM-992	0.58	8.01	0.64 (109.4 %*)	134.50	7.57	142.70 (105.6 %*)

* Porcentaje alcanzado de cada variable dependiente con respecto a su valor en las condiciones basales del medio LM a pH 7.0. ual: unidades arbitrarias de luminiscencia.

que maximizan la variable dependiente, se produce un decremento de los valores de μ y luminiscencia para ambos cultivos con respecto a las condiciones de cultivo basales (medio LM) (Tabla 2). En el caso de μ solo se alcanza el 56.8 % y el 86.3 % de los valores obtenidos a partir del medio basal LM para las cepas CBM-976 y CBM-992, respectivamente. Por su parte, la luminiscencia solo representa el 92.4 % en CBM-976 y el 96.1 % en CBM-992 de la alcanzada en el medio LM.

Discusión

En general el comportamiento del crecimiento microbiano para las condiciones de pH y salinidad inicial, donde se evidenció el potencial metabólico de los cultivos, no permitió observar la fase de latencia (Figuras 1A, 1B, 3A y 3B). Este comportamiento debe estar relacionado con la concentración celular inicial y los procesos de adaptación genotípica y fenotípica a las

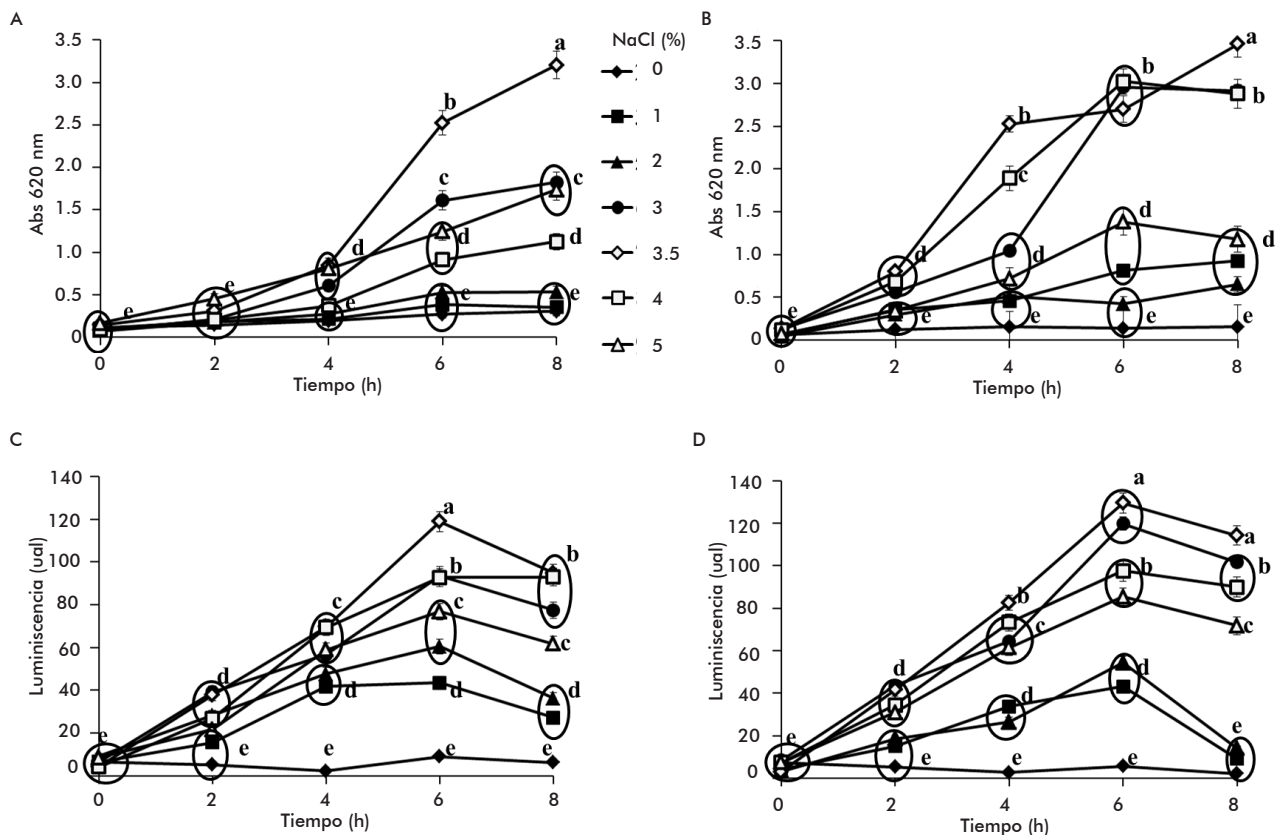


Figura 3. Influencia de la concentración de NaCl (%) inicial sobre el crecimiento (Absorbancia a 620 nm, Abs 620 nm; (A y B)) y la luminiscencia (en unidades arbitrarias de luminiscencia, Luminiscencia (ual); (C y D)) de las cepas CBM-976 (A y C) y CBM-992 (B y D), cultivadas a pH inicial 7,47 y 7,57 respectivamente, en medio LM modificado a 28 °C y 160 rpm. Los datos representan la media \pm SD. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores ($p < 0,05$; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori).

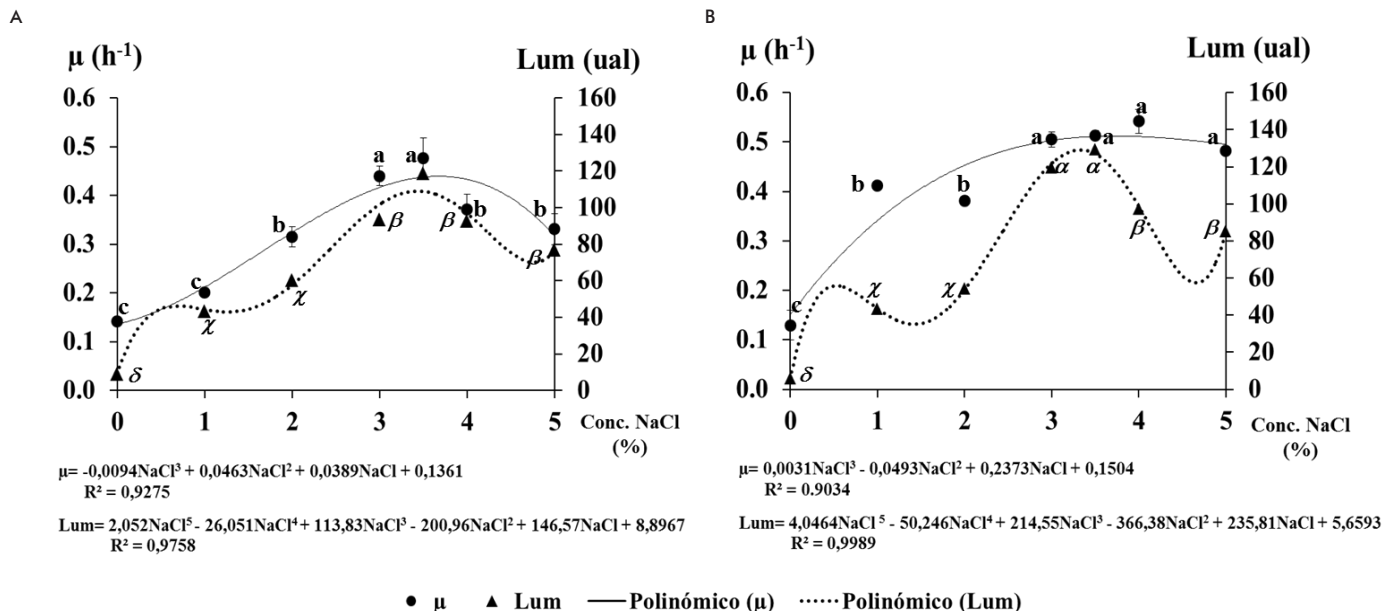


Figura 4. Ajuste polinómico de la velocidad específica de crecimiento (μ) y luminiscencia máxima (en unidades arbitrarias de luminiscencia, Lum(ual)) de las cepas CBM-976 (A) y CBM-992 (B) en función de la concentración de NaCl inicial en el medio LM modificado a pH inicial 7.47 y 7.57 respectivamente, 28 °C y 160 rpm. Los datos representan la media \pm SD. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores ($p < 0,05$; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori). Las curvas representan el ajuste del modelo para cada variable dependiente.

condiciones de cultivo en la etapa de inóculo, que inciden en el acortamiento de la etapa de latencia y un rápido alcance de la μ [16].

Los valores de pH obtenidos para alcanzar los óptimos de μ y luminiscencia de estas bacterias están dentro de los informados en la literatura especializada. Kumar *et al.* [18] informaron que el crecimiento óptimo de 20 cepas de bacterias luminiscentes aisladas de la bahía de Bengala se encontraba entre pH 7 y 9. Tanto para el estudio de la bahía de Bengala como para los aislados CBM-976 y CBM-992 se comprobó que la luminiscencia en medio líquido no se afecta significativamente por cambios de pH en las proximidades del intervalo al cual se maximiza la luminiscencia de cada cepa. Además, estos valores de pH se corresponden con el hábitat de los aislamientos ya que el pH de las aguas marinas cubanas oscila entre 7 y 8 [19].

Por otra parte, Ramhian *et al.* [15] informaron que a pH 7 se alcanzaba el crecimiento máximo de bacterias luminiscentes de las especies *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*, *V. fischeri* y *V. harveyi*; sin embargo, a pH superiores (9 y 10) el crecimiento disminuía significativamente. A diferencia de esos resultados, las cepas *V. harveyi* CBM-976 y *V. harveyi* CBM-992 muestran una zona de óptimo de μ para el intervalo de pH inicial entre 7 y 10 ($p = 0,05$; $n = 72$). Estos resultados demuestran la especificidad de factores y condiciones de cultivos para microorganismos filogenéticamente relacionados, incluso de la misma especie.

Los intervalos de concentración de NaCl determinados que maximizan la μ y la luminiscencia de las cepas estudiadas resultan similares a los encontrados para bacterias luminiscentes marinas aisladas de diferentes latitudes. Walters y Lloyd [20] en una investigación realizada en Japón con tres especies de bacterias luminiscentes (dos simbioses: *P. phosphoreum* y

Tabla 2. Valores de concentración de NaCl inicial, velocidad específica de crecimiento (μ) y luminiscencia (Lum) de las cepas CBM-976 y CBM-992 para las condiciones de cultivo basal (medio LM) y óptimas (medio LM modificado, concentración de NaCl μ óptima o NaCl Lum óptima) a escala de zaranda, a 28 \pm 1 °C y 160 rpm

Cepas	μ_{LM} (h ⁻¹)	pH μ óptima	μ óptima (h ⁻¹)	Lum _{LM} (ual)	pH Lum óptima	Lum _{óptima} (ual)
CBM-976	0.63	3.63	0.44 (56.8 %*)	118.97	3.44	109.22 (92.4 %*)
CBM-992	0.58	3.69	0.51 (86.3 %*)	134.50	3.33	129.08 (96.1 %*)

* Porcentaje alcanzado de cada variable dependiente con respecto a su valor en las condiciones basales del medio LM a pH 7.0. ual: unidades arbitrarias de luminiscencia.

P. leiognathi, y un aislado de agua de mar *V. fischeri*) encontraron que todas eran capaces de crecer a concentraciones de NaCl entre 0.9 y 3 %. Sin embargo, a concentraciones por debajo de 1 % no se observó luminiscencia en *P. leiognathi* y *P. phosphoreum*. En cambio las cepas de *V. fischeri* fueron capaces de crecer y emitir luz en todo el intervalo de salinidad evaluado.

Soto *et al.* [9] demostraron en cepas de *V. fischeri* aisladas de diversos nichos ecológicos (simbioses y de vida libre) la capacidad de crecer en un intervalo entre 1-7 % de NaCl. Otros autores como Ramhian *et al.* [15] proponen el 3 % de NaCl como valor de concentración de esta sal para alcanzar el crecimiento óptimo en cepas de las especies *V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. phosphoreum* y *P. leiognathi*, aisladas del Mar Árabe. Asimismo, resulta interesante que las especies evaluadas por estos investigadores no crecieron en ausencia de NaCl, en correspondencia con los resultados del presente estudio, de cepas aisladas de la plataforma marina cubana.

A partir de estos resultados se evidencia que el NaCl es imprescindible para el crecimiento y la luminiscencia de las bacterias luminiscentes aisladas. Los estudios de la influencia del NaCl han demostrado que la concentración de esta sal para maximizar el

18. Kumar AR, Jayaprakashvel M, FeuK-Lagerstedt E, Hussain AJ. Factors affecting bioluminescence in free living *Photobacterium* spp. isolated from Bay of Bengal, India. *J Mar Biosci.* 2015;1(1):33-49.

19. Lluís-Riera M. Estudios hidrológicos del Golfo de Batabanó y de las aguas oceánicas adyacentes. *Serie Oceanol.* 1972;14:1-49.

20. Walters P, Lloyd D. Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analyzed on gradient plates. *J Gen Microbiol.* 1985;131:2865-9.

21. Nunes-Halldorson VdS, Duran NL. Bioluminescent bacteria: Lux genes as environmental biosensors. *Braz J Microbiol.* 2003;34:6.

crecimiento y la emisión de luz puede variar de una especie a otra; e incluso entre aislados de una misma especie proveniente de regiones o nichos ecológicos diferentes [21].

Por otra parte, se demostró la influencia de los diferentes micronutrientes que aporta el agua de mar para los cultivos CBM-976 y CBM-992, teniendo en cuenta que las μ y luminiscencia óptimas determinadas, de acuerdo al análisis de la influencia de la concentración de NaCl, fueron inferiores a las alcanzadas en el medio LM. El agua de mar incluye elementos que son reconocidos como cofactores en el proceso de emisión de luz, no incluidos en la composición de un medio a base de agua destilada y suplementado con concentraciones de NaCl. Entre los elementos relacionados con la inducción de la luminiscencia se encuentran Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Mg^{2+} y S^{2-} [22, 23], los cuales se incluyen en la composición del agua de mar.

No obstante, la sustitución del agua de mar en el medio de cultivo por NaCl y agua destilada puede considerarse satisfactoria; al alcanzar valores de luminiscencia superiores al 90 % con respecto a la condición basal del medio LM para ambas cepas. Bajo estas nuevas condiciones se facilitan y abaratan los costos de fermentación a escalas superiores, donde el trabajo con agua de

mar resulta engorroso; siendo necesario procesos intermedios para la eliminación de las impurezas y de los problemas de corrosión que ocasiona este componente.

En resumen, los resultados sobre la influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y la luminiscencia para ambas cepas, demostraron que las condiciones de cultivo para maximizar estas variables se corresponden con condiciones similares a las encontradas en las aguas de la plataforma costera cubana de donde fueron aisladas las cepas CBM-976 y CBM-992.

Agradecimientos

Al Programa de Ciencia, Tecnología e Innovación de Interés Nacional “Uso sostenible de los componentes de la diversidad biológica en Cuba” que financió la investigación a través del Proyecto *Empleo de bacterias luminiscentes para la detección de xenobióticos en la zona costera cubana*. Al Centro de Estudios de Proteínas de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana por el apoyo en el desarrollo de la investigación.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

22. Tabei Y, Era M, Ogawa A, Morita H. Effects of magnesium sulfate on the luminescence of *Vibrio fischeri* under nutrient-starved conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(6):1073-8.

23. Tabei Y, Era M, Ogawa A, Morita H. Interactions between bicarbonate, potassium, and magnesium, and sulfur-dependent induction of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Basic Microbiol*. 2012;52(3):350-9.

Recibido en noviembre, 2020.

Aprobado en diciembre, 2020.