

Efecto del pH y la salinidad en el crecimiento y luminiscencia de una bacteria marina como biosensor ambiental

Effect of pH and salinity on the growth and luminescence of a marine bacterium as an environmental biosensor

Autores: Vener Pérez Lemes¹
Yolaine Delgado Gómez²

Dirección para correspondencia: venerpl@ult.edu.cu

Recibido: 11-abril-2016

Aceptado: 23-mayo-2016

Resumen

El trabajo se desarrolló en el Centro de Estudios de Proteínas de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana en septiembre de 2012 con el objetivo de evaluar el crecimiento y la luminiscencia de la cepa bacteriana CBM-784 en el medio LM a diferentes intervalos de pH y salinidad y determinar los rangos óptimos para sus crecimiento y luminiscencia. Los resultados demuestran que la bacteria luminiscente CBM-784 mostró su mejor crecimiento y luminiscencia a pH= 8,3 y concentraciones de NaCl entre 2,95 y 3,5%.

Palabras clave: bacterias; ecología marina; luciferase; luminiscencia bacteriana; medio de cultivo.

Abstract

The work was developed at the Center for Protein Studies of the Faculty of Biology of the University of Havana in September 2012 with the objective of evaluating the growth and luminescence of the bacterial strain CBM-784 in the LM medium at different intervals of pH and salinity and to determine the optimal ranges for its growth and luminescence. The results demonstrate that the luminescent bacterium CBM-784 showed its best growth and luminescence at pH = 8.3 and NaCl concentrations between 2.95 and 3.5%.

Keywords: bacteria; marine ecology; luciferase; bacterial luminescence; culture medium.

Introducción

La bioluminiscencia es un proceso bioquímico mediante el cual los organismos emiten luz. Este fenómeno ocurre en muchas especies de organismos (terrestres y acuáticos) (Sáenz, Guadalupe y Nevárez, 2010), sin embargo las bacterias luminiscentes se consideran las más abundantes en el entorno natural (Meighen, 1993). En los océanos se encuentran ya sea como especies de

¹ Licenciada. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Las Tunas. Las Tunas, Cuba.

² Master en Ciencias. Instituto de Oceanología. La Habana, Cuba. Correo electrónico: yolaine@oceano.inf.cu

vida libre, organismos saprofitos, simbioses en órganos de peces marinos (Lin *et al.*, 2001) o como parásitos de crustáceos e insectos (Wegrzyn y Czyz, 2002).

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 (Martín, Serrano, Santos, Marquina y Vázquez, 2010).

Está demostrado que para estos microorganismos la capacidad de crecer y emitir luz en medios artificiales está relacionada con varios factores tales como los nutrientes empleados, tensión de oxígeno y la temperatura (Reichelt y Baumann, 1975). El pH y la salinidad también juegan un papel importante en la fisiología bacteriana (Waters y Lloyd, 1985). Al utilizar azúcares como fuente de carbono, en condiciones anaerobias ocurre una producción considerable de ácido pirúvico que para algunas especies de bacterias luminiscentes, es tan elevada que origina disminución del pH del medio e inhibe la síntesis de la luciferasa, aun a baja densidad celular (Krieg y Holt, 1984; Berglind, Leffler y Sjoström, 2010). Por otra parte el efecto de la salinidad puede variar de una especie a otra e incluso entre una misma especie aislada de regiones o nichos ecológicos diferentes (Silva y Duran, 2003).

Debido a la diversidad de bacterias luminiscentes marinas se hace necesario la selección de cepas específicas y la determinación de sus condiciones óptimas de cultivo para su empleo como biosensores ambientales (Podgórska, Pazdro, y Węgrzyn, 2007; Weng, Kheng, Ahmad, Yook y Surif, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia que implica el empleo de bacterias luminiscentes marinas para el monitoreo de la calidad ambiental de las costas cubanas el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH y la salinidad en el crecimiento y la luminiscencia de la cepa CBM-784 para su posterior estudio como posible bioindicador.

Metodología

Selección de la cepa de trabajo

La cepa de bacteria luminiscente empleada en el presente estudio fue la CBM-784, aislada de la plataforma noroeste de Cuba, perteneciente al Instituto de Oceanología, la cual se encuentra conservada en la colección de bacterias marinas del Centro de Bioproductos Marinos (Cebimar).

Mantenimiento y conservación de la cepa CBM-784

El medio empleado para el mantenimiento de la cepa CBM-784 fue el medio LM, recomendado para el aislamiento de bacterias luminiscentes (Baumann y Baumann, 1981).

La cepa fue mantenida en tubos de plano inclinado de LM agarizado con aceite mineral estéril a temperatura de 4 °C, los cuales constituyeron el banco maestro. De este se realizaron pasajes a tubos con planos inclinados con igual medio pero sin aceite mineral que constituyeron el banco de trabajo.

Preparación del preinóculo

A partir de un tubo del banco de trabajo, se tomó 1 mL de medio LM líquido y se descargó en el tubo de plano inclinado con el fin de arrastrar la biomasa. Posteriormente, esta biomasa se vertió en un erlenmeyer que contenía 75 mL de medio LM líquido y se colocó en zaranda (160 rpm) a una temperatura entre 27-28 °C, durante 18h. La densidad óptica del preinóculo se midió a una longitud de onda (λ) igual a 620 nm, en una cubeta de 1 cm de paso de luz.

A partir de este cultivo (preinóculo) se inocularon 4 erlenmeyers de 500 mL de capacidad, por cada medio de cultivo ensayado, los cuales contenían 150 mL de medio fresco.

Para inocular se tomaron volúmenes del preinóculo entre 0,0027 y 1% para obtener densidades ópticas iniciales que oscilaban entre 0,0535 y 0,077, según lo recomendado por Stuart (1998).

Se realizaron curvas de crecimiento a la cepa bajo estudio. Las determinaciones del crecimiento, mediante la medición de la densidad óptica, se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu, en cubetas de 1 cm de paso de luz, a una longitud de onda (λ) de 620 nm, a intervalos regulares de tiempo (30 minutos), en las primeras etapas de crecimiento y a partir de los 240 minutos se espaciaron las mediciones (cada 120 min), hasta los 1448 minutos. En cada medición se tomaron muestras de cada frasco de cultivo, de 2 mL de volumen.

Paralelo a esto se midió la luminiscencia y se realizaron espectros de emisión de luz desde los 380 nm hasta los 665 nm espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301pc), en una cubeta de cuarzo pulido de 1 cm de paso de luz.

Por último, se procedió al cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) durante la etapa de crecimiento exponencial.

Efecto del pH sobre la μ y la luminiscencia

La marcha experimental para la evaluación del efecto del pH fue similar a la de la temperatura, sólo que aquí se mantuvo constante la salinidad (3,5 %) y la temperatura (28°C) y agitación de 160 rpm.

El estudio de la influencia del pH inicial en el crecimiento fue realizado en un rango entre 3 y 9 ajustando con NaOH ó HCl 1N según el caso. Los valores de pH a evaluar fueron: 3, 5, 7, 8 y 9. Posteriormente fue modelada la relación entre pH y μ mediante el empleo del modelo de polinomios ortogonales para la optimización.

Efecto de la salinidad sobre la μ y la luminiscencia

El efecto de la salinidad se evaluó de forma similar al pH, sólo que se mantuvo constante el pH (7) y se varió la concentración de NaCl. La salinidad se evaluó empleando concentraciones de NaCl adecuadas para ajustar la concentración de sal deseada. Las concentraciones de NaCl a evaluar fueron: 0, 1, 2, 3, 3.5, 4 y 5. Para la optimización se utilizó igual que en el pH el modelo de polinomios ortogonales.

Velocidad específica de crecimiento (μ): la μ fue determinada en la fase exponencial del crecimiento, mediante el modelo de crecimiento no restringido (López y Godia, 1998).

Velocidad específica de formación de producto (Q_p): Este parámetro cinético fue determinado por el método de los incrementos (López y Godia, 1998).

Tratamiento estadístico de los resultados

Todos los ensayos se realizaron con tres réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias entre las diferentes variables empleadas. En todas las tablas y gráficos se refieren las medias con el intervalo de confianza para un coeficiente de significación del 95%. Todos los datos fueron procesados con el paquete estadístico Statistica v 7.0 y Excel 10.0 para Windows.

Resultados

Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de la cepa CBM-784

La cepa CBM-784 mostró amplia tolerancia a pH entre 7 y 9, sin embargo, no fue capaz de crecer a pH ácidos como pH=3 y pH=5 (figura 1). El máximo valor de crecimiento bacteriano se obtuvo a pH 8 ($DO = 8,00 \pm 3,812$) a los 480 min, fase exponencial.

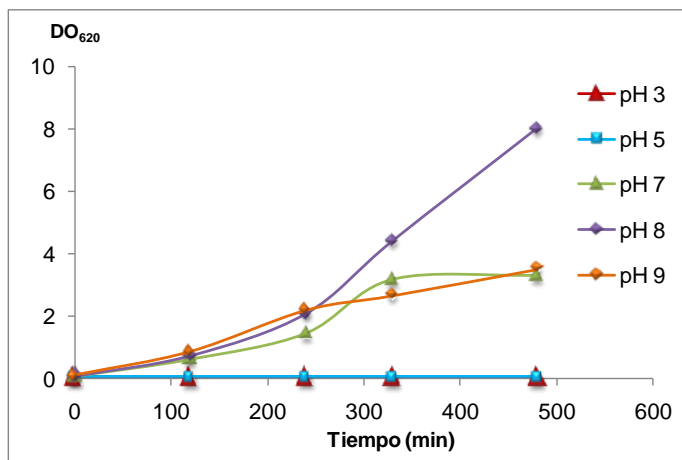


Figura 1. Comportamiento del crecimiento de la cepa CBM-784 a diferentes pH (3, 5, 7, 8 y 9), en medio LM, T=28 °C y 160 rpm.

En las curvas de crecimiento descritas por la cepa CBM-784 en los pH entre 7 y 9 no se pudo observar la fase de latencia (figura 1). Lo cual pudiera asociarse a una elevada velocidad de crecimiento del microorganismo y además porque el medio empleado para el preinóculo fue el mismo. Por estas razones la batería enzimática de la bacteria probablemente estuviera adaptada, lo cual constituiría un factor importante en el acortamiento de la etapa de latencia (Martínez, Sánchez, Quintana, Pazos y Del Barrio, 1989).

El comportamiento de la emisión de luz frente a pH diferentes de la cepa en estudio fue similar al crecimiento. A pH ácidos (3 y 5) no hubo emisión de luz,

ya que no hubo crecimiento. Por el contrario, a pH entre 7 y 9 exhibió intensidades de luz elevadas, las cuales fueron estadísticamente similares entre sí (figura 2).

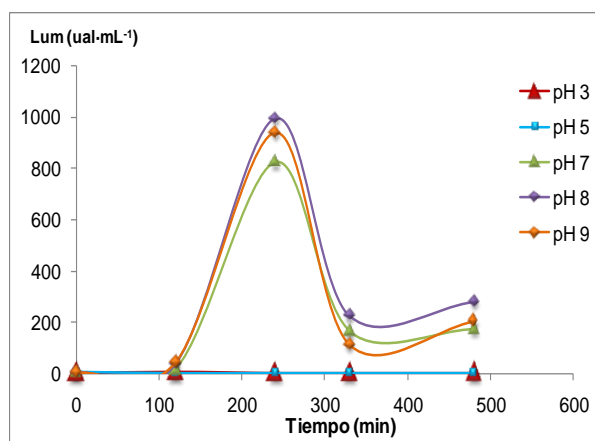


Figura 2. Comportamiento de la luminiscencia de la cepa CBM-784a diferentes pH (3, 5, 7, 8 y 9), en medio LM, T=28 °C y 160 rpm-1.

La mayor intensidad de luminiscencia se alcanzó a pH 8 ($993,178 \pm 0,008$) a los 240 min de crecimiento. Es importante destacar que a los 240 min se midieron las máximas intensidades de luz en todos los pH ensayados, encontrándose los cultivos en fase exponencial (figura 2).

La figura 3 muestra el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento (μ) con relación al pH inicial del medio, y la dependencia de μ basado en un modelo de polinomios ortogonales.

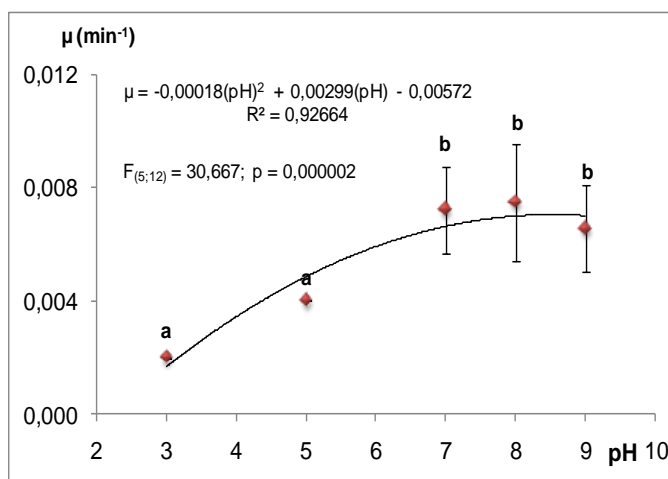


Figura 3. Influencia del pH sobre la μ de la cepa CBM-784 en medio LM en zaranda a 28 °C y 160 rpm-1.

Se aprecia que μ varía de forma significativa con los cambios de pH inicial. El valor de la μ aumenta a medida que el pH inicial aumenta hasta pH 8 y luego se observa un ligero descenso de la μ a pH 9, aunque no es significativo.

Luego de aplicar el análisis matemático al modelo obtenido se obtuvo que el valor óptimo de pH para el crecimiento de la cepa CBM-784 es 8,3. El cual está

en correspondencia con el hábitat de esta bacteria, si tenemos en cuenta que el pH de las aguas marinas cubanas oscila entre 7-8 (Lluis-Riera, 1972).

En general, podemos inferir que el rango de pH entre 7 y 9 es adecuado para el crecimiento de la cepa CBM-784, ya que no hubo diferencias significativas entre las velocidades específicas de crecimiento y las intensidades de luz en este rango. Aunque para estudios más detallados como de fisiología o que se requiera un máximo de emisión de luz se recomienda el pH 8,3 obtenido en este estudio.

Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia de la cepa CBM-784

La cepa CBM-784 mostró una amplia tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Los altos valores de densidades ópticas aparentes obtenidas en el rango de concentración de NaCl entre 1 y 5% no mostraron diferencias significativas, excepto en el medio con ausencia de NaCl (0%), donde no creció. Sin embargo, con adición de bajas concentraciones de NaCl (1%) la cepa fue capaz de crecer y emitir luz. El crecimiento máximo fue a 3,5% de NaCl ($4,557 \pm 0,0874$) a los 480 min (figura 4).

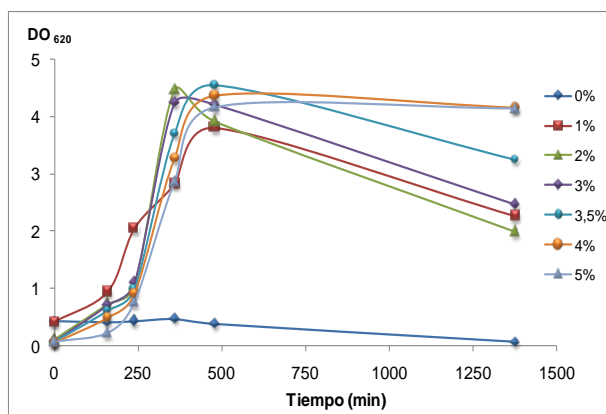


Figura 4. Comportamiento del crecimiento de la cepa CBM-784 a diferentes concentraciones de NaCl (%), en medio LM, T=28 °C y 160 rpm.

La luminiscencia de la cepa CBM-784 mostró una mayor sensibilidad a los cambios de salinidad que el crecimiento bacteriano. En todas las concentraciones ensayadas hubo emisión de luz, excepto en el medio con ausencia de NaCl, donde no hubo crecimiento. A la concentración de 3,5% de NaCl se registró la máxima intensidad de luz ($999,807 \pm 21,259$) a los 360 min, el cual resultó significativamente superior al resto de las salinidades evaluadas, mientras que al 2% de NaCl la luminiscencia resultó significativamente inferior (figura 5).

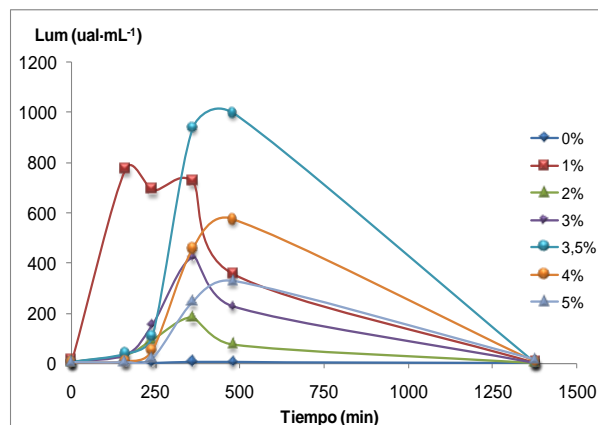


Figura 5. Comportamiento de la luminiscencia de la cepa CBM-784 a diferentes concentraciones de NaCl (%), en medio LM, T=28 °C y 160 rpm.

El análisis de la μ con respecto a la concentración de NaCl en el medio de cultivo, mostró diferencias significativas entre las salinidades evaluadas (figura 6).

El valor de la μ aumenta de forma significativa a medida que se incrementa la concentración de NaCl hasta un valor de 5%. Es importante señalar que las μ obtenidas entre 2 y 4% estadísticamente son similares.

Luego de aplicar el análisis matemático al modelo obtenido se obtuvo que el valor óptimo de concentración de NaCl para el crecimiento es de 2,95%.

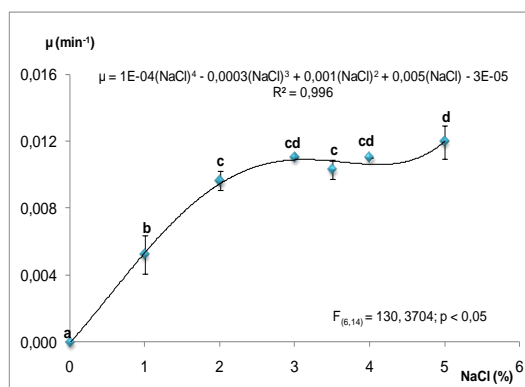


Figura 6. Influencia de la concentración de NaCl sobre la μ de la cepa CBM-784 en medio LM a 28 °C, pH 7 y 160 rpm.

Teniendo en cuenta las intensidades luz de la cepa CBM-784 obtenidas a diferentes salinidades y las densidades aparentes alcanzadas, se propone como rango óptimo de NaCl para el crecimiento y la luminiscencia de 2,95- 3,5%, ya que en este intervalo se obtuvieron valores de crecimiento elevados con velocidades específicas de crecimiento similares y máximas intensidades de luz.

Discusión

Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de la cepa CBM-784.

El rango óptimo de pH obtenido en este estudio para la cepa CBM-784 está dentro de los rangos encontrados en la literatura especializada del tema.

Ramaiah y Chandramohan (1991) encontraron que el crecimiento máximo para cuatro especies diferentes de bacterias luminiscentes fue a pH 7. Sin embargo, a pH superiores (9 y 10) el crecimiento decrecía significativamente.

Kumar (2010), al analizar el efecto de los factores externos que influyen en la luminiscencia de 20 cepas aisladas de la bahía de Bengala, determinó que el crecimiento óptimo se encontraba entre pH 7 y pH 9. Además plantea, que en medio líquido la luminiscencia no es afectada significativamente por los cambios de pH. Resultado similar al encontrado en este estudio.

Por otra parte en un estudio realizado por Kannahi y Sivasankari (2014) con 10 cepas aisladas de la localidad de Nagapattinam (Tamil Nadu, India) encontraron óptimos los valores de luminiscencia a pH 7 y 9.

Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia de la cepa CBM-784

El no crecimiento y emisión de luz de la cepa CBM-784 en el medio con ausencia de NaCl demuestra su dependencia a la presencia de NaCl, como factor determinante para el crecimiento y la luminiscencia y confirma además, su origen marino.

Los resultados alcanzados en este estudio sobre a la influencia de la salinidad en el crecimiento de la cepa CBM-784 resultan similares a rangos óptimos encontrados para bacterias luminiscentes marinas aisladas de diferentes latitudes.

Ramaiah y Chandramohan (1991) proponen como valor óptimo de NaCl para el crecimiento, en cepas de las especies *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* y *P. leiognathi*, 3% de NaCl. Estas especies además, no crecieron en ausencia de NaCl en el medio de cultivo, demostrando su naturaleza marina.

Soto, Gutierrez, Remmenga y Nishiguchi (2009), observaron en cepas de *Vibrio fischeri* aisladas de diversos nichos ecológicos (simbiontes y de vida libre) que estas bacterias crecían en un rango de concentraciones de NaCl desde 1% hasta 7%, excepto una cepa de vida libre que fue capaz de tolerar concentraciones de 9% de NaCl.

Kannahi y Sivasankari (2014) encontraron adecuada la intensidad de la luminiscencia hasta el 6% de concentración de NaCl y el cese de emisión de luz por encima del 9% de salinidad en las cepas analizadas.

Todos estos resultados demuestran que el ión Na⁺ es imprescindible para el crecimiento y la luminiscencia y que el valor óptimo puede variar de una especie a otra e incluso entre una misma especie aislada de regiones o nichos ecológicos diferentes (Reichelt y Baumann, 1975; Silva y Duran, 2003).

Algunos autores plantean que concentraciones de NaCl por debajo de los 5 g/L pueden causar ruptura en la pared de la membrana celular, debido a la baja presión osmótica externa del medio (Silva y Duran, 2003).

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre la influencia del pH y concentración de NaCl en el crecimiento y la luminiscencia, permitieron proponer como valores óptimos de pH= 8,3 y salinidad entre 2,95 y 3,5%.

Conclusiones

La cepa CBM-784 mostró su mejor crecimiento y luminiscencia a pH= 8,3 y concentraciones de NaCl entre 2,95 y 3,5%, similares a las de las aguas de la plataforma costera cubana de donde fue aislada lo que constituye una buena propiedad para su empleo como indicador de calidad de las aguas costeras tropicales.

Referencias bibliográficas

- Baumann, P. & Baumann, L. (1981). The marine gram- negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. En: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, y H.G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes* (1301- 133).
- Berglind, R., Leffler, P. & Sjostrom, M. (2010). Interactions between pH, potassium, calcium, bromide, and phenol and their effects on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 73 (16), 1102-12.
- Kannah, M., Sivasankari, S. (2014). Isolation and Identification of Bioluminescent Bacteria from Marine Water at Nagapattinam Sea Shore Area. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 26 (2), 346-351.
- Krieg, N. R. & Holt, J. G. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (343-352, 507, 510-511, 516-545). Baltimore, London. Editorial Williams and Wilkins.
- Kumar, A. (2010). Isolation of luminescent bacteria from bay of Bengal and their molecular characterization (Tesis de Maestría). Universidad de Boras, India.
- Lin, L.Y., Sulea, T., Szittner, R., Vassilyev, V., Purisima, E.O. & Meighan, E. A., (2001). Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data. *Protein Science*, 10, 1563-1571.
- Lluís-Riera, M. (1972). Estudios hidrológicos del Golfo de Batabanó y aguas oceánicas adyacentes. *Rev. Oceanol.*, 14 (24), 1-49.
- López, J. & Gódia, F. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. 1ra Edición. España: Editorial SINTESIS, S.A.
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D. & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca*, 3, 75-86.
- Martínez, J., Sánchez, A.I., Quintana, M., Pazos, V. & Del Barrio, G. (1989). *Microbiología general* (pp. 31-55, pp. 100-101). La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación.

- Podgórska, B., Pazdro, K. & Wêgrzyn, G. (2007). The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *J. Appl. Gene.*, 48(4), 409–412.
- Ramaiah, N. & Chandramohan, D. (1991). Bacterial bioluminescence in marine pollution assessment. *Ocean Technology: Perspectives*, 4, 967-980.
- Reichelt, J. L. & Baumann, P. (1975). *Photobacterium mandapamensis*, a later subjective synonym of *Photobacterium leiognathi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25, 208 – 209.
- Sáenz, C. I., Guadalupe, M. & Nevárez, V. (2010). La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. *Acta química Mexicana*, 2 (3).
- Silva, V. & Duran, N. L. (2003). Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *B. J. of Microbiol.* 34, 91-96.
- Soto, W., Gutierrez, J., Remmenga, M. D. & Nishiguchi, M. K. (2009). Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microb. Ecol.*, 57, 140–150.
- Stuart, M. (1998). Efecto de algunos xenobióticos sobre el crecimiento y la luminiscencia de la cepa *Photobacterium leiognathi* IDO-331 aislada de la plataforma cubana (Tesis Maestría). Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- Waters, P. & Lloyd, D. (1985): Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysed on gradient plates. *J. of Gen. Microbiol.*, 131, 2865-2869.
- Wegrzyn, G. & Czyz, A. (2002). How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology? *Oceanologia*, 44, 291–305.
- Weng, B. Ch., Kheng, L.Y., Ahmad, A., Yook, L. & Surif, S. (2012). The Potential of Luminescent Bacteria '*Photobacterium leiognathi*' as a Biosensor for the Detection of Aquatic Toxicity. *J. of Environm. and Natural Resource*, 8 (3), 1-9.