

Optimización del crecimiento y la luminiscencia de *Vibrio harveyi* CBM-992 en función de las concentraciones de nutrientes

Optimization of growth and luminescence of *Vibrio harveyi* CBM-992 as a function of nutrient concentrations

Ayamey Pérez Oduardo*, **Eudalys Ortiz Guilarte****, **Thais Renee Chong Almaguer*****,
María Victoria Iglesias Rodríguez****, **Carlos Álvarez Valcárcel*******,
Gladys Margarita Lugioyo Gallardo*****, **Roberto Rafael Núñez Moreira*******

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.112972

RESUMEN

La bioluminiscencia es un proceso bioquímico; que ocurre en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias, mediante el cual estos organismos emiten luz. Se han empleado diferentes especies de bacterias en la detección de contaminación ambiental, tanto en aguas como en sedimentos, pues al exponerse ante diferentes agentes tóxicos disminuyen su luminiscencia. En la presente investigación se optimizó el crecimiento y la luminiscencia de la cepa de *Vibrio harveyi* CBM-992 a partir de la variación de las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol en el medio basal LM; mediante el método de superficie de respuesta. Además, en el medio óptimo para la bioluminiscencia, se evaluó su atenuación frente a diferentes concentraciones de $HgCl_2$, $K_2Cr_2O_7$ y $Fe_2(SO_4)_3$, mediante un diseño en bloques completamente aleatorizados. El análisis matemático demostró que el valor óptimo de crecimiento y luminiscencia se alcanza a concentraciones de los nutrientes inferiores a las del medio basal LM. En particular, se definió la composición de un medio que garantiza un aumento de la luminiscencia (5.3 %) con una reducción de la concentración de los nutrientes entre un 6-18 %, que permitirá disminuir costos de producción a escalas superiores de fermentación. El análisis de la EC_{50} frente a tres metales tóxicos evidencia que la nueva formulación del medio no afecta la capacidad

* Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0006-1748-463X>

** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; laly@icimar.cu (Autor de correspondencia); <https://orcid.org/0000-0001-8043-4076>

*** Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0002-9058-7716>

**** MSc. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-1548-4285>

***** PhD. Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-9640-3474>

***** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0001-7517-8063>

***** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; robertico@icimar.cu (Autor de correspondencia); <https://orcid.org/0000-0001-7327-9442>

de respuesta de *Vibrio harveyi* CBM-992, con una secuencia de toxicidad: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Fe}^{3+}$. Estos resultados constituirán información básica imprescindible para el futuro diseño de un bioensayo para la detección de contaminantes.

Palabras claves: emisión de luz; crecimiento microbiano; toxicidad; metodología de superficie de respuesta.

ABSTRACT

Bioluminescence is a biochemical process that occurs in vertebrates, invertebrates, plants, and bacteria by which these organisms emit light. Different species of bacteria have been used to detect environmental contamination, both in water and sediments, because their luminescence decreases when exposed to different toxic agents. In the present investigation, the growth and luminescence of the *Vibrio harveyi* CBM-992 strain were optimized by varying the concentrations of tryptone, yeast extract and glycerol in the basal LM medium using the response surface methodology. Furthermore, in the optimal medium for bioluminescence, its attenuation against different concentrations of HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ was evaluated using a completely randomized block design. Mathematical analysis showed that the optimum value of growth and luminescence was obtained at nutrient concentrations lower than those of the basal LM medium. In particular, the composition of a medium that guarantees an increase in luminescence (5.3%) was defined, with a reduction of the nutrient concentration between 6-18%, which will allow to reduce the production costs at higher fermentation scales. The analysis of the EC_{50} against three toxic metals shows that the new formulation of the medium does not affect the response capacity of *Vibrio harveyi* CBM-992, with a toxicity sequence: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Fe}^{3+}$. These results will constitute essential basic information for the future design of a bioassay for the detection of contaminants.

Keywords: light emission; microbial growth; toxicity; response surface methodology.

Recibido: febrero 14 de 2024

Aprobado: 18 de abril de 2025

INTRODUCCIÓN

La emisión de luz por bacterias luminiscentes es el resultado del sistema enzimático lucifera-luciferasa que se encuentra íntimamente relacionado con los procesos de transferencia de energía en las células e indica el estado metabólico de la célula (Martín *et al.*, 2010). De esta manera, una atenuación de la luminiscencia evidencia una afectación en el proceso de respiración celular. Contaminantes químicos y biológicos, así como algunos factores físicos del ambiente pueden afectar la respiración celular y alterar la síntesis de proteínas y lípidos modificando por tanto la luminiscencia.

Los análisis de toxicidad mediante diferentes técnicas han avanzado en los últimos años como una herramienta eficiente para la evaluación de riesgos ambientales por el incremento de la actividad industrial (Park *et al.*, 2023; Blanco *et al.*, 2017; Boehler *et al.*, 2017). Estas metodologías constituyen una alternativa de interés a los análisis físico-químicos que, por sí solos, no brindan información sobre la toxicidad de las muestras ambientales, son más laboriosos, consumen más tiempo y requieren de equipamiento altamente específico y costoso (Mahendran *et al.*, 2022; Quinn *et al.*, 2018).

Los bioensayos basados en la luminiscencia bacteriana se caracterizan por ser rápidos, sencillos y de alta sensibilidad y por tanto permiten reducir el costo y el tiempo

de operación (Mahendran *et al.*, 2022; Halmi *et al.*, 2019; Halmi, 2016). Estos ensayos se fundamentan en la sensibilidad de las bacterias luminiscentes a la presencia de sustancias tóxicas o a las condiciones adversas del medio, que disminuyen su emisión de luz.

El diseño de un bioensayo, a partir de un grupo de microorganismos tan diverso como las bacterias luminiscentes marinas, requiere de investigaciones básicas que permitan establecer con éxito las condiciones para su empleo como biosensores rutinarios. Estas investigaciones incluyen la selección e identificación taxonómica de la cepa de bacteria, la evaluación de condiciones de cultivo a diferentes escalas de fermentación, la estimación de su sensibilidad frente a agentes tóxicos; así como la formulación y establecimiento de condiciones para su empleo como biosensores ambientales (Veysi & Zeinoddini, 2023; Muneswaran *et al.*, 2021; Shanware *et al.*, 2013).

En los procesos biológicos resulta complejo establecer condiciones óptimas para obtener mayor rendimiento de un producto determinado. La identificación y la selección de las variables independientes, así como el método de optimización empleado, dependerán de las características y condiciones de trabajo. En particular, la fermentación microbiana es un proceso complejo de reacciones metabólicas dependientes de varios factores relacionados con los nutrientes del medio de cultivo y

las condiciones de operación, entre otras (Schlembach et al., 2021, Pérez et al., 2019; Simutis & Lübbert, 2015).

Las investigaciones relacionadas con maximizar la luminiscencia en cultivos sumergidos han estado relacionadas fundamentalmente con *Photobacterium phosphoreum* y dirigidas a la evaluación convencional de la influencia de un factor sobre la variable respuesta (Parmar et al., 2020). Esas investigaciones implican largos períodos de investigación y no permiten identificar las posibles interacciones entre estos factores (Eisapour et al., 2013; Khani 2011). El empleo de las metodologías de superficie de respuesta han sido utilizadas en tecnología de bioprocesos para la obtención de metabolitos de diferente naturaleza (Jacek et al., 2021; Bilgi et al., 2016; Scordia et al., 2010) porque evalúan el efecto que ejerce la variación cuantitativa o cualitativa de cada factor y la de sus interacciones sobre la variable respuesta (Montgomery, 2004). Actualmente, esta metodología ha permitido establecer con éxito los factores y las interacciones que mayor influencia ejercen sobre la emisión de luz en cultivos de bacterias luminiscentes (Muneeswaran et al., 2021; Parnar et al., 2020; Adnan et al., 2019).

La caracterización de bacterias luminiscentes aisladas de la plataforma cubana se ha dirigido a su utilidad como bioindicadores de calidad ambiental en ecosistemas marinos de Cuba. Estas investigaciones han incluido aspectos relacionados con el aislamiento, identificación y fisiología de estos microorganismos (Iglesias et al., 2020a; 2020b; Delgado-Gómez et al., 2017). En particular, la evaluación de cuatro medios de cultivos recomendados en la literatura especializada para este grupo de bacterias, permitió la selección del medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981) para el crecimiento y emisión de luz de la cepa de *Vibrio harveyi* CBM- 992 (Iglesias et al., 2020b).

La presente investigación tiene como objetivo optimizar el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM- 992 mediante la evaluación de la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981).

MATERIALES y MÉTODOS

Microorganismo empleado

La cepa luminiscente *V. harveyi* CBM-992 empleada en este estudio fue aislada de las aguas de la plataforma noroeste de Cuba (Iglesias et al., 2020b). Se encuentra depositada en la Colección de Bacterias Marinas del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), La Habana, Cuba.

Condiciones de cultivo

Las variantes de medio de cultivo a evaluar fueron definidas en función de las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol del medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981). Los experimentos fueron desarrollados a escala de zaranda en Erlenmeyers de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio de cultivo e incubados de acuerdo a las condiciones propuestas por Iglesias et al. (2020b).

Diseño de superficie de respuesta para maximizar el crecimiento y la luminiscencia

La optimización del crecimiento y la luminiscencia mediante la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno se realizó por el método de superficie de respuesta del diseño central compuesto de Box y Hunter (Jiménez, 2015; López Planes, 1988). Para calcular los niveles de concentración de las variables independientes: triptona, extracto de levadura y glicerol se utilizó el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981) como centro del plan factorial. Las variantes de medio de cultivo incluyeron valores mínimos (-1), puntos centrales (0) y valores máximos (+1) de los nutrientes de acuerdo a las combinaciones del diseño central compuesto de Box y Hunter (Tabla 1).

Este diseño consistió en 19 corridas experimentales, que incluyeron cinco repeticiones en el centro del plan (medio LM). Para cada tratamiento se evaluaron como variables respuesta la DO y la luminiscencia.

Para evaluar la significación de los coeficientes en el modelo de regresión se aplicó el test de Student y el test de Fischer para comprobar el ajuste del modelo. Los valores óptimos se calcularon al igualar a cero la prime-

Tabla 1. Concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno para optimizar el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 mediante un diseño central compuesto de Box y Hunter.

| Composición del medio (g/L) | | | |
|-----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Nutriente | Nivel bajo (-1) | Centro del plan (0) | Nivel alto (+1) |
| Triptona | 3.0 | 5.0 | 7.0 |
| Extracto de levadura | 3.0 | 5.0 | 7.0 |
| Glicerol | 2.5 | 3.5 | 4.5 |

ra derivada para las variables dependientes (crecimiento microbiano y luminiscencia) en función de cada variable independiente. La obtención del máximo local se demostró mediante la evaluación de los valores óptimos en la segunda derivada.

El crecimiento microbiano, expresado como unidades de densidad óptica (DO) a 620 nm se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1201. Por su parte, la luminiscencia se determinó mediante el empleo de un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301pc, de manera que la fuente de luz de excitación fue bloqueada para evitar que incidiera sobre la muestra.

Los valores de luminiscencia se determinaron 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 unidades arbitrarias de luminiscencia (ual).

Los resultados de crecimiento y luminiscencia fueron procesados con el programa Statgraphics 19, mediante el cual se obtuvo la ecuación de regresión con los coeficientes significativos (Pareto estandarizado), la superficie de respuesta y de contorno; así como el valor óptimo del modelo obtenido para cada variable dependiente.

Ensayo de toxicidad

A partir del cultivo *V. harveyi* CBM-992 en el medio obtenido para maximizar la luminiscencia, se evaluó su atenuación frente a tres compuestos tóxicos, que incluyeron las sales de metales: HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.

El efecto de la concentración de los compuestos tóxicos se evaluó mediante un diseño en bloques completamente aleatorizados para los metales seleccionados a diferentes concentraciones (Tabla 2). Las diluciones de cada sustancia fueron preparadas en solución salina según lo descrito por Stuart *et al.* (1999).

Para cada evaluación fue expuesto el cultivo en su máxima luminiscencia a las soluciones de los tóxicos en una relación 1:1 (v:v) y como control del ensayo se utilizó solución salina por solución del tóxico. La luminiscencia

se evaluó a los 5 y 15 min de incubación para determinar su atenuación por efecto de los tóxicos (Futra *et al.*, 2014; Villaescusa *et al.*, 1997). La concentración del tóxico que provocó una disminución de un 50 % de la luminiscencia original (EC_{50}) se determinó de acuerdo a la ISO-11348-1 (2007) para este tipo de ensayos.

Las evaluaciones se realizaron por triplicado. Para el procesamiento estadístico de los datos se usó análisis de varianza de clasificación simple con un coeficiente de significación del 95 % y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977). Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Spss v.21.0 y Excel 7.0 para Windows.

RESULTADOS

Optimización del crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992

En todas las variantes de medio de cultivo del diseño central compuesto de Box y Hunter se produjeron variaciones del crecimiento microbiano y la luminiscencia del cultivo *V. harveyi* CBM-992. El procesamiento inicial de los resultados mediante regresión lineal multifactorial determinó las ecuaciones para las variables dependientes (crecimiento microbiano y luminiscencia) en función de los nutrientes evaluados, de acuerdo a las expresiones 1 y 2.

$$Y_1 = 6,41323 + 0,0823092X_1 - 0,107472X_2 + 0,00865347X_3 - 1,35345X_1^2 - 0,18X_1X_2 - 0,0525X_1X_3 - 1,20496X_2^2 - 0,1X_2X_3 - 1,10066X_3^2 \quad (1)$$

$$R^2 = 0.963$$

$$Y_2 = 131.802 - 9.94863X_1 - 23.553X_2 - 2.68079X_3 - 30.8341X_1^2 - 0.80125X_1X_2 - 10.8313X_1X_3 - 26.0841X_2^2 + 2.50125X_2X_3 - 41.6528X_3^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.910$$

Y₁: DO Y₂: Luminiscencia X₁: Triptona X₂: Extracto de levadura X₃: Glicerol

El diagrama de Pareto estandarizado para cada variable dependiente muestra gráficamente la magnitud y dirección de los efectos de las variables independientes sobre el crecimiento microbiano y la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 (Figura 1). El análisis de varianza para la DO indicó que tres efectos tienen influencia significativa negativa en el crecimiento microbiano de la cepa evaluada para un nivel de confianza del 95 % (Figura 1a). Por su parte, para la lumi-

Tabla 2. Concentraciones empleadas en la evaluación del efecto de diferentes sales de metales sobre la luminiscencia *V. harveyi* CBM-992.

| Compuesto | Concentraciones (mg/L) | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | 3.70 | 1.85 | 0.93 | 0.46 | 0.23 | 0.12 | 0.06 | 0.03 | - | - |
| HgCl_2 | 900.00 | 450.00 | 225.00 | 112.50 | 56.00 | 28.00 | 14.00 | 7.00 | 3.50 | 1.76 |
| $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ | 370.00 | 185.00 | 92.50 | 46.25 | 23.13 | 11.56 | 5.78 | 2.89 | 1.45 | 0.72 |

niscencia resultaron cuatro efectos significativamente negativos para esta variable con un nivel de $p < 0.05$ (Figura 1b). En particular, la concentración de triptona, extracto de levadura y glicerol en su expresión cuadrática tuvieron un efecto estadísticamente negativo sobre el crecimiento y la luminiscencia de CBM-992, que indica que la variable respuesta disminuye cuadráticamente, a medida que el nivel de estos factores se incrementa (Rodríguez, et al. 2017).

El análisis del diagrama de Pareto estandarizado de la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento microbiano y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 (Figura 1) determinó las ecuaciones de ajuste para los coeficientes significativos (ecuaciones 3 y 4).

Las ecuaciones del modelo de regresión para las variables dependientes DO (Y_1) y luminiscencia (Y_2) permitieron obtener las superficies de respuesta y de contorno, donde se observa gráficamente el comportamiento de esas variables en función de los niveles de las interacciones: triptona-extracto de levadura, triptona-glicerol y glicerol-extracto de levadura. Los resultados muestran un óptimo local de cada variable dependiente para la zona de estudio (Figura 2 y Figura 3). En particular, como resultado del análisis del diseño para esa zona de óptimo local se obtiene un máximo de crecimiento microbiano de DO= 6.44, que no difiere del valor obtenido en el medio basal LM (6.41). En contraste, para la luminiscencia se alcanzó un valor máximo de 137.9 ual, superior al del medio de cultivo LM (130.9 ual).

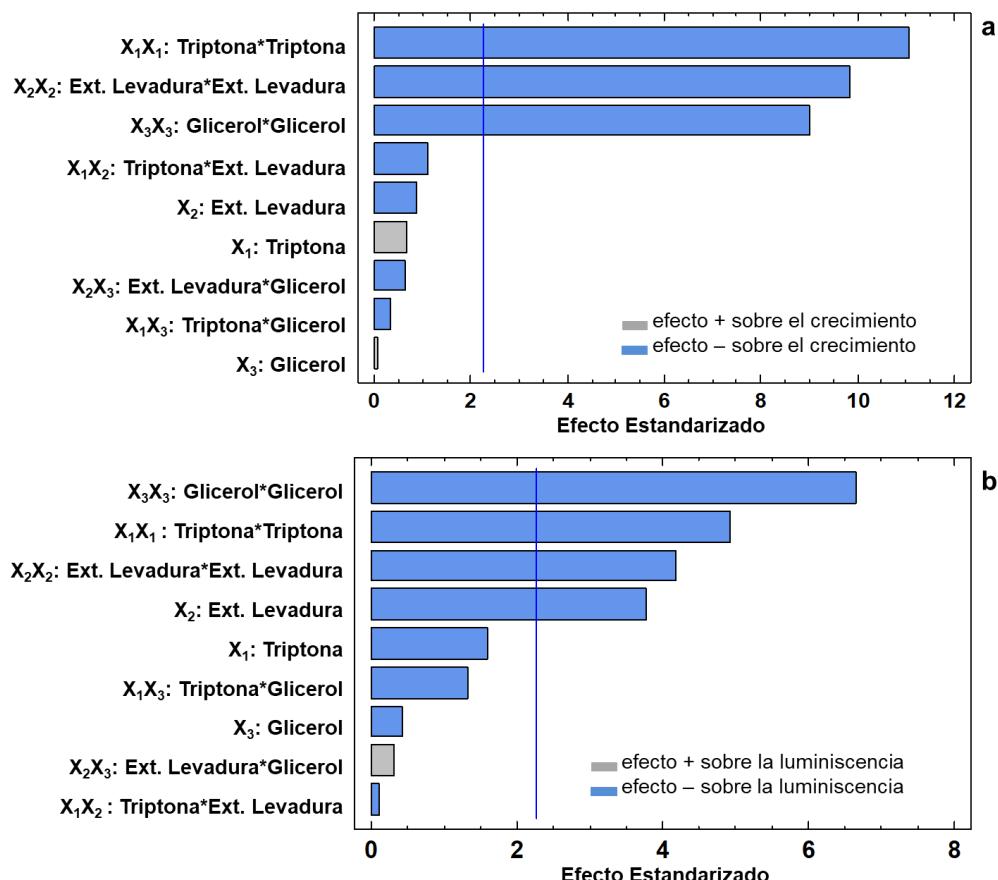


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para la DO (a) y la luminiscencia (b) de *V. harveyi* CBM-992 para un nivel de confianza del 95%. Las barras que sobrepasan la línea vertical representan los coeficientes significativos para cada una de las variables dependientes ($p < 0.05$).

$$Y_1 = 6,41323 - 1,35345X_1^2 - 1,20496X_2^2 - 1,10066X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 131.802 - 23.553X_2 - 30.8341X_1^2 - 26.0841X_2^2 - 41.6528X_3^2 \quad (4)$$

Y_1 : DO Y_2 : Luminiscencia X_1 : Triptona X_2 : Extracto de levadura X_3 : Glicerol

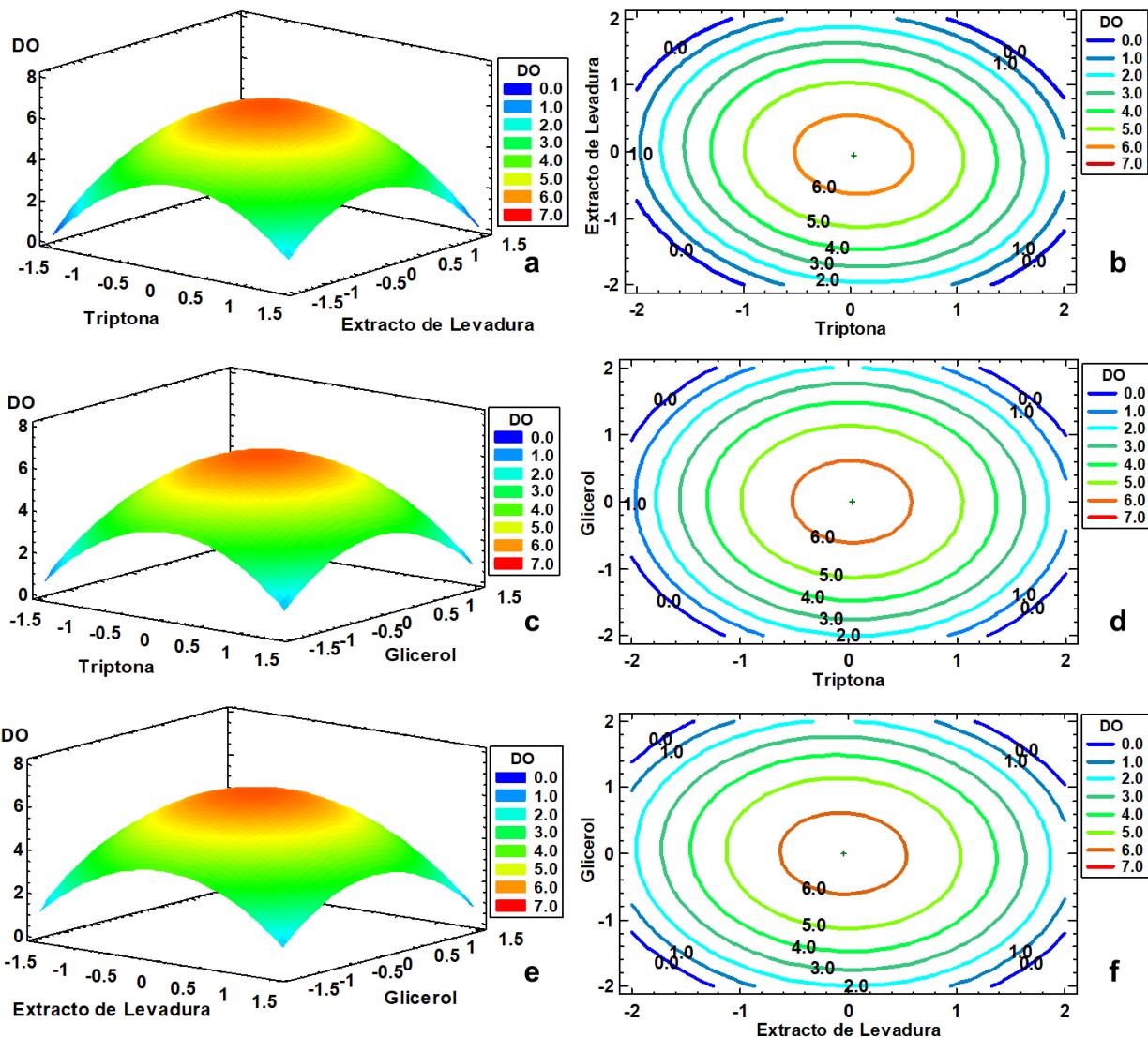


Figura 2. Superficies de respuesta de la optimización del crecimiento microbiano de la cepa *V. harveyi* CBM-992 para las interacciones a. triptona-extracto de levadura, c. triptona-glicerol y e. extracto de levadura-glicerol. Transformaciones canónicas de la superficie de respuesta para las interacciones b. triptona-extracto de levadura, d. triptona-glicerol y f. extracto de levadura-glicerol.

Tabla 3. Concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno que maximizan el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 para el diseño central compuesto de Box y Hunter.

| Nutriente | Medio LM | Medio óptimo de crecimiento | Medio óptimo de luminiscencia |
|----------------------------|----------|-----------------------------|-------------------------------|
| Triptona (g/L) | 5.00 | 5.07 | 4.70 |
| Extracto de levadura (g/L) | 5.00 | 4.90 | 4.10 |
| Glicerol (g/L) | 3.50 | 3.01 | 2.97 |

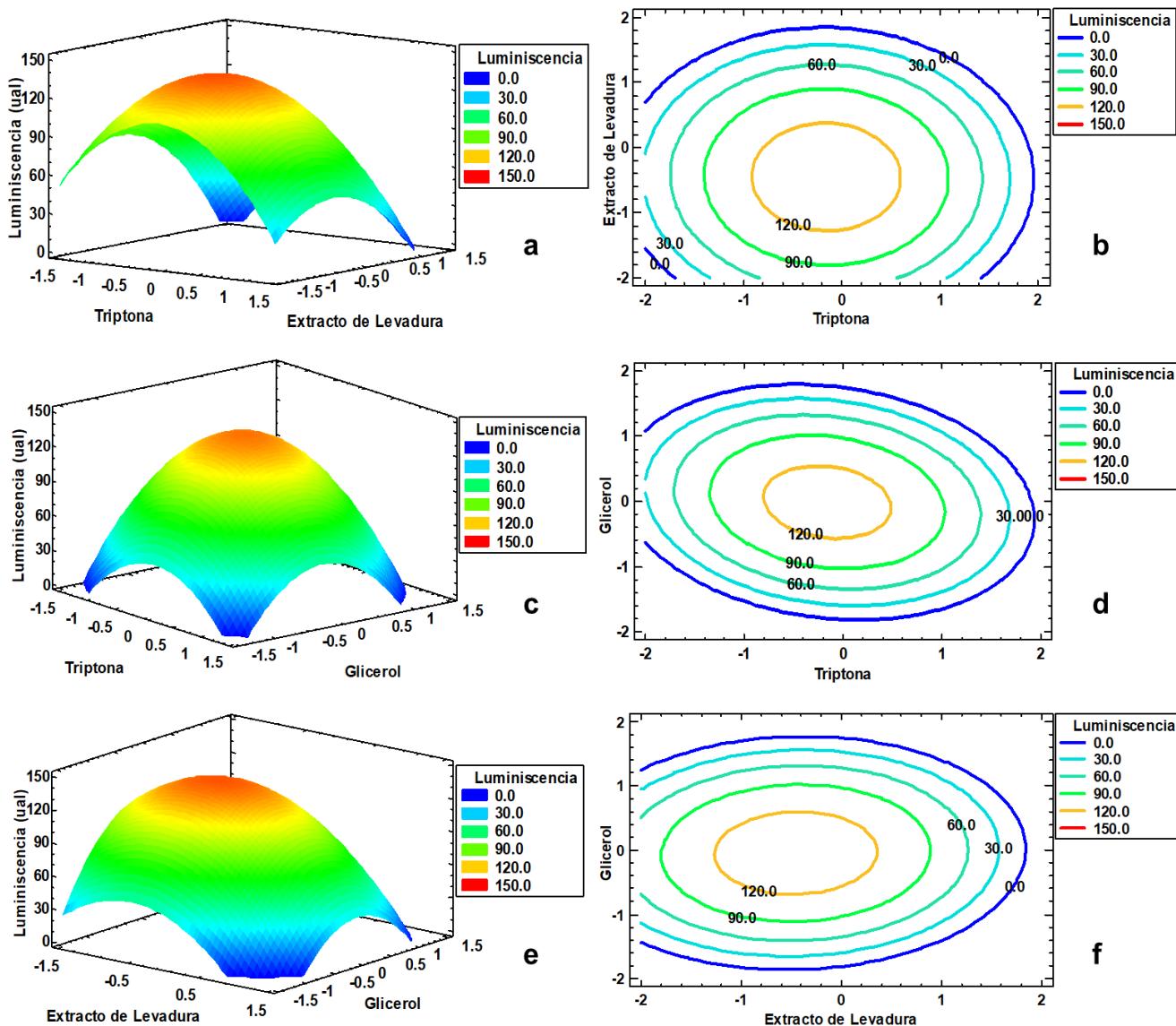


Figura 3. Superficies de respuestas de la optimización de la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 para las interacciones a. triptona-extracto de levadura, c. triptona-glicerol y e. extracto de levadura-glicerol. Transformaciones canónicas de la superficie de respuesta para las interacciones b. triptona-extracto de levadura, d. triptona-glicerol y f. extracto de levadura-glicerol.

El cálculo de la primera derivada de las ecuaciones de ajuste para la DO (Y_1) (3) y luminiscencia (Y_2) (4) determinó las concentraciones de las variables independientes que maximizan el crecimiento y la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 (Tabla 3).

Las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol reducidas en un 6 %, 18 % y 15 %, respectivamente, maximizan la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 en un 5 % con respecto a la obtenida en el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981). Por su parte, los resultados del proceso de optimización del medio para

el crecimiento microbiano, no promovió un incremento de biomasa, posiblemente asociado a la calidad del medio original de partida para alcanzar un buen rendimiento. Sin embargo, es de notar que estos resultados se alcanzan con una concentración menor del extracto de levadura (2%) y de glicerol (14%) lo cual tiene implicaciones importantes en los costos del medio de cultivo.

Efecto de diferentes compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992

La concentración efectiva media (EC_{50}) es ampliamente utilizada para la evaluación de la atenuación de la lumi-

Tabla 4. Valores estimados de EC₅₀ de *V. harveyi* CBM-992, basados en la atenuación de la intensidad de la luminiscencia a 5 y 15 min de exposición a compuestos tóxicos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores ($p < 0.05$; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori).

| Tóxico | EC ₅₀ a 5 min (mg/L) | EC ₅₀ a 15 min (mg/L) |
|---|---------------------------------|----------------------------------|
| HgCl ₂ | 1.64 ^c ± 0.74 | 1.52 ^c ± 0.25 |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ | 60.79 ^b ± 5.97 | 58.44 ^b ± 4.84 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 168.41 ^a ± 15.64 | 158.53 ^a ± 10.31 |

niscencia frente a diferentes compuestos tóxicos, ya que indica la concentración del tóxico que provoca la atenuación de la luminiscencia en un 50 %.

En la Tabla 4 se muestran los valores de EC₅₀ a los 5 y 15 min de exposición al evaluar el efecto de tres compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de CBM-992 en el medio de cultivo óptimo para la luminiscencia.

La atenuación de la intensidad de la luminiscencia de CBM-992 expresada como valores de EC₅₀ no difiere estadísticamente a los diferentes tiempos de incubación para un mismo compuesto (Duncan, $p < 0.05$). Asimismo, la secuencia de sensibilidad mostrada por el cultivo a la exposición de estos compuestos fue: Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Fe³⁺, independientemente del tiempo de contacto evaluado.

DISCUSIÓN

Los estudios sobre optimización del crecimiento y emisión de luz por bacterias luminiscentes no aparecen ampliamente difundidos en la literatura especializada. No obstante, existen evidencias de la influencia de diferentes nutrientes y condiciones de cultivo en el crecimiento y luminiscencia de estas bacterias. En particular, para una cepa del género *Vibrio* se ha demostrado una correlación directa entre el crecimiento celular y la concentración de extracto de levadura en el intervalo de 1-9 g/L, aunque a concentraciones de 1 g/L se produce el máximo de luminiscencia (Parmar et al., 2020). Por su parte, para *Photobacterium leiognathi* cepa GoMGm1 se ha demostrado que el extracto de levadura hasta concentraciones de 8 g/L produce un aumento de la luminiscencia, mientras el crecimiento se inhibe a concentraciones superiores de 6 g/L (Muneeswaran et al., 2021).

En el caso de la triptona se ha informado que favorece el crecimiento y la luminiscencia, probablemente por la presencia de la arginina, que estimula la expresión de la luciferasa; así como la transcripción del sistema bioluminiscente (Srivastava & MacLeod, 1971). Asimismo, la efectividad de varias fuentes de nitrógeno como ácido glutámico, peptona y triptona en la luminiscencia de *Photobacterium* sp. cepa MIE, demostró que la triptona

es el componente más favorable para la luminiscencia a una concentración óptima entre 30-40 g/L (Halmi et al., 2014), que resulta superior a la que maximiza la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992.

Referido al glicerol, aparece ampliamente documentado que no tiene un efecto significativo para el crecimiento y la luminiscencia de estas bacterias (Parmar et al., 2020; Nawaz & Ahmed, 2011). Sin embargo; se ha demostrado su importancia para el crecimiento y la emisión de luz en determinadas cepas de bacterias luminiscentes (Adnan et al., 2020; Iglesias et al., 2020b; Halmi et al., 2014).

Determinadas concentraciones de glicerol pueden inducir o inhibir el crecimiento y la luminiscencia de estos microorganismos (Ramesh et al., 2014). El glicerol puede actuar como una única fuente de carbono utilizada por la enzima luciferasa para la producción de luminiscencia. Friedrich y Greenberg (1983) reportaron que el crecimiento de una cepa luminiscente del género *Vibrio* en ausencia de glicerol causó la represión catabólica de la enzima luciferasa. Asimismo, se ha demostrado que la conservación de una cepa de *P. phosphoreum* en alginato-glicerol al 3 % mantiene máximos de luminiscencia aproximadamente por cuatro semanas (Chun et al., 1996). Por su parte, otros autores refieren concentraciones de glicerol que maximizan la luminiscencia en el intervalo de 3-6 % (Halmi et al., 2014; Ramesh et al., 2014).

Para el presente estudio se confirmó que las concentraciones de nutrientes pueden diferir para alcanzar los máximos de crecimiento microbiano y la luminiscencia, aunque las interacciones de estos nutrientes no tuvieron una influencia significativa sobre la variable respuesta; los factores de manera independiente resultaron significativos para el crecimiento y luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992. A pesar de la limitación de los métodos de optimización, para el presente estudio, se evidenció la bondad del diseño central compuesto de Box y Hunter, que permitió un aumento de la luminiscencia en un 5.3 %, con disminución de las concentraciones de diferentes nutrientes con respecto al medio basal LM. Esta nueva formulación de medio de cultivo permitirá un mayor rendimiento a escalas superiores del proceso fermentati-

vo, con la consiguiente reducción de los costos de producción. Asimismo, estos resultados confirman que las condiciones de cultivo y en particular los requerimientos de nutrientes dependen de la cepa seleccionada (Schlembach *et al.*, 2021). En este sentido, es necesario continuar la evaluación de la influencia de factores ambientales, como el pH y la temperatura, que permitan establecer las condiciones de cultivo de una cepa aislada de la plataforma cubana para incrementar los niveles de producción de luminiscencia.

Los estudios fisiológicos a escala de zaranda han permitido la formulación de un medio de cultivo que maximiza la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992. En esas condiciones de máxima luminiscencia mostró sensibilidad frente a los tres compuestos tóxicos evaluados, independientemente del tiempo de contacto evaluado.

El mercurio es uno de los elementos tóxicos más abundantes en la naturaleza y se encuentra entre los metales cuyos efectos adversos sobre los organismos se encuentran bien documentados (Jan *et al.*, 2016). Sin embargo, aún es muy usado con fines industriales en la producción de baterías, combustión de carbón, industria de la pintura, papel, minería, entre otras (Ayangbenro & Babalola, 2017).

Los valores de EC₅₀ de *V. harveyi* CBM-992 para el Hg²⁺ a 5 min de exposición (EC_{50-5min} = 1.64 mg/L) se encuentran por encima de lo reportado para una cepa de *P. leiognathi* aislada de aguas marinas cubanas (EC_{50-5min} = 0.21 mg/L) (Stuart *et al.*, 1999). Sin embargo, la toxicidad de la cepa en estudio para el Hg²⁺ resultó similar a la mostrada por *V. fischeri* en el ensayo Microtox para este compuesto (EC_{50-5min} = 1.6 mg/L y EC_{50-15min} = 0.8 mg/L) (Cho *et al.*, 2004). Asimismo, la sensibilidad *V. harveyi* CBM-992 frente a este tóxico fue más de nueve veces superior a la de *Vibrio alginolyticus* PBR1 en un medio óptimo de luminiscencia (EC_{50-15min} = 14.18 mg/L) (Parmar *et al.*, 2020).

El cromo es un elemento natural abundante en la corteza terrestre; formando parte de diversos compuestos en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades industriales (Ayangbenro & Babalola, 2017). Para este compuesto tóxico se han reportado valores de EC₅₀ similares a diferentes tiempos de incubación en el ensayo de Microtox (EC_{50-5min} = 18.9 mg/L y EC_{50-15min} = 17.2 mg/L) (Cho *et al.*, 2004), en correspondencia con las EC₅₀ de *V. harveyi* CBM-992 frente Cr⁶⁺ para ambos tiempos de exposición. Los valores de EC₅₀ mostrados por la cepa en estudio se encuentran por debajo de los referidos por otros investigadores para este metal, en

condiciones similares de evaluación. Tal es el caso de Lopez-Roldan *et al.* (2012) (EC_{50-15min} = 190.4 mg/L), Fylladosa *et al.* (2005a) (EC_{50-15min} >500 mg/L) y Villaescusa *et al.* (1997) (EC_{50-5min} = 1 164 mg/L y EC_{50-15min} = 584 mg/L). Esto evidencia la sensibilidad de la cepa en estudio para la detección de cromo en muestras de agua.

El hierro es uno de los metales trazas más importantes para la vida. Es un elemento que actúa como cofactor de disímiles enzimas que intervienen en procesos metabólicos esenciales para la vida como: respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metanogénesis, transporte de oxígeno y regulación genética (Mackenzie *et al.*, 2008). Sin embargo, en la actualidad se refiere un incremento notable de las partículas de hierro que se vierten en el mar a niveles tóxicos, generadas por las ciudades y la industria procedentes de la fabricación de acero y la quema de carbón (Ayangbenro & Babalola, 2017).

Los valores de EC₅₀ para la exposición al Fe³⁺ en esta investigación (EC_{50-5min} = 168.4 mg/L, EC_{50-15min} = 158.5 mg/L) se encuentran por encima de los descritos en la literatura especializada, lo cual sugiere una menor sensibilidad de *V. harveyi* CBM-992 a este compuesto. Ejemplo de ello son los valores referidos por Cho *et al.* (2004) para *V. fischeri* con EC₅₀ de 15.9 y 16.5 mg/L a los 5 y 15 min, respectivamente. Otros autores refieren EC₅₀ de 70 mg/L a los 5 min (Futra *et al.*, 2014) y de 52.08 mg/L a los 15 min (Lopez-Roldan *et al.*, 2012).

El análisis de la EC₅₀ como medida indirecta de la toxicidad demostraron que el mercurio resultó ser el metal más tóxico para *V. harveyi* CBM-992, similar para una cepa de *P. leiognathi*, aislada de aguas de la plataforma cubana (Stuart *et al.*, 1999). Asimismo, la secuencia de toxicidad coincide con la informada por Futra *et al.* (2014) (Cu²⁺ > Cr⁶⁺ > Ag⁺ > Fe³⁺).

En general, la atenuación de la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992, expresado como EC₅₀ para cada uno de los metales evaluados constituye información básica de su sensibilidad a compuestos tóxicos. Sin embargo, es necesario continuar la evaluación de la atenuación de la luminiscencia frente a otros metales, plaguicidas, hidrocarburos, entre otros, que permitan caracterizar la sensibilidad de la cepa frente a posibles contaminantes ambientales. Asimismo, resulta imprescindible su evaluación frente a combinaciones de estos tóxicos y a muestras naturales con diferentes orígenes de impactos, donde la combinación de múltiples compuestos tóxicos pudiera modificar su respuesta.

Varios estudios han demostrado los efectos tóxicos sinérgicos de los compuestos xenobióticos sobre la

atenuación de la luminiscencia, donde la sensibilidad de estos sistemas biológicos dependerá de diferentes factores, como condiciones de cultivos, tipo y concentración respectiva de los tóxicos, factores físicos, entre otros (Fulladosa *et al.*, 2005b) Estos ensayos basados en la bioluminiscencia bacteriana representan una alternativa para evaluaciones de la calidad de ambientes acuáticos por las ventajas que ofrecen en relación a otras metodologías (Mahendran *et al.*, 2022; Halmi, 2016; Girotti *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La aplicación del análisis multivariado a la influencia de nutrientes del medio sobre el crecimiento y la luminiscencia permitió la formulación de un medio que maximiza la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 y garantiza su sensibilidad frente a compuestos tóxicos. Esta formulación representa una disminución en los futuros costos de producción con vistas a la implementación de un bioensayo para el monitoreo de ambientes marinos contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Sectorial de Ciencia, Tecnología e Innovación: Uso sostenible de los componentes de la Diversidad Biológica en Cuba; por el financiamiento para la ejecución del proyecto Diseño de un bioensayo para la detección de contaminantes en ecosistemas marinos mediante tres bacterias luminiscentes de la especie *Vibrio harveyi*.

REFERENCIAS

- Adnan, N. A., Halmi, M. I. E., Gani, S. S. A., Zaidan, U. H., Othman, R., & Shukor, M. Y. A. (2020). Statistical modeling for the optimization of bioluminescence production by newly isolated *Photobacterium* sp. NAA-MIE. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 797-810.
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94. doi:10.3390/ijerph14010094.
- Baumann, P., & Baumann, L. (1981). The marine Gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, & *Alcaligenes*. The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, & identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag. 1302-1331.
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., & Hames, E. E. (2016). Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *International journal of biological macromolecules*, 90, 2-10.
- Blanco, M., Pérez-Albaladejo, E., Piña, B., Kušpilić, G., Milun, V., Lille-Langøy, R., Karlsen, O. A., Goksøyr, A., & Porte, C. (2017). Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. *Science of the Total Environment*, 624, 1640-1648.
- Boehler, S., Strecker, R., Heinrich, P., Prochazka, E., Northcott, G. L., Ataria, J. M., Leusch, F. D., Braunbeck, T., & Tremblay, L. A. (2017). Assessment of urban stream sediment pollutants entering estuaries using chemical analysis and multiple bioassays to characterise biological activities. *Science of the Total Environment*, 593, 498-507.
- Cho, J. C., Park, K. J., Ihm, H. S., Park, J. E., Kim, S. Y., Kang, I., Kyu-Ho, L., Deokjin, J., Dong-Hun, L., & Kim, S. J. (2004). A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(2), 338-344. doi:10.1016/j.bios.2004.02.001.
- Chun, U. H., Simonov, N., Chen, Y., & Britz, M. L. (1996). Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resources, conservation and recycling*, 18(1-4), 25-40.
- Delgado-Gómez, Y. D., Castro, R. U., González, S. S., Rodríguez, M. V. I., Guilarte, E. O., Valcárcel, C. Á., & Gallardo, G. M. L. (2017). Phenotypic characterization and molecular identification of a luminescent marine bacterium isolated from the nw shelf of Cuba. *Bioteecnica*, 19(3), 3-10. doi: 10.18633/bioteecnica.v19i3.441
- Eisapour, M., Keshtkar, A., Moosavian, M. A., & Rashidi, A. (2013). Bioleaching of uranium in batch stirred tank reactor: Process optimization using Box-Behnken design. *Annals of Nuclear Energy*, 54, 245-250.
- Friedrich, W., & Greenberg, E. (1983). Glucose repression of luminescence and luciferase in *Vibrio fischeri*. *Archives of microbiology*, 134, 87-91.
- Fulladosa, E., Murat, J. C., & Villaescusa, I. (2005a). Effect of cadmium (II), chromium (VI), and arsenic (V) on long-term viability-and growth-inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 49, 299-306.
- Fulladosa, E., Murat, J. C., & Villaescusa, I. (2005b). Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere*, 58(5), 551-557.
- Futra, D., Heng, L. Y., Surif, S., Ahmad, A., & Ling, T. L. (2014). Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors*, 14(12), 23248-23268. doi:10.3390/s141223248.

- Girotti, S., Bolelli, L., Ferri, E., Carpené, E., & Isani, G. Bioindicators in environmental monitoring: .(2015) bioluminescent bacteria, algae and honeybees. In *International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece*
- Halmi, M. I. E. (2016). Rapid ecotoxicological tests using bioassay systems-a review. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 29-37.
- Halmi, M. I. E., Jirangon, H., Johari, W. L. W., Abdul Rachman, A. R., Shukor, M. Y., & Syed, M. A. (2014). Comparison of Microtox and Xenoassay light as a near real time river monitoring assay for heavy metals. *The Scientific World Journal*, 2014. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/834202>.
- Halmi, M. I. E., Kassim, A., & Shukor, M. Y. (2019). Assessment of heavy metal toxicity using a luminescent bacterial test based on *Photobacterium* sp. strain MIE. *Rendiconti Lincei.Scienze Fisiche e Naturali*, 30(3), 589-601.
- Iglesias-Rodríguez MV, García-Mesa L, Ortiz-Guilarte E, Álvarez-Valcárcel CM, Lugioyo-Gallardo GM, Núñez-Moreira RR. (2020a). Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y emisión de luz de dos cepas de *Vibrio harveyi*. *Biotechnol Apl*, 37(4), 4211-7.
- Iglesias-Rodríguez, M. V., Umaña-Castro, R., García-Mesa, L., Ortiz-Guilarte, E., Núñez-Moreira, R., Álvarez-Valcárcel, C., & Lugioyo-Gallardo, G. M. (2020b). 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. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1298-1310.
- ISO-11348-1. (2007). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-1:2007, IDT).
- Jacek, P., da Silva, F. A. S., Dourado, F., Bielecki, S., & Gama, M. (2021). Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100022.
- Jan, A. T., Azam, M., Choi, I., Ali, A., & Haq, Q. M. (2016). Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. *brazilian journal of microbiology*, 47, 55-62. doi:[10.1016/j.bjm.2015.11.023](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.023).
- Jiménez, M. G. (2015). Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto. *Revista Varianza*, 11, 31-36.
- Khani, M. H. (2011). Statistical analysis and isotherm study of uranium biosorption by *Padina* sp. algae biomass. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 790-799.
- Lerch G (1977). *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico Técnica. La Habana.
- López Planes, R. (1988). *Diseño estadístico de experimentos*. Ed. Científico-Técnica. La Habana.
- Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M. C., González, S., & Cortina, J. L. (2012). Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of the total environment*, 440, 307-313.
- Mackenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, 10(6), 997-1030. doi:[10.1089/ars.2007.1893](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1893).
- Mahendran, G., Savitha, T., Khalifa, A. Y., Sharma, A., & Sankaranarayanan, A. (2022). Evaluation of environment by microbial sensors. In *Bioprospecting* .424). Elsevier-of Microbial Diversity (pp. 407
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca (Biología)*, 3(5), 75-86.
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. México, D. F. Limusa Wiley (2^a Ed). México 75-81 pp. p 681.
- Muneeswaran, T., Kalyanaraman, N., Vennila, T., Rajesh Kannan, M., & Ramakritinan, C. M. (2021). Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* *Environmental Monitoring and .strain GoMGm1 .18-1 ,193 ,Assessment*
- Nawaz, A., & Ahmed, N. (2011). Isolation and characterization of indigenous luminescent marine bacteria from Karachi coast. *Academic Research International*, 1(2), 74.
- Park, J., Shin, K., Lee, H., Choi, S., Kim, G., Depuydt, S., De Saeger, J., Heynderickx, P.M., Wu, D., Asselman, J., Janssen, C., & Han, T. (2023). Evaluating ecotoxicological assays for comprehensive risk assessment of toxic metals present in industrial wastewaters in the Republic of Korea. *Science of The Total Environment*, 867, 161536.
- Parmar, P., Shukla, A., Goswami, D., Patel, B., & Saraf, M. (2020). Enhanced detection of heavy metals using *Vibrio alginolyticus* PBR1 by optimizing luminescence medium through statistical modeling. *Environmental Sustainability*, 3(4), 437-452.
- Pérez, C., Oramas, J., Arcadio, E., Miranda, A., Roman, Y., & González, A (2019). Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de

- Pseudomonas fluorescens*. *Biotecnología Vegetal*, 19 (2), 127-138.
- Quinn, C. W., Cate, D. M., Miller-Lionberg, D. D., Reilly III, T., Volckens, J., & Henry, C. S. (2018). Solid-phase extraction coupled to a paper-based technique for trace copper detection in drinking water. *Environmental science & technology*, 52(6), 3567-3573.
- Ramesh, C., Mohanraju, R., Karthick, P., & Narayana, S. (2014). Impact of light, temperature, salinity and glycerol on the intensity of luminescence and growth of marine bioluminescent bacteria *Vibrio campbellii* (strain STF1). *Current Science*, 511-513.
- Rodríguez, M. D., Castrillo, M. L., Velázquez, J. E., Kramer, G. R., Sedler, C., Zapata, P. D., & Villalba, L. (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2), 317-324.
- Schlembach, I., Grünberger, A., Rosenbaum, M. A., & Regestein, L. (2021). Measurement techniques to resolve and control population dynamics of mixed-culture processes. *Trends in biotechnology*, 39(10), 1093-1109.
- Scordia, D., Cosentino, S. L., & Jeffries, T. W. (2010). Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresource Technology*, 101(14), 5358-5365.
- Shanware, A., Thakre, N., & Pande, S. (2013). Isolation and characterization of novel marine luminescent bacteria from Diu beach, India. *Journal of Pharmacy Research* 7(2013) 529-533. doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.019.
- Simutis, R., & Lübbert, A. (2015). Bioreactor control improves bioprocess performance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1115-1130.
- Srivastava, V. S., & MacLeod, R. A. (1971). Nutritional requirements of some marine luminous bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(5), 703-711.
- Stuart, M., Lugioyo, M., & Alvarez, C. (1999). Atenuación de la luminiscencia de una cepa de *Photobacterium leiognathi*, aislada de aguas cubanas, por acción de xenobióticos y muestras ambientales. *Contribution to Education and environmental protection*, 0, 32-35.
- Veysi, S., & Zeinoddini, M. (2023). Optimized Detection of Water and Food Toxin Contamination Using *Vibrio persian* Bioluminescence Inhibition Assay (VPBIA). *Journal of Water Chemistry and Technology*, 45(6), 564-573. doi.org/10.3103/S1063455X23060073.
- Villaescusa, I., Martí, S., Matas, C., Martíne, M., & Ribó, J. M. (1997). Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(5), 871-874.