

Bacterias bioluminiscentes marinas en la costa de Gran Canaria

Z. González-Lama y A. Díez del Pino

Microbiología. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apdo. 550. 35080 Las Palmas, España.

RESUMEN

Han sido aisladas bacterias bioluminiscentes en aguas superficiales costeras de la isla de Gran Canaria y en la superficie y el contenido intestinal de Sarpa salpa (Linnaeus, 1758), pez muy común en las islas Canarias. Las especies aisladas fueron Vibrio splendidus biovar 1, Vibrio logei, Vibrio fischeri y Photobacterium phosphoreum. La población de bacterias bioluminiscentes en estas aguas superficiales fluctúa considerablemente, desde 50 000 unidades formadoras de colonias por litro (ufc/l) en los meses de verano a 3 000 ufc/l en invierno. Hemos encontrado una correlación positiva entre la temperatura del agua y el número de bacterias bioluminiscentes.

Palabras clave: Bacterias bioluminiscentes, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Sarpa salpa*, Gran Canaria.

ABSTRACT

Bioluminescent marine bacteria on the Gran Canaria coast.

Bioluminescent bacteria were isolated on coastal surface waters, and on the surface and in the gastrointestinal tract of Sarpa salpa (Linnaeus, 1758) (a very common fish in the Canary Islands) off Gran Canaria Island. The species isolated were: Vibrio splendidus biovar 1; Vibrio logei; Vibrio fischeri and Photobacterium phosphoreum. The population of bioluminescent bacteria in these coastal surface waters fluctuated considerably, being as high as 50 000 cfu/l in the summer and as low as 3 000 cfu/l in the winter. There is a positive correlation between water temperature and the number of bioluminescent bacteria.

Key words: Bioluminescent bacteria, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Sarpa salpa*, Gran Canaria.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias bioluminiscentes están ampliamente distribuidas en muchos hábitats marinos diferentes, mientras son menos abundantes en medios no marinos (Hastings y Nealson, 1979; Nealson y Hastings, 1992). Las formas marinas pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Alteromonas* (Baumann *et al.*, 1983). Estas bacterias se encuentran en muchos hábitats dentro del ambiente marino, incluyendo formas planctónicas (vida libre), saprofitas, parásitas, simbioses intestinales y simbioses de órganos luminosos (Haygood, 1993).

En los últimos años las bacterias luminosas han atraído considerablemente la atención por sus aplicaciones técnicas. Como bacterias intactas han sido utilizadas para la detección de compuestos carcinogénicos (Ulitzur, 1986) o para monitorizar actividades tóxicas generales (Bulich, 1986; Lee *et al.*, 1992; Sun y Stahr, 1993) y la enzima luciferasa se usa en diversos bioensayos (Gastrin, Gustafson y Lundin, 1989; Koenig, Tick y Hanna, 1992; Nilsson, Hoffner y Ansehri, 1988; Pazzagli *et al.*, 1989; Simpson, 1993).

El objetivo de este trabajo ha sido intentar conocer las bacterias bioluminiscentes

en las costas de la isla de Gran Canaria ya que, habiendo sido estos microorganismos objeto de múltiples investigaciones en otros países (Hastings y Nealson, 1979; Olson *et al.*, 1978; Ruby y Nealson, 1978; Shilo y Yetinson, 1979; Yetinson y Shilo, 1979), no tenemos conocimiento de que hayan sido estudiadas en algún punto del litoral español.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las bacterias bioluminiscentes han sido aisladas de aguas litorales de la isla de Gran Canaria, así como de la superficie y el contenido intestinal de salemas *Sarpa salpa* pez muy común en las costas de Gran Canaria. El medio de cultivo más utilizado ha sido el descrito por Waters y Hastings (1977); y una modificación del mismo añadiéndole 0,2 g de L-arginina por litro de medio. Los microorganismos fueron identificados siguiendo las directrices del manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994) y los criterios expuestos por Baumann *et al.* (1983). Para la identificación bioquímica hemos utilizado el sistema API 20E, más otras pruebas complementarias. La catalasa se ha detectado con agua oxigenada; para la prueba de la oxidasa se ha utilizado el reactivo de la casa comercial Difco que contiene dihidrocloruro de N,N,N₁,N₁-tetrametil-p-fenilenediamina. El requerimiento de sodio se determina cultivando los microorganismos en el medio de Waters y Hastings (1977), con distintas concentraciones de ClNa (0, 1, 3, 5 y 10%). La influencia del oxígeno en la producción de bioluminiscencia por estas bacterias, se observó cultivándolas en medio líquido de Waters y Hastings (1977) con agitación y sin ella. Para determinar si la arginina influía en la producción de bioluminiscencia en estas bacterias, se cultivaron en medio de Waters y Hastings (1977) sin y con arginina al 0,02%.

La cinética de la luciferasa se ha estudiado utilizando extractos enzimáticos de estas bacterias bioluminiscentes marinas como fuente de la enzima luciferasa. La cinética de la caída de la bioluminiscencia

se ha detectado utilizando un luminómetro modelo 1250 LKB-Wallas; la reacción utilizada es la propuesta por la casa comercial Sigma para la luciferasa bacteriana referencia L-8507 y los reactivos utilizados en la misma han sido NADH, FMN y un aldehído de larga cadena (dodecanal) suministrados por Sigma.

Se considera la cinética de la luciferasa como lenta cuando la caída de la bioluminiscencia dura varios minutos y rápida cuando dura unos cuantos segundos (5-20 s).

Para el estudio de la distribución estacional de las bacterias bioluminiscentes en agua de mar se recogieron diariamente, durante un año, muestras de agua litoral de la playa de las Canteras en la isla de Gran Canaria, a la misma hora y en el mismo lugar, tomándose también la temperatura del agua. Seguidamente, alícuotas de esta agua de mar eran filtradas por el sistema Millipore, que consta de una bomba de vacío, un porta filtros de vidrio, donde se coloca en condiciones de esterilidad un filtro de nitrocelulosa estéril, con un tamaño de poro de 0,45 µm; cada filtro se colocaba sobre un placa con medio sólido de Waters y Hastings (1977) y se incubaba a 20 °C durante 24 horas. Posteriormente se procedía al recuento, en cámara oscura, de las colonias luminosas y a su marcado para posterior resiembra y aislamiento. Los resultados obtenidos han sido sometidos a un estudio estadístico y se han representado como número de microorganismos bioluminiscentes o unidades formadoras de colonias por litro de agua de mar (ufc/l).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias bioluminiscentes pueden ser encontradas en muchos hábitats dentro del ambiente marino, incluyendo formas planctónicas o de vida libre, saprofitas, parásitas, simbioses intestinales y simbioses del órgano luminoso de algunos animales marinos.

A partir de aguas superficiales marinas de la playa de las Canteras, en la isla de Gran Canaria, y de la superficie y el contenido

intestinal de salemas (*Sarpa salpa*), pez muy común en las costas de Gran Canaria, hemos aislado bacterias bioluminiscentes. Tanto el medio de Waters y Hastings (1977), como la modificación del mismo, añadiéndole arginina, dieron similar rendimiento en el aislamiento de las bacterias bioluminiscentes marinas. De entre un gran número de estirpes o cepas aisladas, basándonos en el tipo

de bioluminiscencia que producían las colonias (muy brillante o poco brillante), el hábitat (aguas superficiales, superficie y contenido intestinal de peces), características bioquímicas y otras características que se muestran en la tabla I, se seleccionaron siete estirpes o cepas que denominamos E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7. Todas estas estirpes son bacilos Gram negativos, móviles y biolu-

Tabla I. Pruebas de identificación de bacterias bioluminiscentes marinas de la isla de Gran Canaria.

Prueba	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Cinética luciferasa	Lenta	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	-
Crecimiento a 4 °C	+	+	-	-	+	+	+
Crecimiento a 25 °C	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 35 °C	-	-	+	+	-	-	-
Crecimiento a 40 °C	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento de sodio	+	+	+	+	+	+	+
Pigmentación amarillo-anaranjada	-	+	+	+	+	-	-
Sensibilidad a O/129	+	+	+	+	+	+	+
Necesidad de arginina para bioluminiscencia	-	-	-	-	-	-	-
Influencia del oxígeno en la bioluminiscencia	-	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Ortonitrofenil-β-D-galactopiranosido	-	+	+	+	+	-	-
Arginina dehidrolasa	+	-	-	-	-	+	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	-	+	+	+
Ornitina descarboxilasa	-	-	+	+	+	-	+
Utilización del citrato	-	-	-	-	-	-	-
Producción de SH ₂ a las 24 h.	-	-	-	-	-	-	-
Producción de SH ₂ a las 48 h.	-	-	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	+	+	-
Triptófano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	-	+	+	+	+	-	-
Producción de ácido de glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa + producción de gas	-	-	-	-	-	+	+
D-manitol	-	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	+	+	+	+	-	-
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	+	+	-	+	-	+
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	+	-	-	-	-

miniscentes. El se diferencia del resto de las estirpes por presentar una cinética de la luciferasa lenta; en las otras seis estirpes la cinética de la luciferasa es rápida. De acuerdo con estas características, y las que se muestran en la tabla I, estas siete estirpes se han clasificado en tres especies de *Vibrio* y una de *Photobacterium*. Como bacterias planctónicas o de forma libre en el agua del mar hemos aislado dos estirpes diferentes (E6 y E7), ya que difieren en algunas propiedades bioquímicas, de *Photobacterium phosphoreum*. Es de destacar que la estirpe E6 de *Photobacterium phosphoreum* en poco tiempo se convirtió en forma oscura (variante K) incapaz de producir bioluminiscencia; ésta es una característica que poseen las bacterias bioluminiscentes marinas, después de sucesivas resiembras en medios artificiales. Este fenómeno ocurre espontáneamente y también puede ocurrir espontáneamente la reversión (Hastings y Nealson, 1979). Además de la emisión de luz, también se alteran otras propiedades como la morfología y tipo de las colonias.

Las bacterias bioluminiscentes marinas se distribuyen en seis grupos (Nealson y Hastings, 1992). En la superficie de los peces, como formas saprofitas, hemos encontrado *Vibrio splendidus* biovar 1 (E1) que pertenece al grupo de *Vibrio harveyi* (constituído por las especies *V. harveyi*, *V. splendidus* y *V. orientalis*), *Vibrio logei* (E2) y *Vibrio fischeri* (E3) que pertenecen al grupo *V. fischeri* (constituído por las especies *V. fischeri* y *V. logei*). En el contenido intestinal de los mismos animales hemos encontrado *Vibrio logei* (E5) y *Vibrio fischeri* (E4), aunque con algunas propiedades bioquímicas diferentes de las encontradas en la superficie de los peces.

Las formas planctónicas pueden ser fácilmente aisladas y han sido a menudo utilizadas para estudios estacionales, ambientales y geográficos de la distribución de las bacterias bioluminiscentes (O'Brien y Sizemore, 1979; Orndorff y Colwell, 1980; Ruby, Greenberg y Hastings, 1980; Ruby y Nealson, 1978; Yetinson y Shilo, 1979). Probablemente todas las especies bioluminiscentes marinas pueden comportarse como

saprofitas y se aíslan de la superficie de animales marinos muertos, tales como peces y crustáceos (Harvey, 1952). El crecimiento puede depender en gran medida de la producción de enzimas extracelulares, como proteasas o quitinasas.

Quizá el hábitat más común de las bacterias bioluminiscentes es el intestino de los peces marinos (Ohwada, Tabor y Calwell, 1980) y de invertebrados: la mayoría de las especies han sido aisladas de este nicho. Hastings, Makemson y Dunlap (1987) observaron, en algunos peces, que cuando era sembrado su contenido intestinal sobre agar nutritivo, todas las colonias que crecían eran bioluminiscentes. Ha sido descrito que las bacterias bioluminiscentes permanecen viables e incrementan su número al paso por el intestino de los peces (Ruby y Morin, 1979).

La figura 1 muestra la distribución a lo largo de un año de las bacterias bioluminiscentes en aguas superficiales de la playa de las Canteras en la isla de Gran Canaria. La temperatura del agua del mar osciló entre 18 °C y 24 °C en los meses de octubre a marzo y entre 20 °C y 24 °C de abril a septiembre. Como se puede observar en la gráfica, existe un aumento en el número de bacterias bioluminiscentes en los meses de marzo a septiembre, coincidiendo con un ligero aumento de la temperatura del agua.

Fueron Ruby y Nealson (1978) los primeros en observar que la población de estas bacterias es dinámica y sufre unos cambios regulares. Estudios de la distribución de las especies luminosas en océano abierto, en el Atlántico norte, realizados por Ruby, Greenberg y Hastings en 1980, indican que *V. harveyi* era el organismo bioluminiscente predominante, durante la primavera, por encima de los 150 m de profundidad, disminuyendo en el otoño y estando ausente en el invierno. *Photobacterium phosphoreum* se encontraba entre 250 y 1 000 m de profundidad, permaneciendo su número prácticamente estable en un estudio que se realizó en un periodo de seis meses.

En aguas costeras en San Diego (California) Ruby y Nealson (1978) encontra-

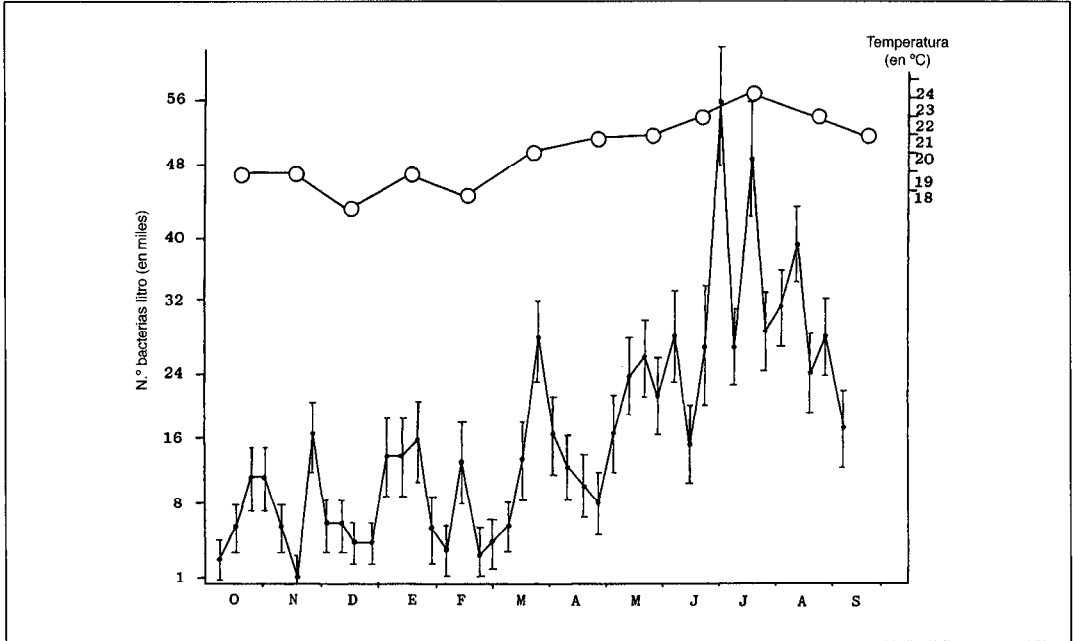


Figura 1. Recuento de bacterias bioluminiscentes marinas (en ufc/l) durante 1 año en la playa de Las Canteras (isla de Gran Canaria).

ron ciertas variaciones en el número de *V. harveyi* y *V. fischeri* aislados en estas aguas, observando un pico máximo de *V. fischeri* en primavera, previo al aumento del número de *V. harveyi*. También vieron una correlación positiva entre la temperatura del agua y el número de *V. harveyi* presentes. También *V. fischeri* y *V. harveyi* fueron las bacterias bioluminiscentes aisladas con más frecuencia en aguas superficiales del Mar de los Sargazos (Orndorff y Colwell, 1980).

Variaciones estacionales diferentes y más complejas fueron observadas en las costas de Israel y el golfo de Elat (Shilo y Yetinson, 1979; Yetinson y Shilo, 1979). *V. harveyi* fue la única especie detectada en el intestino de peces y sedimentos marinos en un estudio realizado en un estuario semi-tropical en la isla de Galverton en Texas por O'Brien y Sizemore (1979).

Tanto *V. fischeri* como *V. harveyi* han sido encontrados en la superficie y contenido intestinal de animales marinos (Hastings y Neelson, 1979; Neelson y Hastings, 1992;

Ruby y Neelson, 1978; Ruby y Morin, 1979; Holt *et al.*, 1994). Nosotros hemos encontrado, además, *V. logei* y *V. splendidus* biovariedad I.

Los resultados obtenidos en nuestros recuentos de bacterias bioluminiscentes en aguas superficiales marinas dan valores muy superiores a los hallados en los estudios citados, en los que se oscila de 1 000 a 6 000 ufc/l en aguas costeras cerca de San Diego en California (EE UU), a valores más bajos en mar abierto, frente a las 40 000 o incluso 50 000 ufc/l de nuestros recuentos en meses como julio. La causa de esto es, probablemente, lo postulado por Yetinson y Shilo (1979): de que la distribución de estas bacterias viene condicionada por propiedades de las mismas, como son sensibilidad a la fotoinactivación, inactivación térmica, resistencia a la hipersalinidad y capacidad de crecer en un medio pobre en nutrientes. En nuestro caso particular, hay que añadir que la playa de las Canteras es una zona de mar tranquilo y protegida por un arrecife natural de origen volcánico.

BIBLIOGRAFÍA

- Baumann, P., L. Baumann, M. J. Woolkalis y S. S. Bang. 1983. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*: A basis for a natural classification. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 369-398.
- Bulich, A. 1986. Bioluminescence assays. En: *Toxicity testing using microorganisms*. G. Bitton y B. J. Dutka (eds.) 1: 57-74. CRC Press. Boca Raton, EE UU.
- Gastrin, B., R. Gustafson y A. Lundin. 1989. Evaluation of a bioluminescence assay for detection of bacteriuria. *Scand. J. Infect. Dis.* 21: 409-414.
- Harvey, E. N. 1952. *Bioluminescence*. Academic Press. Nueva York.
- Hastings, J. W., J. Makemson y P. V. Dunlap. 1987. How are growth and luminescence regulated independently in exosymbiotic? *Symbiosis* 4: 3-24.
- Hastings, J. W. y K. H. Nealson. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43: 496-518.
- Haygood, M. G. 1993. Light organ symbioses in fishes. *Crit. Rev. Microbiol.* 19: 191-216.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Stalleg y S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9.^a ed.: 256-274. Williams and Wilkins. Baltimore, EE UU.
- Koenig, C., L. J. Tick y B. A. Hanna. 1992. Analyses of the Flash Track DNA probe and UTIscreen bioluminescence test for bacteriuria. *J. Clin. Microbiol.* 30: 342-345.
- Lee, S., K. Sode, K. Nakanishi, J. L. Marty, E. Tamiya e I. Karube. 1992. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosens Bioelectron* 7: 273-277.
- Nealson, K. H. y J. W. Hastings. 1992. The luminous bacteria. En: *The Prokaryotes*. 2.^a ed. A. Balows et al. (eds.): 625-639. Springer-Verlag. Nueva York. Berlín.
- Nilsson, L. E., S. E. Hoffne y S. Ansehri. 1988. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1208-1212.
- O'Brien, C. H. y R. K. Sizemore. 1979. Distribution of the luminous bacterium *Beneckeia harveyi* in a semitropical estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 928-933.
- Ohwada, K., P. S. Tabor y R. R. Calwell. 1980. Species composition and barotolerance of gut microflora of deep-sea benthic macrofauna collected at various depths in the Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 746-755.
- Olson, R. J., B. M. Tebo, E. Mousalli, A. F. Carlucci, F. Azam y O. Holm-Hassen. 1978. Microbial investigations in the Ross sea. *Antarct. J. US* 13: 130-131.
- Orndorff, S. A. y R. R. Colwell. 1980. Distribution and identification of luminous bacteria from the Sargasso sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 983-987.
- Pazzagli, M., E. Cadenas, L. J. Kricka, A. Roda y P. E. Stanley. 1989. *Bioluminescence and chemiluminescence: studies and applications in biology and medicine*. John Wiley. Nueva York.
- Ruby, E. G., E. P. Greenberg y J. W. Hastings. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 302-306.
- Ruby, E. G. y J. G. Morin. 1979. Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 406-411.
- Ruby, E. G. y K. H. Nealson. 1978. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in the near shore sea water. *Limnol. Oceanogr.* 23: 530-533.
- Shilo, M. y T. Yetinson. 1979. Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean sea and the gulf of Elat. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 577-584.
- Simpson, W. J. 1993. Application of «in vivo» bioluminescence to the study of ionophoretic action. *J. Biolum. Chemilum.* 8: 147-152.
- Sun, T. S. y H. M. Stahr. 1993. Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test. *J. AOAC* 76: 893-898.
- Ulitzur, S. 1986. Bioluminescence test for genotoxic agents. *Methods Enzymol.* 133: 264-274.
- Waters, C. A. y J. W. Hastings. 1977. Mutants of luminous bacteria with altered control of luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 131: 519-525.
- Yetinson, T. y M. Shilo. 1979. Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the Eastern Mediterranean sea and the gulf of Elat. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1230-1238.

Recibido en septiembre de 1996. Aceptado en diciembre de 1996.