



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**ESTABLECIMIENTO Y MODELADO DE UN
CULTIVO BACTERIANO BIOLUMINISCENTE COMO
FUENTE DE ILUMINACIÓN ALTERNATIVA**

Tesis que presenta:

ODETTE CASTILLO GÓMEZ

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México
Octubre, 2018

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Energía Renovable y Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Proyecto Interno CICY para el fortalecimiento de la investigación multidisciplinaria 2017 bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Ramírez Rivera y la codirección de la Dra. Ruby Valdez Ojeda.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Víctor Ramírez Rivera por todo su apoyo y orientación, pero sobre todo por la confianza y continuidad que le brindó al proyecto. A mi codirectora de tesis la Dra. Ruby Valdez Ojeda por todas sus enseñanzas, dedicación e invaluable recomendaciones.

A mis asesores, la Dra. Blondy Canto Canché por su interés, disposición, confianza y su incalculable apoyo. A la Dra. Belem Saldivar Márquez por su conocimiento compartido y orientación.

Al M.C. Miguel Tzec Simá, Bartolomé Chi Manzanero técnicos de la unidad de Biotecnología, por todo el apoyo brindado durante la experimentación de esta tesis y sus grandes enseñanzas.

Al Ing. Juan Méndez Magaña y Tanit Toledano Thompson técnicos de la unidad de Energía Renovable por todo su apoyo.

A Katia Ancona Canché por todo su apoyo a lo largo de la experimentación del proyecto y por sus recomendaciones de gran valor.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional No. 766726 y al fondo del Centro de Investigación Científica de Yucatán por la convocatoria interna para el Fortalecimiento de la Investigación Multidisciplinaria 2017 correspondiente al proyecto “Integración de investigación multidisciplinaria para el desarrollo de un sistema de bioluminiscencia empleando cultivos bacterianos de *Aliivibrio fischeri* como iluminación de advertencia en una estación marina de generación de energía” a cargo del Dr. Víctor Ramírez Rivera, a quien agradezco extensamente por las facilidades otorgadas.

A mis padres y hermanos por el apoyo, cariño y compañía que me han brindado a lo largo de este periodo. Y a mi esposo Arturo Marbán por todo el amor y soporte que me ha entregado.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	3
1.1 Organismos bioluminiscentes	3
1.2 Enzimas en la bioluminiscencia	4
1.2.1 Luciferasa bacteriana.....	4
1.2.2 Ácido graso reductasa.....	7
1.2.3 Flavín mononucleótido reductasa	8
1.3 Capacidad simbiótica de <i>A. fischeri</i>	9
1.4 Autoinducción o percepción de quórum.....	11
1.5 Factores que afectan el crecimiento y la luminiscencia de <i>Aliivibrio fischeri</i> ..	12
1.5.1 Temperatura y salinidad.....	12
1.5.2 Iones inorgánicos.....	13
1.5.3 Arginina.....	14
1.6 Cultivo continuo de <i>Aliivibrio fischeri</i>	14
1.7 Cultivo en batch de <i>Aliivibrio fischeri</i>	16
1.8 Modelos matemáticos del crecimiento de sistemas bacterianos.....	16
1.8.1 Modelos matemáticos lineales – Ecuaciones de Monod.....	18
1.8.2 Modelos matemáticos no lineales	19
1.9 Diseño de reactores biológicos.....	19
1.10 Objetivos.....	21
1.10.1 Objetivo general	21
1.10.2 Objetivos específicos.....	21
2. CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA.....	22
2.1 Reactivación de <i>Aliivibrio fischeri</i> (ATCC®, 7744)	22
2.2 Análisis estadístico y diseño de experimentos de medios de cultivo	23
2.3 Cultivo sólido, pre-cultivo y cultivo líquido de <i>Aliivibrio fischeri</i>	24

2.4	Curvas de crecimiento de <i>Aliivibrio fischeri</i>	25
2.5	Medición del promedio de intensidad de luminiscencia.....	25
2.6	Uso de sal de mesa para el cultivo de <i>A. fischeri</i>	25
2.7	Escalamiento de <i>Aliivibrio fischeri</i>	25
2.8	Cultivo semi-continuo de <i>Aliivibrio fischeri</i>	26
2.9	Modelo matemático del crecimiento celular de <i>Aliivibrio fischeri</i>	26
2.10	Sistema de control para el mantenimiento de pH y diseño del prototipo de reactor para <i>Aliivibrio fischeri</i>	27
2.10.1	Control de pH.....	27
2.10.2	Diseño físico del prototipo de reactor.....	28
3.	CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1	Reactivación de <i>Aliivibrio fischeri</i>	30
3.2	Diseño de experimentos de medios de cultivo para <i>Aliivibrio fischeri</i>	31
3.3	Cultivos sólidos, pre-cultivos y cultivos subsecuentes líquidos.....	32
3.4	Curvas de crecimiento de <i>Aliivibrio fischeri</i>	34
3.5	Curvas del promedio de intensidad de luminiscencia.....	36
3.6	Análisis estadístico del diseño de experimentos.....	40
3.7	Uso de sal de mesa para el cultivo de <i>A. fischeri</i>	41
3.8	Escalamiento de <i>A. fischeri</i>	42
3.9	Cultivo semi-continuo de <i>A. fischeri</i>	43
3.10	Modelo matemático del crecimiento celular de <i>A. fischeri</i>	45
3.11	Diseño del prototipo del reactor para cultivo semi-continuo de <i>A. fischeri</i>	47
3.11.1	Control de pH.....	47
3.11.2	Diseño físico de prototipo de reactor.....	50
	CONCLUSIONES	54
	PERSPECTIVAS	55
	ANEXOS	56
	Anexo A. Código utilizado para el control de pH, programación de microcontrolador Arduino.....	56
	REFERENCIAS	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Medio de cultivo LB20 utilizado para la reactivación de <i>A. fischeri</i>	22
Tabla 2.2 Factores y niveles para diseño de experimentos.....	24
Tabla 2.3 Diseño de experimentos de medios de cultivo para el crecimiento de <i>A. fischeri</i> . Todos los medios con pH 7.0 y 50 mM Tris-HCl.....	24
Tabla 2.4 Medio de cultivo sólido para el crecimiento de <i>A. fischeri</i>	24
Tabla 2.5 Modelos matemáticos no-lineales de crecimiento celular	27
Tabla 3.1 Composición de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de <i>A. fischeri</i>	31
Tabla 3.2 Absorbancias leídas a 600nm de cultivos. Promedio de réplicas.	35
Tabla 3.3 Tabla ANOVA de análisis de varianzas con una r^2 ajustada de 98.65%.....	40
Tabla 3.4 Densidad óptica de cultivo semi-continuo de <i>A. fischeri</i>	43
Tabla 3.5. Parámetros de crecimiento y coeficientes estadísticos obtenidos de la regresión de la $DO_{600\text{ nm}}$ del cultivo de <i>A. fischeri</i>	45
Tabla 3.6 Medidas utilizadas para el diseño de reactor para <i>Aliivibrio fischeri</i>	50
Tabla 3.7 Dimensiones del contenedor para inóculo	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Reacción de luciferasa bacteriana. Sustratos: FMNH ₂ , oxígeno y un aldehído graso de cadena larga. Productos de la reacción: ácido graso, agua y FMN [27].	4
Figura 1.2 Estructura de luciferasa bacteriana. Conformada por la subunidad α y la subunidad β [27].	5
Figura 1.3 Secuencia de genes <i>lux</i> involucrados en la bioluminiscencia [27].	6
Figura 1.4 Reacciones de la transferasa, sintetasa y reductasa en el complejo enzimático ácido graso reductasa [27].	8
Figura 1.5 Reacción de enzima FMN reductasa [27].	8
Figura 1.6 Fotografía de <i>Euprymna scolopes</i> tomada por William Ormerod [41].	9
Figura 1.7 <i>A. fischeri</i> entra a los órganos de luz del calamar <i>E. scolopes</i> a través de los poros de cada lado de los órganos. Se pueden ver tres poros del lado derecho e izquierdo de la imagen. El color azul es producido por la bacteria [48].	10
Figura 1.8 Arreglo de genes estructurales <i>lux</i> de <i>A. fischeri</i> [27].	11
Figura 1.9 Mecanismo de autoinducción en <i>A. fischeri</i> [27].	12
Figura 1.10 Intensidades de luminiscencia de <i>A. fischeri</i> en medios con combinaciones de dos iones inorgánicos a 14h y 24h [56].	13
Figura 1.11 Esquema de fermentador para cultivo continuo de <i>A. fischeri</i> . PMT: fotomultiplicador, PD: fotodiodo [17].	15
Figura 1.12 Curva de crecimiento microbiano. 1) Fase de latencia o tiempo <i>lag</i> ; 2) Fase logarítmica o exponencial; 3) Fase de transición; 4) Fase estacionaria. [69].	17
Figura 1.13 A.) Biorreactor de 30 L para el cultivo de bacteria <i>E. coli</i> [77]. B.) Biorreactor de 5 L para el cultivo de bacterias, levaduras y hongos [78]. C.) Biorreactor con cultivo luminiscente de dinoflagelados [79].	20
Figura 2.1 Vial de cepa <i>Aliivibrio fischeri</i> ATCC-7744.	22
Figura 2.2 Apertura de vial conteniendo la cepa de <i>Aliivibrio fischeri</i> .	23
Figura 2.3 Escalamiento de cultivo <i>A. fischeri</i> , 500 mL.	26
Figura 2.4 Sensor de pH análogo e interfaz PH2.0 de DF Robot.	28

Figura 2.5 Microcontrolador Arduino ATmega328p.	28
Figura 3.1 Reactivación de <i>A. fischeri</i> a las 24h.	30
Figura 3.2 A.) Ultracongelador a -80°C. B.) Vial con cultivo criopreservado de <i>A. fischeri</i> con glicerol 1:1 (v/v).	30
Figura 3.3 Medios de cultivo observados a las 8 h A. bajo luz y B. bajo oscuridad.	32
Figura 3.4 Siembra en medio de cultivo sólido 2. A.) día 1. B.) día 5.	32
Figura 3.5 Siembra en medio de cultivo sólido 4, día 1.	33
Figura 3.6 Pre-cultivo bioluminiscente de <i>A. fischeri</i> observado a las 24 h.	33
Figura 3.7 Cultivo de <i>A. fischeri</i> a las 24 h. A.) Cultivo que no presentó bioluminiscencia. B.) Cultivo que presentó bioluminiscencia.	34
Figura 3.8 Curva de crecimiento de <i>A. fischeri</i> en diferentes medios de cultivo.	36
Figura 3.9 Promedio de intensidad de luminiscencia de <i>A. fischeri</i> en diferentes medios de cultivo.	38
Figura 3.10 Luminiscencia de <i>A. fischeri</i> en Medios 1, 2, 3 y 4 (M1, M2, M3 y M4) durante la curva de crecimiento.	39
Figura 3.11 Análisis estadístico. A.) Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la intensidad promedio de luminiscencia. B.) Gráfica de cubos para la intensidad promedio de luminiscencia.	41
Figura 3.12 A. Cultivo de <i>A. fischeri</i> con sal de mesa refinada Elefante y B. con NaCl de laboratorio.	42
Figura 3.13 Escalamiento a 500 mL observado a las 24 h. A.) Foto con luz. B.) Foto en oscuridad.	42
Figura 3.14 Escalamiento a 900 mL observado a las 24 h. A.) Foto con luz. B.) Foto en oscuridad.	43
Figura 3.15 Cultivo semi-continuo de <i>A. fischeri</i> durante 10 días.	44
Figura 3.16 Comparación entre valores medidos y estimados para el crecimiento de <i>A. fischeri</i> en medio 4 utilizando modelos matemáticos no lineales.	46
Figura 3.17 Prototipo de control de pH. En el centro se encuentra un cultivo de <i>A. fischeri</i> con sensor de pH. Del lado derecho una bomba peristáltica y un buffer a pH 8.0. Del lado izquierdo el microcontrolador y el puente-H.	47
Figura 3.18 Disminución de pH de 7.0 (200mV) a 3.5 (100mV) en cultivo bacteriano.	48

Figura 3.19 Pulsos generados por el control PI ON-OFF.	48
Figura 3.20 Incremento de pH en matraz hasta llegar a un pH 7.0 (200mV).	49
Figura 3.21 Modelo 2D de reactor con sistema de control.	51
Figura 3.22 Modelo 3D de reactor. 1) Salida de cultivo para cultivo semi-continuo (cada 24 h). 2) Salida de cultivo para recircular por manguera luminiscente (durante las noches). 3) Sensor de pH y temperatura. 4) Manguera de sistema de aireación. 5) Entrada de medio de cultivo estéril para cultivo semi-continuo (cada 24 h). 6) Entrada de cultivo para recircular por manguera luminiscente (durante las noches). 7) Contenedor de inóculo. 8) Interior de reactor con capacidad de 1 L.	52
Figura 3.23 Estación marina con espacios inferiores donde se localizaría el reactor del cultivo de <i>A. fischeri</i>	53

RESUMEN

La bioluminiscencia producida por las bacterias luminiscentes es una alternativa atractiva como fuente de iluminación biológica. La bacteria bioluminiscente *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*) se conoce por no ser patógena y por crecer en temperaturas cálidas ($\approx 28^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, *A. fischeri* pierde su luminiscencia después de 24 h de crecimiento, por lo que es necesario mantener las condiciones necesarias para que la bacteria prolongue su bioluminiscencia. Se diseñaron cuatro medios de cultivo (M1, M2, M3 y M4) con el objetivo de inducir mayor tiempo e intensidad de luminiscencia en el cultivo de *A. fischeri*. El M4 presentó un incremento de 2.4-veces del promedio de intensidad de luminiscencia en comparación con el M1 y 10-veces más en comparación con el M2 y M3. Este medio de cultivo tiene un costo 14 veces menor al recomendado por el proveedor para el cultivo de *A. fischeri* (Medio Photobacterium) y genera una luminiscencia similar. El M4 se escaló y se desarrolló un crecimiento semi-continuo considerando los tiempos de fase exponencial, lo que permitió un crecimiento celular prolongado y mantener continua la bioluminiscencia durante diez días, nueve días más que los obtenidos en un cultivo en lote tradicional. Además, se desarrolló un prototipo para el control de pH, así como el diseño de un reactor para el crecimiento de *A. fischeri*. El uso de la bioluminiscencia como fuente alternativa permite su consideración para la iluminación durante la noche.

ABSTRACT

Bioluminescence produced by luminescent bacteria is an attractive alternative as a biological illumination source. The bioluminescent bacteria *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*) is known for being non-pathogenic and for growing in warm weathers ($\approx 28^{\circ}\text{C}$). Nevertheless, *A. fischeri* loses its luminescence after 24 h of culture, so it is necessary to establish conditions to prolong the bacterial bioluminescence. Four culture media were designed here (M1, M2, M3 and M4) with the objective to induce more duration and intensity of luminescence in the culture of *A. fischeri*. M4 had an increase of 2.4-times the average of the luminescence intensity in comparison with M1 and 10-times more in comparison with M2 and M3. This medium is 14-times cheaper than the commercial one recommended by the supplier for the growth of *A. fischeri* ("Photobacterium Broth") and it generates similar luminescence. The culture with M4 was scaled-up and a fed-batch culture was developed considering the exponential phase time, which allowed to extend cellular growth and kept continuous bioluminescence for ten days, nine days more than those obtained from a traditional batch culture. Additionally, a prototype for the control of pH was developed, as well as a design of a reactor for the growth of *A. fischeri*. The use of bioluminescence as an alternative fuel allows its consideration for the illumination during the night.

INTRODUCCIÓN

La bioluminiscencia es conocida por la producción de luz por organismos vivos, desde bacterias hasta peces [1,2]. En la actualidad se están llevando a cabo proyectos en diferentes países (Francia, Estados Unidos y Holanda) para aprovechar la bioluminiscencia natural de los microorganismos para el alumbrado público y doméstico. Se han empleado para bio-iluminación bacterias marinas, bacterias transgénicas, e incluso microalgas. Sin embargo, al momento no existe alguna propuesta para bio-iluminación en ambientes costeros marinos.

La bioluminiscencia es generada a partir de la enzima luciferasa, la cual reacciona en presencia de oxígeno, FMNH₂ (flavín mononucleótido reducido) y un ácido graso de cadena larga [3,4]. La oxidación y reducción de estos sustratos producen energía en forma de una luz verde/azul [4,5]. La emisión de bioluminiscencia es controlada por un sistema de autoinducción, también llamado percepción de quórum [6–9]. En concentraciones celulares altas el autoinductor, *N*-acil homoserina lactona (AHL), es acumulado en el medio extracelular; una vez que se alcanza una determinada concentración (5 - 10 nM) ocurre una respuesta transcripcional que desarrolla la luminiscencia [6,8–11].

Las bacterias bioluminiscentes se encuentran dentro de cinco géneros: *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* y *Photorhabdus* [12–14]. La especie más estudiada de la familia *Vibrionaceae* es *Aliivibrio fischeri*, la cual es conocida por su simbiosis con los calamares sepióolidos y peces monocéntricos [1,15]. *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*) una vez autoinducida brilla continuamente en la presencia de oxígeno [1,10]. Adicionalmente su carácter inocuo en comparación con otras bacterias luminiscentes [16], la sitúan como una candidata adecuada para la configuración de sistemas bioluminiscentes.

Es posible que el suministro de nutrientes de manera continua, así como el mantenimiento del pH (6.0 – 9.0) [17], permita un crecimiento celular de largo plazo y una bioluminiscencia continua. La implementación de este tipo de sistemas bioluminiscentes requiere del acoplamiento de sistemas autónomos para suministrar en un reactor nutrientes al medio de cultivo y mantener las condiciones de pH y oxígeno necesarias.

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un cultivo semi-continuo de *Aliivibrio fischeri* y el diseño de un reactor controlado para la activación de un sistema

bioluminiscente bacteriano que mantenga la luminiscencia por un determinado tiempo, para utilizarse en aplicaciones posteriores como indicador luminiscente. El desarrollo de este sistema implica el acoplamiento de un sistema biotecnológico con un sistema de control, lo que genera un sistema de iluminación alternativo, sustentable e innovador.

1. CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Organismos bioluminiscentes

La bioluminiscencia se encuentra en un amplio rango de organismos desde bacterias y protistas hasta calamares y peces [1,2,18]. En la mayoría de los casos, la luminiscencia es producida por los mismos organismos y no por simbiosis con bacterias. En el caso de los organismos simbióticos, como son los calamares y los peces que utilizan a las bacterias luminiscentes, han desarrollado órganos de luz especializados para mantener en su interior la población bacteriana [9,10,19]. La importancia biológica de la bioluminiscencia en los organismos marinos queda manifestada por su amplia distribución en el océano, desde la superficie hasta las profundidades, desde los polos hasta los trópicos [1,18,20].

Los microorganismos bioluminiscentes han sido estudiados en un amplio rango de áreas. El uso principal que se les ha dado es en el campo de la biología molecular y ambiental, utilizados desde investigaciones sobre el sistema quórum [6,7,21,22] hasta el monitoreo de compuestos tóxicos [23–25].

Las bacterias bioluminiscentes habitan comúnmente en el mar, especialmente en aguas templadas y calientes. La emisión de bioluminiscencia es controlada por un sistema de autoinducción o “percepción quórum” [6,9,12]. En concentraciones celulares altas el autoinductor es acumulado en el medio extracelular; una vez que se alcanza una determinada concentración celular y por lo tanto de autoinductor, se desarrolla una respuesta transcripcional de genes particulares dando como resultado la luminiscencia [6,8–11]. Una vez inducidas brillan continuamente en la presencia de oxígeno, en vez de producir intermitencia de luz. Estas propiedades son específicas de las bacterias, lo que las hace adecuadas como fuente de iluminación continua y de espectaculares fenómenos marinos como los mares luminosos [1,9].

Las bacterias bioluminiscentes conocidas se clasifican en cinco géneros: *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* y *Photorhabdus* [12,12–14]. Las más estudiadas son las que pertenecen al género *Aliivibrio* y *Vibrio* de la familia *Vibrionaceae*, incluyendo la especie predominantemente libre *V. harveyi* (*Vibrio harveyi*). También se encuentra la bacteria *A. fischeri* (*Aliivibrio fischeri*), la cual se conoce por su simbiosis con calamares

sepiólidos y loligínidos y peces monocéntricos [1,15,18]. Previo a 2007 esta bacteria se llamaba *Vibrio fischeri* dentro de la familia *Vibrionaceae* [14]. Los principales factores que limitan el crecimiento de estos organismos luminiscentes son los nutrientes (carbono, nitrógeno y cloruro de sodio) y las condiciones ambientales (temperatura y pH) [12,26].

1.2 Enzimas en la bioluminiscencia

1.2.1 Luciferasa bacteriana

Las reacciones bioluminiscentes se deben a la acción enzimática de la luciferasa que es activada por el oxígeno. En el caso de la luciferasa bacteriana, los sustratos son: flavín mononucleótido reducido (FMNH₂), oxígeno y un aldehído graso de cadena larga. La reacción consiste en la oxidación del FMNH₂ y el aldehído graso a FMN y ácido graso; y en la reducción del oxígeno a H₂O. El conjunto de estas reacciones libera energía en forma de luz verde/azul (máx. ~ 490 nm) (Figura 1.1) [3–5].

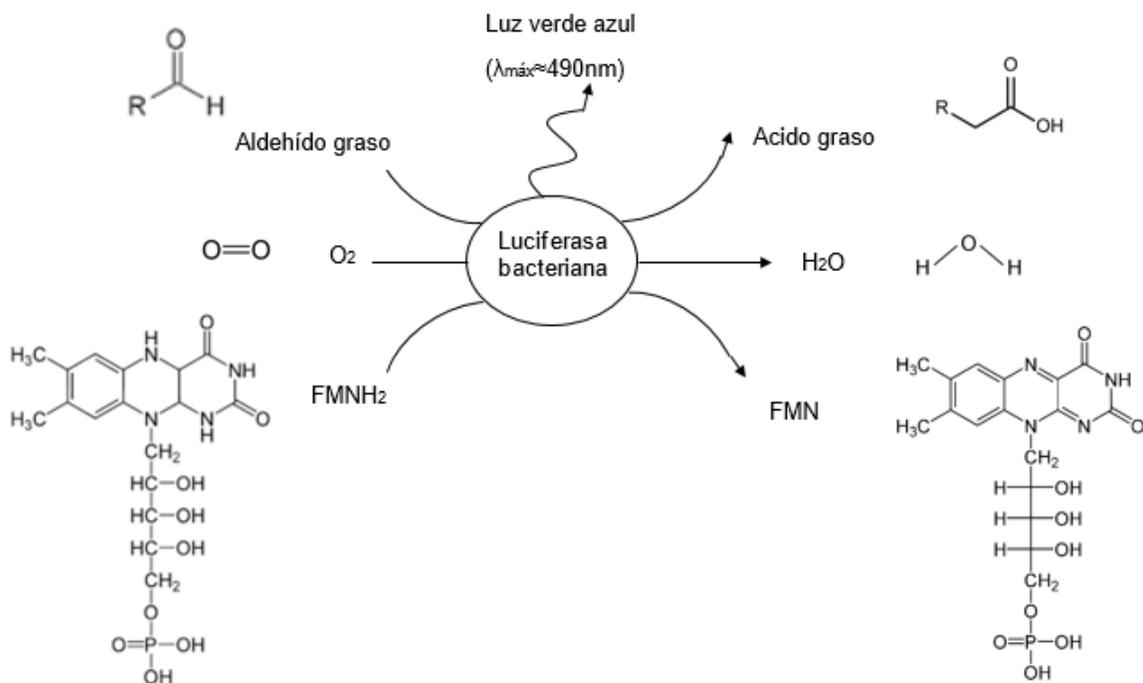


Figura 1.1 Reacción de luciferasa bacteriana. Sustratos: FMNH₂, oxígeno y un aldehído graso de cadena larga. Productos de la reacción: ácido graso, agua y FMN [27].

La afinidad de la enzima luciferasa al oxígeno es muy alta, su constante de afinidad (K_M) por el oxígeno se encuentra en el rango nanomolar. En condiciones limitantes de oxígeno, la luciferasa compite en la captura del O_2 contra algunas oxidasas (ej. respiración). Las bacterias luminiscentes pueden disminuir rápidamente las concentraciones de oxígeno en el medio. *A. fischeri* típicamente crece aeróbicamente, pero también son anaerobias facultativas en ambientes sin oxígeno [10,28].

La enzima luciferasa bacteriana consta de dos subunidades: alfa ($\approx 40,000$ Da) y beta ($\approx 35,000$ Da). El sitio activo de la enzima y el sitio de anclaje del FMNH₂ se localizan en la subunidad alfa, mientras que la subunidad beta es requerida para la emisión de luz (Figura 1.2) [29–31].

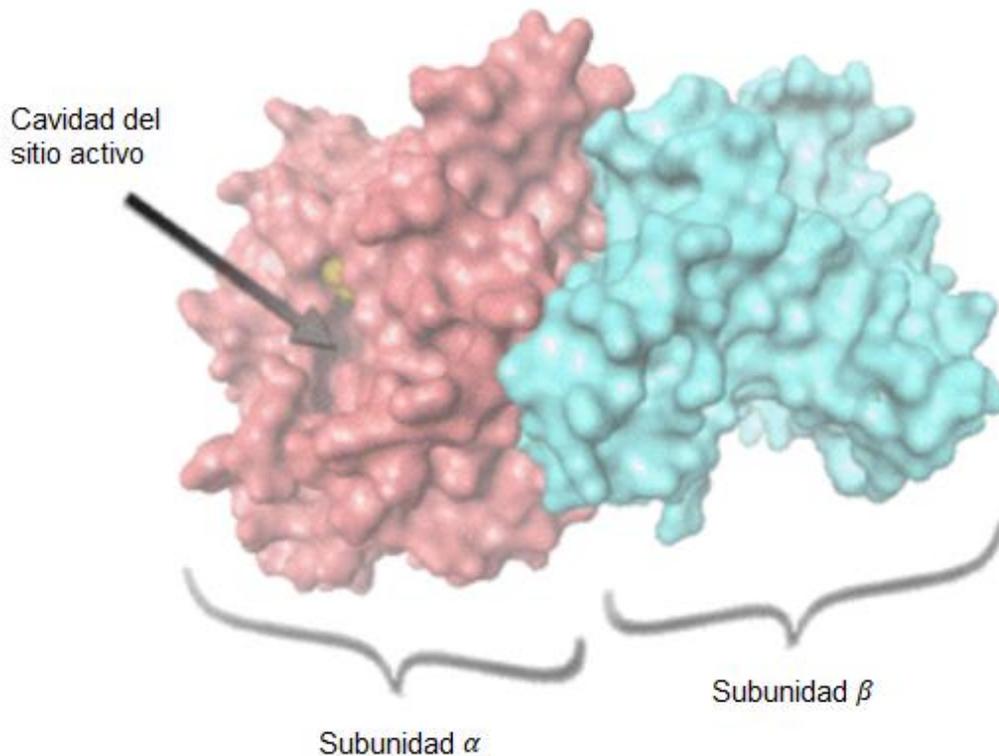


Figura 1.2 Estructura de luciferasa bacteriana. Conformada por la subunidad α y la subunidad β [27].

La velocidad máxima de reacción de la enzima luciferasa se encuentra en un rango óptimo entre 6.5 y 7.5 [5]. En valores de pH menores a 6.0 y arriba de pH 9.0 la

bioluminiscencia comienza a atenuarse. Mientras que debajo de pH 4.5 y arriba de 10.5 la bioluminiscencia cesa por completo [17].

La luciferasa bacteriana es inhibida por ácidos grasos como el ácido oleico, resultante de la oxidación de la cadena de aldehídos, así como por alcoholes alifáticos [32–34]. La temperatura y el pH son críticos para la estabilidad de la enzima. Arriba de 35°C la enzima es irreversiblemente desnaturalizada. Así como en medios ácidos (pH <6 para la luciferasa de *A. fischeri*) o alcalinos (pH > 9 para la luciferasa de *A. fischeri*), la luciferasa pierde definitivamente su actividad [17,35].

Los genes que codifican las proteínas que permiten la luminiscencia se han aislado de diferentes bacterias luminiscentes, incluyendo *Vibrio harveyi*, *Aliivibrio fischeri* y *Photobacterium phosphoreum*. Existen cinco genes *lux* estructurales: *luxC*, *luxD* y *luxE* codifican para el complejo ácido graso reductasa, el cual se encarga de la formación de los aldehídos grasos; y *luxA* y *luxB* que codifican para las subunidades alfa y beta de la luciferasa (Figura 1.3) [10,36].

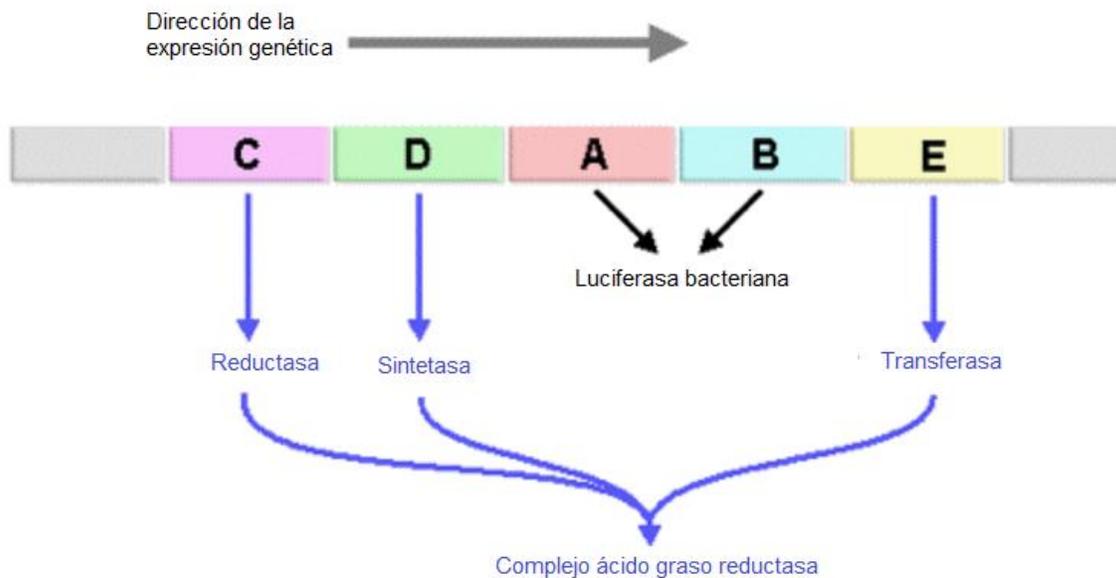


Figura 1.3 Secuencia de genes *lux* involucrados en la bioluminiscencia [27].

En el modelo de regulación de *A. fischeri* se involucran tres operones: el primer operón contiene al gen *luxI* el cual codifica para la proteína AHL sintetasa, la cual se encarga de la producción de moléculas de señalización (más información en la sección 1.4).

El segundo operón contiene al gen *luxR*, el cual codifica a un factor de transcripción que funciona como receptor de las moléculas de señalización. Posteriormente este complejo estimula el tercer operón, el cual se encarga de la transcripción de los genes *luxCDABE*. De esta forma se establece una respuesta positiva en ciclo logrando una autoinducción de luminiscencia mediante la acumulación de moléculas de señalización en el medio a partir del incremento de la densidad celular [9,10,36,37].

Sin embargo, para que la emisión de la luz ocurra por tiempos prolongados, los sustratos tienen que ser suministrados continuamente. Esto implica que otras enzimas como los complejos ácido graso reductasa y flavín mononucleótido (FMN) reductasa funcionen de manera continua [38–40].

1.2.2 Ácido graso reductasa

La enzima que forma el aldehído graso es el complejo ácido graso reductasa, sus genes están regulados por el operón *Lux* (*LuxC*, *LuxD* y *LuxE*). La enzima está conformada por 12 polipéptidos (4 copias de *luxC*, *luxD* y *luxE*). El primer paso es mediado por la actividad de la transferasa, codificada por *LuxD*, la cual transfiere donantes Acyl (provenientes de la vía de biosíntesis de los ácidos grasos), a un grupo hidroxilo, seguido por la conversión del éster a un ácido graso a través de la hidrólisis (Figura 1.4). La transferasa tiene alta especificidad por cadenas de 14 carbonos, como el tetradecanal que es conocido por ser uno de los sustratos de la luciferasa. El segundo paso es mediado por la actividad sintetasa (codificada en *LuxE*), que activa el grupo carboxilo con ATP para formar un anhídrido de Acyl-AMP. Posteriormente reacciona con un tiol formando un enlace covalente entre el grupo Acyl y la sintetasa, liberando el AMP [39–42].

El último paso es una reducción (codificado por *luxC*), en la que a partir de una transesterificación el Acyl-graso cambia su enlace covalente de la sintetasa hacia la reductasa. Posteriormente la reductasa rompe el enlace tiol-éster utilizando un NADPH, liberando el aldehído graso y la enzima regresa a su estado libre. Las subunidades de la ácido graso reductasa están organizadas en una forma radial con un centro de cuatro subunidades reductasas, seguidas por una sintetasa y en la parte más alejada del centro están las transferasas [40–42].

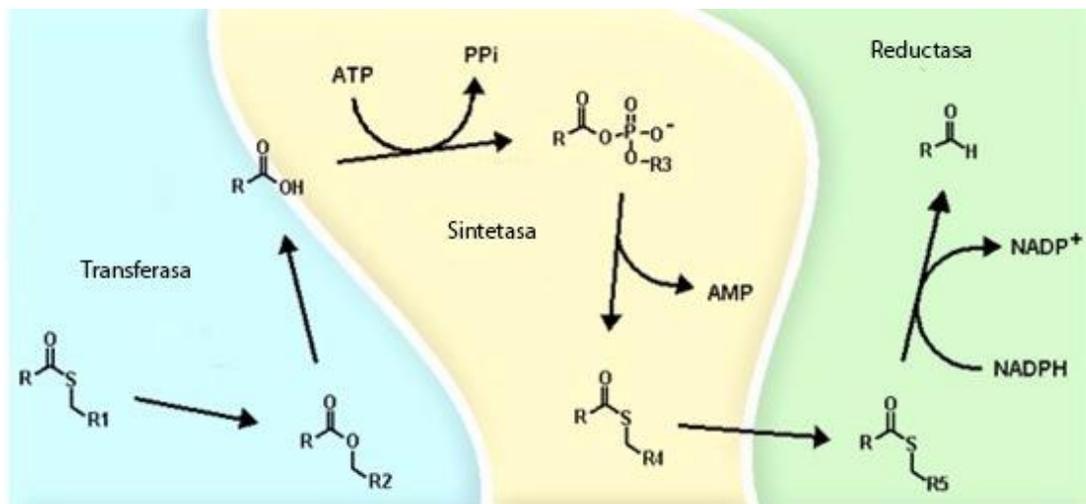


Figura 1.4 Reacciones de la transferasa, sintetasa y reductasa en el complejo enzimático ácido graso reductasa [27].

1.2.3 Flavín mononucleótido reductasa

El flavín mononucleótido (FMN) es un portador de electrones, capaz de donar y recibir uno o dos electrones. El FMN es derivado de la riboflavina (vitamina B2), la cual es un nutriente esencial para células eucariotas y procariontas; éste se obtiene a partir de la acción enzimática de la riboflavina quinasa + ATP añadiendo un fosfato a la riboflavina formando la FMN reductasa [43,44]. La reducción del FMN a FMNH₂ se lleva a cabo por una oxidorreducción catalizada por la FMN reductasa (Figura 1.5) [38,39,44].

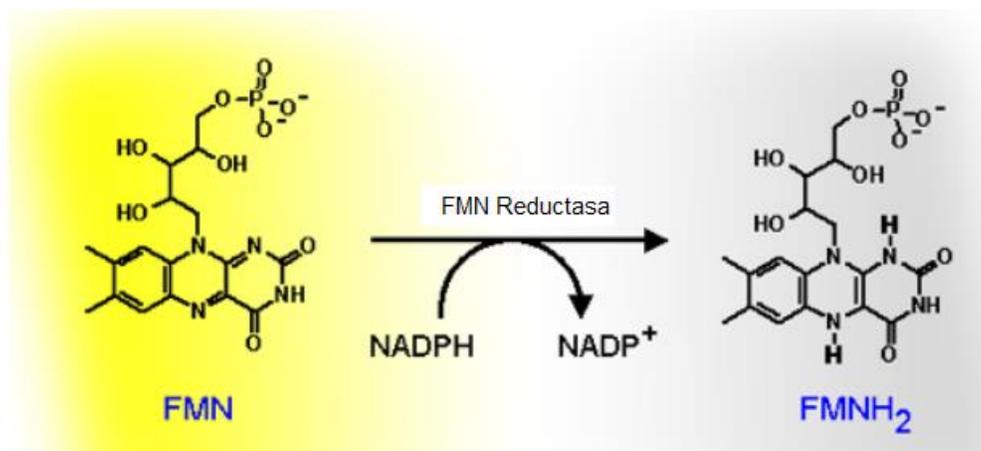


Figura 1.5 Reacción de enzima FMN reductasa [27].

1.3 Capacidad simbiótica de *A. fischeri*

Algunas de las bacterias luminosas de la familia *Vibrionaceae* forman asociaciones benéficas con peces o calamares marinos. Los organismos marinos utilizan la bioluminiscencia para diferentes fines como atracción de presas, comunicación, evasión de depredadores y contra-iluminación. Un ejemplo de esta relación es el mutualismo entre *A. fischeri* y el calamar hawaiano *E. scolopes* (Figura 1.6). Este calamar utiliza la contra-iluminación durante la noche como una estrategia de camuflaje para evitar depredadores [45,46]. Emite luz a través de sus órganos de luz, en los cuales puede dirigir, modular y difuminar la luminiscencia en respuesta a la luz descendente de la luna y las estrellas [10,19,45,46]. De esta forma el hospedador provee de un ambiente rico en nutrientes para el crecimiento de las bacterias a cambio de los beneficios de la bioluminiscencia.



Figura 1.6 Fotografía de *Euprymna scolopes* tomada por William Ormerod [41].

La bacteria *A. fischeri* se encuentra libre en el agua de mar y coloniza a sus hospedadores simbióticos. La colonización comienza en los calamares jóvenes, *A. fischeri* utiliza sus flagelos polares para entrar a través de los poros ubicados en el exterior de los

órganos de luz (Figura 1.7). Cuando *A. fischeri* comienza la colonización se adhiere a las criptas de los órganos de luz y comienza su crecimiento a partir de los nutrientes suministrados por el calamar, y en alrededor de 12 horas llega a una población de 10^5 - 10^6 de bacterias [19]. Durante el amanecer los calamares expulsan 90-95% de las bacterias y se entierran en la arena. El 5-10% remanente de las bacterias se multiplican durante el día y vuelven a llegar a una población completa luminiscente en la noche [10,19,47].

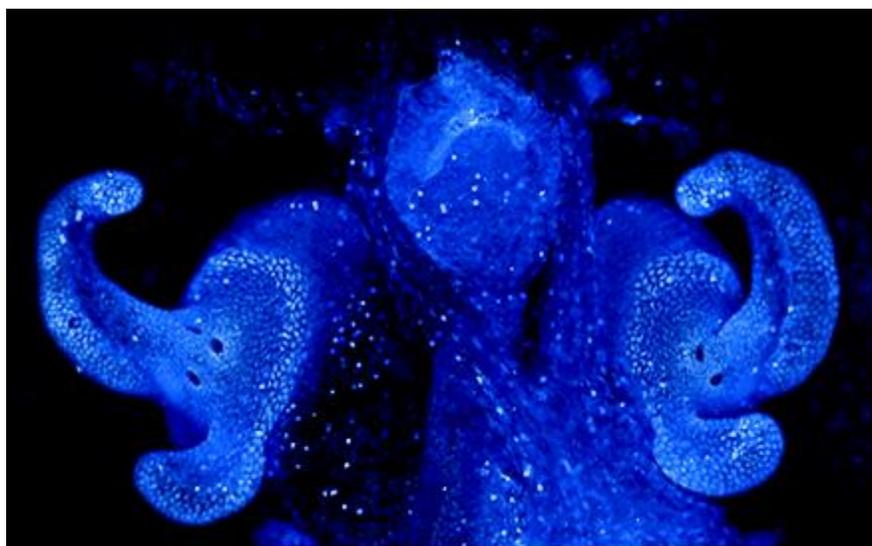


Figura 1.7 *A. fischeri* entra a los órganos de luz del calamar *E. scolopes* a través de los poros de cada lado de los órganos. Se pueden ver tres poros del lado derecho e izquierdo de la imagen. El color azul es producido por la bacteria [48].

Dentro de las primeras 12 horas de la colonización, *A. fischeri* pasa por un proceso de diferenciación perdiendo su flagelo, presenta una reducción de tamaño celular, una disminución en la velocidad de crecimiento y su luminiscencia mejora. El calamar puede llegar a tener una población bacteriana desde 10^5 hasta 10^{11} células, dentro de este rango de concentración celular se llega a obtener la señalización quórum [9,11,19,49], lo que permite la bioluminiscencia. Las asociaciones calamar-*Aliivibrio* son complejas y antiguas, provenientes de años de evolución entre el hospedador y su simbiote.

1.4 Autoinducción o percepción de quórum

La autoinducción bacteriana o percepción quórum es un término utilizado para describir el lanzamiento de moléculas de señalización por células bacterianas hacia el medio extracelular; la acumulación de estas moléculas permite a una célula bacteriana censar el número de las demás bacterias presentes, lo que conlleva a la población entera de tener una respuesta coordinada. En el caso de *A. fischeri* la respuesta que se realiza es la expresión de los genes *luxCDABE* [6,10,49,50].

Aliivibrio fischeri cuenta con el gen *luxI* que codifica para la enzima AHL, esta enzima se encarga de la producción de N-acil-homoserina lactona (AHL) específicamente la N-3-(oxohexanoil)-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), la cual es una de las moléculas más conocidas de señalización de la percepción quórum [46,49,50]. Esta molécula, llamada autoinductor, se acumula en el medio durante el crecimiento y una vez que se alcanza un límite de concentración, AHL interactúa directamente con un factor de transcripción codificado por el gen *luxR* desarrollando una respuesta transcripcional (Figura 1.8 y Figura 1.9). Esta respuesta genera la producción de luminiscencia [10,49,50].

La percepción quórum LuxI/LuxR se ha identificado en varias especies de bacterias gram-negativas de diversos hábitats, algunas patógenas de plantas y animales. Entre las diferentes actividades que la percepción quórum controla se encuentra la bioluminiscencia, la producción de enzimas extracelulares, transferencia de plásmidos, síntesis de antibióticos y la formación de biopelículas [51,52].

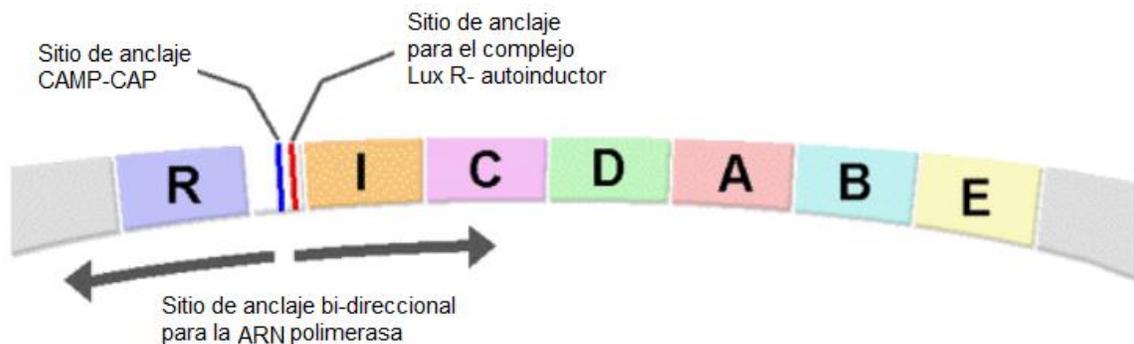


Figura 1.8 Arreglo de genes estructurales *lux* de *A. fischeri* [27].

En cultivos de *A. fischeri* en los que se adicionó al medio 3-oxo-C6-HSL para lograr los niveles completos de inducción que ocurren en los órganos de luz, se produjo un alto

nivel de luminiscencia además de una tasa de crecimiento menor, comparada contra aquellos en los que la emisión de luz era muy baja o ausente [11,28].

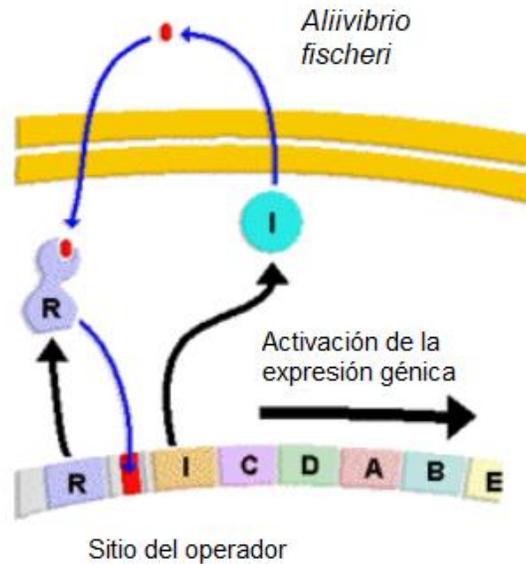


Figura 1.9 Mecanismo de autoinducción en *A. fischeri* [27].

Las bacterias que residen en los órganos de luz de los hospedadores simbiotes (*A. fischeri* - *E. scolopes*), llegan a una concentración de 10^5 hasta 10^{11} células/mL [9,11,19,49]. En esta concentración se acumula suficiente autoinductor (AHLs) (100 nM) en el medio extracelular lo que permite una emisión de luz muy brillante utilizada por el pez o calamar para sus propios fines [11,49]. Las bacterias expulsadas de estos órganos hacia el mar no producen luciferasa en el exterior. Pueden sobrevivir largos periodos, incluso por muchos años, con poco o casi nulo crecimiento [53].

La autoinducción de luminiscencia bacteriana es uno de los mecanismos de comunicación célula-célula. Los genes se activan bajo condiciones de alta densidad celular, cuando los agregados de luz emitida son suficientemente brillantes para ser percibidos y de esta forma cumplir con una función [10,49,50].

1.5 Factores que afectan el crecimiento y la luminiscencia de *Aliivibrio fischeri*

1.5.1 Temperatura y salinidad

Años de investigación de diferentes miembros de la familia *Vibrionaceae* demuestran que la temperatura y la salinidad son agentes importantes en su dinámica

poblacional [15]. Se demostró que las bacterias bioluminiscentes marinas no crecen en concentraciones salinas menores a 1% ni en mayores a 7%, mientras que su crecimiento óptimo se encuentra en un rango entre 2%-4% [12,15,54]. Se observó que esta bacteria puede crecer en un amplio rango de temperatura desde 12°C hasta 32°C, aunque su mejor crecimiento es a 28°C [15,55].

1.5.2 Iones inorgánicos

Generalmente las bacterias marinas como *A. fischeri* requieren iones inorgánicos, tanto cationes como aniones, los cuales están involucrados en la inducción de la luminiscencia [54,56,57]. Los cationes principales son: sodio, potasio, calcio y magnesio, mientras que los aniones incluyen al bicarbonato, cloruro, bifosfato y sulfato [54,57,58].

El azufre es un elemento esencial requerido para la biosíntesis de proteínas, enzimas, cofactores y biomoléculas importantes. En las bacterias el azufre representa el 0.5-1% del peso seco celular. La asimilación del azufre es precedida por el transporte del azufre inorgánico hacia la célula. En estudios de inducción de luminiscencia de *A. fischeri* se demostró el requerimiento de altas cantidades de azufre exógeno (3.5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) usando, además de concentraciones apropiadas ya sea de $NaHCO_3$ o KCl [56,57]. Los iones que han demostrado un efecto negativo en la luminiscencia son el $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En la Figura 1.10 se muestra el comportamiento de diferentes iones utilizados para el cultivo de *A. fischeri*, graficados contra la luminiscencia que emite cada una de las combinaciones.

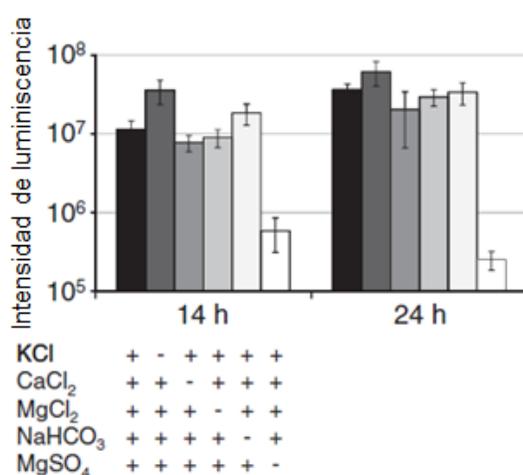


Figura 1.10 Intensidades de luminiscencia de *A. fischeri* en medios con combinaciones de dos iones inorgánicos a 14h y 24h [56].

En bacterias marinas, el sodio funciona como estabilizador de la membrana celular y motilidad del flagelo. También se ha reportado que las bacterias marinas poseen una cadena respiratoria dependiente de sodio, y ésta tiene una correlación cercana con la luminiscencia [59]. La fuente de sodio que ha demostrado inducir la luminiscencia en combinación con el MgSO_4 es el NaHCO_3 en una concentración de 0.011-0.11 g/L (Figura 1.10) [56,57].

El potasio intracelular tiene un papel importante en la expresión de genes involucrados con la luminiscencia y en el incremento del contenido de aldehídos de cadena larga en *Photobacterium phosphoreum* [60]. La fuente de potasio que ha demostrado inducir la luminiscencia en conjunto con el MgSO_4 es el KCl en una concentración de 0.77-7.7 g/L (Figura 1.10) [56,57].

En este sentido, la adición de estos iones debe ser NaHCO_3 o KCl, debido al efecto inhibitorio de la luminiscencia al utilizar ambos factores juntos en el medio. Sin embargo, este efecto puede resolverse utilizando MgCl_2 [56,57].

Los bicarbonatos y carbonatos de sodio y amonio (Na_2CO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) tienen un efecto inductor de luminiscencia dependiente de sulfuro inorgánico y orgánico. La adición de bicarbonatos es necesaria para inducir la luminiscencia, éstos tienen la función de activación de la respiración dependiente de Na^+ y de la inducción de luminiscencia [57].

1.5.3 Arginina

Se ha demostrado que la concentración de arginina es responsable de la variación de la intensidad luminiscente. El efecto de la arginina fue descrito por primera vez por Coffey (1967), quién postuló que la arginina era el inductor de la bioluminiscencia bacteriana [61]. Nealson et al. (1970) demostraron que la arginina únicamente potencia el efecto del autoinductor [62]. De esta manera, la arginina estimula factores que incrementan la expresión de luciferasa, así como la transcripción del sistema bioluminiscente *in vivo* [17,54,62–64].

1.6 Cultivo continuo de *Aliivibrio fischeri*

El cultivo continuo en un fermentador permite mantener una población en fase exponencial de crecimiento durante un largo periodo de tiempo, días e incluso semanas [65]. Las condiciones óptimas que se reportan para el cultivo continuo de *A. fischeri* con

una bioluminiscencia estable son: densidad celular de 9.5×10^9 - 2.53×10^{10} , una tasa de dilución de 0.08 - 0.09 h^{-1} , suministro de aire de 600 ml min^{-1} , agitación de 300 - 350 rpm , temperatura de 20 - 26°C y un pH de 7.8 [17].

La adición de arginina se conoce por estimular la bioluminiscencia [17,62,64]. Los cultivos que han demostrado mejor luminiscencia son aquellos cultivados con triptona, peptona de soya y caseína pancreática [17]. La disminución de pH en el medio genera una disminución de bioluminiscencia. Mientras que el uso de carbonato de calcio ocasiona un efecto buffer en el medio, ayudando a que la disminución de pH sea lenta, con lo cual se genera una bioluminiscencia prolongada [17].

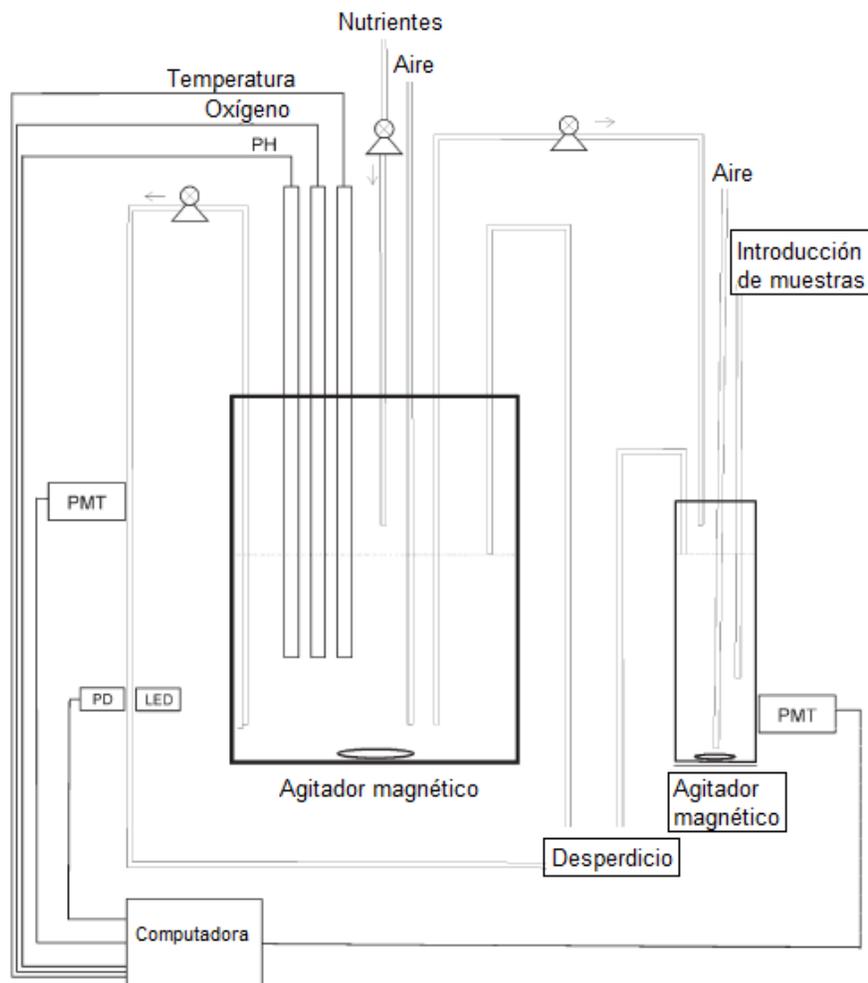


Figura 1.11 Esquema de fermentador para cultivo continuo de *A. fischeri*. PMT: fotomultiplicador, PD: fotodiodo [17].

En este sentido, el pH juega un papel importante en el mantenimiento de la bioluminiscencia. La bioluminiscencia es atenuada por debajo de pH 6 y por arriba de pH 9. La luciferasa es inhibida a un pH menor a 4.5 y superior a 10.5 [17].

Scheerer et al. (2006) obtuvieron un cultivo continuo de *A. fischeri* (Figura 1.11) en el que identificaron que los parámetros que influyen en la producción de bioluminiscencia son el pH y la fuente de aminoácidos.

1.7 Cultivo en batch de *Aliivibrio fischeri*

En el cultivo en batch el crecimiento exponencial de una población no puede continuar indefinidamente debido a la disminución de sustrato en el medio, por lo cual se obtiene una típica curva de crecimiento con fases de latencia, exponencial, estacionaria y muerte celular [65]. Petrun y Lostroh (2013) compararon diferentes medios para el cultivo en batch de *A. fischeri*: 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de triptona, 20g/L de NaCl y 100 mmol/L Tris-HCl o 100 mmol/L ácido 3-n-morfolino propanosulfónico (MOPS), todos a pH 7. Los cultivos crecieron a 28°C durante 7 días sin ningún nutriente añadido. Las mayores densidades celulares se obtuvieron con el buffer MOPS [53].

El objetivo de este crecimiento en batch durante 7 días se llevó a cabo con la finalidad de analizar el comportamiento de *A. fischeri* en la fase estacionaria. Se le denomina fase estacionaria de largo plazo a aquellos cultivos que sobreviven durante varios días, en donde no se añaden nutrientes después del suministro inicial; estas son condiciones de estrés similares a las que los microorganismos se encuentran en condiciones naturales [66].

A. fischeri tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales bajo estrés y llevar su crecimiento a una fase estacionaria de largo plazo. Una diferencia entre *E. coli* y *A. fischeri*, es que *A. fischeri* no presenta una fase de muerte celular entre la fase estacionaria inmediata y la fase estacionaria de largo plazo [53].

1.8 Modelos matemáticos del crecimiento de sistemas bacterianos

Los modelos matemáticos de un sistema permiten predecir y estimar el comportamiento ya sea estático o dinámico bajo ciertas condiciones. Específicamente para poder obtener el modelo del crecimiento bacteriano, se tiene que caracterizar y validar experimentalmente el sistema a través de la medición de algunos parámetros que

representan funciones en un modelo matemático que están relacionadas directamente con el crecimiento. El crecimiento bacteriano por lo general muestra una fase de latencia o tiempo *lag* (λ) en la que la tasa de crecimiento comienza con un valor cercano a cero y después acelera hasta un valor máximo (μ). La curva tiene una última fase en la que la tasa de crecimiento desacelera hasta que finalmente llega a cero y alcanza una asíntota (C). Cuando se grafica el logaritmo de la concentración celular con respecto al tiempo, se genera una curva sigmoidea con la fase de latencia inicialmente, seguida de una fase exponencial y finalmente la fase estacionaria (Figura 1.12) [67].

El crecimiento celular se expresa generalmente en concentración microbiana (unidades formadoras de colonias por mililitro), pero también en términos de densidad óptica (DO) como una medición indirecta. La densidad óptica se conoce a partir de la absorbancia medida en un espectrofotómetro, ésta es una medición fácil, rápida y económica [67,68].

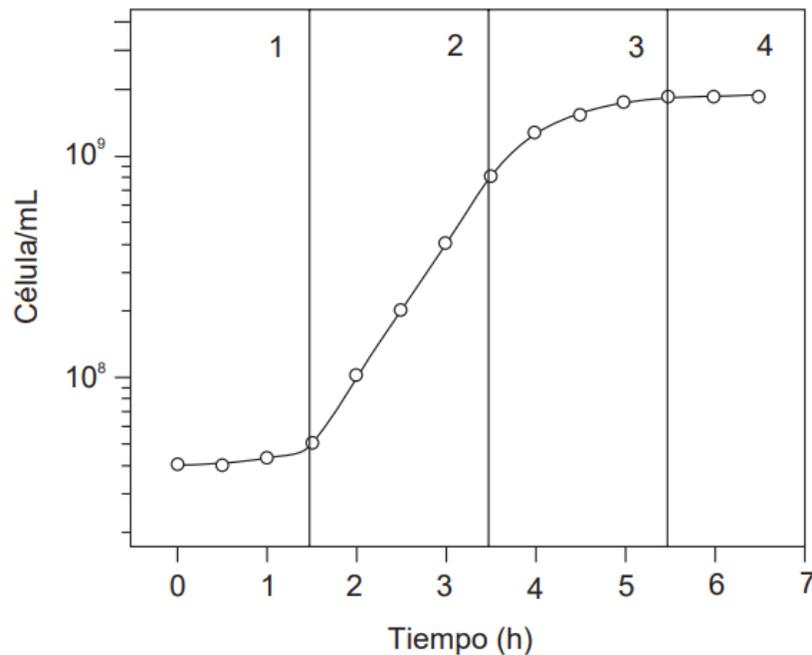


Figura 1.12 Curva de crecimiento microbiano. 1) Fase de latencia o tiempo *lag*; 2) Fase logarítmica o exponencial; 3) Fase de transición; 4) Fase estacionaria. [69].

1.8.1 Modelos matemáticos lineales – Ecuaciones de Monod

Las ecuaciones de balance de materia que describen el crecimiento en la fase exponencial son las ecuaciones de Monod [70,71]:

$$\dot{X} = \mu X \quad (1)$$

$$\dot{S} = -\frac{\mu}{Y}X - mX \quad (2)$$

En donde X es la concentración celular, μ es la tasa de crecimiento específico, S es la concentración del sustrato limitante y Y es el coeficiente de rendimiento. Se asume que el sustrato se convierte en biomasa y m es el coeficiente de mantenimiento.

Se pueden añadir términos a estas ecuaciones dependiendo del tipo de cultivo que se utilice y la finalidad. Las ecuaciones (1) y (2) describen un crecimiento en un cultivo en lote, en este no se añaden sustratos durante el crecimiento. En un cultivo continuo se consideran otras constantes como lo es la tasa de dilución D (3), la tasa de flujo de alimentación F (L/h) y el volumen en el reactor V (L).

$$D = \frac{F}{V} \quad (3)$$

En el cultivo continuo se tiene una entrada y salida constantes de medio de cultivo al reactor. Las ecuaciones (4) y (5) describen el crecimiento en un cultivo continuo [71].

$$\dot{X} = \mu X - DX \quad (4)$$

$$\dot{S} = DR - \frac{1}{Y}X\mu - DS \quad (5)$$

En donde \dot{X} es la tasa de cambio de la concentración celular con respecto al tiempo, S es la concentración del sustrato (mg/L), X es la concentración celular (mg/L), μ es la tasa de crecimiento celular (1/h), γ es el coeficiente de rendimiento aparente (mg células/mg sustrato) y R es la concentración del sustrato en la alimentación (mg/L).

Estas ecuaciones describen el crecimiento de los microorganismos únicamente en el crecimiento lineal, el cual se presenta durante la fase exponencial. Para poder obtener la tasa de crecimiento (μ) se obtiene la pendiente del logaritmo de la concentración celular

con respecto al tiempo a partir de una regresión lineal de los datos en fase exponencial. Sin embargo, en esta investigación se busca modelar el crecimiento considerando todas las fases del crecimiento celular.

1.8.2 Modelos matemáticos no lineales

En la literatura se encuentran reportadas varias ecuaciones que describen el comportamiento sigmoide como lo son el modelo de Gompertz, Richards, el modelo Logístico, entre otros (Tabla 2.5). Se diferencian por la finalidad con la que se emplean y por el número de parámetros que tiene cada ecuación. La elección de los datos en la fase exponencial, en el caso de las ecuaciones de Monod, puede ser subjetivo. Los modelos matemáticos no lineales permiten obtener los parámetros de crecimiento sin sesgos, ya que se analizan todos los datos con un solo modelo [67,68,72].

Para poder elegir el modelo matemático no lineal que describa adecuadamente el comportamiento del microorganismo de interés, es necesario compararlo estadísticamente. Algunos de los coeficientes estadísticos utilizados son el coeficiente de determinación (r^2), el error cuadrático medio (ECM) y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSE) [67,68,72].

1.9 Diseño de reactores biológicos

Un reactor biológico o biorreactor se refiere a un sistema cerrado en el que se lleva a cabo una reacción bioquímica mediante organismos vivos o sustancias activas derivadas de los organismos, ya sean enzimas, microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), células animales o vegetales [73]. La función principal del biorreactor es proveer un ambiente con las condiciones necesarias para el crecimiento celular y/o formación de un producto deseado [74].

Existen diferentes tamaños de biorreactores desde los de pequeña escala (cajas Petri, bolsas de cultivo, frascos de cultivo celular, frascos Spinner, etc.) caracterizados por su diseño simple en la parte de instrumentación y control. Por lo general estos necesitan el uso complementario de otros equipos como incubadoras o agitadores. Un biorreactor de escala grande consiste en un tanque, una unidad de control, un sistema de enfriamiento y calentamiento, un sistema de muestreo e instalaciones de seguridad (Figura 1.13) [74].

El uso de sensores y actuadores en el interior del tanque permite monitorear y controlar los valores de pH, oxígeno disuelto, temperatura y otros parámetros de interés. Para garantizar niveles óptimos de mezclado y transferencia de oxígeno se emplean sistemas de aireación y agitación [75]. El uso de reactores de pequeña escala instrumentados ha sido esencial en el proceso de escalamiento [75].

Dependiendo del organismo a cultivar se diseñará un biorreactor específico. Algunas de las condiciones físicas que se deben considerar son agitación, aireación del sistema, flujo de entrada y de salida del sustrato, pH, temperatura, concentración celular óptima, entre otras [76].

Con base en lo anteriormente descrito, en este trabajo se formuló la siguiente hipótesis: es posible extender el periodo de luminiscencia de la bacteria *A. fischeri* al prolongar su fase exponencial mediante un cultivo semi-continuo en el cual se añadan los nutrientes necesarios, manteniendo una temperatura y pH controlados. Además, se podrá diseñar un reactor considerando las condiciones de crecimiento necesarias (agitación, aireación, pH y temperatura) para inducir la bioluminiscencia de *A. fischeri*.

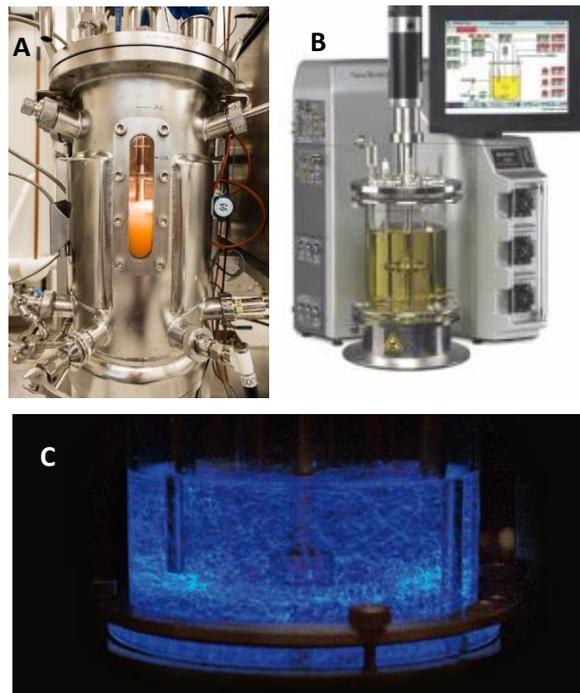


Figura 1.13 A.) Biorreactor de 30 L para el cultivo de bacteria *E. coli* [77]. B.) Biorreactor de 5 L para el cultivo de bacterias, levaduras y hongos [78]. C.) Biorreactor con cultivo luminiscente de dinoflagelados [79].

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

Desarrollar un cultivo semi-continuo de *Aliivibrio fischeri* y diseñar un reactor para la activación de un sistema bioluminiscente bacteriano.

1.10.2 Objetivos específicos

- Diseñar un medio de cultivo para mejorar el crecimiento y la luminiscencia de *Aliivibrio fischeri* en condiciones *in vitro*.
- Modelar la curva de crecimiento de cultivo *in vitro* y obtener los coeficientes para los modelos matemáticos no-lineales que describan el crecimiento de *Aliivibrio fischeri*.
- Escalar el cultivo de *Aliivibrio fischeri*.
- Cultivar de manera semi-continua a *Aliivibrio fischeri*.
- Diseñar y construir un sistema de control para el mantenimiento de pH.
- Diseñar un prototipo de reactor para el cultivo de *Aliivibrio fischeri*.

2. CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

2.1 Reactivación de *Aliivibrio fischeri* (ATCC®, 7744)

La cepa utilizada en esta investigación es *Aliivibrio fischeri*. La cepa fue suministrada por la ATCC y corresponde a la cepa 7744. Una vez recibido el cultivo liofilizado (Figura 2.1) fue reconstituido en el medio de cultivo reportado para el crecimiento de bacterias LB20 (Tabla 2.1) y ajustado a pH 7.0 con Tris-HCl 50mM.

Tabla 2.1 Medio de cultivo LB20 utilizado para la reactivación de *A. fischeri*.

Componentes	Peso (g/L)
Extracto de levadura	10
Triptona	5
NaCl	20



Figura 2.1 Vial de cepa *Aliivibrio fischeri* ATCC-7744.

La reactivación se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor, para lo cual se calentó el vial con la flama de un mechero y se colocaron unas gotas de agua destilada en la punta caliente para romper el vidrio. Se golpeó el vial para remover la punta y se tomó con pinzas el vial interior donde se encontraba el cultivo bacteriano liofilizado (Figura 2.2).

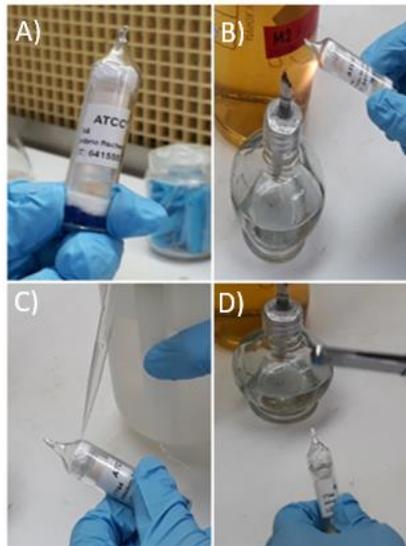


Figura 2.2 Apertura de vial conteniendo la cepa de *Aliivibrio fischeri*.

Posteriormente se colocaron 2 mL de medio de cultivo (Tabla 2.1) en el vial y se mezcló manualmente. Seguidamente se depositó 1 mL del cultivo bacteriano resuspendido en 20 mL de medio estéril en matraces de 125 mL. La cepa reactivada se incubó a 100 rpm y $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Toda vez que el cultivo presentó bioluminiscencia, el cultivo se preservó a -80°C con glicerol estéril como crioprotector en una relación 1:1 (v/v).

2.2 Análisis estadístico y diseño de experimentos de medios de cultivo

Se realizó un diseño de experimentos (DOE) utilizando el software Minitab para observar el efecto de los sustratos del medio de cultivo en el crecimiento celular y la luminiscencia de *A. fischeri*. El DOE seleccionado fue factorial fraccionado; los factores analizados fueron extracto de levadura, triptona y cloruro de sodio (Tabla 2.2). Cada factor se estudió en dos niveles (concentración alta y concentración baja) por duplicado. Se realizó un análisis estadístico de los diseños de experimentos con lo cual se determinó si un factor era o no significativo. Además, se determinó el nivel óptimo de cada factor (concentración g/L) a través de la herramienta de optimización de respuesta para mejorar la luminiscencia.

De acuerdo con el resultado obtenido del diseño de experimentos, se plantearon cuatro medios de cultivo para su evaluación (Tabla 2.3), ajustados a pH 7.0 con Tris-HCl 50mM. Los medios de cultivo se prepararon por duplicado en matraces de 250 mL con 40

mL de medio de cultivo y 2.5% (v/v) de inóculo. Los cultivos se incubaron a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 rpm por 36 h. Se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo cada 4 h.

Tabla 2.2 Factores y niveles para diseño de experimentos.

Factores (Componentes)	Nivel bajo (g/L)	Nivel alto (g/L)
Extracto de levadura	5	10
Triptona	5	10
NaCl	20	30

Tabla 2.3 Diseño de experimentos de medios de cultivo para el crecimiento de *A. fischeri*. Todos los medios con pH 7.0 y 50 mM Tris-HCl.

Componentes	Medio 1 (M1)	Medio 2 (M2)	Medio 3 (M3)	Medio 4 (M4)
Extracto de levadura (g/L)	5	10	5	10
Triptona (g/L)	5	5	10	10
NaCl (g/L)	30	20	20	30

2.3 Cultivo sólido, pre-cultivo y cultivo líquido de *Aliivibrio fischeri*

Una alícuota de 200 μL de cultivo líquido fueron tomados para sembrar con asa de Drigalski y de platino o bacteriológica sobre toda la superficie, en los medios sólidos 2 y 4 (Tabla 2.4) utilizando 2% de agar (pH 7.0, con Tris-HCl 50 mM). Posteriormente se incubaron a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ para comprobar el crecimiento y la emisión de bioluminiscencia, así como su duración.

Tabla 2.4 Medio de cultivo sólido para el crecimiento de *A. fischeri*.

Componentes	Medio 2 (g/L)	Medio 4 (g/L)
Extracto de levadura	10	10
Triptona	5	10
NaCl	20	30
Agar	20	20

Los pre-cultivos líquidos de *Aliivibrio fischeri* partieron de alícuotas criopreservadas. Esto se realizó inoculando el 5% (v/v) del cultivo en 20 o 40 mL del medio 2 y 4, incubando a 100 rpm y $27\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Los cultivos líquidos subsecuentes se realizaron en 40 mL de medio 4, en matraces de 250 mL y 2.5% (v/v) de inóculo proveniente de pre-cultivos bioluminiscentes. Las condiciones de incubación fueron 100 rpm y $27\pm 1^\circ\text{C}$ durante 36 horas.

2.4 Curvas de crecimiento de *Aliivibrio fischeri*

El crecimiento se midió determinando la absorbancia de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro UV-VIS. Las muestras que se midieron fueron aquellas obtenidas del diseño de experimentos de medios de cultivo. Las curvas de crecimiento se generaron graficando las DO_{600} de cada cultivo con respecto al tiempo.

2.5 Medición del promedio de intensidad de luminiscencia

La luminiscencia se midió indirectamente mediante el procesamiento de las imágenes fotografiadas durante la curva de crecimiento. El promedio de intensidad de los píxeles se obtuvo mediante el software de Matlab. Un píxel puede tener un valor de intensidad desde 0 hasta 255, siendo 255 un píxel blanco y 0 un píxel negro. La intensidad promedio de una fotografía o de una determinada área de una fotografía es el promedio de intensidad de todos los píxeles seleccionados. Las fotografías fueron leídas con el software, convertidas a una escala de blanco y negro y con base a ella se determinó la intensidad promedio.

2.6 Uso de sal de mesa para el cultivo de *A. fischeri*

El NaCl grado laboratorio se reemplazó por sal de mesa refinada yodada marca Elefante (sales del Istmo) en el medio que obtuvo mayor luminiscencia (M4) con la finalidad de disminuir costos en el medio de cultivo. Se mantuvo la misma concentración de 3% (p/v).

2.7 Escalamiento de *Aliivibrio fischeri*

En matraces de 1000 mL con 500 mL de medio 4 y 2.5% (v/v) de inóculo (partiendo de un pre-cultivo bioluminiscente), se realizó el primer escalamiento (Figura 2.3). El escalamiento siguiente se realizó en matraces de 1000 mL con 900 mL del medio 4 y 2.5% de inóculo (v/v). Para proporcionar la agitación requerida para el crecimiento de *A. fischeri*

ambos escalamientos fueron aireados mediante una bomba de aire Elite 802 (76 L) y un flujo de aire de 3.5 L/min, con un filtro de 0.22 μm para asegurar esterilidad.



Figura 2.3 Escalamiento de cultivo *A. fischeri*, 500 mL.

2.8 Cultivo semi-continuo de *Aliivibrio fischeri*

El cultivo semi-continuo permite el mantenimiento del cultivo en fase exponencial y la prolongación de la bioluminiscencia. El volumen del cultivo semi-continuo fue de 500 mL, debido a la capacidad del cultivo luminiscente del prototipo del reactor planteado en el presente proyecto.

El procedimiento fue el siguiente: se cultivó en un matraz de 1000 mL con 500 mL de medio 4 y 2.5% (v/v) de inóculo. A partir de este primer cultivo se realizaron subcultivos, tomando 12.5 mL del cultivo previo e inoculándolo en 500 mL de medio 4 estéril cada 24 horas durante 10 días. Los cultivos se airearon como se ha mencionado previamente.

2.9 Modelo matemático del crecimiento celular de *Aliivibrio fischeri*

Utilizando los datos obtenidos en la curva de crecimiento de *A. fischeri* en el medio 4 durante un periodo de 28 h, se realizó un análisis de regresión con diferentes modelos matemáticos no-lineales: Gompertz, Logístico y Richards (Tabla 2.5). A través de la herramienta de ajuste de datos del software Matlab 5.0 se obtuvieron los valores para los

parámetros de crecimiento, así como el error cuadrático medio (ECM), la r^2 y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSE) con 95% de confianza.

Tabla 2.5 Modelos matemáticos no-lineales de crecimiento celular

Modelo	Ecuación
Gompertz	$y = y_0 + C e^{-e^{\left(\frac{\mu \exp(1)}{C}(\lambda-t)+1\right)}}$
Logístico	$y = y_0 + \frac{C}{1 + e^{\left(\frac{4\mu}{C}(\lambda-t)+2\right)}}$
Richards	$y = y_0 + C \left(1 + \beta e^{(1+\beta)} e^{\left(\left(\frac{\mu}{C}\right)(1+\beta)\left(1+\frac{1}{\beta}\right)(\lambda-t)\right)} \right)^{-1/\beta}$

y : absorbancia en tiempo t ; y_0 : absorbancia inicial; μ : tasa de crecimiento máxima; λ : tiempo *lag*; C : incremento de absorbancia desde y_0 hasta $y_{m\acute{a}x}$; β : coeficiente de modelo.

2. 10 Sistema de control para el mantenimiento de pH y diseño del prototipo de reactor para *Aliivibrio fischeri*

2.10.1 Control de pH

El control de la neutralización del pH juega un rol importante en muchas reacciones biológicas y químicas. Sin embargo, el control de pH es complicado debido a su comportamiento no-lineal [80].

Es por esto que se desarrolló un prototipo para regular el pH del cultivo en un intervalo de 7.0-7.5 introduciendo una solución de pH de 8.0. El objetivo fue controlar el pH en un valor determinado para el crecimiento de *A. fischeri*. El sensor que se utilizó es el sensor de pH Gravity análogo conectado a la interfaz PH2.0 de DF Robot. Esta interfaz se encarga de recibir la señal analógica para procesarla posteriormente mediante un microcontrolador (Figura 2.4).

Con un soporte universal se sujetó el sensor de pH, la manguera con flujo de aire y la manguera de alimentación, los cuales se introdujeron a un matraz con el cultivo (pH 7.0). La solución con pH 8.0 que se alimentó simula el medio estéril que estaría introduciéndose al cultivo. La señal amplificada obtenida en la interfaz fue alimentada al microcontrolador

Arduino ATmega328p en la entrada analógica A0 (Figura 2.5). El código utilizado para la programación del microcontrolador Arduino se presenta en el Anexo A.

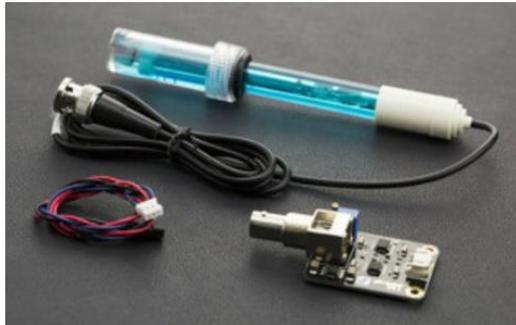


Figura 2.4 Sensor de pH analógico e interfaz PH2.0 de DF Robot.

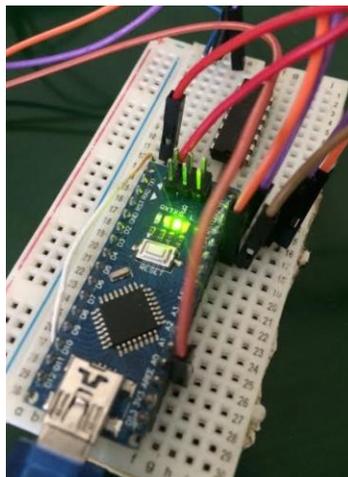


Figura 2.5 Microcontrolador Arduino ATmega328p.

El microcontrolador a través de un puerto de comunicación procesa la ley de control diseñada y envía una respuesta de retroalimentación mediante una señal digital que activa el semiconductor “puente-H” L298N, el cual acciona la dirección de giro de la bomba peristáltica, transfiriendo la potencia necesaria para el encendido y apagado, y de esta forma controlar de manera continua el pH empleando el modelo lineal de sistemas invariantes en el tiempo.

2.10.2 Diseño físico del prototipo de reactor

Se consideró un cultivo de *A. fischeri* de 500 mL y como estructura un prisma rectangular. Se hizo un análisis de flujo para calcular la longitud y diámetro del tubo flexible

y se determinó el tipo de material a emplear para la interconexión de válvulas y el reactor, así como la localización de los sensores. Con base en estas consideraciones se desarrolló el dibujo asistido por computadora del prototipo de un reactor con el software Solid Works 2016.

El suministro de aire contemplado en el diseño físico del reactor fue el mismo utilizado para los experimentos del cultivo semi-continuo; a partir de una bomba de aire Elite 802 (76 L), con una capacidad de flujo de 3.5 L/min conectada mediante una manguera de silicona a un filtro microbiológico con tamaño de poro de 0.22 μm que asegure la esterilidad del aire. El filtro se une a una manguera la cual se introduce al biorreactor.

3. CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Reactivación de *Aliivibrio fischeri*

Se observó bioluminiscencia en los cultivos de *A. fischeri* después de las 24 h de la reactivación del cultivo liofilizado (Figura 3.1). El cultivo bioluminiscente se preservó con glicerol a -80°C (Figura 3.2). La luminiscencia también fue observada en los cultivos establecidos a partir de las alícuotas criopreservadas. Este método de criopreservación se ha reportado para muchas bacterias y resulta efectivo para bacterias bioluminiscentes, obteniéndose cultivos viables [53,81].



Figura 3.1 Reactivación de *A. fischeri* a las 24h.

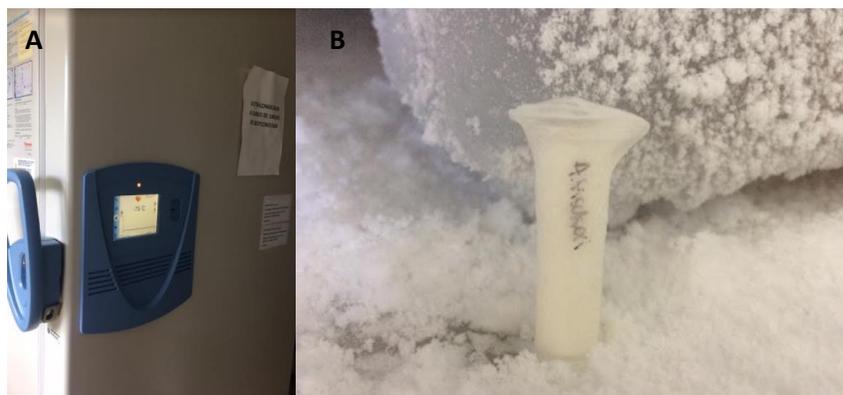


Figura 3.2 A.) Ultracongelador a -80°C . B.) Vial con cultivo criopreservado de *A. fischeri* con glicerol 1:1 (v/v).

3.2 Diseño de experimentos de medios de cultivo para *Aliivibrio fischeri*

Se llevó a cabo un análisis de la composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *A. fischeri*, para el diseño de un nuevo medio que pudiera inducir una mayor luminiscencia. Los medios que se analizaron fueron los reportados por Scheerer et al. (2006), Petrun y Lostroh (2013) y el medio comercial Photobacterium Broth (Sigma 38719) (Tabla 3.1) [17,53]. El medio utilizado por Petrun y Lostroh (2013) también se conoce como medio LB alto en sal (20 g/L) o medio LB20.

Tabla 3.1 Composición de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *A. fischeri*.

Componentes	Medio Scheerer et al. (2006)	Medio Petrun y Lostroh (2013)	Photobacterium Broth (Sigma, 38719)
Extracto de carne (g)	5	-	-
Peptona (g)	5	-	-
Extracto de levadura (g)	-	5	2.5
Triptona (g)	-	10	5
NaCl (g)	25	20	30
Cloruro de Amonio (g)	-	-	0.3
Sulfato de Magnesio (g)	-	-	0.3
Cloruro Férrico (g)	-	-	0.01
Carbonato de Calcio (g)	-	-	1
Dihidrógeno fosfato de potasio (g)	-	-	3
Na ₂ HPO ₄ (g)	15.5	-	-
NaH ₂ PO ₄ (g)	2	-	-
MOPS (g)	-	20.9	-
Glicerofosfato sódico (g)	-	-	23.5
Agua destilada (mL)	1000	1000	1000

En función al medio más sencillo (LB20) se elaboró el diseño de experimentos, los niveles superiores e inferiores de concentración de cada componente se basaron en los límites utilizados en los medios para el crecimiento de esta bacteria (Tabla 2.3).

En todos los cultivos se observó crecimiento y luminiscencia (Figura 3.3). Las observaciones de los cultivos en crecimiento se realizaron cada 4 h, lo que permitió monitorear la bioluminiscencia y el crecimiento durante 36 h.

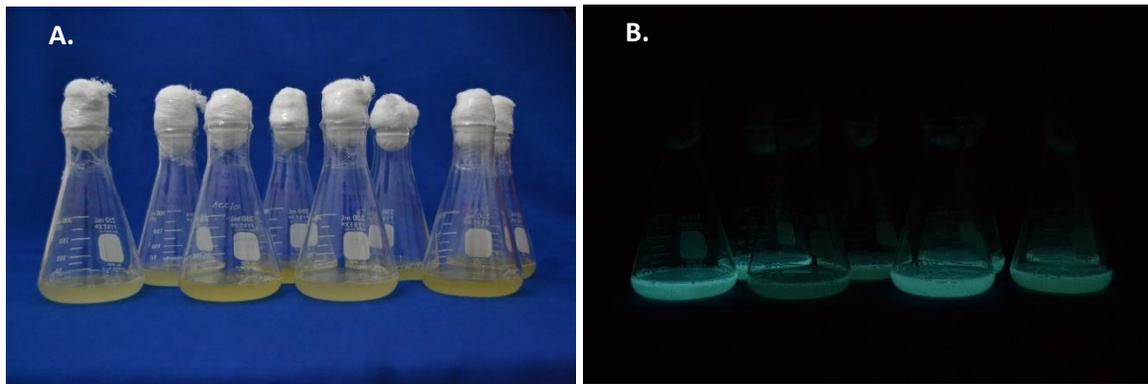


Figura 3.3 Medios de cultivo observados a las 8 h A. bajo luz y B. bajo oscuridad.

3.3 Cultivos sólidos, pre-cultivos y cultivos subsecuentes líquidos

En los medios de cultivo sólido 2 y 4, la bioluminiscencia fue observada durante 7 días a 27°C a partir de la siembra de alícuotas de cultivo líquido (Figura 3.4 y Figura 3.5). La bioluminiscencia fue más intensa el día 1 y disminuyó paulatinamente. La resiembra del cultivo (medio sólido - medio sólido) también presentó bioluminiscencia. Cabe señalar que la luminiscencia en medio sólido fue observada en siembras realizadas a partir de medio líquido o sólido y mantenida durante 7 días en todos los casos.

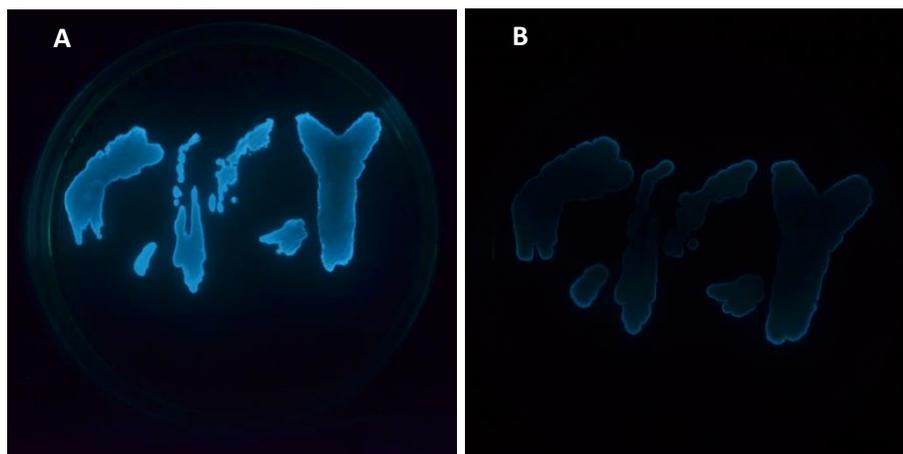


Figura 3.4 Siembra en medio de cultivo sólido 2. A.) día 1. B.) día 5.



Figura 3.5 Siembra en medio de cultivo sólido 4, día 1.

Los pre-cultivos presentaron bioluminiscencia desde las 8 h hasta las 36 h. En la Figura 3.6 se muestra un pre-cultivo en medio 4 a las 24 horas de incubación. La inoculación de los subcultivos se realizó a partir de los pre-cultivos que mostraron mayor bioluminiscencia. El cultivo restante se preservó a -80°C en glicerol.

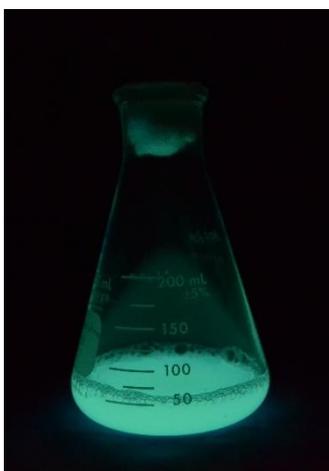


Figura 3.6 Pre-cultivo bioluminiscente de *A. fischeri* observado a las 24 h.

Por otra parte, los cultivos líquidos de *A. fischeri* presentaron diferentes resultados. La bioluminiscencia fue observada a partir de una DO_{600} de 0.779, alcanzada en la fase exponencial. Ésta se mantuvo hasta las 36 h presentando una disminución de bioluminiscencia al iniciar la fase estacionaria. Mientras que otros cultivos, a pesar de mostrar la densidad esperada ($0.78 < \text{DO} < 1.8$), se tornaron amarillentos y no presentaron

bioluminiscencia (Figura 3.7). La pérdida de producción de bioluminiscencia ocurre comúnmente en muchas especies y cepas bacterianas, esto se debe a varios factores como la temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes [82] y en algunos casos a mutaciones en el gen *luxR* [21].

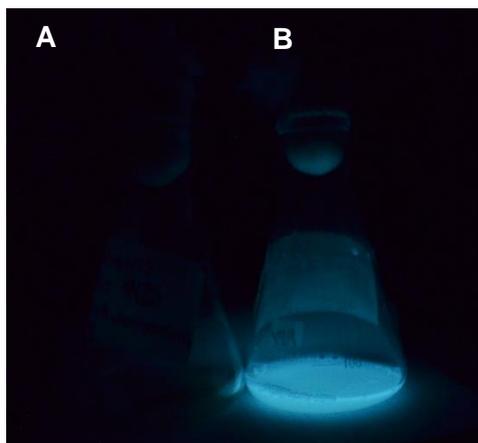


Figura 3.7 Cultivo de *A. fischeri* a las 24 h. A.) Cultivo que no presentó bioluminiscencia. B.) Cultivo que presentó bioluminiscencia.

3.4 Curvas de crecimiento de *Aliivibrio fischeri*

Los valores de absorbancia de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) se muestran en la Tabla 3.2. Se construyeron las curvas de crecimiento graficando las absorbancias medidas con respecto al tiempo (Figura 3.8).

Entre los cuatro medios evaluados en esta investigación, el medio 4 presentó el mayor crecimiento celular de *A. fischeri*. La fase exponencial comenzó a las 4 h posterior a la inoculación en todos los medios de cultivo. La duración de la fase exponencial difirió desde 8 h (M3) hasta 16 h (M4). Una segunda fase exponencial se puede observar en el medio 4, lo que permitió mantener la luminiscencia por un periodo mayor de tiempo. La fase estacionaria se alcanzó en diferentes tiempos, a las 12 h en el medio 3 y a las 24 h en el medio 4 (Figura 3.8).

Chong et al. (2013) reportaron resultados similares en el medio LB20, debido a que presentó una fase de latencia en las primeras 4-6 h, una fase exponencial a las 10-11 h y una fase estacionaria después de 15 h [21]. Este medio corresponde a la formulación del medio 3 usado en esta investigación y los resultados son compatibles. Por otro lado, Chiado

et al. (2011) utilizaron el medio de Agua Marina (DSMZ 246), el cual es similar al medio 4 empleado en el presente estudio, y sus resultados fueron similares a los aquí obtenidos: la fase estacionaria se alcanzó a las 24 h posteriores a la inoculación [83].

Tabla 3.2 Absorbancias leídas a 600nm de cultivos. Promedio de réplicas.

Tiempo (h)	Medio 1		Medio 2		Medio 3		Medio 4	
	DO ₆₀₀	σ						
0	0.143	0.013	0.198	0.023	0.186	0.003	0.182	0.025
4	0.368	0.004	0.440	0.025	0.393	0.007	0.447	0.029
8	0.780	0.007	0.863	0.017	0.786	0.015	0.779	0.008
12	1.228	0.011	1.353	0.018	1.199	0.015	1.229	0.009
16	1.466	0.001	1.534	0.018	1.200	0.013	1.492	0.004
20	1.536	0.010	1.588	0.023	1.279	0.022	1.659	0.014
24	1.593	0.010	1.643	0.009	1.361	0.005	1.870	0.004
28	1.593	0.008	1.712	0.004	1.390	0.002	1.893	0.003
32	1.572	0.000	1.764	0.005	1.478	0.002	1.937	0.001
36	1.444	0.002	1.477	0.026	1.261	0.002	1.895	0.017

σ : desviación estándar de réplicas

La duración de las diferentes fases de crecimiento es variable; la fase exponencial más corta se observó empleando los medios 2 y 3, los cuales tuvieron una concentración de sal menor (20 g/L). El medio 4 presentó la fase exponencial más prolongada, probablemente debido a la disponibilidad de nutrientes y a la concentración de sal alta (30 g/L) (Figura 3.8).

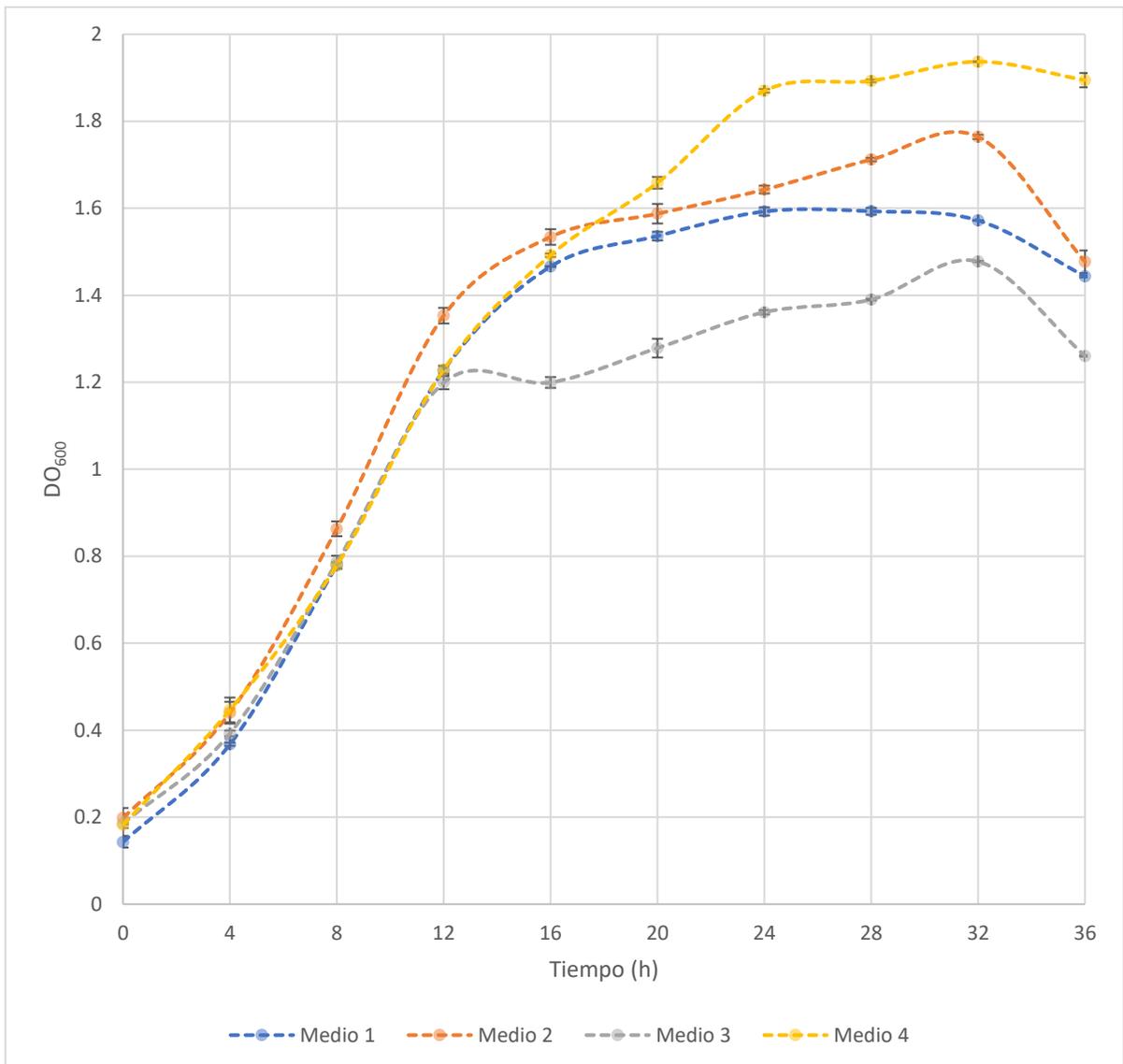


Figura 3.8 Curva de crecimiento de *A. fischeri* en diferentes medios de cultivo.

3.5 Curvas del promedio de intensidad de luminiscencia

Los cuatro medios de cultivo evaluados indujeron bioluminiscencia en *A. fischeri*. El medio 1 indujo la mayor intensidad de luminiscencia durante las primeras 20 h mientras el medio 4 permitió el mantenimiento de la intensidad de luminiscencia hasta las 28 h (Figura 3.9 y Figura 3.10). La intensidad más alta de luminiscencia se detectó con 3% (w/v) de NaCl, presente en los medios 1 y 4. Hongda et al. (2008) también reportó una mayor luminiscencia al utilizar 3% (w/v) de NaCl para el cultivo de *Vibrio sp.*, una bacteria luminiscente [12]. Los medios 2 y 3 fueron constituidos con la menor concentración de NaCl

(2% w/v), lo cual es coincidente con la menor intensidad de luminiscencia (casi oscuros a las 24 h).

Watanabe et al. (1991) reportó un incremento en los iones de K⁺ intracelulares (>300mM) en *Photobacterium phosphoreum* causado por un aumento del 1% al 3% de NaCl en el medio [60]. El incremento de iones de K⁺ intracelulares pueden causar cambios conformacionales en el ADN (superenrollamiento), favoreciendo la transcripción del operón *lux* [60].

La composición de aminoácidos y péptidos de la triptona y extracto de levadura no se examinaron, posiblemente las diferentes concentraciones de arginina contenida en los medios evaluados aquí son responsables de las diferentes intensidades de luminiscencia obtenidas. El medio 4 tuvo la mayor cantidad de arginina (teóricamente 0.885 g/L), contenida en el extracto de levadura y triptona, así como la mayor intensidad de luminiscencia. Este aminoácido se ha reportado como estimulante de luminiscencia [17,62,64], los resultados observados fueron consistentes con esta información. Los demás medios tuvieron las siguientes concentraciones de arginina teóricamente M1: 0.442 g/L, M2: 0.6075 g/L, M3: 0.7185 g/L. Sin embargo, el efecto de los demás componentes contenidos en el extracto de levadura y triptona no se pueden descartar.

En todos los casos la bioluminiscencia comenzó en la fase exponencial y terminó al iniciar la fase estacionaria (Figura 3.9 y Figura 3.10). Dunlap y Greenberg (1985) también reportaron la iniciación de bioluminiscencia después de 4-5 h de la inoculación; y demostraron que la adición del autoinductor N-acil-homoserina lactona (AHL) induce el inicio de la luminiscencia, con lo cual se acorta el tiempo para alcanzar la concentración de AHL necesaria para la inducción de luminiscencia (5-10 nM) [11]. Cabe señalar que en el presente trabajo no se añadió autoinductor al medio, sino que éste fue producido por la misma bacteria durante la fase de latencia. Scheerer et al. (2006) y Wang et al. (2013) describieron que la luminiscencia disminuye cuando se alcanza la fase estacionaria a las 24 h [17,55]. Para mantener el cultivo en fase exponencial y prolongar la bioluminiscencia, en el presente trabajo se consideró el empleo de un cultivo semi-continuo, haciendo un recambio de medio cada 24 h.

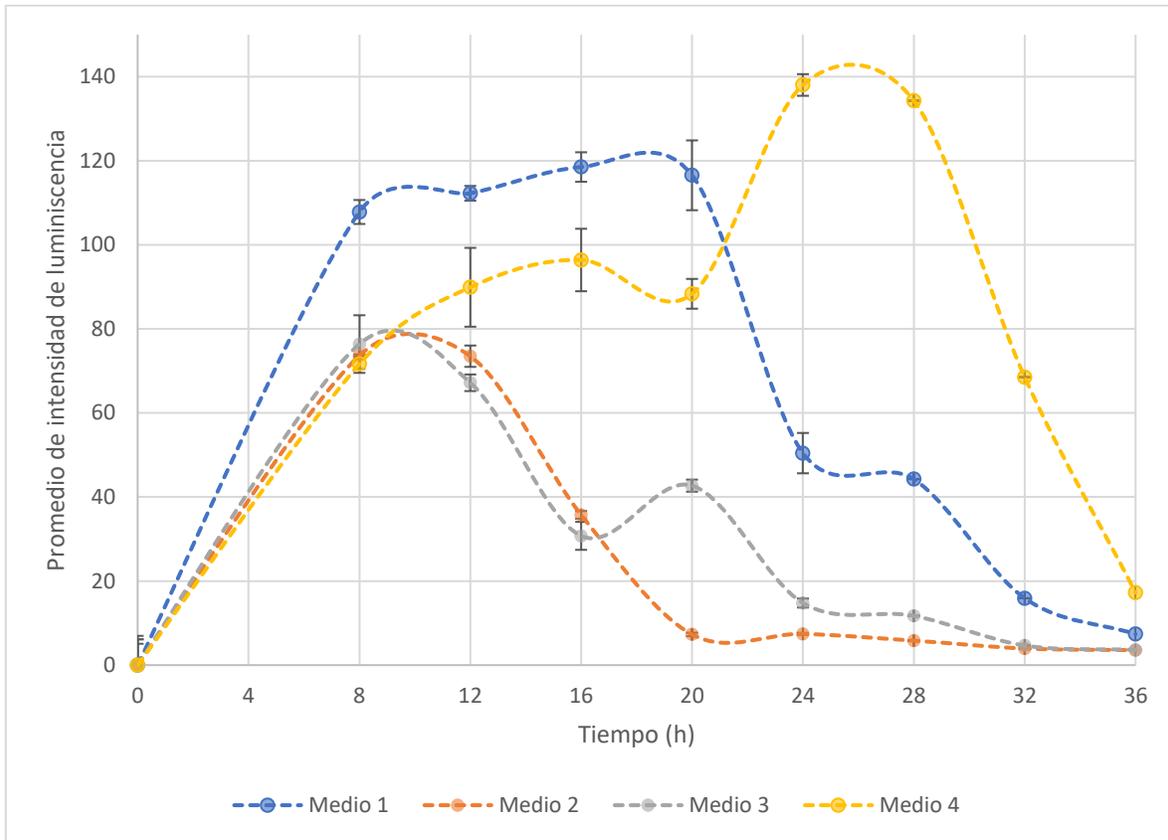


Figura 3.9 Promedio de intensidad de luminiscencia de *A. fischeri* en diferentes medios de cultivo.

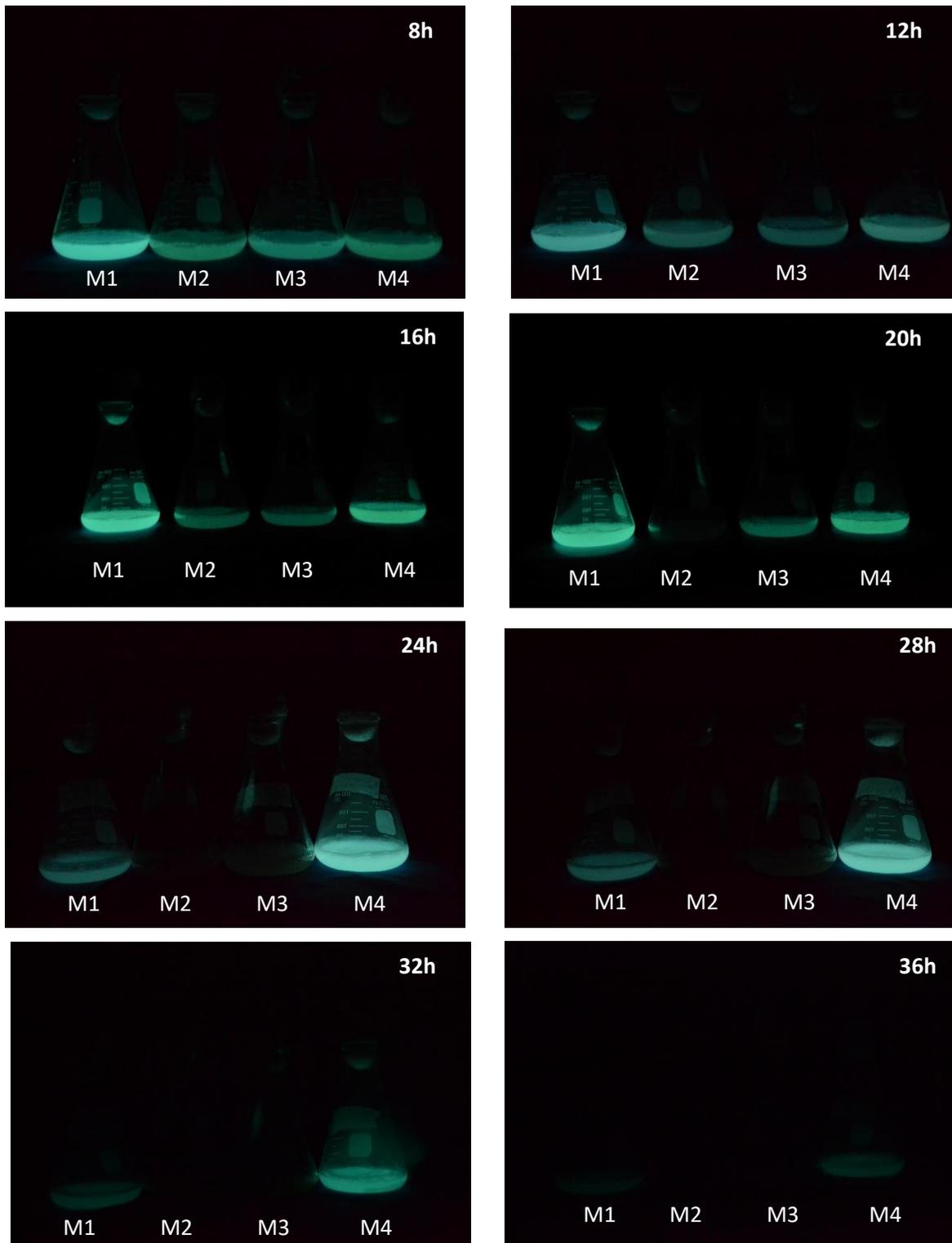


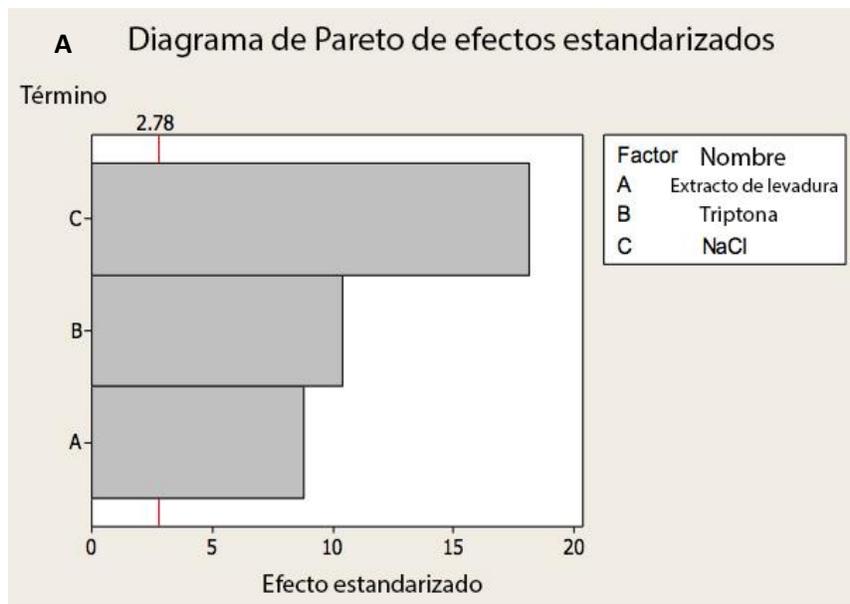
Figura 3.10 Luminiscencia de *A. fischeri* en Medios 1, 2, 3 y 4 (M1, M2, M3 y M4) durante la curva de crecimiento.

3.6 Análisis estadístico del diseño de experimentos

Los resultados de la tabla ANOVA y del diagrama de Pareto (la línea roja indica el umbral para la significancia estadística de los factores evaluados) muestran que los tres factores (triptona, extracto de levadura y NaCl) son significativos ($\text{valor-}p < 0.05$) (Tabla 3.3), siendo el cloruro de sodio el que presentó un mayor efecto sobre la intensidad de la luminiscencia, seguido por la triptona y el extracto de levadura (Figura 3.11.A). La gráfica de cubos muestra con un círculo rojo que la mayor intensidad de luminiscencia (138.07) se obtuvo empleando el medio 4 (10 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura y 30 g/L de cloruro de sodio) (Figura 3.11.B) en un tiempo de cultivo de 24 horas.

Tabla 3.3 Tabla ANOVA de análisis de varianzas con una r^2 ajustada de 98.65%

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Efectos principales	3	21552.1	21552.1	7184	171.4	0.000
Extracto de Levadura	1	3220.1	3220.1	3220.1	76.83	0.001
Triptona	1	4507	4507	4507	107.53	0.000
NaCl	1	13825.1	13825.1	13825.1	329.84	0.000
Error	4	167.7	167.7	41.9		
Total	7	21719.7				



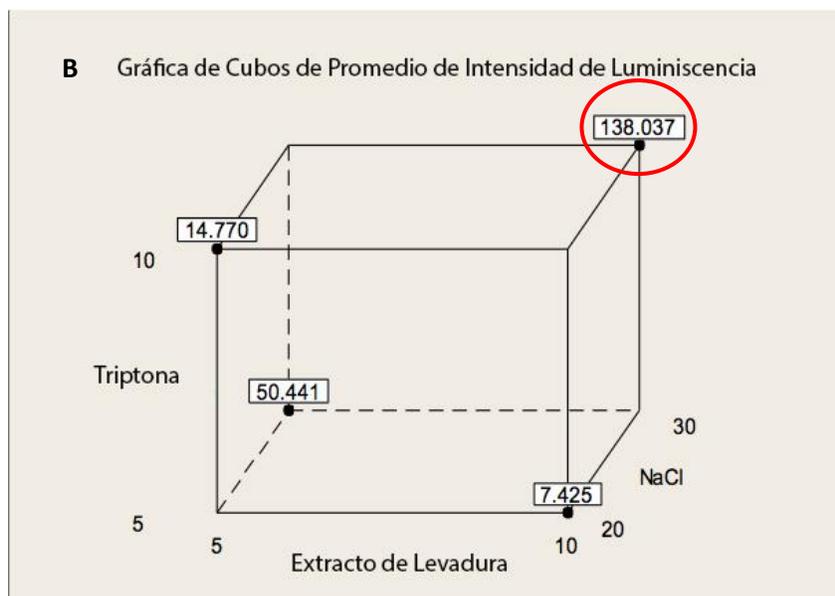


Figura 3.11 Análisis estadístico. A.) Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la intensidad promedio de luminiscencia. B.) Gráfica de cubos para la intensidad promedio de luminiscencia.

3.7 Uso de sal de mesa para el cultivo de *A. fischeri*

El cultivo con sal de mesa refinada obtuvo una mayor luminiscencia con un promedio de intensidad de 80.98 (Figura 3.12.A) y el cultivo con sal de laboratorio obtuvo 39.09 (Figura 3.12.B) a las 28 h. La mayoría de los organismos vivos contienen trazas de yodo, el cual es esencial para procesos metabólicos [84]. En la literatura se encuentran diferentes estudios que demuestran que los microorganismos participan en la fijación del yodo en el medio ambiente. Se han encontrado varias bacterias marinas que tienen la capacidad de metilar el yodo (I^-) contenido en el mar produciendo yoduro de metilo (CH_3I), como lo son *A. macleodii*, *Photobacterium spp.*, y *V. splendidus* [85,86]. Podría ser que este elemento químico contenido en el mar le de algún beneficio al crecimiento de *A. fischeri*, así como a la producción de bioluminiscencia, aunque no hay información al respecto en la literatura. Al utilizar sal de mesa para el cultivo de *A. fischeri* se podrán disminuir los costos del medio de cultivo, además de inducir mayor bioluminiscencia y de esta forma facilitar su uso.

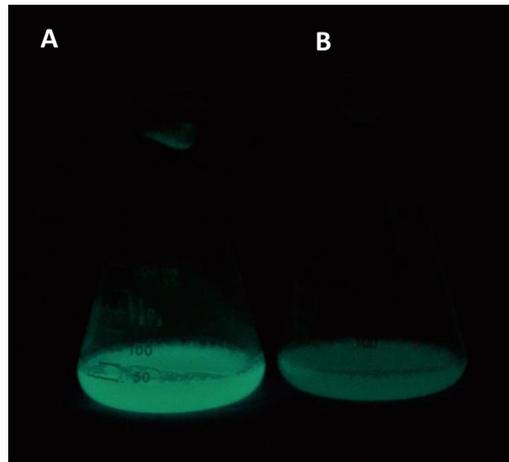


Figura 3.12 **A.** Cultivo de *A. fischeri* con sal de mesa refinada Elefante y **B.** con NaCl de laboratorio.

3.8 Escalamiento de *A. fischeri*

Los escalamientos de 500 mL y de 900 mL presentaron bioluminiscencia con una DO_{600} de 1.435 y 1.785 respectivamente a las 24 h (Figura 3.13 y Figura 3.14).

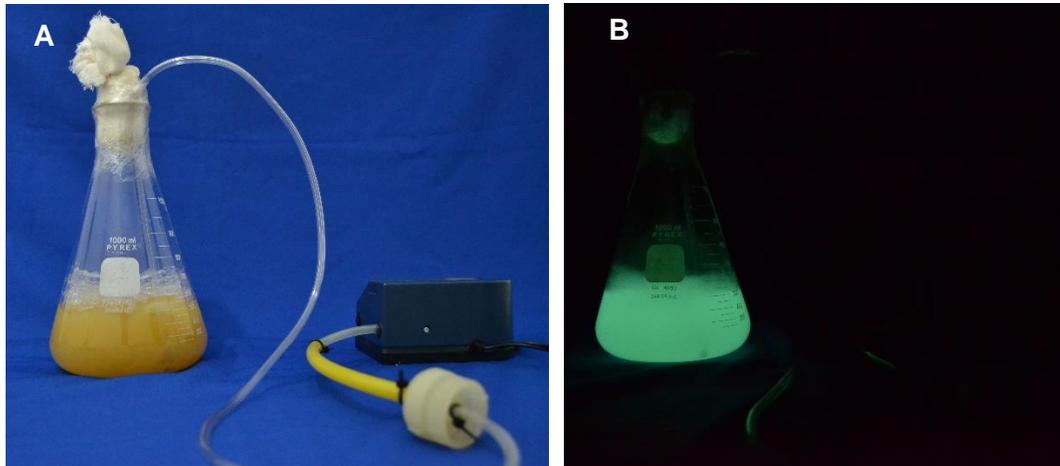


Figura 3.13 Escalamiento a 500 mL observado a las 24 h. A.) Foto con luz. B.) Foto en oscuridad.

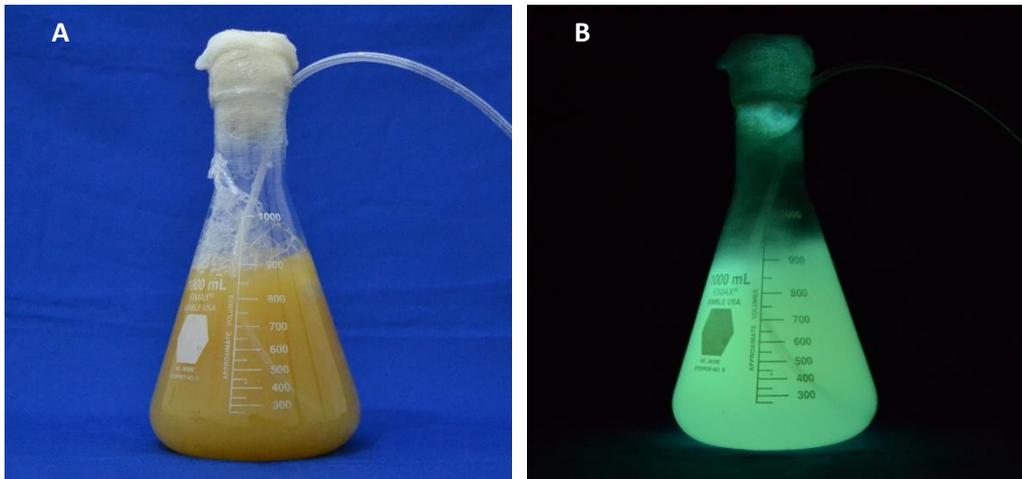


Figura 3.14 Escalamiento a 900 mL observado a las 24 h. A.) Foto con luz. B.) Foto en oscuridad.

3.9 Cultivo semi-continuo de *A. fischeri*

Se obtuvo bioluminiscencia durante 10 días en el cultivo semi-continuo de *A. fischeri* (Figura 3.15). El recambio de medio de cultivo se realizó cada 24 h. Se obtuvieron diferentes DO_{600} , desde 1.382 hasta 1.631 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Densidad óptica de cultivo semi-continuo de *A. fischeri*.

Tiempo (días)	DO_{600}
1	1.382
2	1.525
3	1.507
4	1.531
5	1.499
6	1.522
7	1.579
8	1.589
9	1.536
10	1.631

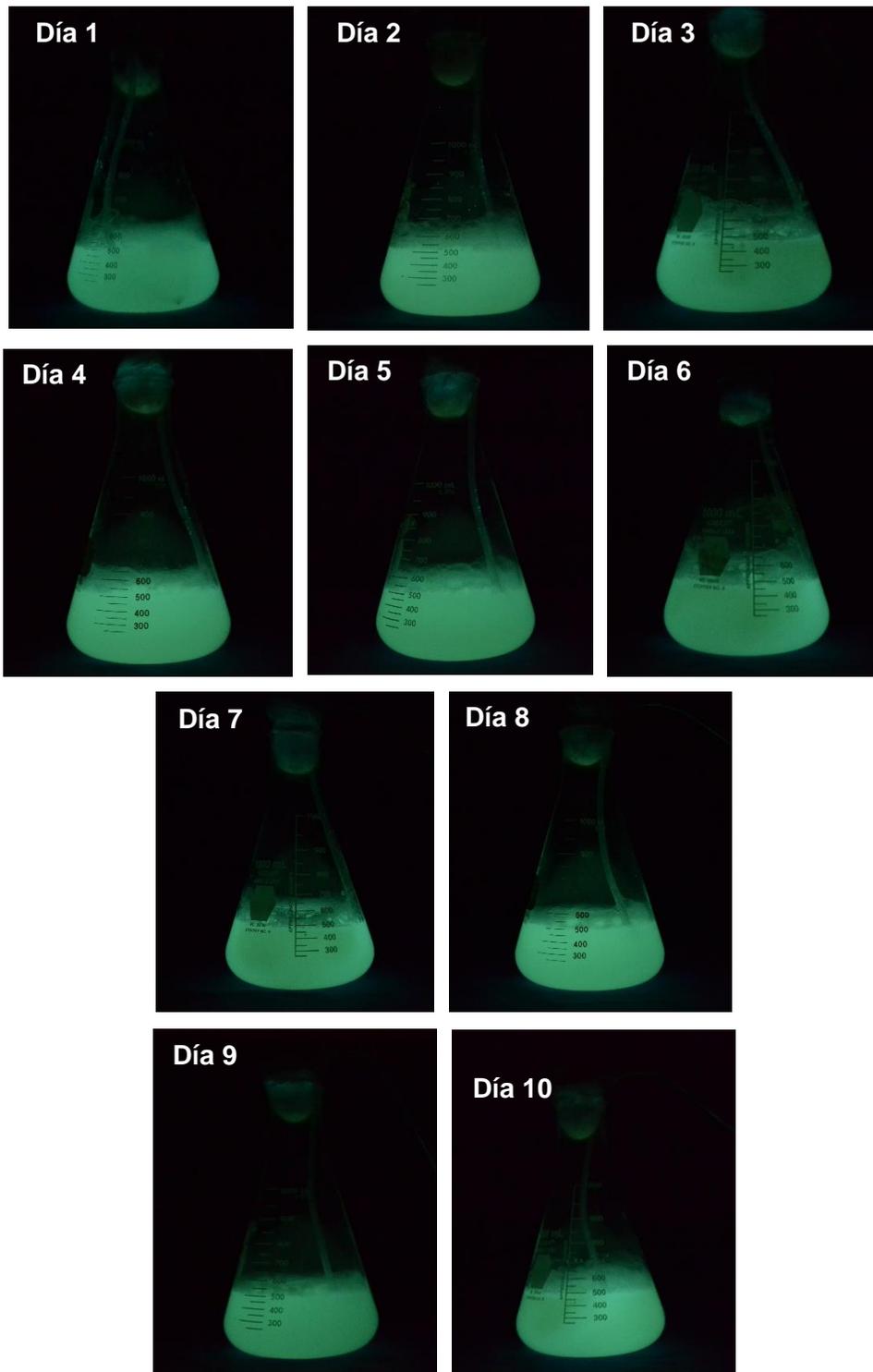


Figura 3.15 Cultivo semi-continuo de *A. fischeri* durante 10 días.

3.10 Modelo matemático del crecimiento celular de *A. fischeri*

Los parámetros de crecimiento y coeficientes estadísticos obtenidos de las regresiones no-lineales se muestran en la Tabla 3.5. Los tres modelos no-lineales evaluados (Gompertz, Logístico y Richards) tuvieron un ajuste de curva adecuado con una r^2 mayor de 0.990 y un ECM menor de 0.016. El menor tiempo *lag* se obtuvo por el modelo Gompertz (0.9282 h) seguido por Richards (1.603 h) y el Logístico (1.673). La tasa de crecimiento presentó valores entre 0.1005 y 0.1049 unidades de DO h⁻¹. Un valor inicial de absorbancia de 0.1 DO se obtuvo a partir de la aplicación de los tres modelos. El incremento de la absorbancia inicial a la máxima (*C*) fue entre 1.798 y 1.911 unidades de DO.

Tabla 3.5. Parámetros de crecimiento y coeficientes estadísticos obtenidos de la regresión de la DO_{600 nm} del cultivo de *A. fischeri*.

Parámetros y coeficientes	Modelo matemático de crecimiento		
	Gompertz	Logístico	Richards
λ : Tiempo <i>lag</i> (h)	4.887	5.331	5.278
μ : Tasa de crecimiento (DO h ⁻¹)	0.1526	0.1549	0.1491
y_0 (DO)	0.001	0.001	0.001
<i>C</i> (DO)	1.955	1.889	1.894
β	NA	NA	0.9
r^2	0.9964	0.9917	0.9924
r^2 ajustada	0.9938	0.9884	0.9893
ECM	0.01607	0.03725	0.03447
RMSE	0.06337	0.08632	0.08303

ECM: error cuadrático medio. RMSE: desviación de la raíz cuadrada media.

A partir de las ecuaciones de los modelos no-lineales (Tabla 2.5) y los parámetros de crecimiento (Tabla 3.5), se obtuvieron estimaciones del cambio de densidad óptica durante un periodo de tiempo. Estas estimaciones se compararon con los valores obtenidos durante el crecimiento (Figura 3.8) de *A. fischeri* en el medio 4 (Figura 3.16).

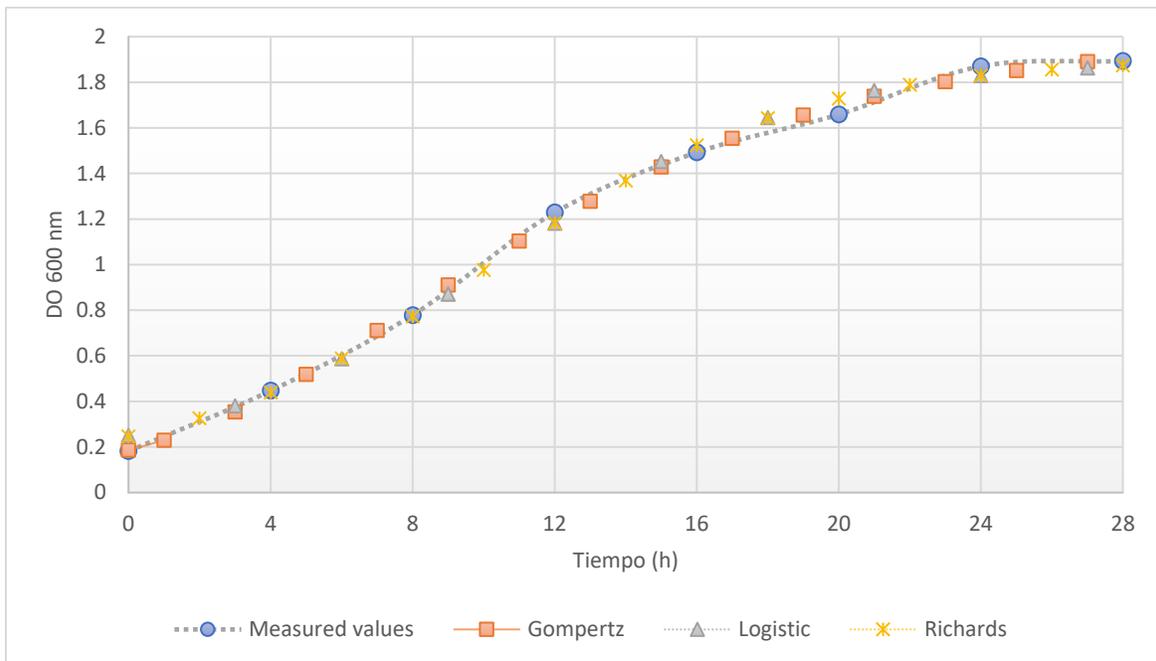


Figura 3.16 Comparación entre valores medidos y estimados para el crecimiento de *A. fisheri* en medio 4 utilizando modelos matemáticos no lineales.

Los modelos matemáticos no-lineales para predecir el crecimiento celular tienen diferentes desempeños para diferentes microorganismos. Zwietering et al. (1990) reportaron que la ecuación Gompertz era adecuada para describir el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, *Nocardia sp.*, *Salmonella Heidelberg* y *Listeria monocytogenes* [67]. Dalgaard y Koutsoumanis (2001) reportaron que el modelo Richards predecía adecuadamente la tasa de crecimiento y el tiempo *lag* de diferentes bacterias que descomponen alimentos de origen marino [72]. López et al. (2004) utilizaron datos de diferentes especies bacterianas y fúngicas y reportaron que el mejor desempeño se obtuvo con los modelos Baranyi, tres-fases-lineales, Richards y Weibull, obteniendo mejor ajuste de datos comparados con el modelo Gompertz [87]. En esta investigación los tres modelos no-lineales utilizados fueron capaces de predecir correctamente el crecimiento de *A. fisheri*. Debido a que es mejor utilizar modelos sencillos y simples (con menos parámetros) [67], los modelos Gompertz y logístico se recomiendan sobre el modelo Richards para estimar el crecimiento de *A. fisheri*, debido a que éstos cuentan con una r^2 mayor a 0.98 y cuentan con un parámetro menos en su ecuación.

3.11 Diseño del prototipo del reactor para cultivo semi-continuo de *A. fischeri*

3.11.1 Control de pH

Se desarrolló un prototipo de control de pH (Figura 3.17), el cual se alimenta de una solución de hidróxido de sodio con pH 8.0 que permite que el medio se neutralice y llegue al pH deseado.

El valor de pH inicial del cultivo bacteriano fue de 7.0, que corresponde al valor inicial de 200mV. La transformación de mV a pH se obtuvo con la fórmula $pH=35 \cdot Volts$, por lo que $0.2V \cdot 35$ corresponde a un pH de 7.0. Posteriormente se añadió ácido clorhídrico disminuyendo el pH hasta 3.5 (Figura 3.18).

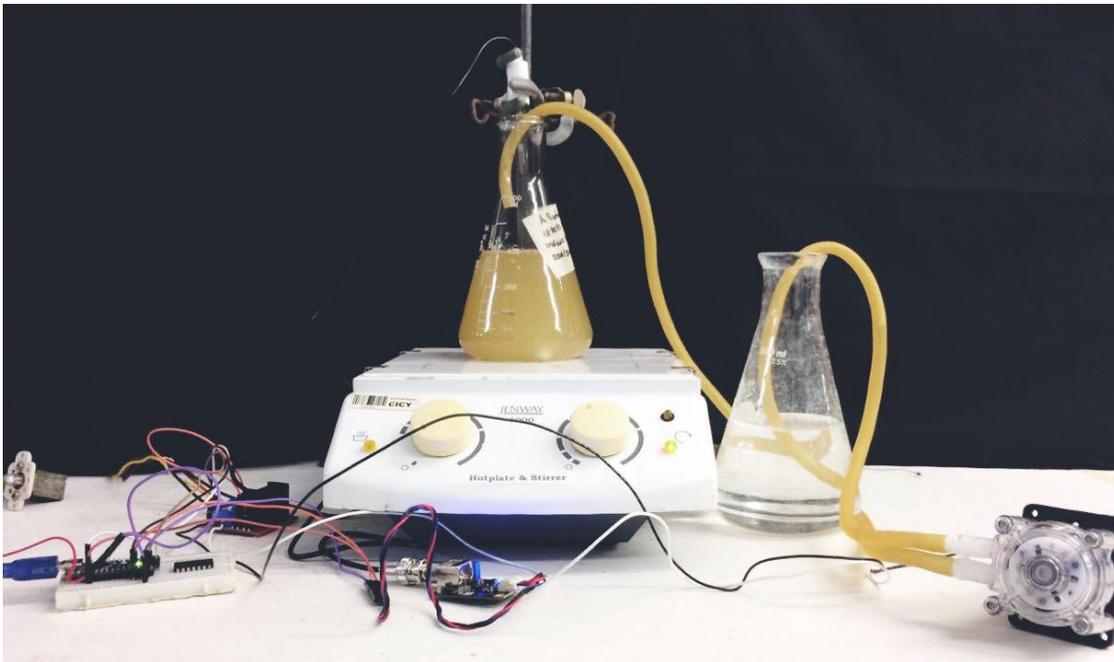


Figura 3.17 Prototipo de control de pH. En el centro se encuentra un cultivo de *A. fischeri* con sensor de pH. Del lado derecho una bomba peristáltica y un buffer a pH 8.0. Del lado izquierdo el microcontrolador y el puente-H.

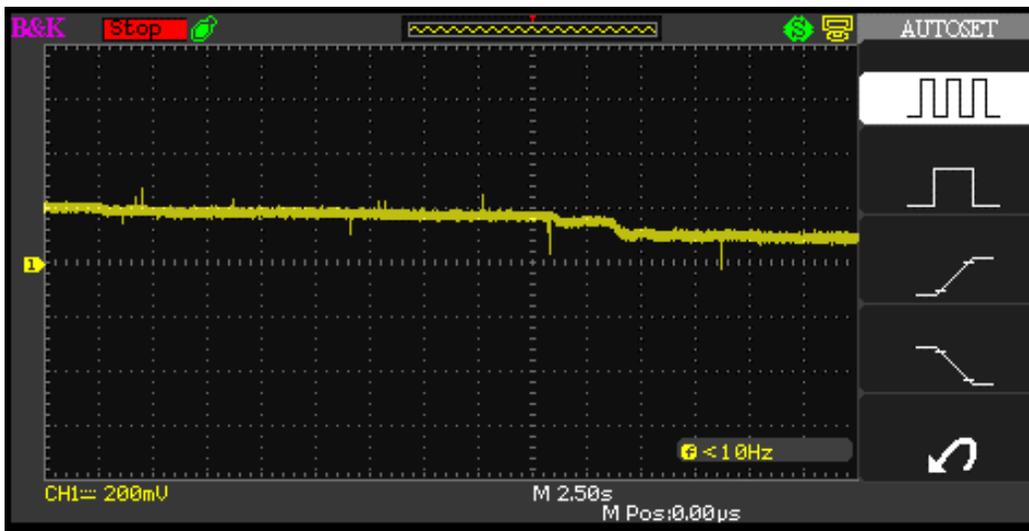


Figura 3.18 Disminución de pH de 7.0 (200mV) a 3.5 (100mV) en cultivo bacteriano.

En cuanto disminuyó el pH de 7.0 a 3.5, la bomba peristáltica comenzó a funcionar con los retardos programados para compensar el tiempo de ajuste de pH (código utilizado para control de pH en Anexos). Los pulsos generados por el control PI ON-OFF se presentan en la Figura 3.19, el ciclo de trabajo fue fijo con un valor de 66.6%.



Figura 3.19 Pulsos generados por el control PI ON-OFF.

El pH se incrementó conforme la bomba fue alimentando la solución con pH 8.0, una vez que el medio obtuvo un valor de pH 7.0 la bomba peristáltica se desactivó. En la Figura 3.20 se demuestra como el pH fue incrementando hasta llegar al valor deseado.

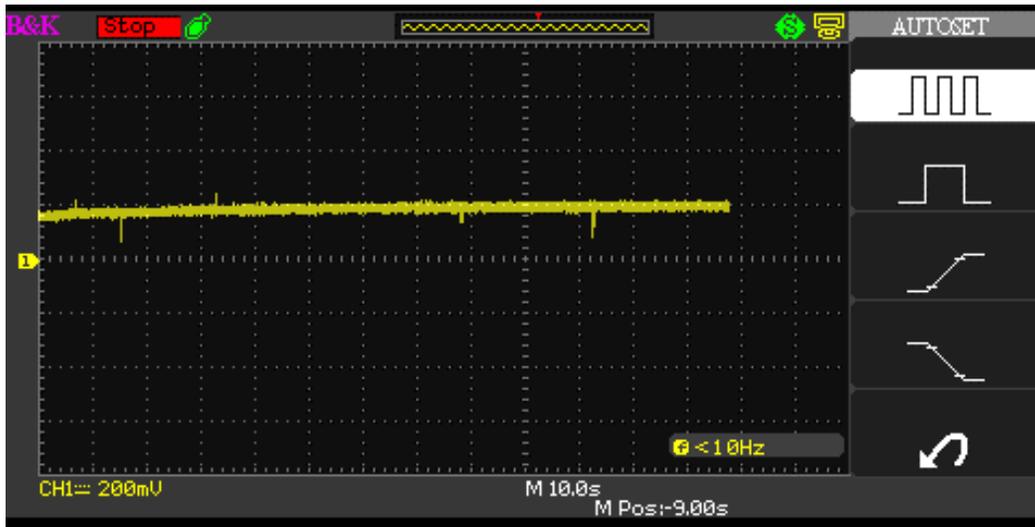


Figura 3.20 Incremento de pH en matraz hasta llegar a un pH 7.0 (200mV).

Utilizando un controlador proporcional-integra (PI) ON-OFF con las constantes de diseño del controlador k_p y k_i de 2 y 0.1 respectivamente, se logró el control de pH a un valor de 7.0. Los controladores proporcional e integral se obtuvieron mediante sintonización y se utilizaron conforme a la siguiente ecuación:

$$u(t) = K_p e(t) + \frac{K_p}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau$$

Donde $u(t)$ es la señal de control con respecto al tiempo, K_p es el controlador proporcional, $e(t)$ es el error con respecto al tiempo, $k_i = K_p/T_i$ es la constante integral, T_i es el tiempo integral y es quien ajusta la acción integral.

El ciclo de trabajo fue de 66.6% para la alimentación del buffer básico. Para neutralizar el pH se utilizó una solución con pH 8.0 elevando el pH de 3.5 a 7.0 en un tiempo estimado de 5 minutos y manteniendo el pH en 7.0.

3.11.2 Diseño físico de prototipo de reactor

3.11.2.1 Dimensiones de reactor

Se modeló el diseño de un reactor considerando un prisma rectangular con las medidas reportadas en la Tabla 3.6, que pueda satisfacer las necesidades del proyecto. El reactor tiene un volumen interno de 1 L, esto con la finalidad de almacenar 500 mL de cultivo de *A. fischeri* además de permitir la salida de gases (Figura 3.22).

Tabla 3.6 Medidas utilizadas para el diseño de reactor para *Aliivibrio fischeri*.

Arista	Medida (cm)
Longitud	16
Ancho	10
Altura	10
Espesor de acrílico	0.6

3.11.2.2 Sensores y microcontrolador de reactor

Aunque se diseñó el reactor, éste no fue evaluado durante la presente tesis y se evaluará en una siguiente fase. El diseño del reactor cuenta con un sensor de pH y uno de temperatura, éstos estarán conectados a un microcontrolador que estará enviando una señal digital a las electroválvulas y bombas peristálticas, las cuáles permitirán la alimentación de medio de cultivo cuando se detecte un pH menor a 7.0 (Figura 3.22). La temperatura solo se monitoreará, ya que no se estará regulando. Además, el microcontrolador regulará el flujo de las bombas peristálticas las cuales recircularán el cultivo bioluminiscente por las mangueras (durante las noches) (Figura 3.21) y estará añadiendo los sustratos (cada 24 h) para asegurar un crecimiento semi-continuo que mantenga a las bacterias en una fase exponencial. Se estará aprovechando la energía producida por un sistema híbrido (eólico, tidal y fotovoltaico) para mantener el cultivo del reactor en movimiento, con la finalidad de la inducción de la bioluminiscencia, permitiendo la generación de un sistema de iluminación sustentable.

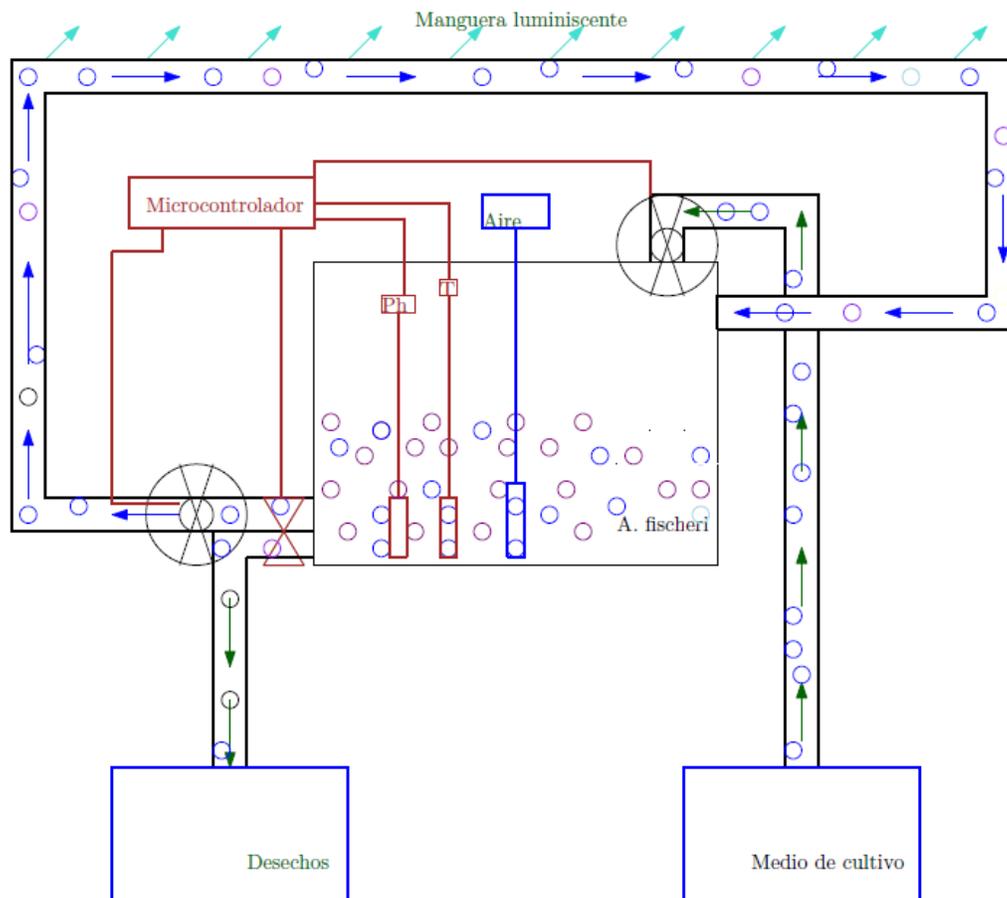


Figura 3.21 Modelo 2D de reactor con sistema de control.

3.11.2.3 Sistema de aireación

El diseño del reactor cuenta con una entrada de aire por burbujeo; el suministro de aire además de brindar oxigenación al medio proporciona agitación para tener el cultivo en movimiento. El diseño del reactor tiene la entrada para una manguera de aire, ésta se encuentra en la parte superior central del reactor y la manguera llega hasta la parte inferior central del reactor (Figura 3.22.4).

3.11.2.4 Contenedor de inóculo

El diseño del reactor tiene un contenedor con un volumen interior igual al 2.5% (v/v) de inóculo requerido para un cultivo semi-continuo de 500 mL. Este se encuentra en la parte derecha inferior del biorreactor con las medidas reportadas en la

Tabla **3.7** (Figura 3.22.7).

Tabla 3.7 Dimensiones del contenedor para inóculo

Arista	Medida (cm)
Longitud	2
Ancho	10
Altura	2.4
Espesor de acrílico	0.6

Al vaciarse el reactor cada 24 horas se mantendrá el líquido dentro del contenedor, siendo éste el inóculo requerido para el cultivo semi-continuo.

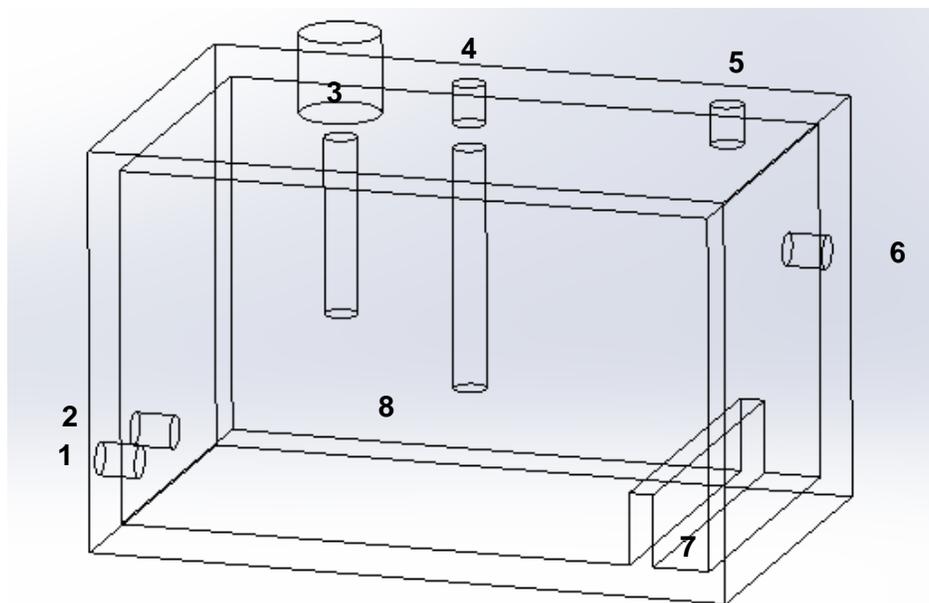


Figura 3.22 Modelo 3D de reactor. **1)** Salida de cultivo para cultivo semi-continuo (cada 24 h). **2)** Salida de cultivo para recircular por manguera luminiscente (durante las noches).

3) Sensor de pH y temperatura. **4)** Manguera de sistema de aireación. **5)** Entrada de medio de cultivo estéril para cultivo semi-continuo (cada 24 h). **6)** Entrada de cultivo para recircular por manguera luminiscente (durante las noches). **7)** Contenedor de inóculo. **8)** Interior de reactor con capacidad de 1 L.

3.11.3 Perspectivas de ubicación del reactor

Un posible uso del reactor a futuro es en una estación marina (Figura 3.23). El cultivo de *A. fischeri*, contenido en el reactor, se bombearía hacia una manguera que rodearía la

periferia de la estación marina y regresaría como entrada al reactor. A lo largo de la manguera se estaría observando la bioluminiscencia, la cual indicaría la posición de la estación marina.

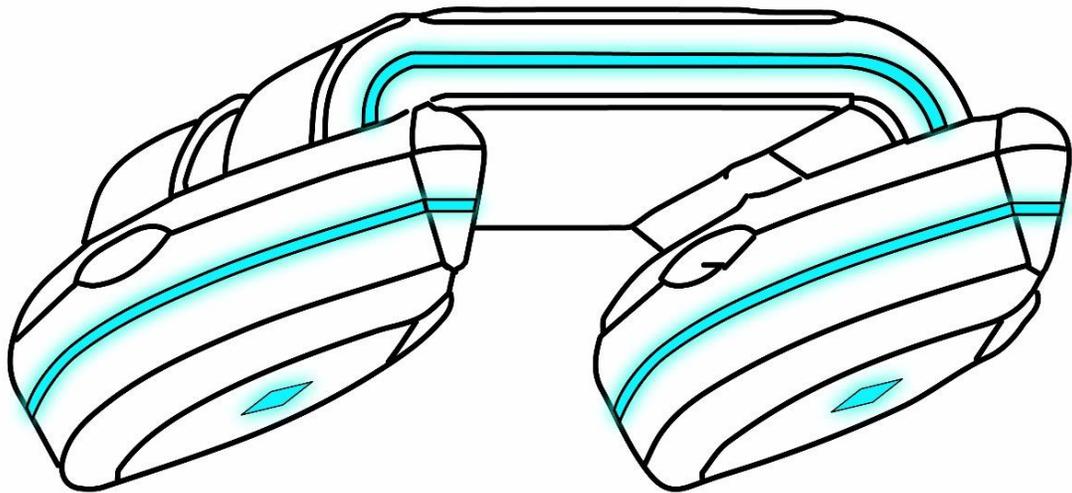


Figura 3.23 Estación marina con espacios inferiores donde se localizaría el reactor del cultivo de *A. fischeri*.

CONCLUSIONES

Mediante un diseño factorial fraccionado se analizó el efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia de *A. fischeri*. Se realizaron curvas de crecimiento y de intensidad de luminiscencia promedio para evaluar el desempeño de los medios diseñados. El medio que produjo una mayor densidad celular de *A. fischeri*, así como una mayor luminiscencia, consistió en 1% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) de triptona, 3% (p/v) de NaCl y Tris-HCl 50 mM a un pH 7.0. Esta composición produjo un incremento de 2.4-veces del promedio de intensidad de luminiscencia en comparación con el medio 1, y 10-veces más en comparación con los medios 2 y 3.

Se analizó y graficó con modelos matemáticos no-lineales (Gompertz, Richards y logístico) la curva de crecimiento con base en los resultados obtenidos con el medio 4, con la finalidad de estimar los tiempos de fase exponencial y predecir su crecimiento. Se obtuvieron los coeficientes para los modelos matemáticos no-lineales que describen el crecimiento de *A. fischeri*.

A partir del medio que favoreció la luminiscencia de la bacteria se logró escalar el cultivo a 500 mL y 900 mL. Se desarrolló un crecimiento semi-continúo considerando los tiempos de fase exponencial, lo que permitió un crecimiento celular prolongado y una bioluminiscencia continua durante diez días. La adición de medio de cultivo se realizó cada 24 h con un inóculo del 2.5% (v/v).

Así mismo, se modeló el diseño del prototipo del reactor con un volumen interno de 1 L considerando la posición de los sensores, de las mangueras de entrada y de salida de cultivo y oxígeno. Así como un contenedor con una capacidad de 2.5% (v/v) necesario para inocular un cultivo de 500 mL.

Finalmente se desarrolló un sistema que regula el pH (7.0) utilizando un sensor de pH analógico, un microcontrolador Arduino ATmega328p, un semiconductor "puente-H" L298N y como actuador una bomba peristáltica, con un controlador PI con ganancias $k_p=2$ y $k_i=0.1$. Se programó la tarjeta de adquisición de datos utilizando el código presentado en Anexo A.

PERSPECTIVAS

Con la base del cultivo semi-continuo de *A. fischeri* y la construcción del reactor diseñado en esta tesis se podrá tener un sistema que utilice la bioluminiscencia como fuente alternativa de iluminación. Es necesario disminuir el costo del medio de cultivo, ya que, aunque se obtuvo una disminución de 14 veces el costo comparado contra el “medio Photobacterium”, se requiere seguir disminuyendo éste para hacerlo rentable. Además, será necesario optimizar el consumo del medio de cultivo. Con estas mejoras se podrá hacer uso de la bioluminiscencia como una fuente alternativa de iluminación, y utilizarse a futuro como indicador luminiscente en diversas aplicaciones.

ANEXOS

Anexo A. Código utilizado para el control de pH, programación de microcontrolador Arduino

```
//Se definen variables
double Setpoint, Input, Output;
PID myPID(&Input, &Output, &Setpoint,2,0.1,0.0, DIRECT);
float error=0.0;
float control=0.0;

//Se define el Puerto del ADC
int digPin = 10;
#define SensorPin 0

//Se almacena el valor promedio de la respuesta del sensor
unsigned long int avgValue;
float b;
int buf[10],temp;

//Se define valor de pH deseado
float valordeseado=7.0;

void setup()
{
  //Instrucciones de pH
  Input = analogRead(0);
  Setpoint = 7;

  //Instrucciones de PID
  myPID.SetMode(AUTOMATIC);
  pinMode(13,OUTPUT);
  Serial.begin(9600);
```

```

Serial.println("Ready");
}

void loop()
{
  //Programación de pH
  for(int i=0;i<10;i++) //Se toman 10 valores del sensor para suavizar el valor
  {
    buf[i]=analogRead(SensorPin);
    delay(10);
  }
  for(int i=0;i<9;i++)
  {
    for(int j=i+1;j<10;j++)
    {
      if(buf[i]>buf[j])
      {
        temp=buf[i];
        buf[i]=buf[j];
        buf[j]=temp;
      }
    }
  }
  avgValue=0;
  for(int i=2;i<8;i++) //tomar el valor promedio de 6 muestras centrales
  avgValue+=buf[i];
  float pHValue=(float)avgValue*5.0/1024/6; //convertir el valor análogo en millivolts
  pHValue=3.5*pHValue; //convertir milivolts en valor de pH
  Serial.print(" pH:");
  Serial.print(pHValue,2);
  Serial.println(" ");

  //Programación de PID

```

```
error=valordeseado-phValue;
```

```
Input = error;
```

```
myPID.Compute();
```

```
if (error <= 0.0)
```

```
{Output = 0.0;}
```

```
else
```

```
{error = error;}
```

```
//Programación de ON-OFF
```

```
control=Output*80.0;
```

```
if (control > 600.0)
```

```
{control = 600.0;}
```

```
else
```

```
{control = control;}
```

```
digitalWrite(digPin, HIGH); // asigna el valor HIGH al pin
```

```
delay(control); // tiempo de espera con respecto a ganancias del PI
```

```
digitalWrite(digPin, LOW); // asigna el valor LOW al pin
```

```
delay(400); // tiempo de espera de 400ms
```

```
//Para imprimir resultados en pantalla
```

```
Serial.print(" PID:");
```

```
Serial.print(Output,2);
```

```
Serial.println(" ");
```

```
Serial.print(" error:");
```

```
Serial.print(error,2);
```

```
Serial.println(" ");
```

```
Serial.print(" control:");
```

```
Serial.print(control,2);
```

```
Serial.println(" ");
```

```
Serial.print(" sal:");
```

```
Serial.print(Output,2);
```

```
Serial.println(" ");
```

```
}
```

REFERENCIAS

- [1] Widder, E.A. (2010) Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity. *Science*, 328, 704. <https://doi.org/10.1126/science.1174269>
- [2] Haddock, S.H., Moline, M.A. y Case, J.F. (2010) Bioluminescence in the Sea. *Annu Rev Mar Sci*, 2, 443. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028>
- [3] Lee, C.Y., Szittner, R.B. y Meighen, E.A. (1991) The lux gene of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. Nucleotide sequence, difference in gene organization, and high expression in mutant *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 201, 161. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16269.x>
- [4] Liu, H., Lin, H., Mu, Q., Lu, X., Wang, J. y Khan, M.N. (2014) Bioluminescence system assisted by NAD(P)H conversion to increase the sensitivity of quantitative bacterial cell assay. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 26, 375. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.08.007>
- [5] Nicoli, M.E.A. (1974) Bacterial Luciferase. Chemistry of the Reactive Sulfhydryl. *J Biol Chem*, 249, 2385.
- [6] Diggle, S.P. y Williams, P. (2013) Quorum Sensing. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, 2013. p. 25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01252-3>
- [7] Hastings, J.W. y Greenberg, E.P. (1999) Quorum Sensing: the Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria. *J Bacteriol*, 181, 2667.
- [8] Langebrake, J.B., Dilanji, G.E., Hagen, S.J. y De Leenheer, P. (2014) Traveling waves in response to a diffusing quorum sensing signal in spatially-extended bacterial colonies. *J Theor Biol*, 363, 53. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.07.033>
- [9] McFall-Ngai, M., Heath-Heckman, E.A., Gillette, A.A., Peyer, S.M. y Harvie, E.A. (2012) The secret languages of coevolved symbioses: Insights from the *Euprymna*

scolopes–*Vibrio fischeri* symbiosis. *Semin Immunol*, 24, 3.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.11.006>

- [10] Dunn, A.K. (2012) *Vibrio fischeri* Metabolism. *Adv Microb Physiol*, Elsevier, 2012. p. 37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>
- [11] Dunlap, P.V. y Greenberg, E.P. (1985) Control of *Vibrio fischeri* Luminescence Gene Expression in *Escherichia coli* by Cyclic AMP and Cyclic AMP Receptor Protein. *J Bacteriol*, 164, 45.
- [12] Hongda, F., Yanhong, D., Zhanzhou, X., Yin, Y., Xiuqin, L. y Bin, Y. (2008) Cultural and luminescent Conditions of a Marine luminous Bacterium. *Bull Mar Sci*, 10, 8.
- [13] Jia, K. y Ionescu, R.E. (2016) Measurement of Bacterial Bioluminescence Intensity and Spectrum: Current Physical Techniques and Principles. Thouand G, y Marks R, editores. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 154, 19. https://doi.org/10.1007/10_2015_324
- [14] Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J. y Dunlap, P.V. (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 2823. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>
- [15] Soto, W., Gutierrez, J., Remmenga, M.D. y Nishiguchi, M.K. (2009) Salinity and Temperature Effects on Physiological Responses of *Vibrio fischeri* from Diverse Ecological Niches. *Microb Ecol*, 57, 140. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9412-9>
- [16] Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D.G., Cerrano, C. et al. (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea: *Vibrio* infections triggering sea-fan mass mortality. *Environmental Microbiology*, 12, 2007-19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02209.x>
- [17] Scheerer, S., Gomez, F. y Lloyd, D. (2006) Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *J Microbiol Methods*, 67, 321. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.010>

- [18] Moline, M.A., Oliver, M.J., Orrico, C., Zaneveld, R. y Shulman, I. (2013) Bioluminescence in the sea. *Subsea Optics and Imaging*, Elsevier. p. 134-70. <https://doi.org/10.1533/9780857093523.2.134>
- [19] Ruby, E.G. y McFall-Ngai, M.J. (1999) Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol*, 7, 414. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01588-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01588-7)
- [20] Priede, I.G., Bagley, P.M., Way, S., Herring, P.J. y Partridge, J.C. (2006) Bioluminescence in the deep sea: Free-fall lander observations in the Atlantic Ocean off Cape Verde. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53, 1272-83. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2006.05.004>
- [21] Chong, G., Kimyon, O. y Manefield, M. (2013) Quorum Sensing Signal Synthesis May Represent a Selective Advantage Independent of Its Role in Regulation of Bioluminescence in *Vibrio fischeri*. Ben-Jacob E, editor. *PLOS ONE*, 8, 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067443>
- [22] Dunlap, P.V. y Kuo, A. (1992) Cell Density-Dependent Modulation of the *Vibrio fischeri* Luminescence System in the Absence of Autoinducer and LuxR Protein. *J Bacteriol*, 174, 2440.
- [23] Jennings, V.L.K., Rayner-Brandes, M.H. y Bird, D.J. (2001) Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*, 35, 3448-56. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00067-7)
- [24] Girotti, S., Bolelli, L., Roda, A., Gentilomi, G. y Musiani, M. (2002) Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria. *Anal Chim Acta*, 471, 113. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00870-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00870-X)
- [25] Kim, B.C., Gu, M.B. y Hansen, P.D. (2005) Evaluation of Water-Borne Toxicity Using Bioluminescent Bacteria. *Environmental chemistry*. *Springer*, 42, 699-705. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.42-6497>

- [26] Waters, P. y Lloyd, D. (1985) Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates. *Journal of General Microbiology*, 131, 2865-9.
- [27] Lin, Y.T. y Meighen, E.A. (2009) Bacterial Bioluminescence. *Biochemistry and Molecular Biology*. <http://photobiology.info/Lin.html> Consultado 03 de mayo de 2017.
- [28] Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M. y Ruby, E.G. (2000) *Vibrio fischeri* lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *J Bacteriol*, 182, 4578. <https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4578-4586.2000>
- [29] Baldwin, T., Christopher, J., Raushel, F., Sinclair, J., Ziegler, M., Fisher, A. et al. (1995) Structure of bacterial luciferase. *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 798-809. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80014-X](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80014-X)
- [30] Mitchell, R.J., Ahn, J.M. y Gu, M.B. (2005) Comparison of *Photobacterium luminescens* and *Vibrio fischeri* lux Fusions to Study Gene Expression Patterns. *J Microbiol Biotechnol*, 15, 48.
- [31] Nunes-Halldorson, V.S. y Duran, N.L. (2003) Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 91-6. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200001>
- [32] Ulitzur, S. y Hastings, J.W. (1980) Reversible inhibition of bacterial bioluminescence by long-chain fatty acids. *Current Microbiology*, 3, 295-300. <https://doi.org/10.1007/BF02601809>
- [33] Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S. y Barceló, D. (2004) BIOLUMINESCENCE INHIBITION ASSAYS FOR TOXICITY SCREENING OF WOOD EXTRACTIVES AND BIOCIDES IN PAPER MILL PROCESS WATERS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 339. <https://doi.org/10.1897/02-632>
- [34] Yamasaki, S., Yamada, S. y Takehara, K. (2013) Bioluminescence Inhibition of Bacterial Luciferase by Aliphatic Alcohol, Amine and Carboxylic Acid: Inhibition Potency and Mechanism. *Analytical Sciences*, 29, 41-6. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.41>

- [35] Blum. (1997) Light Emitting Reactions for Analytical Purpose. *Bio-and Chemi Luminescent Sensors*, World Scientific, Singapore. p. 46.
- [36] Swartzman, E., Miyamoto, C., Graham, A. y Meighen, E. (1990) Delineation of the Transcriptional Boundaries of the Lux Operon of *Vibrio harveyi* Demonstrates the Presence of Two New Lux Genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 3513-7.
- [37] Gokhale, T., Wali, A., Parikh, S. y Sood, N. (2012) RESEARCH OF MARINE ISOLATES IN DEVELOPMENT OF BIOSENSORS FOR ENVIRONMENTAL POLLUTANTS. *Engineering Review*, 32, 17-22.
- [38] Duane, W. y Hastings, J.W. (1975) Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 6, 53-64. <https://doi.org/10.1007/BF01731866>
- [39] Zenno, S., Saigo, K., Kanoh, H. y Inouye, S. (1994) Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol*, 176, 3536. <https://doi.org/10.1128/jb.176.12.3536-3543.1994>
- [40] Boylan, M., Graham, A. y Meighen, E.A. (1985) Functional Identification of the Fatty Acid Reductase Components Encoded in the Luminescence Operon of *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 163, 1186-90.
- [41] Yong, E. (2009) Glowing squid use bacteria flashlights that double as an extra pair of «eyes». National Geographic. <http://phenomena.nationalgeographic.com/2009/06/02/glowing-squid-use-bacterial-flashlights-that-double-as-an-extra-pair-of-eyes/> Consultado: 14 de julio 2018.
- [42] Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A. y Meighen, E. (1989) Lux C, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, 49, 8.

- [43] Mack, M. y Grill, S. (2006) Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 265-75. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0421-7>
- [44] Inouye, S. (1994) NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Lett*, 347, 163. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00528-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00528-1)
- [45] Jones, B.W. y Nishiguchi, M.K. (2004) Counterillumination in the Hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology*, 144, 1151-5. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1285-3>
- [46] Stabb, E.V. y Millikan, D.S. (2008) Is the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Symbiosis a Defensive Mutualism. *Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis*, CRC Press. Taylor Francis Group, U.S.A. p. 85-96.
- [47] Soto, W., Punke, E.B. y Nishiguchi, M.K. (2012) Evolutionary perspectives in a mutualism of sepiolid squid and bioluminescent bacteria: combined usage of microbial experimental evolution and temporal population genetics. *Evolution*, 66, 1308. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01547.x>
- [48] Wells, C.D. (2013) Mutualism of the month: Hawaiian bobtail squid. Feed the Data Monster. <http://feedthedatamonster.com/home/2013/9/11/mutualism-of-the-month-hawaiian-bobtail-squid> Consultado: 16 de agosto de 2018.
- [49] Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. y Salmond, G.P.C. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 365-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- [50] Wang, T., Liu, Y., Wang, D., Lin, Z., An, Q., Yin, C. et al. (2016) The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 310, 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.061>

- [51] Callahan, S.M. y Dunlap, P.V. (2000) LuxR- and Acyl-Homoserine-Lactone-Controlled Non-lux Genes Define a Quorum-Sensing Regulon in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*, 182, 2811. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2811-2822.2000>
- [52] Agustino, A. y Soberon, G. (2002) El complejo lenguaje de las bacterias. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 53, 60-7.
- [53] Petrun, B. y Lostroh, C.P. (2013) *Vibrio fischeri* exhibit the growth advantage in stationary-phase phenotype. *Can J Microbiol*, 59, 130. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0439>
- [54] Srivastava, V.S. y MacLeod, R.A. (1971) Nutritional requirements of some marine luminous bacteria. *Can J Microbiol*, 17, 703. <https://doi.org/10.1139/m71-113>
- [55] Wang, W., Zhang, M., Fang, J., Zhang, L., Zou, X. y Wang, X. (2013) Improved detection of Ochratoxin A by marine bioluminescent bacteria *V. harveyi* BA. *Czech J Food Sci*, 31, 88. <https://doi.org/10.17221/18/2012-CJFS>
- [56] Tabei, Y., Era, M., Ogawa, A. y Morita, H. (2011) Effects of Magnesium Sulfate on the Luminescence of *Vibrio fischeri* under Nutrient-Starved Conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 1073. <https://doi.org/10.1271/bbb.100880>
- [57] Tabei, Y., Era, M., Ogawa, A. y Morita, H. (2012) Interactions between bicarbonate, potassium, and magnesium, and sulfur-dependent induction of luminescence in *Vibrio fischeri*. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 350-9. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100185>
- [58] Ramesh, C., Mohanraju, R., Murthy, K., Karthick, P. y 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). *Curr Sci*, 106, 511.
- [59] Hase, C.C., Fedorova, N.D., Galperin, M.Y. y Dibrov, P.A. (2001) Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genome Comparisons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 353-70. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.3.353-370.2001>

- [60] Watanabe, H., Inaba, H. y Hastings, J.W. (1991) Effects of aldehyde and internal ions on bioluminescence expression of *Photobacterium phosphoreum*. *Arch Microbiol*, 156, 1. <https://doi.org/10.1007/BF00418179>
- [61] Coffey, J. (1967) Inducible Synthesis of Bacterial Luciferase: Specificity and Kinetics of Induction. *Journal of Bacteriology*, 94, 1638-47.
- [62] Neelson, K., Platt, T. y Hastings, W. (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol*, 104, 313.
- [63] Makemson, J.C. y Hastings, J.W. (1979) Poising of the Arginine Pool and Control of Bioluminescence in *Beneckea harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 140, 532-42.
- [64] Waters, C.A. y Hastings, J.W. (1977) Mutants of Luminous Bacteria with an Altered Control of Luciferase Synthesis. *J Bacteriol*, 131, 519.
- [65] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark, D.P. (2009) Brock: Biología de los microorganismos. 12.^a ed. Pearson Educacion S.A.
- [66] Zambrano, M., Siegele, D.A., Almirón, M., Tormo, A. y Kolter, R. (1993) Microbial Competition: *Escherichia coli* Mutants That Take Over Stationary Phase Cultures. *Science, New Series*, 259, 1757-60.
- [67] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van, K. y Riet, T. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1875.
- [68] Pla, M.L., Oltra, S., Esteban, M.D., Andreu, S. y Palop, A. (2015) Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *Biomed Res Int*, 2015, 1. <https://doi.org/10.1155/2015/365025>
- [69] Ramírez-Santos, J., Contreras-Ferrat, G. y Gómez-Eichelmann, M.C. (2005) La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47, 92-101.

- [70] Gerson, D.F., Kole, M.M., Ozum, B. y Oguztoreli, M.N. (1988) Substrate Concentration Control in Bioreactors. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6, 67-150. <https://doi.org/10.1080/02648725.1988.10647846>
- [71] Smith, H.L. y Waltman, P.E. (1995) The theory of the chemostat: dynamics of microbial competition. Cambridge University Press, Cambridge ; New York, NY.
- [72] Dalgaard, P. y Koutsoumanis, K. (2001) Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *J Microbiol Methods*, 43, 183. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00219-0)
- [73] Jáuregui-Rincón, J. y Chávez-Vela, N.A. (2006) Glosario de Biotecnología. Primer edición. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- [74] Eibl, R., Eibl, D., Portner, R., Catapano, G. y Czemark, P., editores. (2009) Cell and tissue reaction engineering. Springer, Berlin.
- [75] Serrat-Díaz, M. y Méndez-Hernández, A.A. (2015) Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio. *RTQ*, 35, 362-75.
- [76] Asenjo, J.A. y Merchuk, J.C. (1995) Bioreactor system design. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- [77] SRS Communications. (2015) How to grow bacteria in a bioreactor. Saskatchewan Research Council. <https://www.src.sk.ca/blog/learning-how-grow-bacteria-bioreactor> Consultado: 20 de abril de 2018.
- [78] (2018) Scientific Surplus. Scientific Surplus L. L. C. <http://www.scientific-surplus.com/prodlist.asp?Cmd=2&ProductID=1168> Consultado: 16 de abril de 2018.
- [79] Deheyn, D. y Latz, M. (2012) Light Production from Marine Organisms. *Laboratory Journal*. <https://www.laboratory-journal.com/science/umwelt/light-production-marine-organisms> Consultado: 20 de abril de 2018.

- [80] Al-Dawery, S.K., Al-Anbari, H.A. y Ahmed, D.F. (2009) Nonlinear Adaptive Control of a pH Process. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*, 10, 9-16.
- [81] Malave-Orengo, J., Rubio-Marrero, E.N. y Rios-Velazquez, C. (2010) Isolation and characterization of bioluminescent bacteria from marine environments of Puerto Rico. *Current Research, Technology and Education Topics n Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 103-8.
- [82] Robertson, L.A., Figge, M.J. y Dunlap, P.V. (2010) Beijerinck and the bioluminescent bacteria: microbiological experiments in the late 19th and early 20th centuries. *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 185-94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01004.x>
- [83] Chiado, A., Bosco, F. y Marmo, L. (2011) Preliminary studies for the use of bioluminescent bacteria in the development of wireless biosensors for environmental monitoring. *Chemical Engineering Transactions*, 1351–1356. <https://doi.org/10.3303/CET1124226>
- [84] Kirillova, T.N., Gerasimova, M.A., Nemtseva, E.V. y Kudryasheva, N.S. (2011) Effect of halogenated fluorescent compounds on bioluminescent reactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 343-51. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4716-x>
- [85] Amachi, S., Kamagata, Y., Kanagawa, T. y Muramatsu, Y. (2001) Bacteria Mediate Methylation of Iodine in Marine and Terrestrial Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2718-22. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2718-2722.2001>
- [86] Amachi, S., Mishima, Y., Shinoyama, H., Muramatsu, Y. y Fujii, T. (2005) Active Transport and Accumulation of Iodide by Newly Isolated Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 741-5. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.741-745.2005>
- [87] López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S. y France, J. (2004) Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int J Food Microbiol*, 96, 289. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.026>