

COMUNICACIÓN CORTA

Cultivo de *Vibrio cholerae* 638 en condiciones de estrés salino

Yenisey Luna-González, Orlando Reyes-Zamora, Rafael Fando-Calzada y Armando T. Hernández-García.

Departamento de Bioquímica, Dirección de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de octubre de 2013

Aceptado: 29 de mayo de 2013

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, vacuna colérica, concentración salina, osmotolerancia.

Key words: *Vibrio cholerae*, vaccine candidate, salt concentration, osmotolerance.

El cólera es una enfermedad causada por la bacteria *Vibrio cholerae* y se caracteriza por una abundante diarrea acuosa, dicha enfermedad ha constituido un grave problema de salud desde el primer registro de pandemia en 1817. En 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó más de 220 000 casos de cólera y cerca de 5000 muertes en 45 países. Sin embargo, se cree que estos reportes están subestimados porque en muchos países donde el cólera es endémico, no se reportan los casos.¹

El cólera es endémico en el sur de Asia, en algunas partes de África y América Latina, donde se producen brotes estacionales.² Durante los últimos 20 años, la más elevada incidencia reportada pasó de América hacia África. Este último representó el 98 % de los casos reportados de cólera y el 99 % de muertes relacionadas con esta enfermedad durante el 2009.¹

La cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae* (VC 638) procede de una segunda generación de cepas modificadas genéticamente, derivada de la cepa virulenta C7258 *V. cholerae* 01 El Tor Ogawa, aislada durante la epidemia del Perú en 1991.^{3,5} Esta cepa fue seleccionada para desarrollar un candidato vacunal, al ser inmunogénica y poco reactogénica.⁶

En general, la cepa 638 se obtuvo mediante la eliminación de los genes que codifican para la toxina colérica y la inactivación posterior del gen *hapA*, que codifica para la principal proteasa soluble de *V. cholerae* (HA/Proteasa). Este efecto se logró mediante la inserción del gen *celA*, que codifica para la endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum*.^{7,8} Este gen heterólogo es un marcador adecuado para el desarrollo de vacunas vivas contra el cólera, ya que permite la distinción fácil e inequívoca de la bacteria marcada, lo cual facilita los estudios de campo.^{3,8}

Existen organismos adaptados a vivir en entornos hipersalinos, los cuales se denominan halófilos. Los microorganismos halófilos han desarrollado fundamentalmente dos mecanismos osmorreguladores diferentes para hacer frente a las fuerzas iónicas y al estrés osmótico: mantienen elevadas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica.⁹

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento de la cepa VC 638 en el medio de cultivo tripton-peptona (TP)¹⁰ suplementado con cloruro de sodio (NaCl) a concentraciones de 0,5 mol/L y 1 mol/L, de modo tal que el estrés hipersalino pudiera resultar de utilidad práctica al preparar las células para un posterior proceso de secado (liofilización).¹¹

Los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando erlenmeyers de volumen 250 mL y volumen efectivo 50 mL. A partir de un vial que contenía a la cepa 638 crioconservada (se encuentra almacenada en laboratorio a -70°C), se inocularon 10 µL en cuatro precultivos que contenían 5 mL de medio LB (Luria-Bertani), los cuales se incubaron a 37 °C durante toda la noche con agitación de 200 r/min. Todos los precultivos se mezclaron y de este homogenizado se tomó 1 mL, que se inoculó en cada uno de los erlenmeyers que contenían previamente el medio TP suplementado con las concentraciones antes mencionadas, y se incubaron en zaranda a 37 °C y 200 r/min (Fig. 1).

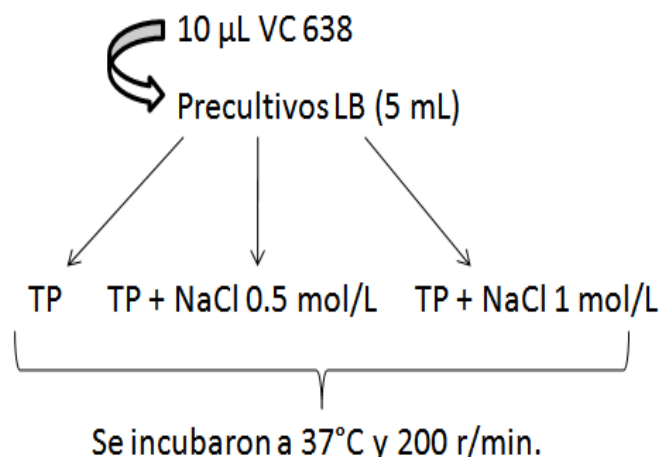


Fig. 1. Diagrama de flujo experimental.

Se tomaron muestras cada una hora (partiendo de tiempo 0 hasta 9 h) y se midió la absorbancia a 600 nm. Los datos obtenidos se graficaron con ayuda del programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). En la fase final del cultivo, a las 9 h se determinó la viabilidad, definiéndose el número de viables como la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), contadas en cada traza multiplicada por 100 y por la dilución, para definir las como UFC/mL.^{6,8} Las placas de LB se incubaron a 37 °C durante 15 h; después de este tiempo se contaron las colonias y se calculó la viabilidad. Los valores correspondientes al conteo de las colonias (unidades formadoras de colonias) se transformaron a logaritmo decimal para el análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía y el test a posteriori de Student Newman Keuls. En los experimentos, el cultivo desarrollado en el medio TP alcanzó la fase estacionaria entre las 4 y 5 h de cultivo y la absorbancia final entre 1,6 y 2,1 (Fig. 2). El comportamiento del cultivo, en el medio suplementado con NaCl 0,5 mol/L alcanzó la fase estacionaria entre las 5 y 6 h, a una absorbancia final entre 1,2 y 1,6. Este cultivo mostró un comportamiento cinético similar al observado en el medio TP (Fig. 2), pues al comparar las velocidades específicas de crecimiento, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Según prueba de Fisher para comparación de curvas ajustadas a un mismo modelo matemático.

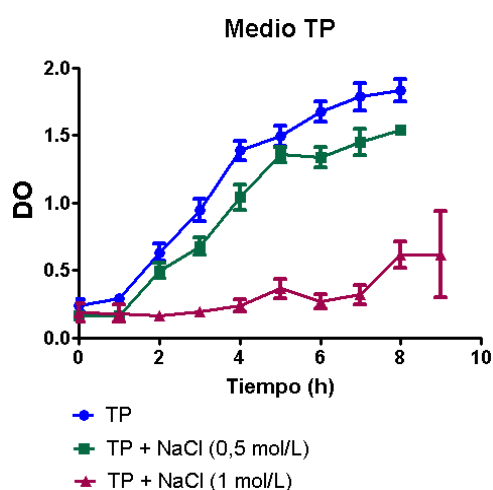


Fig. 2. Crecimiento de los cultivos suplementados con diferentes concentraciones de NaCl en medio TP.

En el caso del medio TP + NaCl 1 mol/L se observó un crecimiento muy lento, con apenas una tendencia exponencial, y una velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\max}$) menor en comparación con los otros medios evaluados, además de que en este medio, el microorganismo alcanzó una absorbancia a las 24 h de cultivo entre 1,3 y 2,0 (Fig. 2).

Tabla 1. Valores de velocidad específica de crecimiento de VC638 en los diferentes medios empleados.

Medios evaluados	$\mu_{\max}$ (h^{-1})
TP	$0,7863^a \pm 0,2009$
TP + NaCl 0,5 mol/L	$0,8592^a \pm 0,2303$
TP + NaCl 1 mol/L	$0,1656^b \pm 0,3797$

$\mu_{\max}$: Velocidad específica de crecimiento.

*En la tabla se declara el valor promedio ($\mu_{\max}$) $\pm$ el error estándar.

Letras iguales denota que no existen diferencias significativas ($\alpha = 0,05$).

Al final de los cultivos se procedió a realizar la viabilidad de cada uno de los experimentos, siguiendo el método descrito por Pérez-Reytor *et al.*¹² Se sembraron en placa las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Se calculó la viabilidad y se graficaron los resultados. Se detectó la actividad endoglucanasa, mediante la superposición de las colonias crecidas en las placas de LB con el indicador-CMC (0,7% de agarosa, 0,5% CM-celulosa en fosfato citrato de pH 6,3), como lo describe Ledón *et al.* Las colonias positivas se visualizaron como colonias rojas rodeadas por un halo transparente en el fondo rojo de la placa.¹³ La prueba de comparación de student Newman-Keuls arrojó que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto al número de colonias al final del cultivo entre el medio TP y TP suplementado con NaCl 0,5 mol/L; mientras que en el caso de TP + NaCl 1 mol/L, se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) en el crecimiento (Fig. 3).

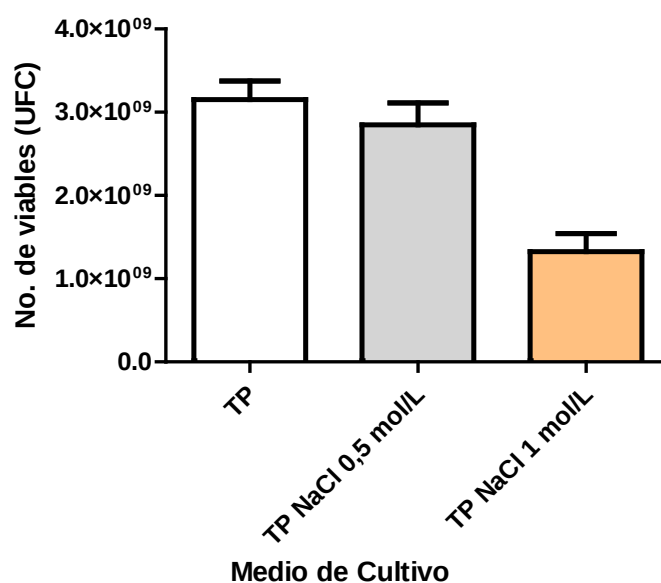


Fig. 3. Comparación entre las viabilidades finales de los cultivos de VC 638 en diferentes medios con concentraciones crecientes de NaCl.

Esto pudiera deberse al hecho de que el medio TP suplementado con NaCl 1mol/L requiere un mayor tiempo para que *Vibrio cholerae* pueda adaptarse a las condiciones salinas, así como para sintetizar sustancias osmorreguladoras. Por otro lado, para cada microorganismo existe una concentración inhibidora del crecimiento, por lo que es muy probable que la correspondiente a 1 mol/L esté cercana a esta concentración.¹⁴ A partir de la información obtenida en estos experimentos, se concluye que es factible cultivar *V. cholerae* 638 en medio TP suplementado con NaCl 0,5 mol/L, lo cual constituye la antesala de la investigación en cuanto a evaluar los efectos de estas condiciones de cultivo en la tolerancia a la desecación de esta cepa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abade A, Oundo J, Kariuki SM, Boga HI, Sharif SK, Akhwale W *et al.* Molecular Epidemiology of Geographically Dispersed *Vibrio cholerae*, Kenya, January 2009-May 2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2012; 18(6):925-931.
2. Taneja N, Sangar G, Chowdhury G, Ramamurthy T, Mishra A. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* causing outbreaks sporadic cholera in northern India. *Indian J Med Res*. 2012; 136(4): 656-663
3. Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F. Live attenuated oral cholera vaccines. *Expert Rev Vacc*. 2006; 5(4):483-49.
4. Liang W, Wang S, Yu F, Zhang L, Qi G, Liu Y, *et al.* Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect Immun*. 2003; 71(10): 5498-5504.
5. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Año G, *et al.* The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infect Immun*. 2005; 73(5):3018-24.
6. Díaz M, Pérez A, Fernández R, Bravo L, García H, Valera R, *et al.* Ensayo clínico de reto, para evaluar una cepa candidata a vacuna contra el cólera. *Revista Cubana de Medicina Tropical Pedro Kourí*. 2010; 62(3):194-199.
7. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, *et al.* Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine*. 1996; 14(16):1517-1522.
8. Cornet P, Millet J, Beguin P y Aubert JP. Characterization of two cel (cellulose degrading) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases. *Biotechnology*. 1983; 1:589-594.
9. González-Hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol*. 2002; 44(3-4):137-156.
10. Talavera A, Año G, García H, Moreira T, Delgado H, Riveron L, *et al.* Process development for a Cuban cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholerae* 638. *Vaccine*. 2006; 24 (18): 3746-3749.
11. García de Castro A, Bredholt H, Strom AR, Tunnacliffe A. Anhydrobiotic Engineering of Gram-Negative bacteria. *Appl Environm Microbiol*. 2000; 66:4142-4144.
12. Pérez-Reytor DC, Domínguez-Vázquez I, Olano-Ruiz E, Sosa-Espinosa AE. Estrategia de verificación de calidad de las cepas de *Escherichia coli* conservadas en la Colección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. *Revista en línea. Vaccimonitor* 2010; 199-15. Consultado el 10 de enero 2013. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=203414614002>.
13. Ledón T, Valle E, Valmaseda T, Cedré B, Campos J, Rodríguez BL *et al.* Construction and characterisation of O139 cholera vaccine candidates. *Vaccine*. 2003; 21: 1282-1291.

14. Kunte HJ. Osmoregulation in Bacteria: Compatible Solute Accumulation and Osmosensing. *Environ. Chem.* 2006; 3: 94-99.