

USO DEL BROMURO DE CETILTRIMETIL AMONIO EN LA CUANTIFICACION DE BACTERIAS AMONIFICADORAS HERPOBENTICAS MEDIANTE LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

Rubén Sommaruga

Facultad de Humanidades y Ciencias,
Dpto. de Hidrobiología, Sección Limnología,
Tristán Narvaja, 1674, Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

Sommaruga, R. 1987. Uso del Bromuro de Cetiltrimetil Amonio en la cuantificación de bacterias amonificadoras herpobénticas mediante la técnica del número más probable. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 18 (1): 71 - 75 .

El uso de este surfactante aumenta la recuperación de células viables, en comparación al control. Posiblemente, la acción de este agente químico sea a nivel de cápsula bacteriana, precipitando sus principales constituyentes, produciendo el desprendimiento entre bacterias y partículas del sedimento.

ABSTRACT

Sommaruga, R. 1987. Use of Cetyltrimethylammonium Bromide in the enumeration of Herpobenthic ammonifying bacteria by the most probable number technic. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 18 (1): 71 - 75 .

The use of this surfactant increases the recovery of viable cells compared to the control. It is set as an hypothesis that the action of this chemical agent takes place at the bacterial capsule level, precipitating its main constituents and causing the bacteria to detach themselves from the particles in the sediment.

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo, la técnica probabilística conocida como Número Más Probable (NMP), ha sido utilizada en bacteriología acuática, principalmente en bacteriología sanitaria y en la cuantificación de grupos fisiológicos. Aunque muchas veces fue objeto de crítica por poseer baja precisión, constituye uno de los pocos métodos

que puede estimar el error con el cual trabaja y que utilizado con ciertas precauciones, resulta una herramienta indispensable para el bacteriólogo acuático⁵.

Las nuevas técnicas de cuantificación, como por ejemplo el uso de la microscopía de epifluorescencia y tinción con naranja de acridina, han sido aplicadas al conteo de bacterias del sedimento^{2,8,17}. Sin embargo, son incapaces de diferenciar y cuantificar grupos fisiológicos. Por lo que aún hoy el NMP sigue siendo utilizado para estudios ecológicos en sedimentos y suelos¹.

Los problemas metodológicos en la cuantificación de poblaciones bacterianas del sedimento están relacionados principalmente con la subestimación causada por los procesos de adherencia entre las partículas del sedimento y las bacterias. Estos procesos son complejos y Campbell³ los resume dividiéndolos en tres fases. La primera, adsorción, es física o química y gobernada principalmente por fuerzas de atracción del tipo de van der Waals o de repulsión, la siguiente es la adhesión en donde se logra estabilizar la unión mediante la secreción de proteínas, polisacáridos o una matriz glicoproteica. Por último se produce o no la colonización de la superficie.

El presente trabajo tiene por objetivo estudiar la acción del bromuro de cetiltrimetil amonio (BCTA), en la disminución de la subestimación en la cuantificación de bacterias amonificadoras herpobénticas, mediante la técnica del NMP. El BCTA es un detergente catiónico de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$, para el cual se conoce su acción precipitante de ácidos nucleicos y mucopolisacáridos^{4,15}. El término herpobénticas se refiere a aquellos organismos que crecen en o sobre el fango fácilmente penetrable y es el acuñado por Hutchinson¹³ y recomendado por Jones¹⁴.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de sedimento de la parte central (ca. 8m) del lago artificial reciente "TonTon", Canelones, Uruguay (34° 51' S, 56° 02' W), fueron obtenidas durante el verano y otoño de 1986. Este lago tiene características eutróficas y durante el período de muestreo presentó un hipolimnion en condiciones anóxicas y subóxicas. Algunas características del sedimento se pueden observar en Cuadro 1. El sedimento fue muestreado mediante buceo autónomo, utilizándose núcleos (corer) de acrílico (50 cm de largo, 5 cm de diámetro interno y 6 cm de diámetro externo). Los núcleos fueron conservados en frío hasta su posterior procesamiento. El sedimento utilizado en los experimentos fue el comprendido entre 0 y 6 cm siendo cortado en secciones de 1 cm de espesor bajo condiciones asépticas y colocados en cajas de Petri estériles. Luego de uno de los segmentos escogidos, 1g de sedimento húmedo fue colocado en el primer blanco de dilución, conteniendo en uno de los casos BCTA (Sigm Chemical Co., St. Louis, MO.) a una concentración final de 0,00001 o/o (v/v)

Cuadro 1
Características del sedimento

Segmento del sedimento (cm)	Porosidad (o/o p/p)	Pérdida en peso a 500° C (o/o)	C orgánica (u-mol/g)	N orgánico (u-mol/g)	Md ϕ (mm)	Color
0 - 3	83	14,0	3145	290	0,022	Negro
3 - 6	70	7,2	2908	221	0,030	Negro
6 - 9	45	2,8	2527	133	0,060	Gris-verdoso
9 - 12	20	0,5	601	57	0,110	Blanco-grisáceo

y en el control peptona al 0,10/o. Las otras diluciones fueron hechas en ambos casos en peptona a igual concentración. Después de una enérgica agitación a mano (30''), 5 tubos conteniendo 5 ml de un medio que tenía una constitución por litro: 5g de Bacto-peptona (Difco Laboratories, Detroit Mich.) y 100 ml de un extracto líquido filtrado de los sedimentos del lugar (concentración final de amonio 0,2 M), fueron inoculados con 1 ml de cada dilución 1:6 e incubados por 7 días a 20°C. Al final de este período los tubos en los cuales existía turbidez y producción de amonio, indicado por la adición de reactivo de Nessler, fueron considerados como positivos. El NMP se obtuvo mediante la utilización del programa en lenguaje BASIC de Hurley & Roscoe¹². La relación peso húmedo: peso seco no fue calculada, considerándose que el sedimento utilizado en cada experimento era homogéneo en cuanto al contenido de agua para todas las submuestras de un mismo nivel. La presencia de cápsula fue observada mediante el uso de la tinción con tinta china⁹ sobre frotis realizados de todas las submuestras. Las características de crecimiento en los tubos también fueron observadas. El test de Student's fue realizado sobre los datos transformados en base al \log_{10} y el valor t calculado, corregido por finitud¹⁹.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados presentados en Cuadro 2, indican que las submuestras tratadas con BCTA, en el primer blanco de dilución presentan diferencias significativas superiores al 950/o en comparación al control con peptona al 0,10/o, siendo los conteos con BCTA superiores.

Scheraga *et al*¹⁸, estudiaron la acción que tenían diversos agentes en la recuperación de células viables en sistemas modelos, utilizando conteos por microscopía, en placa y estimación de ATP. De todos los agentes estudiados el BCTA produjo un aumento en la recuperación de hasta un 58 0/o dependiendo de la bacteria testada, resultando recomendable para bacterias no marinas. Sin embargo, a la concentración utilizada más efectiva 0,0001 0/o (v/v), encontraron que a pesar de aumentar la recuperación, la concentración utilizada constituía un factor crítico, puesto que la acción del detergente puede ser negativa.

Cuadro 2
Comparación entre el conteo de bacterias amonificadoras usando BCTA en el primer blanco de dilución y el control.

Experimento número	Tratamiento	$\bar{x} \pm D.E.$ \log_{10} NMP	Valor - t g.l. = 8
1	BCTA	4,40 \pm 0,36	2,72 *
	Control	3,81 \pm 0,30	
2	BCTA	4,58 \pm 0,40	2,44 *
	Control	4,08 \pm 0,35	
3	BCTA	4,43 \pm 0,35	3,03 *
	Control	3,81 \pm 0,29	

* Conteos significativamente diferentes determinado por el t - test ($p < 0,05$).

Durante los experimentos realizados, la concentración utilizada 0,00001 o/o (v/v) nunca produjo resultados negativos con respecto al control. El crecimiento bacteriano en el medio líquido, fue característico en la mayoría de los tubos, formando un collar de células en su pared interior, en la interfase líquido-aire. Esta característica, indica la tendencia a agregarse en suspensión, adhiriéndose así entre ellas y a la superficie. La presencia de cápsula bacteriana fue confirmada en todos los casos.

Costerton⁷ cita varios trabajos referidos en la literatura, realizados en varios ambientes naturales, en donde se demuestra que todas las bacterias están recubiertas por un glicocálix extracelular. En ambientes acuáticos los exopolímeros microbianos ocurren comúnmente como cápsulas discretas, firmemente adheridas a la superficie celular o como una capa limosa débilmente, o no asociada a la célula^{1,6}. Algunos de estos polímeros superficiales integrantes de las cápsulas, como lo son los exopolisacáridos, pueden actuar como adhesivos en las interacciones de adsorción^{6,10,11}.

Recientemente Platt *et al*¹⁶, aislaron y analizaron parcialmente los constituyentes químicos del material exopolimérico de una bacteria de sedimento de agua dulce. Este exopolímero, estaba constituido por proteínas, polisacáridos y ADN.

Debido a que el BCTA tiene una acción precipitante sobre ácidos nucleicos y mucopolisacáridos parece probable que la acción de éste, sea a nivel de la cápsula bacteriana, precipitando los principales constituyentes de ésta, produciendo así la desadherencia entre bacterias y partículas del sedimento.

AGRADECIMIENTOS

A Ramón de León por la obtención de las muestras y al Dr. Ronald Benner del Departamento de Microbiología de la Universidad de Georgia por la corrección crítica del trabajo.

REFERENCIAS

1. Belsen, L.W. y E.L. Mays. 1982. Use for nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 945 - 948.
2. Bühner, H. 1977. Verbesserte acidinorange methode zur direktzahlung von bakterien aus seesediment. *Schweiz. z. Hydrol.*, **39**: 99 - 103.
3. Campbell, R. 1983. Microbial ecology. *Blackwell Scientific Publication*, London, 185 p.
4. Clausen, J. y G. Asboe-Hansen. 1966. Urinary acid mucopolysaccharides in mastocytosis. A new technique for quantitative estimation. *Clin. Chim. Acta*, **13**: 475 - 483.
5. Colwell, R.R. 1979. Enumeration of specific populations by the most probable number (MPN) method. (p. 56 - 61). En: Costerton, J.W. y R. R. Colwell (eds.). Native aquatic bacteria enumeration, activity and ecology, ASTM STP 695. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, 219 p.
6. Costerton, J.W., G.G. Geesey y K. J. Cheng. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86 - 95.
7. Costerton, J.W. 1984. Direct ultrastructural examination of adherent bacterial populations in natural and pathogenic ecosystems, (p. 115 - 123) En: Klug, M.J. y C.A. Reddy (eds.). *Current perspectives in microbial ecology*. *American Society for Microbiology*, Washington,

8. Dale, N. G. 1974. Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution. *Limnol. Oceanogr.*, 19: 509 – 518.
9. Duguid, J. P. y J. F. Wilkinson. 1953. The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 9: 174 – 189.
10. Fletcher, M.M. y G.D. Floodgate. 1973. An electronic microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.*, 74: 325 – 334.
11. Fletcher, M.M. y S. Mc Eldowney. 1984. Microbial attachment to non-biological surfaces. (p. 124 – 129). En: Klug, M.J. y C.A. Reddy (eds.). *Current perspectives in microbial ecology. American Society for Microbiology*, Washington.
12. Hurley, M.A. y M.E. Roscoe. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J. Appl. Bacteriol.*, 55: 159 – 164.
13. Hutchinson, G.E. 1975. A treatise on Limnology, III, Limnological Botany, *John Wiley & Sons*, New York, 660 p.
14. Jones, J.G. 1977. The study of aquatic microbial communities. (p. 1 – 25). En: Skinner, F.A. y J.M. Shewan (eds.). *Aquatic microbiology. Academic Press*, London, 370 p.
15. Morimoto, H., P.A. Ferchmin y E.L. Bennett. 1974. Spectrophotometric analysis of RNA and DNA using cetyltrimethylammonium bromide. *Anal. Biochem.*, 62: 436 – 448.
16. Platt, R.M., G.G. Geesey, J.D. Davis y D.C. White. 1985. Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can. J. Microbiol.*, 31: 675 – 680.
17. Rublee, P.A. y B.E. Dornseif. 1978. Direct counts of bacteria on the sediment of a north Carolina salt marsh. *Estuaries*, 1: 188 – 191.
18. Scheraga, M., M. Meskili y C.D. Litchfield. 1979. Analysis of methods for the quantitative recovery of bacteria sorbed onto marine sediments (p. 21 – 30). En: Litchfield, C.D. y P.L. Seyfried (eds.). *Methodology of biomass determinations and microbial activities in sediments, ASTM STP 673. American Society for Testing and Materials*, Philadelphia,
19. Yamane, T. 1973. Statistics: An introductory analysis. *Harper & Row* (eds.), New York, 767 p.

Recibido / Received / : 30 setiembre 1987