

La saponina como agente selectivo en la diferenciación de las bacterias rojas halofílicas

Dr. Víctor H. Bertullo

INTRODUCCION

El grupo de bacterias rojas halofílicas subsisten en la sal o alteran los productos salados en clara simbiosis y muchas veces resulta ardua su separación, cuando se desea purificar los cultivos.

Dussault (4) comunica la acción selectiva de la bilis de buey, sobre ambas especies, comprobando que a bajas concentraciones inhibe el crecimiento de **Pseudomonas salinaria**, mientras que **Sarcina littoralis**, la tolera en mayor nivel.

El mismo autor (5) propone para el método de inmersión y el de dilución en agar, 100 y 1.000 p.p.m. de bilis, para hacer una diferenciación selectiva.

Bertullo y Pérez Hettich (3) encuentran que la saponina, el oleato de sodio y el esteato de zinc, inhiben el crecimiento de **Pseudomonas spp.** y **Halobacterium spp.** en una concentración variable entre 40 y 250 p.p.m., mientras que no lo hace con **Sarcina spp.** al 1 %, excepto con el estearato de zinc y comunican que dichas sustancias pueden utilizarse como elementos selectivos.

La finalidad de esta comunicación, es dar a conocer los resultados obtenidos con la saponina.

(1) Profesor de Tecnología Pesquera. Jefe del Depto. de Investigaciones Pesqueras y Biología Marina de la Facultad de Veterinaria de Montevideo.

MATERIAL Y METODO

1) Para nuestra investigación utilizamos un cultivo de **Pseudomonas salinaria** (Harrisson y Kennedy) enviada gentilmente por el Dr. Gibbons de Canadá y dos cultivos de bacterias H 26 y H 48 (6) **Halobacterium spp.** enviados por el Dr. Sreenivasan de India, así como también un cultivo de **Sarcina littoralis** (Poulsen) proporcionado por Gibbons y un cultivo de **Sarcina sreenivasani** (2) de los que mantenemos en nuestro laboratorio.

2) Como medio de cultivo utilizamos el que recomienda Baxter y Gibbons (1) compuesto de la manera siguiente: ácidos casamino, 5 grs.; extracto de levadura, 5 grs.; proteosa peptona, 5 grs.; citrato trisódico, 2 grs.; cloruro de potasio, 2 grs.; sulfato de magnesio $7 H_2O$, 20 grs.; cloruro de sodio, 200 grs. agua destilada, 1.000 mls. con el agregado del 3 % (tres por ciento) de agar-agar, por encontrar que no sólo llena todos los requerimientos nutricionales de las bacterias que en él crecen, sino que también por tolerar perfectamente la adición de la saponina.

3) La saponina agregada en la proporción del 0,5 %, previamente a la esterilización del medio de cultivo, procede de Merck, Alemania.

4) Los ácidos casamino, extracto de levadura, proteosa-peptona, y agar-agar son de los Laboratorios Difco, de los Estados Unidos de América.

5) La temperatura de incubación fue en todo momento de 37° C., siempre que no se determine de otra manera.

RESULTADOS

a) La siembra de los cultivos puros de las formas bacteriaceas, **Pseudomonas salinaria**, y **Halobacterium spp (H26 y H48)** en el medio con saponina, fue negativa durante los quince días a que los cultivos fueron sometidos a observación, mientras que **Sarcina littoralis** y **S. sreenivasani** inician su crecimiento a las 24 hs. según lo comprobamos con la observación por lupa de aumento.

b) Cultivos de **Ps. salinaria** y **Halobacterium H26 y H48** fueron mezclados separadamente con **Sarcina littoralis** y **S. Sreenivasani**, utilizando para tal finalidad una solución estéril de cloruro de sodio al 20 %, agitados vigorosamente durante un minuto y sembrados desde I a IV gotas de la suspensión, en el medio ya estuviese éste en pico de flauta o en caja de Petri para así aumentar la superficie de siembra. A los efectos de control, hicimos igual siembra en el medio de Baxter y Gibbons, sin saponina.

En todos los casos, sólo comprobamos el crecimiento de **Sarcina**

spp, mientras que en los testigos aparecieron mezclados ambos cultivos.

c) Mezclamos cultivos de **Pseudomonas salinaria** y **Halobacterium H26** y **H48**, con cultivos de **Sarcina littoralis** y **S. sreenivasani**, en forma tal que una forma bacteriacea estuviese con las dos cocáceas, procediendo luego igual que en (b).

Los resultados fueron similares, siendo posible separar luego ambas especies de **Sarcina**, por sus características culturales.

d) Los sub-cultivos de **Sarcina littoralis** y **S. sreenivasani**, demostraron no haber sufrido alteración o modificación alguna de los caracteres fisiológicos que los distinguen.

e) Se suspendieron en el medio normal de Baxter y Gibbons adicionado de Saponina al 0,5% cultivos de **Pseudomonas salinaria**, **Halobacterium H26** y **H48**, durante cinco horas y de hora en hora, se fueron tomando muestras representativas que se sembraron y cultivaron como en (a). Los cultivos resultaron estériles durante los 15 días de observación en todos los casos. También se efectuaron observaciones microscópicas durante esos lapsos.

DISCUSION

La saponina tiene aparentemente un efecto letal sobre las formas bacteriáceas del grupo de bacterias rojas halofílicas, inhibiendo su crecimiento en los medios de cultivo que se encuentra presente. Dicho efecto se comprueba al suspender cultivos de los citados organismos, en soluciones de cloruro de sodio al 20% adicionadas de saponina al 0,5% y efectuando observaciones microscópica entre las una y cinco horas. Puede comprobarse que se producen dentro de ese tiempo, plasmoptosis y plasmolisis de las células y que los cultivos sub-siguientes resultan estériles.

Es muy probable que la acción batotona de la saponina, sea la causa determinante de este hecho. No sucede lo mismo con las formas cocáceas, sarcina en este caso, que luego de quince días de permanecer en contacto con la saponina, mantienen sus características culturales y fisiológicas. Debe jugar aquí entre ambas especies de organismos un problema de permeabilidad de la pared celular, unido al de la baja de la tensión superficial.

Por lo expuesto, la saponina permite un amplio lapso para proceder a la separación de las formas cocáceas y bacteriáceas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La adición de 0,5% (medio por ciento) de saponina a los medios de cultivos específicos para bacterias rojas halofílicas, determina que las formas bacteriáceas, se inhiban en su crecimiento, proporcionando una manera de separar éstas de las formas cocáceas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1) BAXTER, R. M. y GIBBONS, N. E. — The glicerol dehidrogenases of *Pseudomonas salinaria*, *Vibrio costicolus* and *Escherichia coli* in relation to bacterial halophilism. *Canadian Jour. of Bioch. and Physiol.* **32**: 206-217 (N. R. C. N° 3240) 1954.
- 2) BERTULLO, V. H. y PEREZ HETTICH, F. — *Sarcina sreenivassani*, n. sp. bacteria productora del "rojo" en las salazones de pescado en el Uruguay. *An. Fac. Vet. de Montevideo*, VII N° 5): 73-81. 1957.
- 3) BERTULLO, V. H. y PEREZ HETTICH, F. — Efectos de la Saponina Oleato de sodio y Estearato de zinc, sobre las bacterias rojas halofílicas. *An. Fac. de Montevideo*: VIII N° 6): 139-144. 1958.
- 4) DUSSAULT, H. P. — Study of Red Halophylic Bacteria in Solar salt and Salted Fish. I. Effect of Bacto-Oxgall. *J. Fish. Res. Bd.* **13** (2): 183-194. 1956.
- 5) DUSSAULT, H. P. — Study of Red Halophilic Bacteria in Solar Salt ant Salted Fish. II. Bacto-Oxgall as a selective Agent for Differentiation. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **13** (2): 195-199. 1956.
- 6) VENKATARAMAN, R. y SREENIVASAN, A. — Further studies on the red halophilic bacteria from solar salt and salted fish. *Proceed. Indian Acad. of Sc.* XLIII, N° 3, Sec. B: 197-206. 1956.