



DESARROLLO DEL METODO CINÉTICO BIOLUMINISCENTE PARA ESTIMACIÓN SELECTIVA DE CONTAMINACIÓN FECAL EN EL AGUA

Federico Cerda Ramírez* (1), Anita Jael Casas Reyes (2), Deyanira Álvarez Ramírez (2), Yolanda Garza García (2), Anna Ilyiná* (2)

(1) Centro de investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna 140, C.P. 25100, Col. Saltillo-400, Saltillo, Coahuila, México. Fax 844 4389838, E-mail: fcерda@ciga.mx

(2) Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, México. Fax: 844-415-95-34 E-mail: anna_ilina@hotmail.com

Palabras clave: detección bioluminiscente de ATP, E. coli, colicina E₁.

Introducción. Las estadísticas demuestran que un número significativo de enfermedades son transmitidas por el agua. El indicador de contaminación de agua más ampliamente utilizado es el grupo de organismos coliformes (1). La afirmación de la presencia de coliformes fecales se realiza evidenciando la presencia de organismos de especie *Escherichia coli* (1). Los métodos microbiológicos (de NOM y los que utilizan los medios con indicadores de actividad enzimática) son costosos en términos de medios, materiales de vidrio y equipamientos utilizados, así como en términos de consumo de tiempo (por ejemplo, el medio de NOM requiere de 24 a 48 horas), la necesidad trabajar en condiciones de esterilidad y contar con un entrenamiento especializado del personal. Esto hace indispensable el desarrollo de una técnica que debe ser más rápida, menos laboriosa y menos costosa. El presente proyecto pretende resolver este problema mediante el método bioluminiscente de detección y cuantificación rápida de microorganismos. El método bioluminiscente está basado en la reacción entre la enzima luciferasa y el ATP (adenosin-tri-fosfato). Su uso actualmente está limitado por la sensibilidad de detección de ATP y selectividad de liberación de éste (2).

En el presente trabajo se propuso demostrar que la evaluación de la cinética de cambio de la concentración de ATP durante 8-10 horas en las muestras sometidas a la identificación de la presencia de *E. coli* (en un medio selectivo a 44°C), permite la cuantificación selectiva de este indicador de contaminación fecal a pesar de las concentraciones iniciales bajas de las bacterias en cuestión. Además, la liberación de ATP mediante el uso de colicina E₁ (bacteriocina que actúa sobre enterobacterias) permite aumentar la selectividad de la detección.

Metodología. La detección de ATP se acopló a la evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa patrón *E. coli* (BD bactrol plus ATCC 25922). Para establecer la relación entre ATP, UFC y NMP, la biomasa separada después de cierto tiempo de la propagación del cultivo se aplicó para la evaluación del ATP por el método bioluminiscente con el uso de el kit de Sigma y en ensayos convencionales. Para detección de ATP, las células se lisaron con dimetil sulfóxido (DMSO) o con colicina E₁ (3) realizando una dilución de 1:9 (suspensión celular: DMSO, v/v) o 1:2:7 (células:vanadato 0.05 mM: colicina 143 U/ml). El cálculo de ATP se efectuó a partir de la curva de calibración

(unidades relativas de luminiscencia (URL) vs ATP estándar) obtenida en el mismo día del ensayo con el mismo preparado de luciferina-luciferasa. En la detección se utilizó el luminómetro Promega TD-20/20.

Resultados y discusión. Partiendo de un inóculo preparado en caldo nutritivo (considerado como un medio sin lactosa) se observó que el incremento en concentración de ATP es apreciable ya después de 3 horas de incubación. La fase exponencial de crecimiento comprende 4 horas posteriores, mientras que después de 8 h de incubación se observa disminución de ATP. Se observó una correlación entre cinéticas obtenidas con el uso de DMSO y colicina. La linearización de la parte exponencial de cinética en fase exponencial permitió aproximar el valor de ATP inicial (ATP₀) que fue posible convertir en UFC/ml y NMP utilizando los factores de relación ATP/UFC y ATP/NMP establecidos en los ensayos efectuados.

Conclusiones. Se demostró que la evaluación de la cinética de crecimiento en un medio selectivo mediante la técnica bioluminiscente de detección de ATP y/o aplicación de colicina E₁ en calidad de agente lisante permite la estimación cualitativa del contenido de *E. coli* considerado como indicador de contaminación fecal. El método permite aumentar la sensibilidad de detección, así como su selectividad, reduciendo tiempo de análisis hasta 8 horas.

Agradecimiento. Al proyecto SEMARNAT-CONACYT 2002-C01-0152-A1.

Bibliografía.

- 1.- NOM-AA-42-1987, Calidad del agua-determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva.
- 2.- Trudil D., Loomis L., Pabon R., Hasan J.A.K. y Trudil C.L. 2000. Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples. *Moscow University Chemistry Bulletin, (Vestnik Moskovskogo Universiteta. Serie 2. Khimiya.)* 41Supp. (6): 27-29.
- 3.- Ilyiná A., Casas Reyes A.J., Alvarez Ramírez D., Angela Deyanira Téllez Ortíz, Virgilio Cepeda Irruegas, Federico Cerda Ramírez. 2004. Using of colicin to develop the bioluminescent method for *E.coli* detection. Artículo *in extenso* en "Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries" Durango, México. Junio 20-23 de 2004. 6 pag.