

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

FACULTAD
DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

GIBBONSIELLA SALINA Y *ELAZARIELLA EURIHALINA*
DOS NUEVAS BACTERIAS HALOFILAS MODERADAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1988 a 1989

Folio

Número

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.^{ña} MARIA JOSE VALDERRAMA CONDE el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "DOS NUEVAS BACTERIAS HA'DOELLAS MODERADAS"

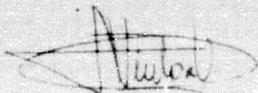
Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de APTO CUM LAUDE

Granada, 11 de Septiembre de 1989

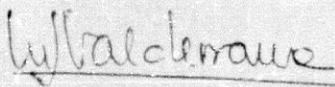
EL PRESIDENTE,



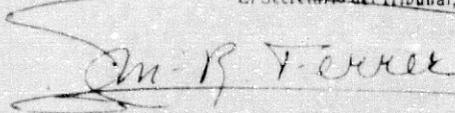
El Vocal,



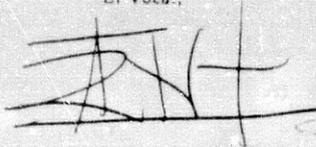
Firma del Graduado,



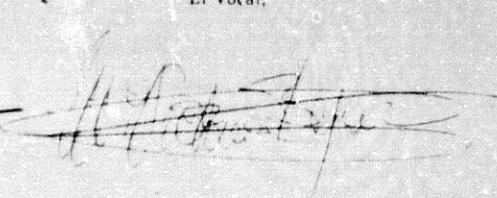
El Secretario del Tribunal,



El Vocal,



El Vocal,



INVESTIDURA . .) En el día de la fecha se ha conferido a D. _____ el Grado de Doctor en la Facultad de _____, conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, de _____ de 19 _____

EL DECANO

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, de _____ de 19 _____

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO,

Granada 11 de Julio de 1.989

Memoria presentada por
la Loda. en Farmacia M^a José
Valderrama Conde para aspirar
al grado de Doctor en Farmacia
por la Universidad de Granada

LOS DIRECTORES

Prof. Dr. Alberto Ramos Cormenzana

Prof. Dr. Emilia Quesada Arroquia.

Catedrático de Microbiología
de la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Granada

Prof. Titular de Microbiología
de la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Granada

Durante la realización de la presente Tesis doctoral la aspirante ha disfrutado de una Beca de Formación del Personal Investigador otorgada por la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en el "EMBO-FEMS Workshop on the molecular basis of haloadaptation in microorganisms" (Obermachtal, RFA, Septiembre 1985), en el X Congreso Nacional de Microbiología (Valencia, Octubre de 1985), en el XIV Congreso Internacional de Microbiología (Manchester, UK, Septiembre de 1986) y en el Simposio "The Microbiology of extreme environments and its biotechnological potential" celebrado en Troia (Portugal) en Septiembre de 1988. Otros resultados se hayan aceptados para su presentación en el XII Congreso Nacional de Microbiología a celebrar en Pamplona, en Septiembre de 1989.

Así mismo, de esta Tesis se ha extraído el trabajo "Numerical Taxonomy of moderately halophilic Gram-negative nonmotile eubacteria", publicado en la revista Systematic and Applied Microbiology, en 1987.

Pobres todas las palabras, quisiera que la presentación de esta Tesis sirviese como signo de gratitud a quienes han alentado y hecho posible su realización:

Al Prof. D. Alberto Ramos Cormenzana, director y crítico acertado.

A Emilia Quesada Arroquia, mi directora y maestra, espíritu y motor de esta tesis.

A Ana, Victoria y Marita, más que compañeras, amigas.

Deseo también dar las gracias:

A los Dres. Antonio Ventosa, M^a Teresa García y M^a Carmen Gutiérrez, del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Sevilla, por su ayuda en la realización de la Taxonomía Numérica y determinación del G+C, y por la realización de la hibridación de ácidos nucleicos.

A la Dra. Mercedes Monteoliva, por su colaboración en el estudio de los ácidos grasos celulares.

A los compañeros de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, donde se han llevado a cabo los estudios de microscopía electrónica.

A Lucía Sánchez, por el excelente trabajo de delineación.

A todos, gracias.

A mi madre

A mis hermanos

INDICE

I., INTRODUCCION	1
I.1. TAXONOMIA BACTERIANA	2
I.1.1. Taxonomía Numérica	5
I.1.2. Los ácidos nucleicos en la taxonomía bacteriana	7
I.1.3. Serología y Quimiotaxonomía	8
I.2. HALOFILISMO	9
I.2.1. Estado actual de la Taxonomía de los microorganismos halófilos moderados	13
a. Eubacterias quimiotrofas	14
b. Eubacterias fototrofas	27
c. Archeobacterias metanógenas	30
I.2.2. Fisiología de las Eubacterias halófilas moderadas	31
a. Requerimientos iónicos	36
b. Composición en solutos intracelulares	37
c. Enzimas	41
- Intracelulares	41
- Extracelulares	43
- Asociadas a la membrana citoplasmática	44
d. Envoltas celulares	45
- Glucopéptido	45
- Proteínas	45
- Lípidos	46
- Quinonas	49
e. Ribosomas y síntesis de proteínas	49
f. Respiración y Transporte activo	51
g. Plásmidos	52
h. Fagos de lisogenia	53
I.3. OBJETIVOS DEL TRABAJO	56

II. MATERIAL Y METODOS	59
II.1. MICROORGANISMOS	60
II.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS	63
II.3. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CEPAS	65
II.4. TAXONOMIA NUMERICA	65
II.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN G+C	71
II.6. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS	72
II.7. ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA CELULAR	74
II.8. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS	76
II.8.1. Determinación de la concentración óptima de sal para el crecimiento	76
II.8.2. Determinación de los requerimientos iónicos y salinos de las cepas	77
II.8.3. Estudio de la composición química celular	80
II.8.4. Estudio de la composición celular de ácidos grasos	83
III. RESULTADOS	86
III.1. TAXONOMIA NUMERICA Y CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LAS CEPAS	87
III.2. CONTENIDO EN G+C	97
III.3. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS	100
III.4. MORFOLOGIA CELULAR	103
III.5. FISILOGIA	108
III.5.1. Concentración óptima de sal para el crecimiento	108
III.5.2. Requerimientos iónicos y salinos	129
III.5.3. Composición química celular	130
III.5.4. Composición celular de ácidos grasos	133

IV. DISCUSION

137

V. CONCLUSIONES

165

VI. BIBLIOGRAFIA

167

I. INTRODUCCION

I.1.- TAXONOMIA BACTERIANA

La unidad taxonómica básica en la clasificación biológica es la especie. En términos generales una especie constituye un grupo de individuos que presentan un grado elevado de similitud fenotípica entre sí, siendo, al mismo tiempo, claramente diferenciable de los integrantes de otros conjuntos de este tipo (Stanier y col., 1984).

No sería posible el reconocimiento de especies si la variación natural fuese continua; sin embargo, la existencia de marcadas discontinuidades en el mundo biológico fue tempranamente establecida; de aquí que el concepto de especie como base del proceder taxonómico resulte funcional.

En el caso de los organismos que poseen reproducción sexual, puede definirse además en términos genéticos y evolutivos: la posibilidad de entrecruzamiento entre los individuos hace que el conjunto de genes propios de la especie sufra una redistribución continua, de forma que las mutaciones que determinan la variabilidad

fenotípica intraespecífica, se dispersen en el conjunto de la población. La aparición de nuevas especies se producirá, siguiendo una evolución divergente, por acumulación de diferencias fisiológicas en respuesta a un aislamiento geográfico, de forma que la reproducción sexual entre los individuos de grupos distintos ya no será posible. Así pues, una especie queda constituida por aquellos grupos de poblaciones que se intercrucan, que están reproductivamente aislados de otros grupos semejantes (Mayr, 1963); definición que supone, de hecho, una explicación de las discontinuidades existentes entre las especies en la naturaleza.

No obstante, este concepto de especie es totalmente inaplicable en sistemática bacteriana, debido al carácter haploide de los microorganismos y a su reproducción eminentemente asexual. Una especie bacteriana no puede considerarse como una comunidad de reproducción, ya que las células hijas resultantes del proceso de división de una célula bacteriana son libres de evolucionar de forma divergente. Aunque las bacterias pueden intercambiar material genético entre sí mediante procesos de transformación, conjugación y transducción, éstos ocurren de hecho de forma irregular, ocasional y altamente inespecífica. Los cambios mutacionales, por otra parte, se producen con demasiada rapidez como para considerar los nuevos caracteres originados como base de diferenciación de especies (Stanier y col., 1984).

No es posible, por tanto, contar con una base teórica para asumir que la evolución bacteriana ha llevado a discontinuidades fenotípicas tales que justifiquen el establecimiento de especies, como ocurre en organismos con reproducción sexual. Sin embargo la experiencia de los microbiólogos taxónomos ha demostrado que, cuando se estudian a fondo muchas cepas de un grupo microbiano determinado, pueden distribuirse en una serie de agrupamientos discontinuos definidos en taxonomía como especies (Stanier y col., 1984).

Los métodos tradicionales de clasificación de bacterias se basaban en la caracterización lo más amplia posible de las cepas en estudio (incluyendo no sólo su morfología, sino también propiedades

bioquímicas, fisiológicas y estructurales), seguida de una ordenación en grupos según el juicio intuitivo del propio investigador.

Este tipo de enfoque ha planteado diversos problemas derivados, por ejemplo, de la concesión de un valor excesivo a determinados caracteres (como los morfológicos o ciertas actividades bioquímicas) frente a otros; o también, por la aparición de un número elevado de cepas atípicas relacionadas con un grupo previamente definido. A pesar de ello, muchas de las clasificaciones así establecidas han sobrevivido al escrutinio de los métodos modernos, gracias a la acertada labor de taxónomos expertos capaces de captar el volumen total de datos y la correlación entre los mismos que lleva a definir una especie.

Frente a este tipo de clasificaciones "artificiales" o "prácticas", basadas exclusivamente en caracteres fenotípicos, se encuentran los sistemas de clasificación "naturales" o "filogenéticos" que se fundamentan en el agrupamiento de los organismos en función de sus afinidades evolutivas. Aunque la aplicación de técnicas genéticas a los estudios de taxonomía bacteriana parece aportar una valiosa información al conocimiento de la filogenia de procariontes, desafortunadamente los datos disponibles no son uniformes, por lo que la interpretación de los mismos no ha sido siempre esclarecedora.

Por el momento, aunque asumida la discreta afirmación de Stackebrandt y Woese (1981) "...la clasificación bacteriana que poseemos probablemente no esté muy de acuerdo con las relaciones naturales que existen entre los organismos", la mayor parte de los taxónomos fundamentan sus estudios en cien años de experiencia, razonable garantía del grado de permanencia de los caracteres fenotípicos que describen las especies (Murray, 1984).

P.1.1.- TAXONOMIA NUMERICA

La Taxonomía Numérica o adansoniana, en honor a Michel Adanson (1727-1806), quien sentó las bases de la misma, fue desarrollada alrededor de 1950 por Sneath y Sokal como parte de un análisis multivariante y en paralelo al desarrollo de los ordenadores. Definida por estos autores como "el agrupamiento mediante métodos numéricos de las unidades taxonómicas en taxa sobre las bases de sus caracteres manifiestos", vino a ser una respuesta a la necesidad de utilización de métodos objetivos para la clasificación de los organismos (Sneath, 1984).

Los principios en que se basa son los siguientes (Sneath y Sokal, 1973):

- 1.- Cuanto mayor sea el contenido en información de los taxa de una clasificación y cuantos más caracteres le sirvan de base, mejor será la clasificación.
- 2.- A priori, cada carácter posee el mismo peso en la creación de taxa naturales.
- 3.- La similitud global entre dos entidades cualesquiera es una función de sus similitudes individuales para cada uno de los caracteres para los cuales está siendo comparada.
- 4.- Los distintos taxa pueden reconocerse ya que las correlaciones de caracteres son diferentes en los distintos grupos de organismos en estudio.
- 5.- A partir de las estructuras taxonómicas de un grupo y las correlaciones de sus caracteres pueden realizarse inferencias filogenéticas, dadas ciertas asunciones acerca de los mecanismos y rutas evolutivas.
- 6.- La Taxonomía se enfoca y practica como una ciencia empírica.
- 7.- Las clasificaciones se basan en la similitud fenotípica.

Conocidos los fundamentos, se establecerán las etapas lógicas en el proceso de clasificación mediante Taxonomía Numérica (Sneath, 1984):

1.- Recolección de datos: deben elegirse las cepas bacterianas a clasificar ("unidades taxonómicas operativas: OTU's") y examinarse según un número relevante de propiedades ("caracteres taxonómicos").

2.- Codificación de los datos de forma adecuada.

3.- Cálculo de la similitud o semejanza entre las cepas, lo que origina una tabla de similaridades ("matriz de semejanza") basada en una serie de caracteres elegidos.

4.- Análisis de la estructura taxonómica del conjunto de semejanzas para conocer los grupos o "clusters" originados; las cepas se ordenan en "fenones" (grupos fenéticos) que corresponden de forma global con grupos taxonómicos ("taxa").

5.- Las características de los fenones pueden tabularse para utilizarlas en otros estudios; también pueden elegirse los caracteres más apropiados ("caracteres de diagnóstico") con los que elaborar "sistemas de identificación" que permitan una mejor identificación de otras cepas.

Los fundamentos de la Taxonomía Numérica han sido ampliamente contestados por taxónomos evolucionistas y filósofos de la ciencia (Hull, 1970). A pesar de ello, resulta notoria su gran aplicación a la clasificación de bacterias que, en la última década, ha hecho uso casi sistemático de ella para la definición de taxa, representando una mejora sustancial en cuanto a niveles de información, rigor, objetividad y capacidad de cuantificación, frente a los enfoques clásicos.

I.1.2.- LOS ACIDOS NUCLEICOS EN LA TAXONOMIA BACTERIANA

Los estudios de los ácidos nucleicos empezaron a aplicarse hace más de veinte años a la taxonomía bacteriana para resolver ciertos problemas que presentaban los métodos de clasificación basados en caracteres fenotípicos. Así, Johnson (1984) considera que el uso de técnicas genéticas aporta una serie de ventajas, como la mayor unificación del concepto de especie bacteriana; el hecho de que las clasificaciones basadas en relaciones genéticas no estén sujetas a cambios frecuentes ni radicales; o la posibilidad de construir esquemas de identificación válidos, tras la clasificación de los organismos, basados en las relaciones genéticas; además de esto, la información así obtenida resultaría útil para entender cómo han evolucionado los distintos grupos bacterianos y cómo se han ordenado de acuerdo con sus relaciones ancestrales.

El porcentaje en bases guanina-citosina (%G+C) del ácido desoxirribonucleico (ADN) es una constante a nivel específico y constituye criterio de tipo excluyente de fundamental importancia en taxonomía bacteriana. Microorganismos muy relacionados presentarán valores de tanto por ciento de G+C muy similares; el razonamiento no puede invertirse: dos cepas con idéntico G+C no tienen por qué pertenecer a la misma especie, puesto que con igual porcentaje dos ADNs pueden codificar secuencias muy distintas.

El descubrimiento de la reasociación de cadenas sencillas de ADN de distinto origen dando lugar a duplex híbridos significó la base de un planteamiento totalmente nuevo para el estudio de la semejanza genética entre bacterias.

Las técnicas de hibridación ADN/ADN *in vitro* permiten evaluar cuantitativamente el porcentaje de secuencias nucleotídicas compartidas por dos organismos sobre el total de su genoma.

Por su parte, los valores de homología ADN/ARN₁ y ADN/ARN₂ se refieren a fragmentos específicos y relativamente pequeños del

genotipo bacteriano, aquellos que codifican las secuencias de bases de los ARN ribosómico y de transferencia.

En general los experimentos de homología de ADN se utilizan para detectar semejanzas entre organismos muy relacionados, mientras que los de homología de ARN son útiles en la investigación de la similitud existente entre organismos distanciados (Johnson, 1984).

La posibilidad de conocer la secuencia de oligonucleótidos del ARN ribosómico ha permitido comparar directamente dos moléculas de ARN, de cepas distintas con el fin de conocer el grado de semejanza existente entre las mismas.

I.1.3.- SEROLOGIA Y QUIMIOTAXONOMIA

Los estudios serológicos de valor en taxonomía bacteriana pueden ser de dos tipos:

a) Los que tratan de detectar diferencias o semejanzas entre distintos organismos en base a la estructura de su superficie celular y a los componentes antigénicos asociados.

b) Los que utilizan antisueros contra determinadas enzimas purificadas para conocer la similitud entre proteínas homólogas de bacterias distintas.

A pesar de que este tipo de estudios presentan ciertas limitaciones, es cierto que proporcionan métodos rápidos y convenientes para asignar semejanzas estructurales entre proteínas homólogas, lo cual es de evidente utilidad en los procesos de clasificación de bacterias (Jones y Krieg, 1984).

Así mismo, la aplicación de técnicas físicas y químicas para elucidar la composición de células bacterianas, o partes de las mismas, ha resultado ser de gran utilidad, tanto que el término "quimiotaxonomía", usado para describir la clasificación de los

microorganismos en base a su composición química, ha tenido una amplia difusión en la literatura (Jones y Krieg, 1984).

Entre las técnicas más empleadas se encuentran el análisis de la estructura y distintos componentes de la pared celular, la composición lipídica (ácidos grasos, fosfolípidos), la presencia de quinonas isoprenoides y citocromos, así como el análisis del perfil proteico junto con las secuencias aminoacídicas de ciertas proteínas específicas, además de la caracterización de determinadas enzimas.

I.2.- HALOFILISMO

Existen medios ambientes salinos tanto naturales como creados por el hombre cuya salinidad varía desde la del agua del mar o de suelos salinizados hasta la utilizada para preservar alimentos, la de los lagos salados o la de salinas solares donde la concentración de sal llega a ser saturante. Sólo los organismos capaces de desarrollarse en tales condiciones han logrado colonizar todos estos ambientes. La extraordinaria capacidad de las bacterias para adaptarse a las condiciones de vida más adversas, entre ellas, sin duda, la elevada salinidad, ha determinado su éxito en la competencia con otros organismos y, por tanto, su distribución en estos hábitats (Russel y Kogut, 1985).

Desde las primeras descripciones de este tipo de microorganismos aislados a partir de alimentos en salazón (Harrison y Kennedy, 1922), o de cueros curados con sal (Lloyd y col., 1929), empezaron a utilizarse los términos "halofílicos", "halotolerantes" y "no halofílicos" para designar a aquellos microorganismos sobre los que ciertas concentraciones de sal ejercían una influencia favorable, más o menos indiferente, o desfavorable, respectivamente. De igual forma, los calificativos "halófilo obligado" y "halófilo facultativo" se usaban para distinguir a los organismos que tenían un requerimiento por la sal de los que podían crecer sin ella, pero ésta los

estimulaba. Las denominaciones "halófilos débiles", "halófilos moderados" y "halófilos extremos" distinguían entre organismos que requerían o eran estimulados por cantidades pequeñas, moderadas o elevadas de sal en su medio ambiente (Larsen , 1962).

Desde entonces se han realizado diversas definiciones y clasificaciones de estos microorganismos, en base a su respuesta frente a la sal, NaCl, considerando tanto el rango en el que se produce crecimiento como las concentraciones a las cuales este crecimiento es más rápido, es decir, la concentración óptima (Larsen, 1962; Gibbons, 1970; Kushner, 1978, 1985; Kushner y Kamakura, 1988).

Así pues, se consideran microorganismos halófilos aquellos que requieren sal para su crecimiento, es decir, que son incapaces de desarrollarse en ausencia de sal. Los halotolerantes, en cambio, son microorganismos no halófilos, o sea, que no necesitan sal para crecer, pero que pueden tolerar cantidades variables de sal; hay que destacar que algunos organismos no halófilos se ven estimulados en su crecimiento por pequeñas cantidades de sal (Kushner y Kamakura, 1988).

Kushner (1985) establece las siguientes categorías para los microorganismos en base a su respuesta frente a la sal:

- No halófilo: crece mejor en medios con menos de 0,2 M de sal.
- Halófilo débil: presenta mejor crecimiento entre 0,2-0,5 M de sal.
- Halófilo moderado: crecimiento óptimo a concentraciones salinas de 0,5-2,5 M. Los organismos capaces de crecer con menos de 0,1 M de sal se consideran halófilos facultativos.
- Halófilo extremo débil ("bordeline"): crece mejor en medios con 1,5-4,0 M de sal.
- Halófilo extremo: óptimo crecimiento en medios con 2,5-5,2 M de sal (saturación).
- Halotolerante: microorganismo no halófilo que puede tolerar sal. Si crecen a más de 2,5 M, se consideran halotolerantes extremos.

Por su parte, Larsen (1986) considera la clasificación de los microorganismos halófilos, es decir, los que requieren sal, en los grupos siguientes:

- Halófilos débiles: presentan crecimiento óptimo entre 2-3% de sal.

- Halófilos moderados: son aquellos que crecen de forma óptima entre 5-20% de sal.

- Halófilos extremos: capaces de crecer óptimamente en medios de concentraciones salinas comprendidas entre 15% y la saturación.

En cuanto a los organismos tolerantes propone unas categorías similares:

- No tolerantes: aquellas bacterias que toleran sólo una pequeña concentración de sal (inferior al 1%).

- Tolerantes débiles: toleran hasta un 6-8% de sal.

- Tolerantes moderados: aquellos que pueden soportar hasta 18-20% de sales en su medio de cultivo.

- Tolerantes extremos: crecen en todo el rango de concentraciones salinas, desde 0 hasta la saturación.

Entre los microorganismos halófilos débiles se incluye un número bastante elevado de eubacterias cuyo hábitat natural es el mar y, por tanto, crecen mejor a concentraciones salinas aproximadas a la del agua del mar (0,2-0,5 M); la mayoría se inhiben a concentraciones ligeramente superiores, por lo que el rango en que se desarrollan es muy estrecho. La denominación de bacterias marinas, como también se los llama, resulta, según algunos autores, más descriptiva (Rodríguez-Valera, 1988).

Los microorganismos halófilos extremos requieren para su crecimiento concentraciones de sal mucho mayores (superiores a 1,5 M). Tradicionalmente la categoría de los halófilos extremos se ha correspondido con los organismos pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae*; todos ellos eran arqueobacterias y como tales presentaban las características peculiares de este grupo

filogenéticamente tan alejado de las eubacterias clásicas (Woese y col., 1978). Sin embargo, en los últimos años se han descrito microorganismos que por sus elevados requerimientos salinos se encuadraban en la categoría de los halófilos extremos, pero que no pertenecen a la familia *Halobacteriaceae*, como por ejemplo una arqueobacteria metanógena (Yu y Kawamura, 1987), e incluso dos especies de la eubacteria fotosintética *Ectothiorhodospira* (Imhoff y Trüper, 1977, 1981).

Los halófilos moderados, en general, son capaces de desarrollarse entre amplios rangos de concentraciones salinas (desde 0,5 hasta 3,0-4,0 M), cuyos márgenes se solapan con los descritos para los extremos y los halófilos débiles. Todas las especies descritas dentro de este grupo hasta hace pocos años eran eubacterias, pero recientemente han aparecido en la bibliografía tres arqueobacterias metanógenas capaces de crecer óptimamente en el rango de concentraciones salinas típico de los halófilos moderados (Zhilina, 1983; Paterek y Smith, 1988; Mathrani y col., 1988).

I.2.1.- ESTADO ACTUAL DE LA TAXONOMIA DE LOS MICROORGANISMOS HALOFILOS MODERADOS

Desde el punto de vista taxonómico, las bacterias consideradas como halófilas moderadas por su comportamiento frente a la sal constituyen un grupo muy heterogéneo, incluyendo especies pertenecientes a muy diferentes géneros. En algunos de éstos existen además especies terrestres, marinas o de agua dulce, mientras que en otros constituyen la única especie del género.

Se han descrito organismos tanto Gram positivos como Gram negativos; bacilos, cocos o espiroquetas; aerobios, anaerobios estrictos o facultativos; la mayoría son quimioheterótrofos, pero también existen bacterias fotosintéticas; incluso muy recientemente se han descrito tres arqueobacterias metanógenas que crecen en concentraciones salinas características de los halófilos moderados.

Los microorganismos que se citan a continuación se consideran aceptados en la actualidad como especies válidas al haber aparecido en las Listas de Nombres de Bacterias Aprobadas (Skerman y col., 1980) o en su suplemento (Moore y col., 1985). Las descritas con posterioridad a 1985 se consideran "válidamente publicadas" si aparecieron en el *International Journal of Systematic Bacteriology*, o si fueron "efectivamente publicadas" en otra revista y posteriormente convalidadas al aparecer en las Listas Anuales del *International Journal of Systematic Bacteriology*.

a. - EUBACTERIAS QUIMIOTROFAS

- Microorganismos Gram positivos

Micrococcus halobius (Onishi y Kamekura, 1972)

Es un coco Gram positivo inmóvil de 0,8-1,5 μm de diámetro, no capsulado, aerobio estricto; se dispone aislado o en parejas y raramente en tetradas o grupos irregulares. Forma colonias circulares, opacas, mucosas y no pigmentadas.

Capaz de desarrollarse entre 1-4 M de NaCl, presentando un crecimiento óptimo a concentraciones de 1 o 2 M. Crece entre 20-40 °C y entre pH 6-10, con óptimo a pH 7. Requiere tiamina, y la biotina estimula su crecimiento.

Fue aislado en Japón a partir de sal sin refinar y designado inicialmente como cepa 28-3.

Su contenido en G+C es del 71,5%.

La cepa tipo es ATCC 21727.

Marinococcus halophilus (Hao y col., 1984)

Coco Gram positivo de 0,5-0,8 μm de diámetro, móvil por 1 o 2 flagelos, aislado o en parejas y ocasionalmente en grupos de tres o en tetradas. No capsulado; aerobio estricto. En medio sólido produce colonias circulares, mucosas, de borde entero, con pigmentación amarillo-naranja no difusible.

Crece de forma óptima en medios con 5-15% de NaCl y entre 10-37 °C.

Esta especie fue descrita como *Planococcus halophilus* (Novitsky y Kushner, 1976), pero ha sido incluida en el nuevo género *Marinococcus* basándose en la presencia de ácido meso-diaminopimélico como principal componente de su pared celular en vez de L-lisina (Hao y col., 1984).

El contenido en G+C es 50,4%.

La cepa tipo es ATCC 27964.

Marinococcus albus (Hao y col., 1984)

Coco Gram positivo, de 1,0-1,2 μm de diámetro; se encuentra aislado, en parejas o grupos. Móvil por uno o dos flagelos. En medio sólido origina colonias circulares, opacas y no pigmentadas. Aerobio estricto.

La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C y el rango de salinidad de 5-15% de NaCl.

Aislado a partir de una salina solar en la provincia de Alicante, fue inicialmente designado como *Planococcus* sp. (Ventosa y col., 1983). Actualmente incluido en el género *Marinococcus*, al igual que la especie anterior, por poseer ácido meso-²⁴aminopinólico en su pared celular (Hao y col., 1984).

El contenido en G+C es 44,9%.

La cepa tipo es CCM 3517.

Sporosarcina halophila (Claus y col., 1983)

Es un coco Gram positivo de 1,0-2,5 μm de diámetro, móvil por uno o dos flagelos; se presenta aislado, en parejas, grupos de tres, tetradas o paquetes. Forma colonias circulares, opacas, con pigmento naranja no difusible.

Capaz de crecer entre 15-37 °C, pH 7-9 y entre 2-15% de NaCl.

Especie aislada de suelos pantanosos salinos de la costa alemana.

El porcentaje en G+C de su ADN es del 40,1-40,9%.

La cepa tipo es DSM 2266.

En la Tabla I.1 se muestran otras características fenotípicas de las especies Gram positivas halófilas moderadas descritas.

Tabla I.1. Características de las eubacterias quimiotrofas
Gram positivas halófilas moderadas

Característica	<i>Micrococcus halobius</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>	<i>Marinococcus albus</i>	<i>Sorosarcina halophila</i>
Pigmento amarillo	-	+	-	+
Novilidad	-	+	+	+
Formación de esporas	-	..	-	+
Catalasa	+	+	-	+
Oxidasa	+	-	+	+
Producción de ácidos:				
Glucosa	+	+	-	-
otros azúcares	+	+	-	-
Indol	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-	-
Producción H ₂ S	-	-	-	-
Hidrólisis de:				
Tween 80	-	-	-	-
Gelatina	+	+	-	+
Caseína	+	+	-	+
Esculina	+	+	-	-
Almidón	+	-	-	+
ADN	ND	d	+	+
Tirosina	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	+	-
Ureasa	-	-	+	-
β-Galactosidasa	+	+	+	d
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-
Fosfatasa	-	-	-	d
Arginina deshidrolasa	-	-	-	-

ND= no determinado

d= 11-89% de las cepas son positivas

- Microorganismos Gram negativos

Paracoccus halodenitrificans (Kocur, 1984)

Coco Gram negativo inmóvil de 0,5 μm de diámetro, aislado o en parejas. Forma colonias circulares, de borde entero, opacas de color crema. Es aerobio pero puede crecer en anaerobiosis con nitrato como último aceptor de electrones.

Crece óptimamente entre 4,4-8,8% de NaCl y 25-30 °C. Acumula intracelularmente gránulos de PHB.

Aislado a partir de carne en salmuera y descrito inicialmente como *Micrococcus halodenitrificans* (Robinson y Gibbons, 1952).

Su G+C es del 64-66%.

La cepa designada como tipo es ATCC 13511.

Deleya halophila (Quesada y col., 1984)

Es un bacilo Gram negativo, aerobio estricto de 0,5-0,7x2,0 μm , móvil por 1-8 flagelos peritricos. En medio sólido forma colonias circulares, lisas, opacas, de color crema. Capsulado y no esporulado.

Capaz de crecer entre 2-30% de sales marinas (óptimo a 7,5%), a temperaturas comprendidas entre 15-45 °C (óptimo, 32 °C) y pH 5-10 (pH óptimo 7).

Aislado a partir de suelos salinos de la provincia de Alicante.

El contenido en G+C es del 66,7%.

La cepa tipo es la ATCC 3662.

Flavobacterium halmophilum (Elazari-Volcani, 1940)

Es un bacilo Gram negativo de 0,5-0,7x2,0 μm , aislado o en parejas. Inmóvil; aerobio. Produce colonias circulares convexas de borde entero, opacas y de pigmentación amarilla.

Presenta crecimiento óptimo entre 3-25% de sal y a 30 °C.

Aislado en el Mar Muerto, fue incluido en las ediciones 7ª y 8ª del Manual de Bergey (Breed y col., 1957; Weeks, 1974). En la Lista de Nombres de Bacterias Aprobadas (Skerman y col., 1980) apareció con el nombre incorrecto de *F. halmophilum* y en la presente edición del Manual (Holmes y col., 1984) como especie *incertae sedis* dentro del género *Flavobacterium* con el nombre *F. halmophilum*. El nombre correcto, con el que originalmente se describió, es *F. halmophilum*, y así aparece en la "corrigenda" de las Listas de Nombres de Bacterias Aprobadas (Hill y col., 1984).

Su contenido en G+C es de 49,7%.

La cepa tipo de esta especie es ATCC 19717.

Vibrio costicola (Baumann y col., 1984; García y col., 1987)

Bacilo curvado (0,5x1,5-3,2 μm) móvil por un flagelo polar; anaerobio facultativo, no esporulado; forma colonias circulares convexas, opacas, color crema.

Crece entre 0,5 y 20% de sales marinas presentando óptimo al 10% y la temperatura de 37 °C; se desarrolla entre 5-45 °C y pH 5-10, siendo 7,5 el pH óptimo.

Fue aislado de costillas de cerdo conservadas en salazón y designado *Vibrio costicolus* (Smith, 1938). Recientemente se ha realizado una descripción corregida de esta especie que incluye además cepas aisladas de distintos hábitats hipersalinos (García y col., 1987).

Su G+C es del 50,0%.

La cepa tipo es NCMB 701.

Halomonas elongata (Vreeland y col., 1980)

Es un bacilo Gram negativo de 0,6-0,8x1,6-1,9 μm ; puede adoptar formas filamentosas bajo determinadas condiciones. Móvil por 4-7 flagelos polares o laterales; no esporulado; anaerobio facultativo. En medio sólido forma colonias lisas, opacas, blancas o color crema.

Las condiciones óptimas de crecimiento son de 3,5-7% de sal y 30-37 °C.

Aislada de una salina solar en las Antillas Holandesas.

El contenido en G+C de esta especie es de 60-61%.

La cepa tipo es ATCC 33173.

Halomonas subglaciescola (Franzmann y col., 1987)

Bacilo Gram negativo de 0,5x1,1 μm , aislado, en parejas o en cadenas cortas; algunas cepas forman largos filamentos flexibles de más de 50 μm . Móvil por flagelos peritricos. Produce colonias crema o blancas en medio sólido, o amarillas en medios enriquecidos con alanina o L-prolina.

Aerobio, aunque puede utilizar nitrato como aceptor de electrones. Muchas cepas crecen entre 0,5-20% de NaCl, pero no al 25% a la temperatura de 10 °C. Presenta crecimiento entre 0-25 °C y pH 5-9.

Esta especie posee dos biovars: Biovar I, formado por bacilos móviles que pueden originar filamentos de longitud superior a 10 μm ; Biovar II, contiene células inmóviles de tamaño inferior a 10 μm . Ambos biovars se diferencian también en algunas propiedades bioquímicas (Franzmann y col., 1987).

Microorganismo aislado a partir de un lago salino de la Antártida.

El porcentaje en G+C es del 60,3-61,9%.

La cepa tipo es UQM 2927.

En la Tabla I.2 aparecen otras características de los bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos halófilos moderados que acaban de describirse.

Spirochaeta halophila (Greenberg y Canale-Parola, 1976)

Microorganismo Gram negativo de morfología helicoidal, de 0,4x1,5-3,0 μm , aunque pueden aparecer células de 5-60 μm . Móvil, con dos filamentos axiales de inserción subterminal. Anaerobio facultativo, produce colonias circulares rojas cuando se cultiva en aerobiosis, mientras que en anaerobiosis las colonias son blancas, esféricas y difusas.

La temperatura óptima de crecimiento es de 35-40 °C. Requiere altas concentraciones de Cl^- , Na^+ , Mg^{++} y Ca^{++} , creciendo de forma óptima con 0,75 M de NaCl, 0,2 M de MgSO_4 y 0,1 M de CaCl_2 .

Fue aislado de un estanque de elevada salinidad localizado en la península de Sinaí (Golfo de Agaba).

Su contenido en G+C es del 62%.

La cepa tipo es la ATCC 29478.

Sporohalobacter lortetii (Oren y col., 1987)

Es un bacilo Gram negativo de 0,5-0,6x2,5-10 μm , con extremos redondeados. Móvil por flagelos peritricos. Forma esporas redondeadas terminales con vacuolas de gas adosadas. Produce colonias circulares, translúcidas, grises, de superficie brillante, a veces extendidas y de borde irregular.

Anaerobio estricto. Crece entre 0,7-2,5 M de NaCl obteniéndose crecimiento óptimo con 1,4-1,5 M a 30 °C y con 1,7 M a 45 °C. La temperatura óptima es de 37 °C siendo capaz de crecer entre 5-60 °C.

Esta especie, aislada del sedimento del Mar Muerto, fue descrita inicialmente como *Clostridium lortetii* (Oren, 1983), pero el mismo autor ha propuesto su transferencia al nuevo género *Sporohalobacter* en base a la pared celular tipo Gram negativo de esta especie y a su relación filogenética con miembros de la familia *Haloanaerobiaceae* (Oren y col., 1987).

El contenido en G+C es del 31,5%.

La cepa tipo de la especie es DSM 35059.

***Sporohalobacter marismortui* (Oren y col., 1987)**

Bacilo Gram negativo de 0,6x3-13 μm y extremos redondeados, móvil por flagelos peritricos, formador de esporas redondeadas terminales. Anaerobio estricto.

Crece óptimamente entre 0,5-2,0 M de NaCl y 36-40 °C. Utiliza diversos azúcares como única fuente de carbono y energía.

Fue aislado a partir del sedimento de las orillas del Mar Muerto.

Su G+C es del 29,6%.

La cepa tipo es la ATCC 35420.

***Haloanaerobium praevalens* (Zeikus y col., 1983)**

Bacilo recto Gram negativo de aproximadamente 1x2,4 μm , inmóvil y no esporulado. En medio sólido produce colonias translúcidas, blancas y brillantes. Anaerobio estricto.

Presenta crecimiento óptimo al 12,5% de NaCl y es capaz de desarrollarse entre 2-30% de sal. El rango de temperatura en que crece es de 5-60 °C (óptimo, 37 °C) y de pH 6-9 (óptimo 7-7,4).

Fue aislado a partir del sedimento de la parte sur del Gran Lago Salado.

El porcentaje en G+C de su ADN es del 27,0%.

La cepa tipo es DSM 2228.

Halobacteroides halobius (Oren y col., 1984)

Bacilo Gram negativo, largo (0,5x10-20 μm) y flexible; en cultivos viejos puede presentar forma esférica. Móvil por flagelos peritricos. Descrito como no esporulado, se ha manifestado capaz de producir esporas en medios enriquecidos (Oren, 1987). En medios sólidos origina colonias circulares, grises, de superficie brillante.

Anaerobio estricto. Crece óptimamente entre 1,5-2,5 M de NaCl y 37-42 °C. Fermenta varios azúcares y requiere biotina y p-aminobenzoato .

Se aisló en el sedimento del Mar Muerto.

Su contenido en G+C es de 30,7%.

La cepa tipo de esta especie es ATCC 35273.

Para albergar a estas dos especies se creó la familia *Haloanaerobiaceae* (Oren y col., 1984) basándose en estudios de secuenciación de oligonucleótidos, que revelaron la escasa relación filogenética entre estas especies y otros grupos de eubacterias previamente descritos.

Otras características de los cuatro bacilos anaerobios y de la espiroqueta anaerobia facultativa, descritos como eubacterias halófilas moderadas, se han recogido en la Tabla I.3.

Tabla I.2. Características de las eubacterias quimiotrofas
Gram negativas halófilas moderadas

	<i>Flavobacterium halophilum</i>	<i>Deleya halophila</i>	<i>Paracoccus halodentrificans</i>
Morfología	bacilo	bacilo	coco
Movilidad	-	+	-
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Producción de ácidos:			
Arabinosa	+	-	ND
Glucosa	+	+	+
Glicerol	+	-	+
Lactosa	+	-	+
Manitol	+	-	+
Indol	-	-	-
Rojo de Metilo	ND	-	ND
Voges-Proskauer	ND	-	-
Producción H ₂ S	-	+	-
Hidrólisis de:			
Tween 80	-	-	-
Gelatina	+	-	-
Caseína	ND	-	ND
Esculina	-	+	-
Almidón	-	-	-
ADN	+	-	ND
Reducción de nitratos	-	+	+
Reducción de nitritos	-	-	+
Fenilalanina desaminasa	ND	-	-
Fosfatasa	+	+	-
Arginina deshidrolasa	ND	ND	-

ND= no determinado

Tabla 1.2. Características de las eubacterias quimiotrofas Gram negativas halófilas moderadas (continuación)

	<i>Vibrio costicola</i>	<i>Halomonas elongata</i>	<i>Halomonas subglaciescola</i>
Morfología	bacilo curvado	bacilo	bacilo
Movilidad por:			
Flagelos peritricos	-	-	+
Flagelos polares	+	+	-
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Producción de ácidos:			
Arabinosa	-	-	-
Glucosa	+	+	ND
Glicerol	d	+	ND
Lactosa	-	-	ND
Manitol	d	-	ND
Producción de Indol	-	d	-
Rojo de Metilo	d	d	-
Voges-Proskauer	+	d	-
Producción H ₂ S	d	-	-
Hidrólisis de:			
Tween 80	d	-	ND
Gelatina	+	d	-
Caseína	+	-	ND
Esculina	d	d	ND
Almidón	-	-	-
ADN	d	-	ND
Reducción de nitratos	-	+	d
Reducción de nitritos	-	+	-
Fenilalanina desaminasa	d	-	-
Fosfatasa	d	+	-
Arginina deshidrolasa	+	-	ND

ND= no determinado; d= 11-89% de las cepas son positivas

Tabla 1.3. Características de los bacilos anaerobios estrictos y de la espiroqueta anaerobia facultativa halófilos moderados.

Característica	<i>Haloanaerobium praevalens</i>	<i>Halobacteroides halobius</i>	<i>Sporohalobacter lortetii</i>	<i>Sporohalobacter marismortui</i>	<i>Spirochaeta halophila</i>
Morfología	bacilo	bacilo largo	bacilo	bacilo	helicoidal
Pigmentación	blanca	gris	gris	gris	roja
Movilidad por					
Flagelos peritricos	-	+	+	+	-
Filamento axial	-	-	-	-	+
Formación de esporas	-	+	+	+	-
Crecimiento en anaerobiosis:					
Estricto	+	+	+	+	-
Facultativo	-	-	-	-	+
Catalasa	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	ND
Producción de indol	ND	-	+	-	ND
Producción H ₂ S	ND	-	+	+	ND
Reducción de nitratos	-	-	ND	ND	+
Productos de fermentación	Butirato, acetato, propionato, CO ₂ , H ₂	Etanol, acetato CO ₂ , H ₂	Acetato, propionato, n-butilato, isobutilato, isovalerato, H ₂	Acetato, etanol, piruvato, formiato, CO ₂ , H ₂	Etanol, acetato, CO ₂ , H ₂

ND= no determinado

Muchas otras bacterias quimioheterótrofas han sido descritas como halófilas moderadas, y aunque en la actualidad no se encuentran aceptadas como especies válidas, algunas de ellas han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista fisiológico.

Así, entre los microorganismos Gram positivos: "*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*", aislado a partir de salsa de soja produce una enzima nucleasa halófila (Kamekura y Onishi, 1974a); dos micrococcos *M. morrhuae* K-17 y *M. luteus* K-15 halófilos moderados, de los que se han estudiado sus rangos de crecimiento salinos (Chang y Leung, 1979); y dos bacilos esporulados, *Bacillus* sp. 21-1, aislado de sal sin refinar y productor de una proteasa (Kamekura y Onishi, 1974b) y *Bacillus* sp. N23-2, capaz de producir una nucleasa extracelular y aislado en Japón a partir de maderas en descomposición (Onishi y col., 1983). Muy recientemente, Ventosa y colaboradores han realizado un detallado estudio taxonómico de esta última cepa, proponiendo su inclusión en un nuevo taxón, para el que sugieren el nombre de *Bacillus halophilus* (Ventosa y col., 1988, en prensa).

Entre las bacterias Gram negativas pueden citarse "*Chromobacterium marismortui*", aislado por Elazari-Volcani en el Mar Muerto (1940), cuya posición taxonómica aún no ha sido determinada; "*Pseudomonas halestorgus*", descrita también en el Mar Muerto (Elazari-Volcani, 1940), de la que no existe ningún cultivo disponible; "*Pseudomonas halosaccharolytica*", designada inicialmente como cepa no. 101 (Hiwatashi y col., 1958), no ha sido descrita o propuesta correctamente como una nueva especie; *Acinetobacter* sp. 204-1, productor de amilasa (Onishi e Hidaka, 1978); *Pseudomonas* A-14, del que se ha estudiado la producción de proteasa (Van Qua y col., 1981); la cepa Ba., designada como halófila moderada (Rafaeli-Skol, 1968) o halotolerante (Shnaiderman y Avi-Dor, 1982); el microorganismo IREB (Deal, 1974); o el halófilo moderado no identificado NRCC 41227 (Matheson y col., 1976), en quien se han estudiado las características de sus ribosomas .

b. - EUBACTERIAS FOTOTROFAS

Rhodospirillum salexigens (Drews, 1981)

Bacteria Gram negativa de forma bacilar curvada o espirilar, de 0,6-0,7x1,0-6,0 μm , móvil por flagelos peritricos. Posee membranas intracitoplasmáticas situadas paralelamente a la membrana citoplasmática; contiene bacterioclorofila a y espiriloxantina como carotenoide mayoritario.

Anaerobio, fotoorganotrofo, capaz de metabolismo quimiorganotrofo en condiciones semi- o aerobias en la oscuridad. Requiere glutamato como fuente de nitrógeno. Crece entre 5-20% de NaCl y 20-45 °C; pH óptimo, 6,6-7,4.

Aislada de estanques de agua de mar parcialmente desecados de la costa de Oregón.

Su G+C es del 64%.

La cepa tipo es DSM 2132.

Rhodospirillum salinarium (Nissen y Dundas, 1984)

Bacilo Gram negativo con forma de bastón o espirilar, de 0,3x1-3 μm . Móvil por un par de flagelos en cada polo. Membranas intracitoplasmáticas de tipo vesicular; posee bacterioclorofila a y espiriloxantina.

Capaz de crecer aerobicamente en oscuridad como quimiheterótrofo. No crece en ausencia de extracto de levadura o peptona. La concentración óptima de NaCl para el crecimiento fototrofo es 12-18% y para el crecimiento quimiotrofo, 6-12%. Crece entre 0-45 °C, con óptimos a 42 °C y pH 7,5-8.

Se aisló a partir de una salina al sur de Lisboa.

El contenido en G+C es de 68,1%.

La cepa tipo es ATCC 35394.

Ectothiorhodospira vacuolata (Imhoff y col., 1981)

Bacilo Gram negativo de 1,5x2,4 μ m. Móvil por flagelos polares politricos; bajo ciertas condiciones de crecimiento puede ser inmóvil y flotar en la superficie debido a la presencia de vacuolas de gas. Las membranas intracitoplasmáticas se presentan como láminas apiladas; posee bacterioclorofila a y carotenoides tipo espiriloxantina.

Fototrofo y anaerobio obligado. Utiliza azufre y sulfato, además de otros compuestos, como donadores de electrones en la fotosíntesis. Crece de manera óptima entre 1-6% de NaCl y pH 7,5-8,5 y 9-9,5, teniendo una fuente inorgánica de azufre reducido y una fuente orgánica de carbono.

Aislado de dos lagos alcalinos salados de Jordania y Kenia.

El G+C de esta especie es 61,4-63,6%.

La cepa tipo es DSM 2111.

Inicialmente el género *Ectothiorhodospira* se incluyó en la familia *Chromatiaceae*. En 1984 se creó la familia *Ectothiorhodospiraceae* debido a la existencia de diferencias morfológicas y fisiológicas evidentes (Imhoff, 1984).

En la Tabla I.4 pueden encontrarse otras características de las especies fototrofas halófilas moderadas.

Tabla I.4. Características de las eubacterias fototrofas
halófilas moderadas

Característica	<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i>	<i>Rhodospirillum salexigens</i>	<i>Rhodospirillum salinarium</i>
Morfología	bacilo recto	bacilo curvado o espiral	bacilo curvado o espiral
Flagelación:			
1-2 flagelos polares	-	-	+
penacho flagelos polares	+	-	-
flagelos bipolares	-	+	-
Vacuolas de gas	+	-	-
Membranas intracitoplasmáticas:			
vesiculares	-	-	+
paralelas a la membrana citoplasmática	+	+	-
Crecimiento en anaerobiosis	+	+	+
Crecimiento aeróbico en la oscuridad	-	+	+
H ₂ S donador de e ⁻	+	-	-
Utilización de:			
acetato	+	+	-
citrato	-	+	-
glicerol	-	+	-
glucosa	-	+	-
lactato	-	-	+
piruvato	-	+	-
succinato	+	+	-

c.- ARQUEOBACTERIAS METANOGENAS

Methanococcus halophilus (Zhilina, 1983)

Cocos poligonales aislados o en parejas que tienden a agruparse, de tamaño aproximado 1-2 μm . Su pared celular es delgada, osmóticamente inestable y sensible a los detergentes. Resistente a la Penicilina G.

Bacteria metanógena capaz de asimilar sustratos como metilaminas, metanol o acetato. Las sustancias orgánicas complejas (extracto de levadura, tripticasa) inhiben su crecimiento. Se desarrolla entre 1,5-15% de NaCl con óptimo al 7%, pH comprendido entre 6,5-7,4 y 26-36 °C.

Aislado a partir de comunidades de cianofíceas en una bahía australiana.

Su contenido en G+C es del 41,9-43,1%.

La cepa tipo es INMIZ 7982.

Methanohalophilus mahii (Paterek y Smith, 1988)

Microorganismo de morfología cocoide irregular, de aproximadamente 1,0 μm de diámetro, que tinte como Gram negativo, inmóvil, no esporulado; se presenta aislado o en pequeños grupos. Forma colonias esponjosas crema-amarillentas. Insensible a la Penicilina G.

Anaerobio estricto, utiliza metanol y metilaminas como sustratos para el crecimiento y metanogénesis, pero no acetato. Capaz de crecer entre 0,5-2,5 M de NaCl (óptimo, 2 M), requiere también K^+ , Mg^{++} , Fe^{++} y Ca^{++} . La temperatura óptima es de 35 °C (no crece por encima de 45 °C) y el pH 7,5.

Aislado de sedimentos anaerobios del Gran Lago Salado.

El porcentaje en G+C es del 48,5%.

La cepa tipo es ATCC 35705.

Methanohalophilus zhilinae (Mathrani y col., 1988)

Coco irregular, de 0,75x1,5 μm de diámetro, aislado o formando tetradas o pequeños grupos de forma ocasional. Típe como Gram negativo y es resistente a la Penicilina G. Origina colonias circulares, de borde entero, convexas, opacas y de pigmentación amarilla. Inmóvil; anaerobio estricto.

Puede utilizar sustratos como metanol o metilaminas para el crecimiento y metanogénesis.

Presenta crecimiento óptimo en presencia de 0,7 M de NaCl, pH-9,2 y 45 °C, aunque es capaz de desarrollarse también entre 0,2-2,1 M de NaCl.

Fue aislado en Egipto, a partir del Lago Bosa del Wadi Natrum.

Su contenido en G+C es del 38%.

La cepa tipo es DSM 4017.

I.2.2.- FISILOGIA DE LAS EUBACTERIAS HALOFILAS MODERADAS

Uno de los aspectos de los microorganismos halófilos moderados cuyo estudio ha despertado en los últimos años un considerable interés ha sido el de su fisiología, y muy especialmente los cambios que ocurren cuando estos microorganismos se adaptan a los diferentes márgenes de concentraciones salinas en que se desarrollan.

Muchos de los trabajos iniciales realizados con las bacterias halófilas moderadas descritas tratan acerca de su crecimiento en distintas concentraciones de sales, así como en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, factores estos últimos que se han revelado esenciales a tener en cuenta para poder determinar el rango de salinidad de una especie bacteriana y, por tanto, su encuadramiento en cada una de las categorías de los microorganismos halófilos.

Así, por ejemplo, uno de los primeros estudios realizados (Novitsky y Kushner, 1976) podría considerar a *Planococcus halophilus* como un organismo halotolerante ya que era capaz de crecer en ausencia de NaCl añadido, a 20 °C (salvo posiblemente el presente como contaminante en el medio de cultivo utilizado), si bien a 30 °C requería para crecer al menos 0,5 M de NaCl, siendo capaz de desarrollarse entre esta concentración y 4 M, con un crecimiento óptimo a 1 M, con lo que se le encuadraría dentro de los halófilos moderados.

Halomonas elongata fue descrito también como un microorganismo halotolerante extremo, capaz de crecer entre 0-32% de sales marinas en un medio de cultivo complejo (Vreeland y col., 1980); sin embargo en un medio químicamente definido con glucosa o L-alanina como única fuente de carbono y energía, necesitó un mínimo de 0,05 M de NaCl añadido para el crecimiento (Vreeland y Martin, 1980), por lo que se comporta como un verdadero halófilo.

Los resultados de otros estudios similares se recogen en la Tabla I.5, donde aparecen los márgenes de concentraciones de sales en que se desarrollan las distintas especies de microorganismos halófilos moderados descritas, así como la concentración para el crecimiento óptimo, junto con el tipo de medio de cultivo y la temperatura de incubación a la que se han determinado.

Algunos microorganismos requieren menores concentraciones salinas para el crecimiento al ser cultivados a temperaturas inferiores: así, por ejemplo, *Micrococcus halobius* en un medio de cultivo complejo necesita sólo 0,1 M de NaCl para crecer a 20 y 25 °C, un mínimo de 0,5 M a 30 °C, y concentraciones superiores a la temperatura de 35 °C (Novitsky y Kushner, 1975).

La composición en nutrientes del medio de cultivo utilizado modifica no sólo los límites de concentraciones salinas que permiten el crecimiento, sino también en algunos casos la concentración necesaria para crecer óptimamente:

Deleya halophila crece entre 2,5-25% de sales a 32 °C en un medio complejo, mientras que en un medio definido no puede desarrollarse por encima de 20% de sal (Quesada y col., 1987)

Vibrio costicola no soporta concentraciones superiores a 2,5 M de NaCl en un medio mínimo con glucosa, y en medio complejo se obtiene crecimiento hasta 3,5 M de NaCl (Forsyth y Kushner, 1970).

En general, los microorganismos halófilos moderados no presentan requerimientos nutricionales complejos, si bien se han utilizado medios ricos a base de extracto de levadura, peptona, triptona, etc., en la mayoría de los estudios realizados. No obstante, se han descrito algunos medios químicamente definidos para el cultivo de diversas bacterias halófilas moderadas.

Algunos de estos medios son de composición muy simple, como los descritos para *Halomonas elongata* a base de glucosa o L-alanina como única fuente de carbono y sulfato amónico como fuente de nitrógeno (Vreeland y Martin, 1980); o el diseñado por Quesada y colaboradores (1987) para *Deleya halophila*, compuesto únicamente por glucosa, nitrato potásico, un tampón de fosfatos y una mezcla de sales marinas, en que el microorganismo es capaz de desarrollarse óptimamente en un amplio margen de concentración de sales.

Vibrio costicola, sin embargo, es incapaz de crecer bien en un medio mínimo con glucosa a no ser que se le adicionen trazas del medio complejo (proteosa-peptona y triptona), y aún así no puede mantenerse indefinidamente en este medio (Forsyth y Kushner, 1970). En 1985 se describió otro medio definido con glutamato, glucosa y tres vitaminas en el que el microorganismo, al igual que otras bacterias halófilas moderadas, sí presenta un buen crecimiento (Kamekura y col., 1985).

Otros medios químicamente definidos poseen una composición más compleja, adecuada para el desarrollo de bacterias halófilas moderadas con mayores requerimientos nutritivos (Kamekura y Onishi, 1978a, 1979; Imhoff y col., 1981; Zeikus y col., 1983).

Tabla 1.5. Rangos y óptimos de concentraciones salinas de las distintas especies de eubacterias halófilas moderadas

Microorganismo	Medio de cultivo/	Temperatura °C	Rango sal	Concentración óptima	Referencia
<i>Micrococcus halobius</i>	MC	20,25	0,1-4M NaCl	1M NaCl	Novitsky y Kushner, 1975
		30	0,5-4M NaCl	"	"
		35	1,0-4M NaCl	"	"
<i>Marinococcus halophilus</i>	MC	20,25	0,1-4M NaCl	"	Novitsky y Kushner, 1976
		30	0,5-4M NaCl	"	"
		35	1,0-4M NaCl	"	"
<i>Marinococcus albus</i>	MC	37	5-20% NaCl	-	Woo y col., 1984
<i>Sporosarcina halophila</i>	MC	30	2-15% NaCl	3-5% NaCl	Claus y col., 1983
<i>Deleya halophila</i>	MC	22,32	2,5-25% sales	7,5% sales	Quesada y col., 1987
		42	2,5-25% sales	10% sales	"
	MD	22	2,5-20% sales	5% sales	"
		32	2,5-20% sales	7,5% sales	"
		42	2,5-25% sales	"	"
<i>Vibrio costicola</i>	MC	32	0,4-3,5M NaCl	1,0-1,5M NaCl	Flanery y col., 1952
	MD-1	30	0,4-2,5M NaCl	1,5-2,0M NaCl	Forsyth y Kushner, 1980
	MD-2	30	0,5-3,0M NaCl	1-2M NaCl	Kamekura y col., 1985
<i>Flavobacterium haimophilum</i>	MC	30	3-25% sales	-	Elazari-Volcani, 1940
<i>Halomonas elongata</i>	MC	23-37	0,05-4,5M NaCl	0,375-2,5M NaCl	Vreeland y Martin, 1980
	MD	30	0,05-3,4M NaCl	0,375-1,37M NaCl	"
		40	1,37-2,5M NaCl	2M NaCl	"
<i>Halomonas subglaciescola</i>	MC	25	2,5-1,75% sales	-	Franzaan y col., 1987
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	MC	25	2,2-23% sales	4,4-8,8% sales	Robinson y Gibbons, 1952
	MD	25	1-2M sales		Hochstein y Tomlinson, 1984
<i>Sporohalobacter lortetii</i>	MC	30	0,7-2,5M NaCl	1,4-2,5M NaCl	Gren, 1983
		37	0,7-2,5M NaCl	1,7M NaCl	"

MC= medio de cultivo complejo;
 MD= medio de cultivo definido; MD-1, MD-2= son dos medios definidos de distinta composición
 - = no determinado

Tabla I.5. (continuación)

Microorganismo	Medio de cultivo/ Temperatura °C	Rango sal	Concentración óptima	Referencia	
<i>Sporohalobacter marismortui</i>	MC	28	0,5-3M NaCl	1M NaCl	Oren y col., 1987
		44	0,5-3M NaCl	1,5M NaCl	"
<i>Haloanaerobium praevalens</i>	MC	37	2-30% NaCl	12,5 % NaCl	Zeikus y col., 1983
<i>Halobacteroides halobius</i>	MC	37	1,2-2,8M NaCl	1,5-2,5M NaCl	Oren y col., 1984
<i>Spirochaeta halophila</i>	MC	37	0,05-1,25M NaCl	0,75M NaCl	Greenberg y Canale-Parola, 1972
<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i>	MD	30	1-10% NaCl	1-6% NaCl	Imhoff y col., 1981
<i>Rhodospirillum salinarium</i>	MC-a	37	3-21% NaCl	6-12% NaCl	Nissen y Dundas, 1984
	MC-an	37	6-24% NaCl	12-18% NaCl	"
<i>Rhodospirillum salixigens</i>	MD	30	5-20% NaCl	6-8% NaCl	Drews, 1981
<i>Micrococcus varians</i> subsp. <i>halophilus</i>	MC	30	0-4,0M NaCl	1-2M NaCl	Kamekura y Onishi, 1976.
	MD	30	0,2-3,5M NaCl	1M NaCl	"
<i>Micrococcus norrhuae</i> K-17	MC	30	0,5-4,0M NaCl	2M NaCl	Chang y Leung, 1979
	MD	30	0,5-3,5M NaCl	"	"
<i>Micrococcus luteus</i> K-15	MC	20	0,2-3,5M NaCl	1M NaCl	"
		30,35	0,5-4M NaCl	"	
	MD	20	0,2-3M NaCl	"	
		30	0,5-3,5M NaCl	"	
		35	0,5-4,0M NaCl	"	

MC= medio de cultivo complejo; MC-a= en aerobiosis; MC-an= en anaerobiosis
MD= medio de cultivo definido;

a.- REQUERIMIENTOS IONICOS

Al igual que el resto de los microorganismos halófilos, las bacterias halófilas moderadas presentan un requerimiento específico por el ión sodio, desligado de su efecto puramente osmótico (Kushner, 1978). Los estudios realizados en este sentido se basan en la sustitución total o parcial de NaCl por otras sales, si bien no existen datos para todas las especies descritas.

En 1952 Flannery y colaboradores estudiaron los requerimientos salinos de *Vibrio costicola* cultivándolo en un medio complejo adicionado de diversas sales por separado; el microorganismo era capaz de crecer en presencia de Na₂SO₄, NaBr, Na₂MoO₄ y una mezcla de fosfatos mono y bisódico, pero no existía respuesta en el caso de NaF, NaI o NaNO₃, ni cuando se sustituía el Na⁺ por otros cationes como Mg⁺⁺, K⁺ o Li⁺, salvo que se adicionase 0,2 M de NaCl al medio de cultivo (Flannery y col., 1952).

Micrococcus halodenitrificans fue objeto de un estudio similar (Robinson y col., 1952), demostrándose que dicha bacteria sólo crece con NaCl, mientras que el resto de las sales ensayadas, aunque no todas, sólo permitían su supervivencia durante distintos periodos de tiempo.

Planococcus halophilus requiere, por encima de 25 °C, un mínimo de 0,5 M de NaCl, no reemplazable por otras sales ni solutos no ionizables (Novitsky y Kushner, 1975).

Chang y colaboradores (1979) concluyeron que es posible sustituir parcial pero no totalmente el Na⁺, requerido por "*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*" para crecer en un medio químicamente definido, por K⁺, Li⁺ o Cs⁺; así mismo evaluaron la influencia de la temperatura encontrando que ésta favorece el efecto de parcial sustitución para el Li⁺ y Cs⁺, pero no para el K⁺.

En otro trabajo posterior con este mismo microorganismo (Kamekura y Onishi, 1982) se demuestra la posibilidad de sustituir el anión Cl⁻ por Br⁻, I⁻, NO₃⁻ o SO₄⁻.

Halomonas elongata requiere Na^+ de forma específica, ya que éste no puede ser sustituido por otros cationes como Mg^{++} , K^+ o NH_4^+ , mientras que el microorganismo sí puede crecer en presencia de otros aniones distintos del Cl^- , como son Br^- o NO_3^- (Vreeland y Martin, 1980). Por ello, el propio Vreeland sugiere que quizás no debería denominarse a este tipo de microorganismos como "halófilos", ya que no requieren sal (NaCl), sino como "natronófilos" por su requerimiento exclusivo por el ión Na^+ (Vreeland, 1987).

Quesada y colaboradores (1987) demostraron igualmente que *Deleya halophila* posee un requerimiento absoluto por Na^+ , no sustituible por otros cationes ni solutos no iónicos como la sacarosa; en cambio, el Cl^- puede ser sustituido por SO_4^{--} , Br^- o $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$, si bien la bacteria presenta un crecimiento mucho peor con estas últimas sales que con NaCl .

b.-COMPOSICION EN SOLUTOS INTRACELULARES

Una cuestión que se plantea inevitablemente en el estudio de la fisiología de los organismos que se desarrollan en medios de alta salinidad es cómo consiguen vivir en estas condiciones. Recordemos que el problema de la supervivencia en medios con elevadas concentraciones salinas no es tanto soportar una elevada concentración de solutos, cuanto la existencia de un bajo potencial o actividad de agua. La situación quedaría resuelta eficientemente acumulando en el interior de las células determinados solutos en concentración suficiente para compensar la elevada presión osmótica externa. Esta sustancia osmóticamente activa impediría que el agua saliera de la célula; más aún, la actividad de agua intracelular resultaría ser así menor que la del medio externo, de modo que el agua podrá penetrar en la célula en respuesta a un gradiente de concentración.

Brown en 1976 acuñó para estas sustancias el acertado término de "solutos compatibles", indicando con el mismo que deberían ser efectivamente compatibles con la actividad metabólica de la célula. Así pues, un buen soluto compatible debería cumplir dos requisitos: procurar un adecuado balance osmótico y proteger la estabilidad y funcionalidad de proteínas estructurales y enzimáticas de las células (Brown, 1976).

En principio, parecía lógico pensar que los microorganismos halófilos acumularan en su interior iones en concentraciones tan elevadas como las que existían en el medio externo.

Christian e Ingram (1959) midieron los puntos de congelación de células y medios de cultivo de *Micrococcus halodenitrificans* y *Vibrio costicola* cultivados en distintas concentraciones de sales, junto con microorganismos halófilos extremos y halotolerantes. Para cada bacteria, en cada concentración salina, el descenso del punto de congelación era igual para el medio de cultivo y para las células centrifugadas, lo que sugería la idea de concentraciones de solutos internas similares a las externas.

Posteriormente diversos autores han determinado la concentración iónica interna de bacterias halófilas moderadas obteniendo resultados diversos, como se muestra en la Tabla I.6.

En *Vibrio costicola* la suma de los iones $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ es al menos tan alta como la del medio externo, y aumenta al elevarse también esta última (Shindler y col., 1977); este hecho también se observó en "*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*" (Chang y col., 1979). En "*Pseudomonas halosaccharolytica*", sin embargo, esta suma permanece prácticamente constante en un amplio rango de concentraciones externas de NaCl (Masui y Wada, 1973). En otras bacterias, como *Halomonas elongata* o en un halófilo no identificado NRCC 41227, la concentración de $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ intracelular es mucho menor que la de Na^+ existente en el medio externo (Matheson y col., 1976; Vreeland y col., 1983).

Tabla I.6. Contenido iónico de distintos microorganismos halófilos moderados

	Concentración iónica (M)					
	en el medio			asociado a la célula		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
<i>Paracoccus halodenitrificans</i> (es)	1,000	0,0400	1,00	0,310	0,470	0,055
	1,000		1,00	0,510	1,007	
	3,000		3,00	1,070	0,116	
<i>Paracoccus halodenitrificans</i> (ex)	1,000			0,110	0,300	
	3,000			0,130	0,330	
<i>Pseudomonas halosaccharolytica</i>	1,000	0,0055	1,00	0,900	0,710	0,710
	2,000	0,0055	2,00	1,150	0,890	0,980
	3,000	0,0055	3,00	1,040	0,670	0,700
<i>Vibrio costicola</i> (ex)	1,000	0,0400	1,00	0,680	0,220	0,140
<i>Vibrio costicola</i> (es)	0,60	0,0080		0,510	0,520	
Halófilo NRCC 41227 no identificado	0,60	0,0400		0,050	0,340	
	4,40	0,0400		0,620	0,580	
<i>Halomonas elongata</i>	0,046	0,0170		0,042	0,0023	
	1,380	0,0160		0,031	0,160	
	3,400	0,0100		0,630	0,018	
<i>Micrococcus varians</i> subsp. <i>halophilus</i>	3,100	0,0120	3,10	2,880	0,207	
	0,056	3,1000	3,10	0,161	2,660	
	0,081	0,0140	1,50	0,950	0,110	
	0,056	0,0160	1,50	0,130	0,004	
<i>Halobacteroides halobius</i>	1,560	0,0130	1,56	0,540	0,920	
<i>Haloanaerobium praevalens</i>	0,990	0,0130	1,00	0,460	0,950	
	2,220	0,0130	2,30	1,520	1,590	2,24
	3,080	0,0130	3,16	2,630	2,05	3,28
<i>Rhodospirillum salinarium</i>	0,500	0,0040	0,50		0,30	
	3,000	0,0040	3,00	0,410	0,39	

ex= fase exponencial ; es= fase estacionaria

"*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*" acumula cantidades substanciales de aquellos cationes presentes en elevadas concentraciones en el medio de cultivo, como Na^+ , K^+ , Rb^+ o Cs^+ (Kamekura y Onishi, 1982).

Los microorganismos halófilos moderados anaerobios *Haloanaerobium praevalens* y *Halobacteroides halobius* poseen elevadas concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ , y la suma de éstos aumenta en proporción al NaCl del medio de cultivo (Oren, 1986). Además, las concentraciones intra y extracelulares de Cl^- son idénticas en *Haloanaerobium praevalens*, hecho no observado en otras bacterias halófilas moderadas, en las que se habían determinado concentraciones intracelulares de Cl^- muy bajas (Oren, 1986).

Recientemente, de Médicis y colaboradores (1986) han determinado el contenido en Mg^{++} y Mn^{++} en tres bacterias halófilas y una no halófila, observando un aumento en la concentración de estas iones cuanto mayor era el "carácter halofílico" de las cepas, por lo que sugieren que podrían jugar un papel importante en los mecanismos de haloadaptación de este tipo de bacterias.

A pesar del número relativamente elevado de estudios llevados a cabo en este sentido, Imhoff plantea la imposibilidad de conocer de forma exacta la concentración intracelular del ión Na^+ con las metodologías empleadas en dichas investigaciones, convirtiéndose así el K^+ en el principal catión presente en el citoplasma de los microorganismos halófilos moderados (Imhoff, 1986a). De esta forma, apunta la necesidad de ahondar en la búsqueda de otros solutos no iónicos que puedan ser acumulados intracelularmente por estas bacterias como solutos compatibles.

Sin embargo, hasta el momento, se han realizado muy pocos estudios en este sentido.

Vreeland y colaboradores (1983) señalaron que se producía un aumento en la concentración intracelular de aminoácidos como glutámico, aspártico y alanina a medida que se elevaba también la concentración de NaCl del medio de cultivo, si bien apuntaron que estos cambios, junto con los iónicos, no equilibraban las modificaciones de la presión osmótica externa.

Imhoff y Rodriguez-Valera (1984) llevaron a cabo un estudio con diversos microorganismos halófilos junto con tres especies no halófilas y encontraron que todas las bacterias halófilas moderadas acumulaban en su interior betaína en proporción a la concentración salina del medio externo; se determinó también el contenido en algunos azúcares, aminoácidos o polialcoholes, observando que la contribución de los mismos al total de solutos era insignificante; si bien el glutámico se acumuló en cantidades substanciales, no guardaba correlación con la variación de la concentración salina externa. Por todo ello, los autores concluyeron que la betaína podría actuar como el principal soluto compatible en los microorganismos halófilos moderados.

A pesar de ello, en las bacterias halófilas moderadas anaerobias, *Haloanaerobium praevalens* y *Halobacteroides halobius*, no se han detectado cantidades significativas de aminoácidos ni betaína en el interior de sus células, y sí concentraciones elevadas de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en proporción a la salinidad del medio de cultivo, por lo que se sugiere que estos microorganismos podrían presentar un comportamiento distinto al de otros halófilos moderados (Oren, 1986).

c. - ENZIMAS

Desde que en 1952 Robinson describiera el efecto de la sal sobre la actividad de dos enzimas de *Micrococcus halodenitrificans* se han realizado estudios muy numerosos sobre diversas actividades enzimáticas de las especies de microorganismos halófilos moderados descritas y sobre la influencia de la sal en las mismas.

- Enzimas intracelulares

Los trabajos iniciales con enzimas citoplasmáticas de bacterias halófilas moderadas mostraban que estas enzimas podían ser inhibidas por concentraciones de sal que resultaban ser óptimas para

su propio crecimiento (Larsen, 1962), e incluso presentar actividad en ausencia total de sal, por lo que empezaron a utilizarse los términos "halofílicas" para aquellas que requirieran sal para su actividad y "no halofílicas" cuya actividad máxima ocurriría en ausencia total de sal (Cazzulo, 1979).

Sin embargo, dado que el conocimiento actual sobre la composición iónica interna de estos microorganismos es incompleto, y ante la posibilidad de que mantengan una baja concentración de cloruro, se hace difícil la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de diversos enzimas intracelulares, ya que la mayoría se han realizado a distintas concentraciones de cloruros de sodio, potasio u otros cationes (Kushner y Kamekura, 1988).

Baxter y Gibbons señalaban en 1956 que las enzimas isocitrato, succínico, málico y α -cetoglutarato deshidrogenasas de *Vibrio costicola* eran más activas en ausencia de sal o en bajas concentraciones de NaCl o KCl. La glucosa oxidasa de "*Pseudomonas halosaccharolytica*", sin embargo, era realmente halofílica, presentando actividad óptima a concentraciones superiores a 1,5 M de NaCl.

Del citoplasma de *Vibrio costicola* se han aislado y purificado dos enzimas: piruvato kinasa y málico deshidrogenasa NADP-dependiente.

La piruvato kinasa se describió como activa en ausencia de sal e inactiva por encima de 1 M de NaCl o KCl (de Médicis y Rossignol, 1977). Utilizando sustratos adecuados (MgADP y fosfoenolpiruvato) los mismos autores demostraron posteriormente la existencia de elevada actividad con 1,5 M de KCl, favorecida por la presencia de iones Mn^{++} (de Médicis y Rossignol, 1979).

La enzima málico deshidrogenasa NADP-dependiente, al igual que otras enzimas málicas, requiere cationes divalentes para su actividad. Es activada además por NH_4Cl o KCl, siendo éstos más activos que el NaCl (Salvarrey y Cazzulo, 1980).

Otras enzimas estudiadas en *Vibrio costicola* fueron la treonina deshidratasa, que era progresivamente inhibida por concentraciones crecientes de NaCl; y la aspartato transcarbamilasa

que mostraba actividad máxima en presencia de 2 M de NaCl (Shindler, 1976).

Más recientemente, Sadler y colaboradores (1980) encontraron que varias deshidrogenasas de *Paracoccus halodenitrificans* eran inhibidas por concentraciones de NaCl o KCl similares a las correspondientes de Na⁺ y K⁺ intracelulares; la concentración de Cl⁻ de este organismo resultó ser mucho menor que la externa, lo que sugiere que la inhibición observada se debía al efecto tóxico de los iones cloruro (Sadler y col., 1980).

Por último, la málico deshidrogenasa de *Rhodospirillum salinarium* presenta su máxima actividad en ausencia de sal, por lo que se la considera una enzima no halofílica (Nissen y Dundas, 1984).

- Enzimas extracelulares

Dado que las exoenzimas funcionan en contacto con el medio externo, es evidente que las producidas por los microorganismos halófilos moderados deben ser activas en amplios márgenes de concentraciones salinas, y por tanto, los estudios de la influencia de la sal en las mismas están plenamente justificados.

Así, Kamekura y Onishi encontraron que "*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*" producía una nucleasa extracelular en pequeña proporción cuando la bacteria se cultivaba a 1 M de sal, mientras que existía una producción relativamente alta a 3 M (Kamekura y Onishi, 1974a). También se estudió el efecto ejercido por otras sales sobre la producción y estabilidad del enzima (Kamekura y Onishi, 1976, 1983).

Esta bacteria produce también una 5'-nucleotidasa extracelular que requiere elevadas concentraciones salinas para su actividad (Onishi y col., 1984).

Otra bacteria halófila moderada descrita como *Bacillus* sp. N32-2 produce una nucleasa de actividad máxima en presencia de 1,4-3,2 M de NaCl o 2,3-3,2 M de KCl (Onishi y col., 1983).

Se han descrito también amilasas halofílicas producidas por microorganismos halófilos moderados:

La producción del enzima por *Micococcus halobius* ocurre cuando éste se cultiva aeróbicamente con 1-3 M de NaCl y se incrementa en presencia de almidón en el medio. La actividad máxima se observó en 1,4-2 M de NaCl o KCl (Onishi, 1972a, 1972b); es inestable en agua pero estable en presencia de calcio y 2 M de NaCl (Onishi y Sonoda, 1979).

Acinetobacter sp. produce dos tipos de amilasa, I y II, en medios con 1-2 M de NaCl o KCl, de actividad máxima entre 0,2-0,6 M (Onishi e Hidaka, 1978).

Dos microorganismos descritos como halófilos moderados pero no caracterizados taxonómicamente, *Bacillus* sp. 21-1 y *Pseudomonas* sp. A-14, producen proteasas activas en presencia de elevadas concentraciones salinas (Kamekura y Onishi, 1974b; Van Qua y col., 1981).

- Enzimas asociadas a la membrana citoplasmática

De la membrana de *Vibrio costicola* se han aislado dos enzimas: adenosín trifosfatasa (ATPasa) (Higa y Cazzulo, 1978) y NADH-oxidasa (Unemoto y col., 1977).

Bengis-Garber y Kushner (1981a, 1981b) demostraron que la actividad ATPásica estaba realmente representada por dos enzimas, una 5'-nucleotidasa insensible a la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), y una F_1F_0 ATPasa inhibida por DCCD. Ambas enzimas se diferencian por su requerimiento en Mg^{++} : la ATPasa se inactiva por encima de 2 mM, mientras que la 5'-nucleotidasa necesita 20 mM de Mg^{++} para su actividad máxima.

Por su parte la NADH-oxidasa mostró un requerimiento específico por Na^+ , necesitando al menos 0,5 M de NaCl para realizar su actividad.

Esta misma enzima, estudiada en *Paracoccus halodenitrificans* parece estar implicada en el flujo de iones a través de la membrana citoplasmática (Hochstein y Cronin, 1984).

d. - ENVUELTAS CELULARES

Los estudios de microscopía electrónica, realizados sobre las especies de halófilos moderados descritas, revelan que la estructura de sus envueltas celulares corresponde a la de los procariotas típicos.

En cuanto a la composición química global de estas envueltas, se han realizado pocos trabajos detallados, si bien en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la composición lipídica de las membranas y su variación con la concentración salina del medio externo, como base de la investigación de los posibles mecanismos de haloadaptación desarrollados por estos microorganismos.

- Glucopéptido

Como cabría esperar en eubacterias, las especies examinadas contienen glucopéptido. Algunas de ellas contienen ácido meso-diaminopimélico en sus cadenas peptídicas, como *Marinococcus halophilus* y *Marinococcus albus* (Novitsky y Kushner, 1976; Hao y col., 1984), mientras que en otras especies, como *Micrococcus halobius* (Onishi y Kamekura, 1972) o *Halomonas elongata* (Vreeland y col., 1984), no se ha detectado; esta última especie posee en cambio un peptidoglicano al parecer único, conteniendo el aminoácido hidrofóbico leucina; hay que añadir que la composición del heteropolímero no se modifica durante el crecimiento a distintas concentraciones salinas (Vreeland y col., 1984). En *Sporosarcina halophila* no ha podido ser demostrada la presencia de ácido meso-diaminopimélico en células vegetativas aunque sí en esporas (Claus y col., 1983; Kandler y col., 1983).

- Proteínas

Las proteínas de las envueltas sólo se han estudiado en dos microorganismos halófilos moderados:

Inhoff y colaboradores (1983) encontraron que las proteínas de membrana de varias especies halófilas de *Ectothiorhodospira* contenían mayor proporción de aminoácidos ácidos y menor de aminoácidos no polares en las especies de requerimientos salinos más altos.

"*Pseudomonas halosaccharolytica*" contiene un exceso de aminoácidos ácidos sobre los básicos en las proteínas de su membrana externa, y, aunque se observaron algunas diferencias en su perfil proteico en presencia de elevadas concentraciones de sal, los resultados obtenidos no guardaron proporción con la concentración de sal del medio de cultivo (Hiramatsu y col., 1980).

- Lípidos

Se ha determinado la composición en ácidos grasos de algunos microorganismos halófilos, así como la influencia de diversos parámetros como temperatura de incubación, fase de crecimiento y concentración salina.

Los cocos Gram positivos estudiados, *Micrococcus halobius*, *Marinococcus halophilus* y *Marinococcus albus* presentan perfiles de ácidos grasos parecidos, con una proporción elevada de ácidos grasos ramificados (a-C15:0, -C17:0, i-C16:0) (Onishi y Kamekura, 1972; Hao y col., 1984; Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana, 1987b). En *Planococcus halophilus* tanto el aumento de la temperatura de incubación como de la concentración salina del medio de cultivo provocan un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados (C16:0, C18:0), junto con una disminución de los ramificados (a-C15:0, a-C16:0) (Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana, 1987b).

La composición en ácidos grasos de los bacilos Gram negativos se ha estudiado en "*Pseudomonas halosaccharolytica*" (Ohno y col., 1975, 1976), *Vibrio costicola* (Hanna y col., 1984) y *Deleya halophila* (Monteoliva-Sánchez y col., 1988), encontrándose como ácidos grasos mayoritarios C16:0 y C18:1 en las tres cepas; también aparecieron en proporciones importantes C16:1 y C18:0, junto con ácidos grasos con anillo ciclopropano, cy-C17:0 y cy-C19:0.

Los ácidos grasos mayoritarios encontrados en el coco Gram negativo *Micrococcus halodenitrificans* son del tipo C18:1, habiéndose detectado también en importante proporción C16:1 y C16:0, y en menores cantidades C18:0 junto con un ácido graso ramificado de cadena corta, br-C13 (Kates y col., 1961).

Las especies anaerobias *Halocanarobium praevalens* y *Halobacteroides halobius* presentaron como ácidos grasos mayoritarios C14:0, C16:1 y C16:0 (Zeikus y col., 1983; Oren y col., 1984).

Tanto en *Deleya halophila* como en "*Pseudomonas halosaccharolytica*" se observó que un incremento de la concentración de sales externa provocaba un incremento en la proporción de ácidos grasos con anillo ciclopropano, frente a una disminución de los monoinsaturados (Ohno y col., 1979; Hiramatsu y col., 1980; Monteoliva-Sánchez y col., 1988). Sin embargo, en *Vibrio costicola* no se pudieron observar cambios significativos en su composición en ácidos grasos (Hanna y col., 1984), como tampoco en *Micrococcus halodenitrificans* (Kates y col., 1961) en relación a las variaciones de salinidad del medio de cultivo.

Las membranas bacterianas contienen normalmente una mezcla de distintos tipos de fosfolípidos cuya proporción depende de las condiciones de crecimiento del organismo (Quinn, 1986).

En "*Pseudomonas halosaccharolytica*" la proporción de fosfolípidos cargados negativamente es superior a la de neutros, detectándose como mayoritarios fosfatidil glicerol (FG), fosfatidil etanolamina (FE), difosfatidil glicerol (DFG) y glucosil fosfatidil glicerol (GFG) (Ohno y col., 1975, 1976).

Halomonas elongata cultivado en presencia de 1,37 M de NaCl contiene elevadas proporciones de FG y FE y menor cantidad de cardiolipina (C) (Vreeland y col., 1984).

En *Vibrio costicola*, además de los fosfolípidos anteriores, se han descrito otros presentes en pequeñas pero significativas proporciones, como lisofosfatidil etanolamina, etanolamina, lisocardiolipina y lisofosfatidil glicerol (Hanna y col., 1984).

Los principales fosfolípidos encontrados en *Halocanarobium praevalens* fueron FG y C (Zeikus y col., 1983).

La bacteria fototrofa *Ectothiorhodospira vacuolata* posee un 54% de lípidos polares, siendo los mayoritarios fosfatidil colina, FG y C; se detectaron trazas de FE estando ausentes los glicolípidos (Imhoff y col., 1982).

Muchos microorganismos halófilos moderados muestran una correlación directa entre la proporción de lípidos de carácter ácido de sus membranas y la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Hiramatsu y colaboradores (1980) estudiaron el efecto ejercido por diversas concentraciones de NaCl sobre la composición en fosfolípidos de las envueltas de "*Pseudomonas halosaccharolytica*" y encontraron que se producía un aumento en el contenido de FG, mientras que la proporción de FE permanecía relativamente constante.

Un trabajo similar realizado con *Halomonas elongata* mostró que el microorganismo cultivado en medios con elevadas concentraciones de NaCl presentaba mayor proporción de fosfolípidos cargados negativamente (FG y C) (hasta un 57% de FG en 5 M de NaCl) y menor de fosfolípidos neutros (FE) que cuando se cultivaba a concentraciones salinas bajas (Vreeland y col., 1984).

En *Vibrio costicola* se ha estudiado la modificación de las proporciones de FG y FE ocurrida en respuesta a la sal; al ser cultivado en medios con distintas concentraciones de NaCl (desde 0,5 a 3 M) se observó un aumento de FG y una disminución de FE cuanto mayor era la salinidad externa (Hanna y col., 1984).

Por otra parte, un aumento repentino de la concentración de NaCl del medio de cultivo (de 1 M a 3 M) provocó una disminución del cociente FE/FG proporcional tanto a la concentración salina final como a la magnitud del cambio, también fue cierto que al disminuir de forma brusca la salinidad (de 3 M a 1 M de NaCl) se incrementó esta relación de los fosfolípidos mayoritarios (Kogut y Russel, 1984).

Mediante un experimento de incorporación de ^{14}C se estudió la modificación de la biosíntesis de fosfolípidos en *Vibrio costicola* durante la adaptación a cambios de concentración salina; como resultado se observó una inhibición instantánea en la biosíntesis de fosfolípidos frente a un aumento brusco de la concentración de NaCl, inhibición que cesa al adaptarse el crecimiento del organismo a la

nueva concentración de sal del medio de cultivo, de forma que en primer lugar aumenta la biosíntesis de FG, ajustándose gradualmente después la síntesis de FG y FE como mecanismo de adaptación a la elevada concentración de NaCl (Russel y Kogut, 1985; Russel y col., 1985).

- Quinonas

Las quinonas isoprenoides fueron examinadas por Collins y colaboradores (1981) en un grupo de bacterias halófilas moderadas. Estos compuestos forman parte de las membranas citoplasmáticas y desempeñan un importante papel en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Kroger e Innerhoffer, 1976; Collins y col., 1981).

Micrococcus halobius posee una elevada proporción de menaquinonas insaturadas con ocho unidades de isopreno (MK-8); *Vibrio costicola*, además de éstas, tiene también ubiquinonas de 8 isoprenos (Q-8), mientras que *Flavobacterium halmephilum* y *Paracoccus halodenitrificans* contienen ubiquinonas de 9 unidades (Q-9) (Collins y col., 1981).

Sporosarcina halophila posee menaquinonas (MK-7) como principales quinonas de sus membranas (Claus y col., 1983), al igual que las dos especies descritas en el género *Marinococcus*, *M. halophilus* y *M. aibus* (Hao y col., 1984).

e.- RIBOSOMAS Y SINTESIS DE PROTEINAS

Existen muy escasos estudios acerca de las propiedades de los ribosomas de microorganismos halófilos moderados. Los realizados con *Vibrio costicola* muestran patrones de sedimentación similares a los de procariotas: monosomas de 64 S, formados por dos subunidades de 28 S y 48 S, que no se ven afectados por los cambios en la concentración salina del medio de crecimiento (Wydro y col., 1975).

Los coeficientes de sedimentación de los ribosomas del halófilo moderado no identificado NRCC 41227 fueron de 70 S para los monosomas, y 30 S y 50 S para las subunidades que los forman (Falkenberg y col. 1976). El análisis de las proteínas ribosomales de este organismo reveló que éstas eran ligeramente más ácidas que las de una bacteria no halófila, *Escherichia coli*, pero menos que las de un halófilo extremo, *Halobacterium cutirubrum*, así mismo se demostró que tanto el perfil electroforético de las proteínas como la composición en aminoácidos de las mismas era similar en células crecidas entre 0,5 y 4,25 M de NaCl. (Falkenberg y col., 1976).

Se conoce la secuencia completa de aminoácidos de la proteína A de la subunidad 50 S (correspondiente a la proteína L12 de *Escherichia coli*) del halófilo moderado no identificado NRCC 41227 y de *Vibrio costicola* (Falkenberg y col. 1979). Los resultados revelan la mayor analogía con otras eubacterias no halófilas que con la arqueobacteria halófila extrema *Halobacterium cutirubrum* (Falkenberg y col., 1979).

Aunque los ribosomas de *Vibrio costicola* son estables en un amplio margen de concentración de sal, la síntesis proteica es mucho más selectiva: la máxima actividad se produce aproximadamente a 0,1 M NaCl, quedando inhibida por encima de 0,5 M (Wydro y col., 1977). Medidas del contenido intracitoplasmático de Cl^- (Kamekura y Kushner, 1984), que fue muy inferior al de Na^+ y K^+ , sugieren que en la biosíntesis "in vitro" se empleó un anión equivocado (Kushner, 1986). Kamekura y Kushner (1984) estudiaron el efecto de otros aniones inorgánicos y orgánicos, encontrándose alta actividad biosintética en presencia de glutamato (0,6 M o superior) u otros aniones orgánicos; parece ser que se han obtenido resultados similares en el microorganismo halófilo moderado no identificado NRCC 41227 (Kushner, 1986).

- Renovación proteica

En general en las bacterias mesófilas en fase logarítmica de crecimiento el porcentaje de renovación proteica es mínimo (Kushner y Kamekura, 1988); sin embargo las proteínas más ácidas de *Escherichia coli* se renuevan más rápidamente que las neutras (Turk y Marks, 1977).

Hipkiss y col. (1980) observaron que en *Vibrio costicola* la tasa de renovación de proteínas era mayor que en bacterias no halófilas pero no se pudo demostrar la existencia de correlación con el carácter ácido de las proteínas. Aunque esta bacteria presentó mayor renovación proteica a bajas que a altas concentraciones salinas en el medio de cultivo, este efecto no ha sido encontrado en todos los microorganismos halófilos (Kamekura y col. 1986).

f- RESPIRACION Y TRANSPORTE ACTIVO

Los sistemas de transporte activo de iones, aminoácidos u otros sustratos a través de las membranas de bacterias marinas y halófilos extremos requieren la presencia de determinadas concentraciones del ión Na^+ ; la energía proporcionada por la fuerza protón-motora puede convertirse en una fuerza sodio-motora a través de una actividad Na^+/H^+ antiporter, pudiendo así entrar los sustratos al citoplasma mediante un simporte Na-sustrato (Lanyi, 1979).

El ácido α -aminoisobutírico (AIB) ha sido utilizado ampliamente como análogo en estudios de transporte de aminoácidos a través de membrana. *Vibrio costicola* requiere Na^+ para el transporte de AIB, para la actividad Na^+/H^+ antiporter y para mantener su potencial de membrana. La actividad Na^+/H^+ antiporter, además, juega un importante papel en la regulación del pH interno. En presencia de otros solutos, como KCl, LiCl, NH_4Cl o colina (cloruro) no se mantiene el potencial de membrana ni se produce transporte de AIB (Kushner y col., 1983; Hamaide y col., 1983, 1985).

Se han descrito también sistemas de transporte activo en otros microorganismos halófilos moderados que no requieren Na^+ . Por ejemplo, en la bacteria Ba, se produce transporte efectivo de prolina en ausencia de NaCl , aunque éste lo estimula (Peleg y col., 1980).

La tolerancia a la sal de los mecanismos de transporte activo es evidente en halófilos moderados. Los estudios realizados con el microorganismo Ba, (Peleg y col., 1980), con *Halomonas elongata* (Martin y col., 1983) y con *Vibrio costicola* (Kushner y col., 1983) mostraron que las concentraciones salinas en las que funcionaba óptimamente el transporte dependían de la concentración de sal del medio en que fueron cultivadas las células.

La adaptación de *Vibrio costicola* que permite el transporte de AIB a elevadas concentraciones de NaCl no requiere síntesis de proteínas y se ve estimulado por la adición de glicina-betaina (Kushner y col., 1983).

Ken-Dror y colaboradores (1984) demostraron la existencia de actividad respiratoria dependiente de una bomba de Na^+ en la bacteria halófila moderada Ba, que genera una fuerza sodio-motora, actividad que se ve estimulada por la presencia de betaina exógena. Por su parte, Kushner y colaboradores (1983) sólo habían apuntado la complejidad de la relación entre respiración y transporte activo en *Vibrio costicola*.

g.- PLASMIDOS

Hasta la fecha, no se han realizado estudios sistemáticos sobre la existencia de ADN extracromosómico en microorganismos halófilos moderados.

Sólo cabe citar el trabajo realizado por García y colaboradores (1987), quienes demostraron la existencia de plásmidos (1-3 bandas de ADN extracromosómico en gel de agarosa) en 29 de las 58 cepas estudiadas pertenecientes a *Vibrio costicola*; no se pudo

detectar la presencia de los mismos en otras especies halófilas moderadas incluidas en el estudio, *Deleya halophila* y *Halomonas elongata*. Los autores, en un estudio acerca de la susceptibilidad de *Vibrio costicola* a diversos metales pesados, relacionaron la existencia de estos plásmidos con la alta resistencia a arsenato encontrada en esta bacteria (García y col., 1987).

b- FAGOS DE LISOGENIA

Muy recientemente, se ha aislado y caracterizado el primer bacteriófago de una cepa lisogénica de la especie halófila moderada *Deleya halophila* (Calvo y col., 1988); dicho fago, que posee una cabeza isométrica y una cola no contráctil, muestra un evidente carácter eurihalino, siendo capaz de replicarse entre 2,5-15% de sales, y presentando un porcentaje máximo de adsorción (98%) en presencia de una concentración salina del 5%.

Las investigaciones realizadas en los últimos años sobre haloadaptación y osmorregulación en procariotas han arrojado cierta luz acerca de los distintos mecanismos desarrollados por las eubacterias halófilas y también halotolerantes para lograr sobrevivir en condiciones de elevada salinidad externa. Se conocen, en este sentido, los cambios que se producen en la composición de determinadas estructuras celulares (proteínas, cubiertas) o en las distintas funciones (reacciones enzimáticas, mecanismos de transporte) (Imhoff, 1986a, 1986b; Kamekura, 1986; Kates, 1986; Kushner, 1986; Quinn, 1986; Vreeland, 1987; Kushner y Kamekura, 1988); incluso se ha sugerido alguna hipótesis sobre el conjunto de fenómenos desencadenados en la célula en respuesta a la sal (Russell y Kogut, 1985).

No obstante, no parece probable que sean sólo estos mecanismos de adaptación a las distintas concentraciones salinas externas los que determinen la condición de halófila de una bacteria (Imhoff, 1986b).

Dado el carácter eurihalino de los microorganismos halófilos moderados en concreto, capaces de adaptarse tanto a condiciones de baja como de alta salinidad, quizás sea el propio requerimiento de sal lo que haya planteado mayor número de interrogantes.

Conocido el papel de determinados cationes, entre ellos Na^+ , K^+ o Mg^{++} , en el metabolismo y funcionalidad de las células bacterianas, lo que realmente caracterizaría a las eubacterias halófilas serían las elevadas concentraciones requeridas de estos cationes, de forma específica, o de sal en términos generales, para desarrollarse. Y sin embargo no se conocen, por ejemplo, cuáles de estas propiedades estructurales o funcionales determinan la concentración de sal observada como necesaria en los distintos halófilos moderados para crecer de forma óptima (Imhoff, 1986b).

Capaces de compensar la elevada presión osmótica externa acumulando determinados solutos compatibles en su interior, ¿significa esto que toleran o que realmente requieren esta baja actividad de agua intracelular que se crea como consecuencia?. Y si es así, ¿cómo se ha producido esta adaptación? ¿Quizás en algún momento de la evolución, los microorganismos que se desarrollaban en medios externos concentrados adaptaron su fisiología a una elevada presión osmótica interna, y ahora ya es cuando requieren un medio externo que sea compatible con esta circunstancia?

Estas y muchas otras cuestiones que quedan aún por resolver, aunque a veces necesariamente especulativas, son uno de los puntos de mayor interés de las investigaciones actuales en el campo del halofilismo bacteriano.

I.3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Cuando, hace ahora algo más de una década, se iniciaron en nuestro Departamento los estudios acerca del halofilismo bacteriano, con la descripción de la población halófila de una salina solar situada en Sta. Pola (Alicante) (Rodríguez-Valera, 1978), la evidente escasez de datos sobre uno de los grupos allí presentes, los halófilos moderados, atrajo la atención de los miembros de nuestro equipo de investigación, llevándoles a emprender diversos estudios sobre este tipo de microorganismos.

Fruto de ellos son las numerosas comunicaciones y publicaciones realizadas desde entonces, que suponen una muy valiosa aportación al conocimiento tanto de la ecología de diversos ambientes hipersalinos, como de la taxonomía y fisiología de la población halófila moderada que los habita.

Algunos de los tipos bacterianos encontrados en los distintos estudios se encuadraron en las diferentes especies de microorganismos halófilos moderados descritas y aceptadas. En otros casos, sin embargo, esto no fue posible, consecuencia de lo cual es, por ejemplo, la descripción de una nueva especie, *Deleya halophila* (Quesada y col., 1984) o la descripción modificada de otra ya existente, *Vibrio costicola* (García y col., 1987).

Continuando en esta línea, nos planteamos estudiar un grupo de microorganismos halófilos moderados, cuya presencia había sido observada en trabajos previos, aunque representaban una pequeña proporción del total de la población bacteriana de los hábitats estudiados: se trata de los bacilos Gram negativos aerobios inmóviles, los cuales constituían un grupo de características bastante homogéneas, y que, al parecer, no podían asignarse de forma clara a ninguna de las especies halófilas moderadas descritas.

Así pues, para llevar a cabo este estudio, se realizaron dos amplios muestreos, en Julio de 1984 y Enero de 1985, en diferentes hábitats hipersalinos (mar, salina solar y suelos salinos de la provincia de Alicante). De un total de aproximadamente 700 colonias aisladas, se seleccionaron mediante tinción de Gram, movilidad y no crecimiento en medios desprovistos de sales, 20 bacilos Gram negativos inmóviles halófilos moderados.

Junto a estas cepas se estudiaron otras 42, de las mismas características, procedentes de un trabajo anterior (Quesada y col., 1983) y otros estudios de taxonomía con cepas procedentes de Granada, Huelva y Chile.

La descripción de los hábitats citados, así como la metodología de aislamiento y selección de las cepas ha sido realizada previamente (Quesada y col., 1982, 1985; Ventosa y col., 1982; del Moral y col., 1987; Márquez y col., 1987).

Una caracterización inicial de este conjunto de cepas mostró la existencia de dos subgrupos claramente diferenciados que fueron asignados provisionalmente a los géneros *Flavobacterium* (cepas oxidasa positivas) y *Acinetobacter* (cepas oxidasa negativas) (Quesada y col., 1985). No obstante, la existencia de importantes diferencias entre nuestras cepas y las especies descritas dentro de estos géneros, nos hizo pensar que podrían constituir nuevos taxa no descritos hasta el momento.

Para confirmar esta hipótesis, se hacía evidente, por tanto, la necesidad de profundizar en el estudio de estos microorganismos mediante la aplicación de técnicas de vigor actual en Taxonomía bacteriana, como es el Análisis Numérico o aquellas que se basan en estudios genéticos.

Por otra parte, y dentro de la misma línea de investigación se habían iniciado en nuestro Departamento los primeros estudios fisiológicos sobre bacterias halófilas moderadas, trabajando con la especie *Deleya halophila*. Ello nos movió a llevar a cabo estudios de este tipo con los dos grupos de microorganismos objeto de este trabajo, con el fin de profundizar en el conocimiento de los mismos, así como de aportar datos comparativos sobre la peculiar fisiología de las bacterias halófilas moderadas.

Así pues, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de estos dos nuevos taxa, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Análisis Numérico de los caracteres fenotípicos de las cepas
- 2.- Caracterización genética (contenido en Guanina más Citosina, estudios de homología ADN/ADN)
- 3.- Estudio de la morfología celular (microscopía electrónica)
- 4.- Características fisiológicas (propiedades culturales en respuesta frente a la sal, composición química celular).

II. MATERIAL Y METODOS

II.1.- MICROORGANISMOS

Los microorganismos objeto de este estudio han sido un total de 62 cepas de bacilos Gram negativos aerobios inmóviles halófilos moderados aislados a partir de diversos ambientes hipersalinos: 45 proceden de suelos salinos de una antigua salina solar localizada en Sta. Pola (Alicante), 4 de la salina "Bras de Port", también en Sta. Pola (Alicante) y otras 5 cepas de agua de mar de la costa alicantina; 5 fueron aisladas de las rías de Huelva, dos de una salina interior situada en La Malá (Granada), y, por último, una cepa procede del Salar de Atacama (Chile).

En la Tabla II.1 aparece la relación de estas 62 cepas junto a su lugar de procedencia.

Tabla I.1. Relación de las cepas objeto de estudio y su lugar de procedencia

Salina (Alicante)	Suelos salinos (Alicante)
A-2	A-3 F9-6
A-6	A-4 F9-8
A-18	A-7 F9-12
A-20	A-8 F10-4
	A-9 F10-5
Salina (Granada)	A-10 F10-11
C-7	A-12 F11-2
C-9	A-16 F11-9
	A-19 F11-10
Rías de Huelva	A-26 F11-11
H-109	A-34 F11-13
H-111	F2-7 F11-14
H-356	F2-8 F11-16
H-361	F2-12 F11-17
H-412	F2-13 41a
	F2-14 43a
Mar (Alicante)	F2-15 43b
A-11	F2-16 G-4
A-13	F2-17 G-15
A-24	F5-10 G-17
A-30	F8-5 G-21
A-32	F8-6
	F8-9
Laguna (Chile)	F8-11
B-1	

Como cepas de referencia se han utilizado los siguientes microorganismos procedentes de colecciones de cultivo (T: cepa tipo):

Acinetobacter calcoaceticus CCM 5581
Acinetobacter calcoaceticus CCM 5593
Alcaligenes faecalis CCM 1052^T
Alteromonas luteoviolacea ATCC 33492^T
"*Chromobacterium marismortui*" ATCC 17056
Deleya aesta NCMB 1980^T
Deleya cupida NCMB 1978^T
Deleya halophila CCM 3662^T
Deleya marina ATCC 25347^T
Deleya pacifica NCMB 1977^T
Deleya venusta NCMB 1979^T
Flavobacterium halmephilum CCM 2833^T
Flavobacterium meningosepticum CCM 2719^T
Halomonas elongata ATCC 33173^T
Halomonas halodurans ATCC 29686^T
"*Pseudomonas halosaccharolytica*" CCM 2851
Pseudomonas putida CCM 1977^T
Vibrio alginolyticus CECT 521^T
Vibrio costicola NCMB 701^T
Vibrio natriegens CECT 526^T
Vibrio parahaemolyticus CECT 511^T

Las especies que aparecen entre comillas no se encuentran aceptadas en la actualidad (Skerman, 1980; Moore, 1985).

II.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Medio complejo (MH)

La composición de este medio, descrito por Quesada y colaboradores (1983) es la siguiente (% p/v):

Proteosa-peptona no. 3 (Difco)	0,5
Extracto de levadura (Difco)	1,0
Glucosa	0,1

adicionado de una mezcla de sales inorgánicas en proporción correspondiente a la de la solución artificial del agua del mar (Subov, 1931).

Así, la composición de dicha solución salina al 30% (p/v), expresada en g/l, sería como sigue:

NaCl	234,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	59,80 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	41,60 g
KCl	6,00 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,10 g
NaBr	0,70 g
NaCO ₃ H	0,20 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	trazas
Agua destilada	1000 ml

Se dispuso de dicha solución de sales para, una vez realizadas las oportunas diluciones, obtener la concentración salina adecuada a cada caso.

Para la construcción del medio de cultivo MH, la solución salina y los nutrientes disueltos en la cantidad correspondiente de agua destilada se esterilizaron por separado en autoclave a 112 °C durante 30 minutos, para evitar la precipitación de las sales que ocurre sobre todo a las concentraciones salinas más elevadas. El pH se ajustó a 7,2 con KOH 1N.

Medio definido (MD)

Su composición es la siguiente (% p/v):
(Quesada y col., 1987)

$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4\text{H}$	0,10
KPO_4H_2	0,05
KNO_3	0,10
Glucosa	0,10

adicionado igualmente de una mezcla de sales totales (Subov, 1931). Con el fin de evitar la precipitación de los fosfatos, la solución de los mismos se esterilizó por filtración y se añadió a la solución de sales, glucosa y KNO_3 , previamente esterilizada en autoclave a 112 °C durante 30 minutos; el pH de ésta última se ajustó a 7,2 con KOH 0,01N.

Medio de conservación de las cepas

Las cepas se conservaron en el medio MH anteriormente descrito, preparado al 7,5% (p/v) de sales totales en el caso de las bacterias halófilas moderadas y al 3% para las marinas y adicionado de un 2% de Agar (Difco), realizándose subcultivos cada tres meses. Las cepas halotolerantes se conservaron en el medio comercializado de Tripticasa-soja-agar.

II.3.- CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS CEPAS

Se realizaron un total de 151 pruebas fenotípicas, incluyendo pruebas morfo-fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y de susceptibilidad frente a antimicrobianos.

Estas pruebas fueron seleccionadas de acuerdo con el Manual de Bergey (Krieg, 1984) y los trabajos de Holmes y colaboradores (1983, 1984) y de Yabuuchi y colaboradores (1983), y modificadas convenientemente para el estudio de los microorganismos halófilos según Ventosa y colaboradores (1982) y Quesada y colaboradores (1983, 1984).

En la Tabla II.2 se relaciona el total de pruebas efectuadas cuya descripción ha sido previamente realizada (Quesada y col., 1987).

II.4.- TAXONOMIA NUMERICA

Los resultados de la caracterización fenotípica de las 62 cepas objeto de este estudio junto con los cinco microorganismos halófilos moderados utilizados como referencia, fueron sometidos a Análisis Numérico empleando el programa MINT de Taxonomía (Mini-Numerical Taxonomy) desarrollado por el Dr. F. J. Rohlf (1985).

Los microorganismos de referencia empleados fueron:

- "*Chromobacterium marismortui*" ATCC 17056
- Deleya halophila* CCM 3662^T
- Flavobacterium halmephilum* CCM 2833^T
- "*Pseudomonas halosaccharolytica*" CCM 2851
- Vibrio costicola* NCMB 701^T

Tabla II.2. Pruebas fenotípicas utilizadas para la caracterización de las cepas.

Pruebas morfológicas y culturales

- Tinción de Gram (Dussault, 1955)
- Tinción de PHB (Baker, 1967)
- Movilidad (Ventosa y col., 1982)
- Características culturales (Ventosa y col., 1982)

Pruebas fisiológicas

- Crecimiento a distintas concentraciones de sal (Ventosa y col., 1982)
- Crecimiento a distintas temperaturas (Ventosa y col., 1982)
- Crecimiento en distintos pH (Ventosa y col., 1982)
- Crecimiento en anaerobiosis (Ventosa y col., 1982)

Pruebas bioquímicas

- Catalasa (Ventosa y col., 1982)
- Oxidasa (Kovacs, 1956)
- Producción de ácidos a partir de (Ventosa y col., 1982):
 - Adonitol
 - L-arabinosa
 - D-celobiosa
 - Dulcitol
 - Etanol
 - D-fructosa
 - D-galactosa
 - D-glucosa
 - Inulina
 - Lactosa
 - Maltosa
 - D-manitol
 - D-manosa
 - D-melecitosa
 - Melibiosa
 - Sacarosa
 - Salicina
 - D-sorbitol
 - D-trehalosa
 - D-xilosa

Tabla II.2. (continuación)

Oxido-fermentación sobre la glucosa (Ventosa y col., 1982)
Respiración sobre fumarato, nitrato y nitrito (Callies y Mannheim, 1978)
Reducción de nitratos y nitritos (Skerman, 1967)
Producción de H₂S (Clarke, 1953)
Producción de indol (Cowan y Steel, 1982)
Rojo de metilo (Cowan y Steel, 1982)
Voges-Proskauer (Barrit, 1936)
Tolerancia al cianuro potásico (Moller, 1954)
Reducción del selenito (Lapage y Bascomb, 1968)
Oxidación del gluconato (Shaw y Clarke, 1955)
Hidrólisis de la urea (Christensen, 1946)
Fenilalanina desaminasa (Cowan y Steel, 1982)
Prueba del orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (Lowe, 1962)
Hidrólisis de la gelatina (Frazier, 1926)
Hidrólisis de la caseína (Hastings, 1903)
Hidrólisis del almidón (Cowan y Steel, 1982)
Hidrólisis del Tween 20 y 80 (Sierra, 1957)
Producción de DNasa (Jeffries y col., 1957)
Producción de fosfatasa (Baird-Parker, 1963)
Hemólisis en agar-sangre (Quesada y col., 1984)
Crecimiento en Agar-MacConkey (Quesada y col., 1987)
Crecimiento en Agar-Cetrimida (Quesada y col., 1987)
Prueba de la lecitovitelina (Larpent y Larpent-Gourgand, 1957)
Hidrólisis de la esculina (Cowan y Steel, 1982)
Formación de piocianina y fluoresceína (Cowan y Steel, 1982)
Hidrólisis de la tirosina (Gordon y Smith, 1955)

Tabla II.2.- (continuación)

Pruebas nutricionales (Ventosa y col., 1982)

Sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía:

<u>Carbohidratos</u>	<u>Acidos</u>	<u>Alcoholes</u>
Almidón	Acetato	Adonitol
L-arabinosa	Benzoato	Dulcitol
D-celobiosa	Caprilato	DL-glicerol
Esculina	Citrato	<i>mi</i> -inositol
D-fructosa	Formiato	D-manitol
D-galactosa	Fumarato	D-sorbitol
D-glucosa	D-gluconato	
Inulina	Hipurato	
Lactosa	DL-lactato	
Maltosa	DL-malato	
D-manosa	Malonato	
L-rafinosa	Oxalato	
L-ramnosa	Piruvato	
Sacarosa	Propionato	
D-salicina	Succinato	
L-sorbosa	D-tartrato	
D-trehalosa	β -hidroxibutirato	
D-xilosa		

Sustratos utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía:

L-alanina	L-leucina
L-arginia	L-lisina
L-aspártico	L-ornitina
L-glutámico	L-serina
L-histidina	L-triptófano
DL-isoleucina	

Tabla II.2.- (continuación)

Sensibilidad frente a antimicrobianos (Bauer y col., 1966)

Acido Nalidixico	30 µg
Amikacina	30 µg
Ampicilina	100 µg
Carbenicilina	100 µg
Cefalotina	30 µg
Clindamicina	2 UI
Cloramfenicol	30 µg
Colistina	50 µg
Eritromicina	15 µg
Estreptomina	10 µg
Gentamicina	10 UI
Penicilina G	10 UI
Folimixina B	300 UI
Rifampicina	5 µg
Sulfamida	200 µg
Tetraciclina	30 µg
Trimetoprim-	Trime-1,25 µg
-Sulfametoxazol	Sulfa-23,75 µg

De un total de 151 pruebas fenotípicas realizadas se seleccionaron 117, eliminándose el resto por presentar resultados iguales para todas las cepas y no ofreciendo por tanto carácter discriminatorio alguno (Sneath y Sokal, 1973). La codificación de los datos se realizó de forma binaria tipo presencia-ausencia asignando el valor 0 a aquellas pruebas que resultaron ser negativas y 1 a las positivas. Se asignó el valor 9 a los caracteres no comparables, por ser el resultado dudoso, por incapacidad de crecimiento en el medio o por ausencia del dato.

Procesamiento de los datos

El análisis de los datos encaminado a obtener el grado de semejanza entre las distintas unidades taxonómicas operativas (OTU's) se realizó utilizando el coeficiente de Sokal y Michener (S_{SM}), de apareamiento simple (Sokal y Michener, 1958), y el de Jaccard (S_J) (Jaccard, 1908).

Los resultados obtenidos con cada uno de los coeficientes de semejanza se sometieron a un análisis de agrupación según la técnica UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Average) o de acoplamiento promedio binario contrapesado, obteniéndose sendos coeficientes de correlación cofenética (Sneath y Sokal, 1973)

Este proceso analítico se llevó a cabo en un ordenador ECLIPSE 1108 del Centro de Informática de la Universidad de Sevilla.

II.5.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN G+C

Para la determinación del contenido en bases Guanina más Citosina se seleccionaron las siguientes cepas:

Fenón A:	F8-11	F11-2	Fenón B:	F9-6	F2-15
	F8-5	F11-10		F2-12	43 a
	A-2	F9-12		41 a	F2-13
	A-30	G-21		B-1	F11-16
	A-32	H-356			

Extracción y purificación del ADN

Las cepas seleccionadas como representantes de cada fenón obtenido tras el Análisis Numérico se cultivaron en el medio MH al 7,5% de sales durante 24 h, en agitación a 32 °C; las células se recogieron por centrifugación en frío y se lavaron con EDTA salino.

Para la extracción y purificación del ADN se siguió la técnica descrita por Marmur en 1961. Las células fueron lisadas mediante proteasa (Sigma) (100 µg/ml) y lisozima (Sigma) (0,4 µg/ml) a 37 °C durante 30 minutos; para completar la lisis se trató con dodecil sulfato de sodio (SDS 25%) a 60 °C durante 10 minutos y posteriormente con perclorato sódico 5M durante 2-4 horas a temperatura ambiente. A continuación se procedió a desproteínizar mediante tratamientos sucesivos con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).

El ADN se precipitó por adición de etanol frío y se recogió con varilla de vidrio, resuspendiéndolo después en tampón de citrato salino (0,1xSSC). Finalmente, tras tratamiento con RNasa (Sigma) (50 µg/ml) durante 60 minutos a 37 °C, el ADN fue precipitado de nuevo con etanol y redisolto en una pequeña cantidad de 0,1xSSC.

La pureza del ADN extraído fue determinada mediante medidas de absorción espectrofotométrica a 230, 260 y 280 nm.

Determinación de la temperatura de desnaturalización

La Temperatura de desnaturalización (T_m) del ADN se determinó según el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976), por elevación progresiva de la temperatura del ADN extraído y purificado y medida de absorción a 260 nm, utilizando para ello un espectrofotómetro Perkin-Elmer VIS-UV 551 S Recorder 561, acoplado a un programador de temperatura que consigue incrementos de 1 °C/minuto.

Cálculo del contenido en G+C

El porcentaje en Guanina más Citosina del ADN puede calcularse a partir del valor de su temperatura de desnaturalización (T_m) (Marmur y Doty, 1962), mediante la fórmula dada por Owen y Hill (1979) utilizando como cepa de referencia *Escherichia coli* NCTC 9001, cuya T_m fue también previamente determinada, asignándosele un valor de 74,6 °C en 0,1xSSC (Owen y Pitcher, 1985).

II.6.- HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron dos cepas representantes de cada fenón, que se compararon con otras de su propio grupo (las mismas a las que se determinó el porcentaje en G+C y que se han citado en el apartado anterior), así como con 21 cepas procedentes de colecciones de cultivo, las cuales aparecen en el apartado II.1.

Preparación del ADN marcado

El marcaje del ADN se realizó mediante un "kit" comercial que utiliza el sistema "multiprime" con ^3H -desoxi(1',2',5)citidina-5'-trifosfato (Amersham). El porcentaje de actividad específica obtenido con este procedimiento fue de $8,4 \times 10^6$ cpm/ μg de ADN. Este ADN marcado se desnaturalizó, previamente a la hibridación, por tratamiento a 100 °C durante 5 minutos, y se conservó sobre hielo.

Hibridación ADN/ADN

Los estudios de homología ADN/ADN se realizaron mediante el método de competición en membrana descrito por Johnson (1981). El ADN competidor se sometió a sonicación (50 vatios en intervalos de 15 segundos) para obtener pequeños fragmentos. Los filtros de membrana sobre los que se había fijado el ADN de referencia, se colocaron en viales junto con el ADN marcado previamente y con el ADN competidor. La relación de concentraciones entre ADN competidor y marcado fue al menos 150:1. Se adicionó un 30% de formamida y el volumen final se ajustó a 140 μ l con 2xSSC. El proceso de hibridación transcurrió durante aproximadamente 18 horas a una temperatura de 56-58 °C, temperatura de hibridación adecuada por encontrarse por debajo del límite correcto para el método del filtro (de Ley, 1970). Estos experimentos se realizaron por triplicado. Tras la hibridación los filtros se lavaron con 2xSSC a la temperatura óptima de renaturalización y la radiactividad de los mismos se midió en un contador de centelleo Beckman. Se realizaron al menos dos determinaciones independientes y el porcentaje de homología se calculó de acuerdo con las propuestas de Johnson (1981).

II.7.- ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA CELULAR

Estos estudios de microscopía así como los de fisiología, que se describen en el apartado siguiente, se han realizado con las cepas elegidas como representantes de los fenómenos obtenidos tras la Taxonomía Numérica. Estas cepas son:

- cepa F8-11: representante del fenómeno A
- cepa F9-6: representante del fenómeno B

II.7.1.- Microscopía óptica.- Medida del tamaño celular

La medida del tamaño celular se realizó mediante microscopía óptica utilizando ocular calibrado a partir de cultivos de 20 horas de las cepas en el medio MH líquido al 7,5% teñidos por el método de Gram.

II.7.2.- Microscopía electrónica de transmisión

Los microorganismos se cultivaron en medio MH sólido preparado al 2,5, 7,5 y 20% de sales totales. La siembra se realizó inundando las placas con unos 5 ml de un cultivo de 18-20 h del microorganismo en el medio MH a la concentración correspondiente. Tras 24 h de incubación a 32 °C, se realizó una suspensión de la bacteria en solución salina.

Las rejillas preparadas para la microscopía con una película de Formvar 1595 E (Serva) como soporte, se depositaron sobre una gota del cultivo bacteriano durante 5 minutos, dejándose secar posteriormente sobre papel de filtro. A continuación se procedió a teñir depositándolas de nuevo sobre una gota de ácido fosfotúngstico durante un minuto y se secaron al aire para su posterior observación. El ácido fosfotúngstico se preparó en solución acuosa al 2%, se ajustó el pH a 7,4 y se filtró y centrifugó antes de su uso.

Para la observación de las muestras se utilizó un Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss EM 902 de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Las imágenes fueron observadas trabajando a 80 KV de voltaje de aceleración.

II.7.3.- Microscopia electrónica de barrido

Las cepas elegidas como representantes fueron cultivadas en medio MH al 2,5, 7,5 y 20% de sales durante 24 horas a 32 °C; las células recogidas por centrifugación en frío se lavaron dos veces con solución salina de la correspondiente concentración.

Las células se fijaron con glutaraldehído preparado al 2% en la solución salina correspondiente. Tras inclusión en poli-L-lisina y lavado, se sometieron a nuevo fijado con OsO_4 al 2%. A continuación se deshidrataron hasta punto crítico en gradiente de acetona, para finalmente proceder al sombreado con oro.

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss DSM 950 de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

II.8.- ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

Todos estos estudios se realizaron con las cepas F8-11 y F9-6, elegidas como representantes de los fenones A y B, respectivamente.

II.8.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE SAL PARA EL CRECIMIENTO

Los microorganismos se cultivaron tanto en medio complejo (MH), como en medio definido (MD), preparados a las siguientes concentraciones de sales totales (% p/v): 0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25. Se realizaron curvas de crecimiento ensayando simultáneamente y por duplicado todas las concentraciones salinas, para cada una de las condiciones de cultivo. Las temperaturas de incubación ensayadas en cada caso fueron 22, 32 y 42 °C.

Como inóculo se utilizó un cultivo de 18 horas del microorganismo en el medio de cultivo correspondiente, MH o MD, al 7,5% de sales y a 32 °C; 0,1 ml de este inóculo se añadieron a 50 ml de medio de cultivo a las diferentes concentraciones salinas contenidos en matraces de 250 ml de capacidad; los cultivos fueron incubados a las distintas temperaturas en agitador mecánico para asegurar su adecuada aireación. En el momento de la siembra, y cada cuatro horas, se realizó el recuento de células viables según el método de Milles y Misra (1938), en placas de petri conteniendo medio MH sólido al 7,5% de sales; se realizaron cuatro diluciones por muestra con una solución de NaCl al 7,5% y se sembraron cuatro gotas por dilución con pipetas Pasteur calibradas (0,03 ml/gota). Las placas se incubaron a 32 °C.

II.8.2.- DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS IONICOS Y SALINOS DE LAS CEPAS

Para llevar a cabo este estudio, se ensayaron distintas sales por separado y combinaciones de las mismas en el medio definido MD, a la temperatura de incubación de 32 °C. La concentración salina final fue del 5%, óptima para el crecimiento de los microorganismos en este medio de cultivo y a esta temperatura, según se determinó en el apartado anterior. La metodología utilizada para realizar las curvas de crecimiento fue la misma anteriormente descrita.

A continuación, y para cada microorganismo por separado, se detallan las sales utilizadas en este estudio:

Cepa F8-11

a.- Se ensayaron las siguientes sales por separado a la concentración del 5%, óptima para el crecimiento del microorganismo en el medio MD y a 32 °C:

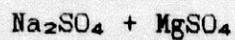
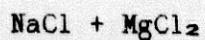
NaCl	KCl
NaBr	MgCl ₂
Na ₂ SO ₄	LiCl
NaNO ₃	NH ₄ Cl

Se utilizó así mismo sacarosa como soluto no ionizable.

b.- Combinaciones de NaCl con cada una de las sales anteriores. La concentración de NaCl fue del 3,8%, concentración que corresponde a la cantidad de NaCl presente en la solución de sales de Subov preparada al 5%. La concentración de la otra sal fue del 1,2%:

NaCl + NaBr	NaCl + KCl
NaCl + Na ₂ SO ₄	NaCl + MgCl ₂
NaCl + NaNO ₃	NaCl + LiCl
	NaCl + NH ₄ Cl

c.- Combinaciones de los cationes Na^+ y Mg^{++} con diferentes aniones. La sal de sodio se utilizó al 3,8% y la de magnesio al 1,2% en todos los casos:



d.- Determinación del requerimiento mínimo de Mg^{++} para el crecimiento óptimo.

Se realizaron combinaciones de NaCl con concentraciones crecientes de MgCl_2 para dar una concentración final del 5%. Las concentraciones de MgCl_2 fueron 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 y 1,2%, siendo las correspondientes de NaCl 4,9, 4,8, 4,6, 4,4, 4,2, 4,0 y 3,8%.

e.- Determinación de la concentración mínima de Na^+ necesaria para el crecimiento.

Se ensayaron las siguientes concentraciones de NaCl (% p/v): 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0%. A cada medio de cultivo se adicionó un 0,4% de MgCl_2 , concentración mínima de Mg^{++} requerida por este microorganismo para el crecimiento.

Cepa F9-6

a.- Las sales ensayadas por separado fueron las mismas que las utilizadas para la cepa F8-11 y que se acaban de citar. La concentración, como ya se ha indicado, fue del 5%, fijada como óptima para el crecimiento de esta bacteria.

b.- Combinaciones de NaCl (3,8%) con otras sales (1,2%). El empleo de las sales en estas proporciones responde a las razones expuestas anteriormente:

NaCl + NaBr

NaCl + Na₂SO₄

NaCl + KCl

NaCl + MgCl₂

c.- Determinación de la concentración mínima de Na⁺ necesaria para el crecimiento.

Se ensayaron las siguientes concentraciones de NaCl: 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0%.

II.8.3.-ESTUDIO DE LA COMPOSICION QUIMICA CELULAR

Se analizó la composición en carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mediante las correspondientes determinaciones químicas, las cuales se llevaron a cabo en liófilos obtenidos a partir de cultivos de los microorganismos en el medio MH.

Preparación de los liofilizados

Las cepas se cultivaron en agitación a 32 °C en el medio complejo MH a tres concentraciones salinas: 7,5%, concentración que permite un buen crecimiento de los microorganismos, una concentración inferior, 2,5%, y otra superior, 20%. Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C a 10.000 g durante 20 minutos utilizando una centrífuga Sorval RC 5B, en tres momentos distintos de la curva de crecimiento de los microorganismos: fase logarítmica, final de esta fase logarítmica y fase estacionaria. Posteriormente se lavaron dos veces con una solución de NaCl a la concentración correspondiente. El sedimento así obtenido fue inmediatamente deshidratado en un liofilizador TELSTAR Modelo Lioalfa.

Los liófilos se conservaron a 4 °C hasta su uso en viales cerrados a vacío para impedir su rehidratación.

- Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó mediante el método de la antrona (Herbert y col., 1971), utilizando glucosa (Merk) como estándar, con la que se construyó una curva patrón con unos márgenes de concentración de 10 a 100 µg/ml. Para realizar las determinaciones se pesaron 50 mg de las muestras liofilizadas y se resuspendieron en cantidades convenientes de agua destilada hasta que la concentración de carbohidratos pudo ser valorada con la curva patrón construida. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto del peso seco, siendo cada valor la media de tres determinaciones.

- Determinación de proteínas

Para el estudio del contenido en proteínas de los microorganismos en las distintas condiciones cultivo se siguió el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando 5 mg de líofilo adecuadamente resuspendido en agua destilada, y seroalbúmina bovina (Sigma) como proteína estándar para la construcción de la correspondiente curva patrón. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

- Determinación de ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB)

El contenido en PHB se determinó siguiendo básicamente la técnica descrita por Law y Slepecky (1961), que se fundamenta en la formación cuantitativa de ácido crotonico a partir del ácido poli- β -hidroxibutírico, por la acción de ácido sulfúrico concentrado.

Con objeto de evitar interferencias de otras sustancias celulares en la valoración del PHB fue necesaria la extracción del mismo mediante cloroformo. Para ello las células liofilizadas (5 mg) fueron sometidas a una digestión con hipoclorito sódico al 10%, a 37 °C durante una hora. Tras centrifugación a 3000 g durante 15 minutos, los lípidos, que quedan adheridos a las paredes del tubo, fueron sometidos a un doble lavado con acetona y etanol absoluto; a continuación, el PHB se extrajo mediante dos tratamientos con cloroformo en baño maría.

Paralelamente se construyó una curva patrón con la sal sódica del ácido poli- β -hidroxibutírico (Sigma), de concentraciones comprendidas entre 10 y 250 $\mu\text{g/ml}$.

La valoración del PHB se realizó por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado en baño a 100 °C durante 30 minutos y medida de absorción a 235 nm.

- Determinación de ácidos nucleicos

La determinación de ácidos nucleicos de las cepas objeto de estudio fue precedida de una extracción selectiva, al objeto de eliminar todas aquellas sustancias que pudieran interferir en la valoración espectrofotométrica.

Los lípidos celulares fueron extraídos y eliminados por tratamiento con etanol; mediante doble tratamiento con ácido perclórico 0,25 N se extrajo el material ácido soluble; finalmente, la extracción de los ácidos nucleicos se realizó con HClO_4 0,5 N.

El contenido en ácido desoxirribonucleico (ADN) de los extractos, se estableció mediante el método de Herbert y colaboradores (1971) que utiliza difenilamina como reactivo. El ADN estándar empleado fue la sal sódica del ADN de timo de carnero (Sigma).

La determinación de ácido ribonucleico (ARN) se realizó según el método del orcinol (Herbert y col., 1971), empleando ARN procedente de levadura (Merk) para construir la curva patrón correspondiente.

II.8.4.- ESTUDIO DE LA COMPOSICION CELULAR DE ACIDOS GRASOS

El análisis de la composición de ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa previa extracción de los mismos según la metodología descrita por Montecliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana (1987a).

Se utilizaron muestras liofilizadas de los microorganismos preparadas según se describió en el apartado anterior.

Extracción de los ácidos grasos

- Saponificación: 50 mg de muestra liofilizada se saponificaron con 5 ml de NaOH en metanol-agua (v/v) mediante ebullición y reflujo durante 3 horas en baño de propilen-glicol.
- Extracción de los ácidos grasos libres: al material saponificado y frío se añadió HCl 6 N con el fin de liberar los ácidos grasos, que fueron posteriormente extraídos con hexano en ampollas de decantación.
- Metilación: la capa hexánica resultante de la extracción anterior se evaporó bajo corriente de nitrógeno y el residuo de ácidos grasos se disolvió en 5 ml de metanol con el que se realizó la metilación, mediante reflujo durante 3 horas, y adicionando unas gotas de ácido sulfúrico como catalizador de la reacción.
- Extracción de los ésteres metílicos: los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con 5 ml de hexano, lavándose este extracto tres veces con agua destilada para retirar los restos de ácido sulfúrico y metanol; el exceso de agua de la capa hexánica se eliminó mediante adición de sulfato sódico anhidro, para finalmente evaporar el extracto a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo así obtenido se disolvió en 100 μ l de hexano para su análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron analizados mediante cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases Carlo-Erba Fractovap 2200 equipado con un detector de ionización de llama.

La separación se realizó en columna de vidrio de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interior, rellena con dietilen glicol succinato (SE-50) al 15% en Chromosoid W. Se inyectaron 5 μ l de muestra programándose un aumento de temperatura de 6 °C/minuto, desde 150 a 215 °C. Como gas portador se utilizó nitrógeno, con un flujo de 35 ml/minuto, y como gases para producir llama, aire (60 ml/minuto) e hidrógeno (30 ml/minuto).

Los ácidos grasos presentes en las muestras analizadas fueron identificados por comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos con los producidos por los ácidos grasos patrones, analizados previamente (Tabla II.3).

El perfil cromatográfico, así como el área de cada uno de los picos y la concentración correspondiente, eran proporcionados directamente por un integrador-registrador Sigma 15 de Perkin-Elmer conectado al cromatógrafo.

Tabla II.3. Relación de los ácidos grasos que en forma de ésteres metílicos se han utilizado como patrones.

Acido graso	Sigla	Casa comercial
Decanoico	C10:0	Polysciences Corporation
2-hidroxidecanoico	2-OHC10:0	Supelco
Undecanoico	C11:0	Sigma
Dodecanoico	C12:0	Polysciences Corporation
2-hidroxidodecanoico	2-OHC12:0	Supelco
3-hidroxidodecanoico	3-OHC12:0	Sigma
12-metiltridecanoico	1-C14:0	Applied Science
Tetradecanoico	C14:0	Polysciences Corporation
2-hidroxitetradecanoico	2-OHC14:0	Supelco
3-hidroxitetradecanoico	3-OHC14:0	Supelco
12-metiltetradecanoico	a-C15:0	Applied Science
Pentadecanoico	C15:0	Sigma
14-metilpentadecanoico	1-C16:0	Applied Science
Hexadecanoico	C16:0	Polysciences Corporation
9-hexadecenoico	C16:1	Polysciences Corporation
2-hidroxihexadecanoico	2-OHC16:0	Supelco
14-metilhexadecanoico	a-C17:0	Applied Science
Heptadecanoico	C17:0	Sigma
9,10-metilenhexanoico	cy-C17:0	Applied Science
Octadecanoico	C18:0	Polysciences Corporation
9-octadecenoico	C18:1	Polysciences Corporation
Nonadecanoico	C19:0	Sigma
11,12-metilenoctanoico	cy-C19:0	Applied Science
Eicosanoico	C20:0	Polysciences Corporation

III. RESULTADOS

III.1. TAXONOMIA NUMERICA Y CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LAS CEPAS

La Figura 1 muestra el Dendrograma simplificado obtenido tras el Análisis Numérico de los caracteres fenotípicos de las 62 cepas objeto de estudio, junto con las cinco cepas de referencia, mediante el coeficiente de semejanza de Sokal y Michener y la técnica de agrupación UPGMA.

Las siguientes cepas no quedaron incluidas en los fenones formados: A-3, A-34, F10-4, F11-11 (oxidasa positivas) y A-18, A-26, C-9 (oxidasa negativas), así como los cinco microorganismos de referencia.

El valor del coeficiente de correlación cofenética resultó ser 0,85879.

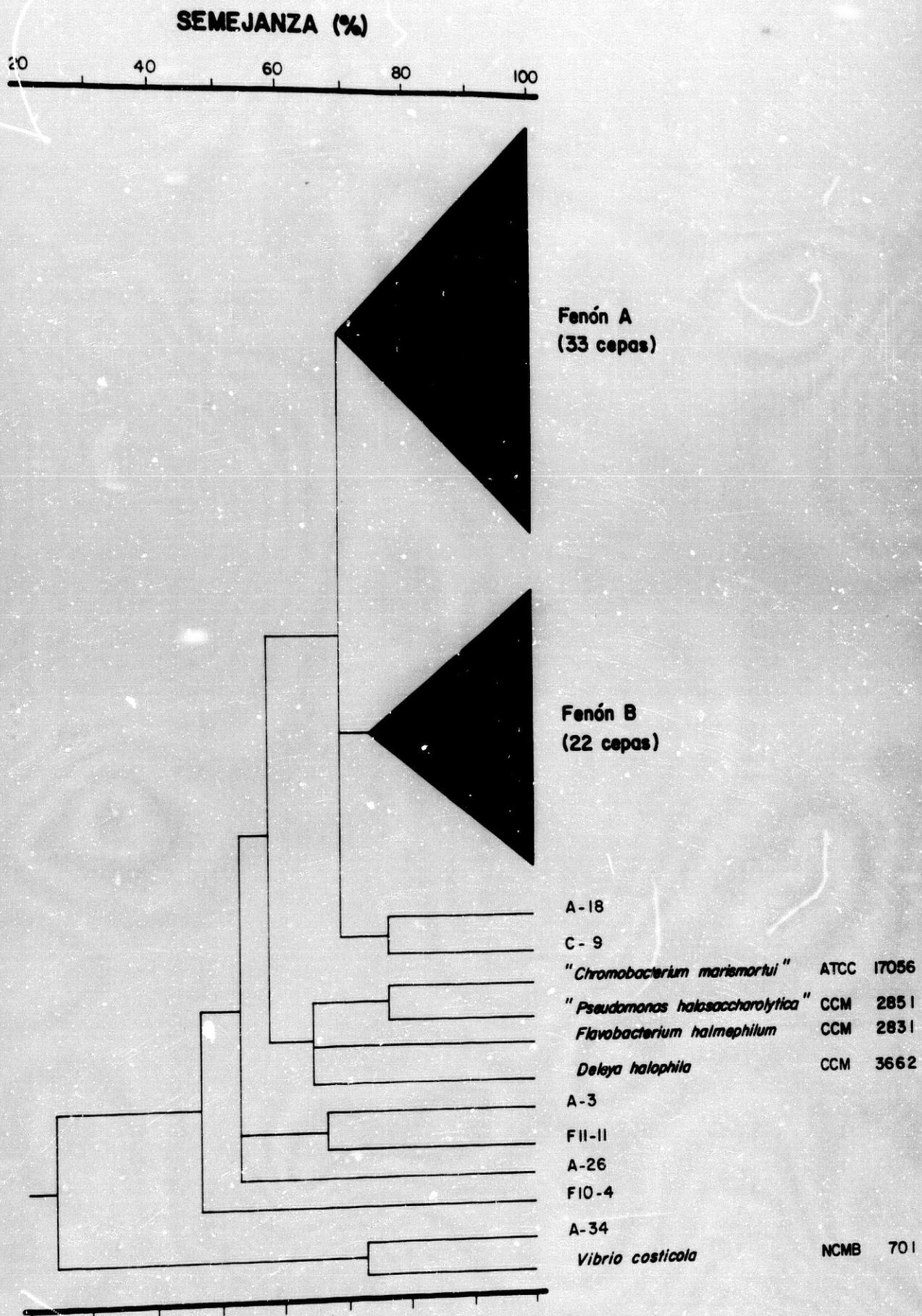


Figura nº 1

La Tabla III.1 muestra las características fenotípicas de las 55 cepas que quedaron agrupadas en los dos fenones resultantes del Análisis Numérico. Los resultados se han expresado como porcentaje de cepas que dan positiva una prueba, sobre el total de cepas que componen cada fenón: 33 cepas en el fenón A y 22 en el fenón B.

Todas ellas son bacilos Gram negativos inmóviles, con inclusiones de PHE. En medio sólido originan colonias circulares, convexas, poco elevadas y en medio líquido crecen uniformemente. Catalasa positivas, con metabolismo respiratorio. Crecen al 5, 7,5 y 10% de sales totales, a pH 6, 7 y 8, y a 15, 20, 25, 32 y 37 °C. No producen piocianina ni fluoresceína, ni forman ácidos a partir de la arabinosa, D-celobiosa, lactosa, salicina ni xilosa. Indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer negativas. No hidrolizan el almidón ni la caseína, son incapaces de respirar sobre fumarato y de utilizar el benzoato como única fuente de carbono y energía. Todas son sensibles al cloramfenicol (30 µg) y a la polimixina B (300 UI).

En la Tabla III.2. se presentan aquellas pruebas útiles para diferenciar los fenones A y B, considerando una diferencia de al menos un 40%.

Tabla III.1. Características fenotípicas de los dos fenones.

Característica	% de cepas que dan positiva una prueba sobre:	
	33 cepas Fenón A	22 cepas Fenón B
Sal: crecimiento a (%), (32 °C)		
0,5	3	54
3	100	91
12,5	97	100
15	97	100
20	94	95
25	9	77
30	3	45
pH: crecimiento a		
5	79	100
9	94	100
10	94	100
Temperatura: crecimiento a (°C)		
5	64	77
40	97	100
45	91	100
Producción de ácidos de:		
Adonitol	3	0
Dulcitol	6	0
Etanol	9	0
D-fructosa	6	0
D-galactosa	9	0
D-glucosa	3	5
Inulina	6	0
Maltosa	6	0
D-manitol	18	0

Tabla III.1. (continuación)

Característica	Fenón A	Fenón B
Producción de ácidos de:		
D-manosa	3	0
D-melecitosa	6	0
Melibiosa	6	0
Sacarosa	18	0
D-sorbitol	6	0
D-trehalosa	6	5
Oxidasa	100	0
Respiración sobre nitrato	58	0
Respiración sobre nitrito	45	0
Reducción de nitratos	91	100
Reducción de nitritos	58	0
Producción de H ₂ S	40	91
Crecimiento en KCN	70	100
Reducción del selenito	97	100
Oxidación del gluconato	18	5
Hidrólisis de la urea	97	95
Fenilalanina desaminasa	48	5
Hidrólisis de la gelatina	6	86
" del Tween 80	25	47
" del Tween 20	85	86
ONPG	29	56
DNAsa	21	36
Fosfatasa	9	86
Hemolisis	3	0
Crecimiento en Agar-MacConkey	55	95
" en Agar-Cetrimida	18	91
Producción de lecitinasa	6	0
Hidrólisis de la esculina	24	77
" de la tirosina	91	100

Tabla III.1. (continuación)

Característica	Fenón A	Fenón B
Utilización de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía:		
Almidón	36	5
L-arabinosa	61	86
D-celobiosa	60	71
Esculina	9	0
D-fructosa	91	76
D-galactosa	51	59
D-glucosa	55	41
Inulina	28	36
Lactosa	29	91
Maltosa	72	90
D-manosa	76	86
L-rafinosa	27	59
L-ramnosa	34	64
Sacarosa	75	64
D-salicina	12	91
L-sorbosa	21	9
D-trehalosa	61	64
D-xilosa	61	64
Acetato	91	77
Caprilato	0	23
Citrato	79	95
Formiato	34	14
Fumarato	88	76
D-gluconato	91	100
Hipurato	33	45
DL-lactato	79	100
DL-malato	91	100
Malonato	61	91
Oxalato	16	10

Tabla III.1. (continuación)

Característica	Fenón A	Fenón B
----------------	---------	---------

Utilización de compuestos orgánicos
como única fuente de carbono y energía:

Piruvato	81	95
Propionato	64	57
Succinato	58	24
D-tartrato	28	9
β -hidroxibutirato	50	91
Adonitol	48	36
Dulcitol	27	33
DL-glicerol	61	45
<i>meso</i> -inositol	51	73
D-manitol	89	91
D-sorbitol	79	45

Utilización de aminoácidos
como única fuente de carbono,
nitrógeno y energía:

L-alanina	70	100
L-arginina	64	100
L-aspártico	94	95
L-glutámico	82	95
L-histidina	9	91
DL-isoleucina	72	81
L-leucina	76	82
L-lisina	36	95
L-ornitina	52	77
L-serina	82	100
L-triptófano	15	0

Tabla III.1. (continuación)

Característica	Fenón A	Fenón B
Sensibilidad frente a:		
Acido Nalidíxico (30 µg)	97	95
Amikacina (30 µg)	15	15
Ampicilina (100 µg)	100	0
Carbenicilina (100 µg)	100	10
Cefalotina (30 µg)	97	14
Clindamicina (2 UI)	3	0
Colistina (50 µg)	100	95
Eritromicina (15 µg)	100	50
Estreptomina (10 µg)	39	0
Gentamicina (10 UI)	66	9
Penicilina G (10 UI)	100	0
Rifampicina (5 µg)	97	100
Sulfamida (200 µg)	100	95
Tetraciclina (30 µg)	54	0
Trimetoprim (1,25 µg)- -Sulfametoxazol (23,75 µg)	97	100

Tabla III.2. Características diferenciales de los dos fenones.

Característica	Nº de cepas positivas	
	Fenón A (33 cepas)	Fenón B (22 cepas)
Oxidasa	33	0
Sal: crecimiento a (%):		
0,5	1	12
25	3	17
30	1	10
Respiración sobre nitrato	19	0
Respiración sobre nitrito	15	0
Reducción de nitritos	19	0
Producción de H ₂ S	12	20
Hidrólisis de la gelatina	2	19
Fenilalanina desaminasa	16	1
Fosfatasa	3	19
Crecimiento en Agar-Cetrinida	6	20
Crecimiento en Agar-MacConkey	18	21
Hidrólisis de la esculina	8	17
Utilización de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía:		
Lactosa	9	20
D-salicina	4	20
β-hidroxibutirato	16	20

Tabla III.2. (continuación)

Característica	Fenón A	Fenón B
Utilización de aminoácidos como única fuente nitrógeno, carbono y energía:		
L-histidina	3	20
L-lisina	12	21
Sensibilidad frente a:		
Ampicilina (100 µg)	33	0
Carbenicilina (100 µg)	33	2
Cefalotina (30 µg)	32	2
Eritromicina (15 µg)	27	6
Gentamicina (10 UI)	21	2
Penicilina G (10 UI)	33	0
Tetraciclina (30 µg)	15	0

III.2. CONTENIDO EN G+C

A continuación se muestran los valores de la Temperatura media de desnaturalización (T_m) y del contenido en bases Guanina más Citosina del ADN de las cepas representantes del fenón A (Tabla III.3) y del fenón B (Tabla III.4)

Tabla III.3. Temperatura media de desnaturalización (T_m) y contenido en G+C (%) de las cepas representantes del fenón A

Cepa	T_m ($^{\circ}$ C)	G+C (%)
F8-11	81.0	64.2
F8-5	80.6	63.4
A-2	79.4	60.8
A-30	80.7	63.6
A-32	80.6	63.3
F11-2	81.4	65.0
F11-10	81.6	65.4
F9-12	80.4	63.0
G-21	78.1	58.2
H-356	79.3	60.7

Tabla III.4. Temperatura media de desnaturalización (T_m) y contenido en G+C (%) de las cepas representantes de fenón B

Cepa	T_m (°C)	G+C (%)
F9-6	81.7	65.7
F2-12	79.6	61.4
41 a	78.5	59.1
B-1	79.5	61.2
F2-15	78.7	59.4
43 a	78.9	59.8
F2-13	77.5	57.0
F11-16	78.8	59.7

III.3. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Los resultados de los experimentos de hibridación ADN/ADN se muestran en la Tabla III.5 (fenón A) y en la Tabla III.6 (fenón B)

Tabla III.5. Homología ADN/ADN entre las dos cepas representantes del fenón A y otros organismos relacionados

ADN no marcado de:	% de Homología con ADN marcado de:	
	Cepa F8-11	Cepa F8-5
Fenón A:		
F8-11	100	87
F8-5	90	100
A-2	75	85
A-30	80	98
A-32	75	75
F11-2	82	73
F11-10	81	99
F9-12	74	84
G-21	77	79
H-356	71	97
Cepa F2-12 (fenón B)	6	10
Cepa F9-6 (fenón B)	40	15
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCM 5581	0	7
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCM 5593	15	0
<i>Alcaligenes faecalis</i> CCM 1052	0	14
<i>Alteromonas luteoviolacea</i> ATCC 33492	3	1
" <i>Chromobacterium marismortui</i> " ATCC 17056	12	4
<i>Deleya aesta</i> NCMB 1980	11	2
<i>Deleya cupida</i> NCMB 1978	2	12
<i>Deleya halophila</i> CCM 3662	18	10
<i>Deleya marina</i> ATCC 25374	0	1
<i>Deleya pacifica</i> NCMB 1977	28	0
<i>Deleya venusta</i> NCMB 1979	0	4
<i>Flavobacterium halmephilum</i> CCM 2833	0	9
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> CCM 2719	0	0
<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173	13	3
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686	0	10
" <i>Pseudomonas halosaccharolytica</i> " CCM 2851	0	2
<i>Pseudomonas putida</i> CCM 1977	11	8
<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 521	0	0
<i>Vibrio costicola</i> NCMB 701	0	11
<i>Vibrio natriegens</i> CECT 526	18	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511	0	0

Tabla III.6. Homología ADN/ADN entre las dos cepas representantes del fenón B y otros organismos relacionados

ADN no marcado de:	% de Homología con ADN marcado de:	
	Cepa F9-6	Cepa F2-12
Fenón B:		
F9-6	100	72
F2-12	80	100
41 a	85	88
B-1	77	72
F2-15	82	76
43 a	90	65
F2-13	80	90
F11-15	78	67
Cepa F8-11 (fenón A)	24	37
Cepa F8-5 (fenón A)	25	20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCM 5581	0	13
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCM 5593	12	22
<i>Alcaligenes faecalis</i> CCM 1052	0	0
<i>Alteromonas luteoviolacea</i> ATCC 33492	17	5
" <i>Chromobacterium marismortui</i> " ATCC 17056	0	3
<i>Deleya aesta</i> NCMB 1980	8	24
<i>Deleya cupida</i> NCMB 1978	6	38
<i>Deleya halophila</i> CCM 3662	19	38
<i>Deleya marina</i> ATCC 25374	15	1
<i>Deleya pacifica</i> NCMB 1977	15	12
<i>Deleya venusta</i> NCMB 1979	22	8
<i>Flavobacterium halmephilum</i> CCM 2833	12	12
<i>Flavobacterium meningosepticum</i> CCM 2719	12	1
<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173	7	40
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686	0	0
" <i>Pseudomonas halosaccharolytica</i> " CCM 2851	22	16
<i>Pseudomonas putida</i> CCM 1977	20	43
<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 521	10	25
<i>Vibrio costicola</i> NCMB 701	22	21
<i>Vibrio natriegens</i> CECT 526	3	25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511	11	17

III.4. MORFOLOGIA CELULAR

Las figuras siguientes muestran la morfología de las cepas representantes de los fenones A y B, realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figuras 2 y 3) y de barrido (Figuras 4 y 5)

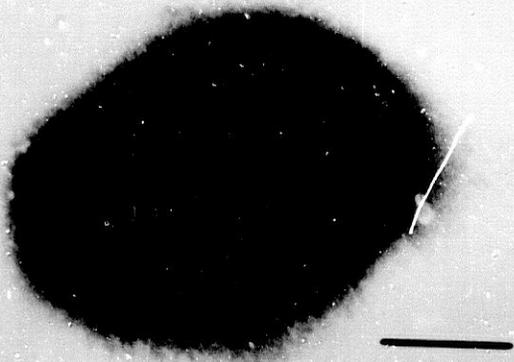
Figuras 2 a - d: Cepa F8-11 cultivada al 2,5% de sales totales
Figuras 2 e y f: Cepa F8-11 cultivada al 7,5% de sales totales
Figuras 2 g y h: Cepa F8-11 cultivada al 20 % de sales totales
Figuras 3 a y b: Cepa F9-6 cultivada al 2,5% de sales totales
Figuras 3 c y d: Cepa F9-6 cultivada al 7,5% de sales totales
Figuras 3 e y f: Cepa F9-6 cultivada al 20 % de sales totales

(La barra equivale a 1 μm)

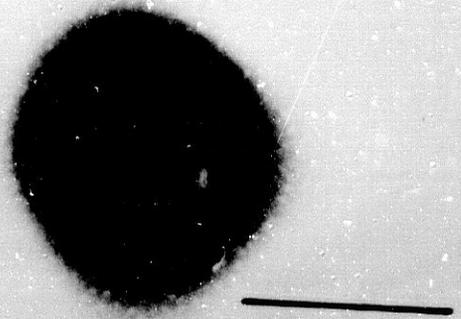
Figura 4 A: Cepa F8-11 al 2,5% de sales totales
Figura 4 B: Cepa F8-11 al 20% de sales totales
Figura 5 A: Cepa F9-6 al 7,5% de sales totales
Figura 5 B: Cepa F9-6 al 2,5% de sales totales

En todos los casos los microorganismos fueron cultivados en el medio MH (Quesada y col., 1983)

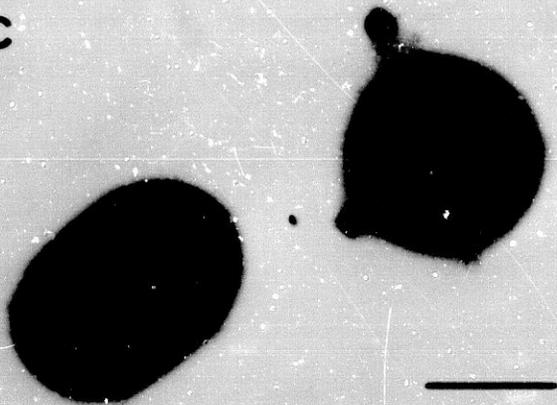
a



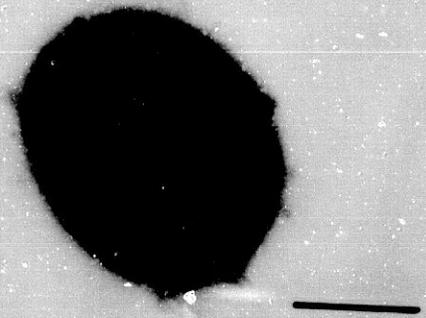
b



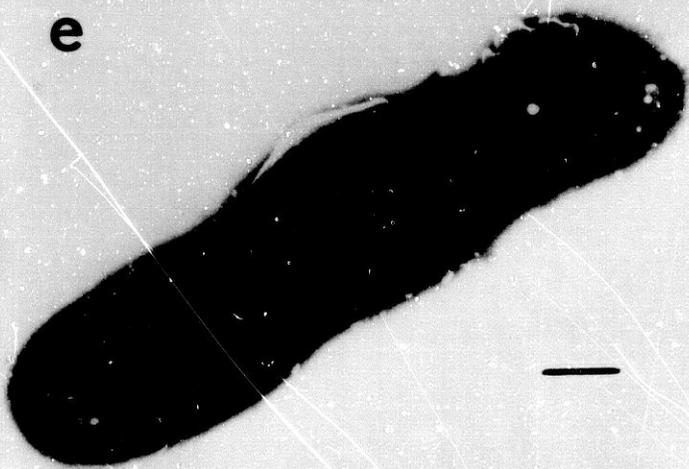
c



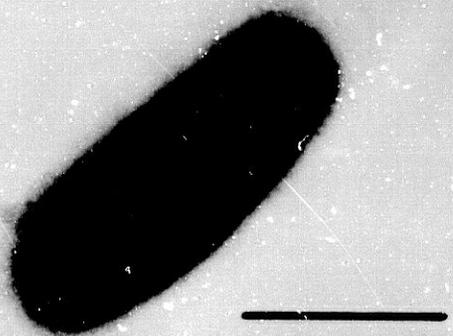
d



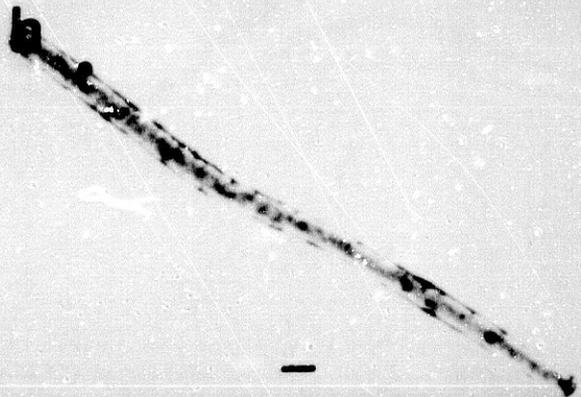
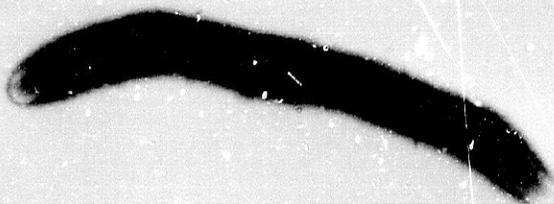
e

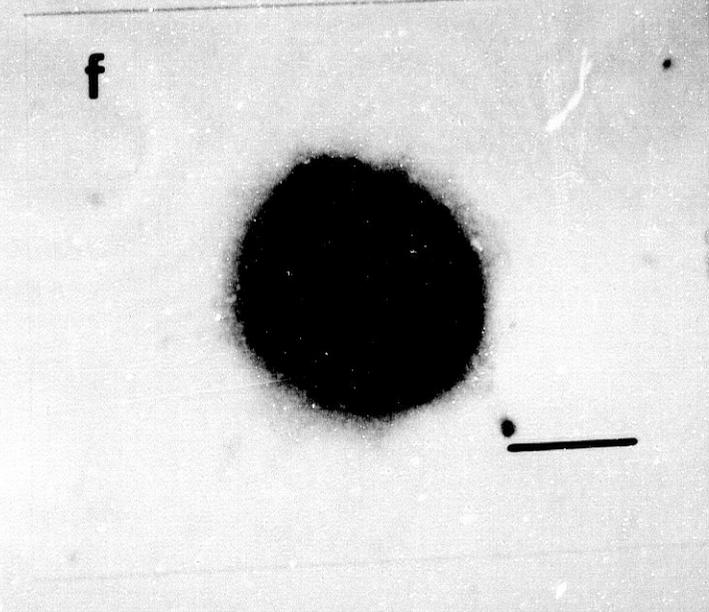
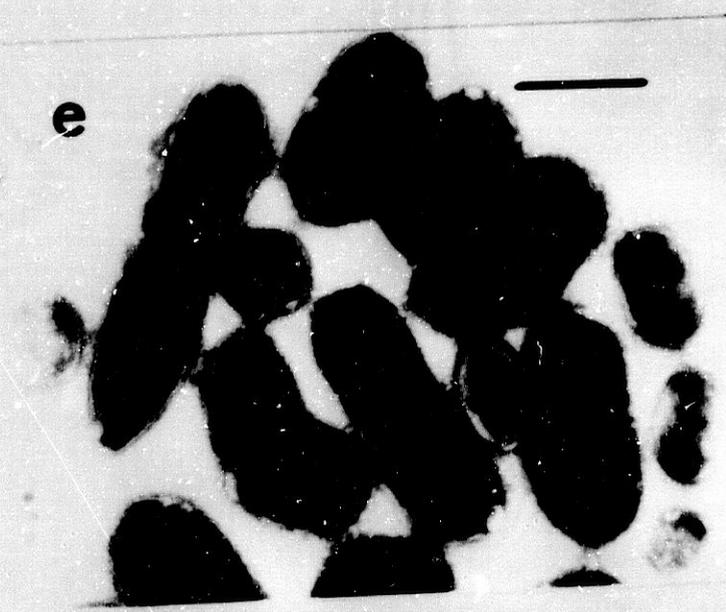
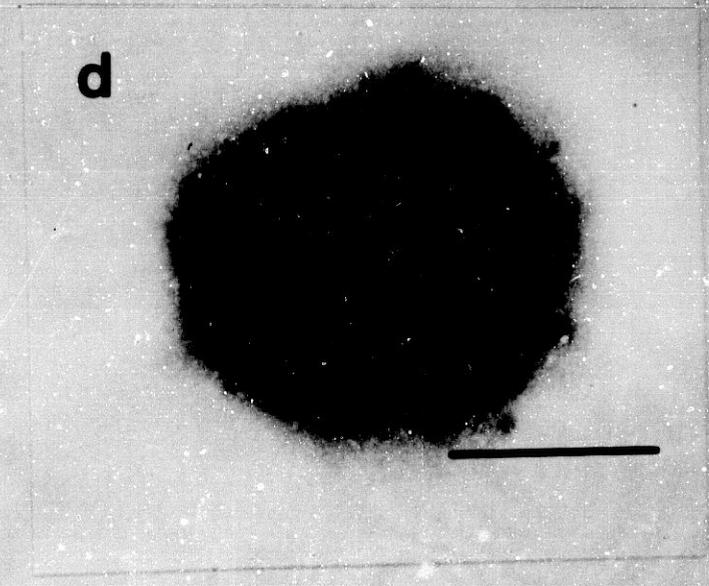
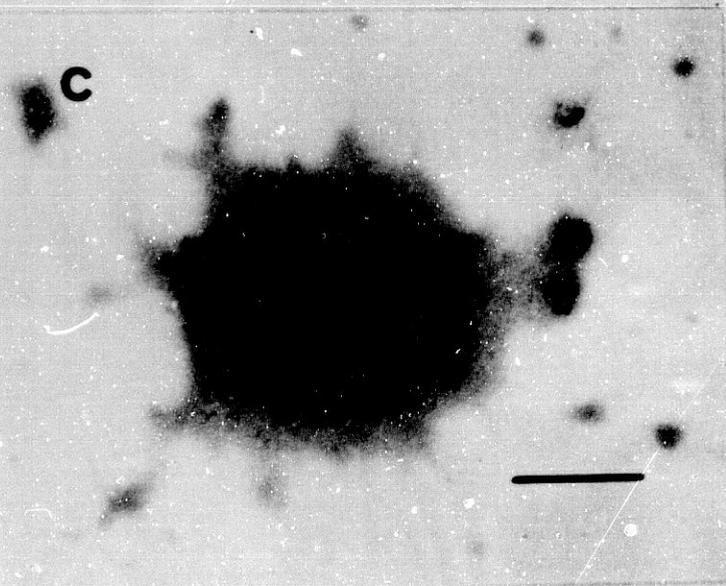
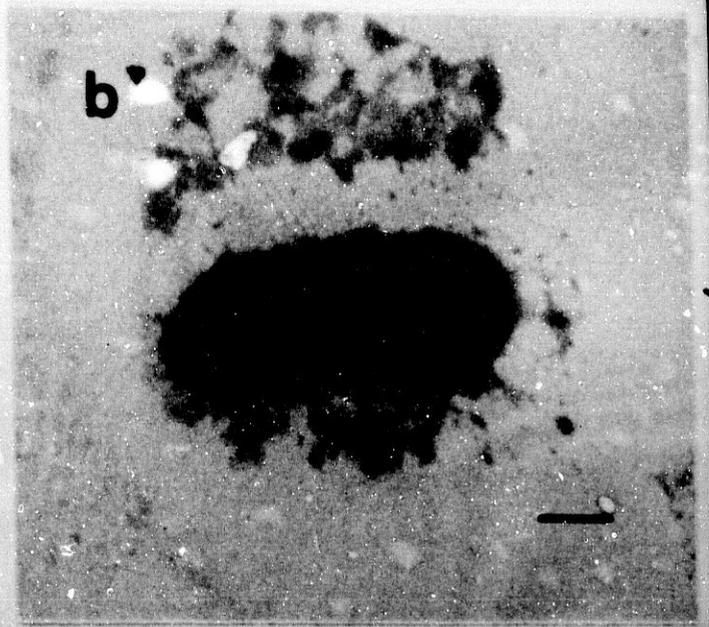
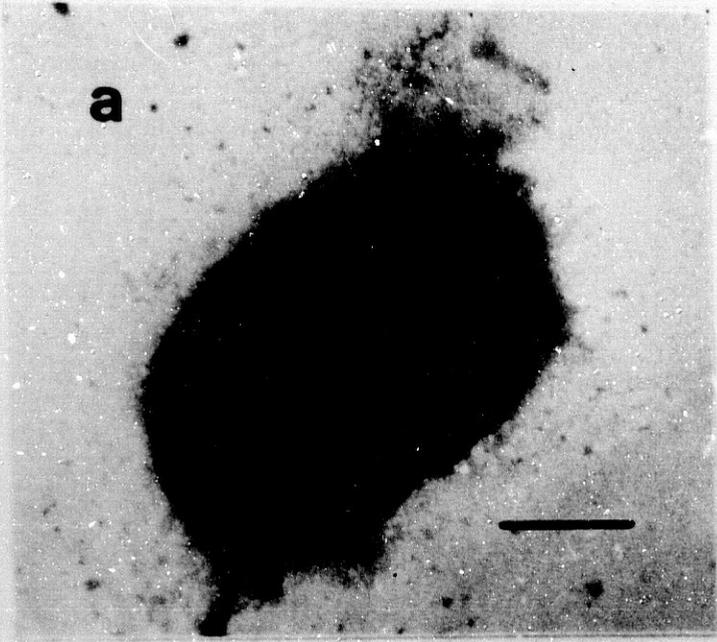


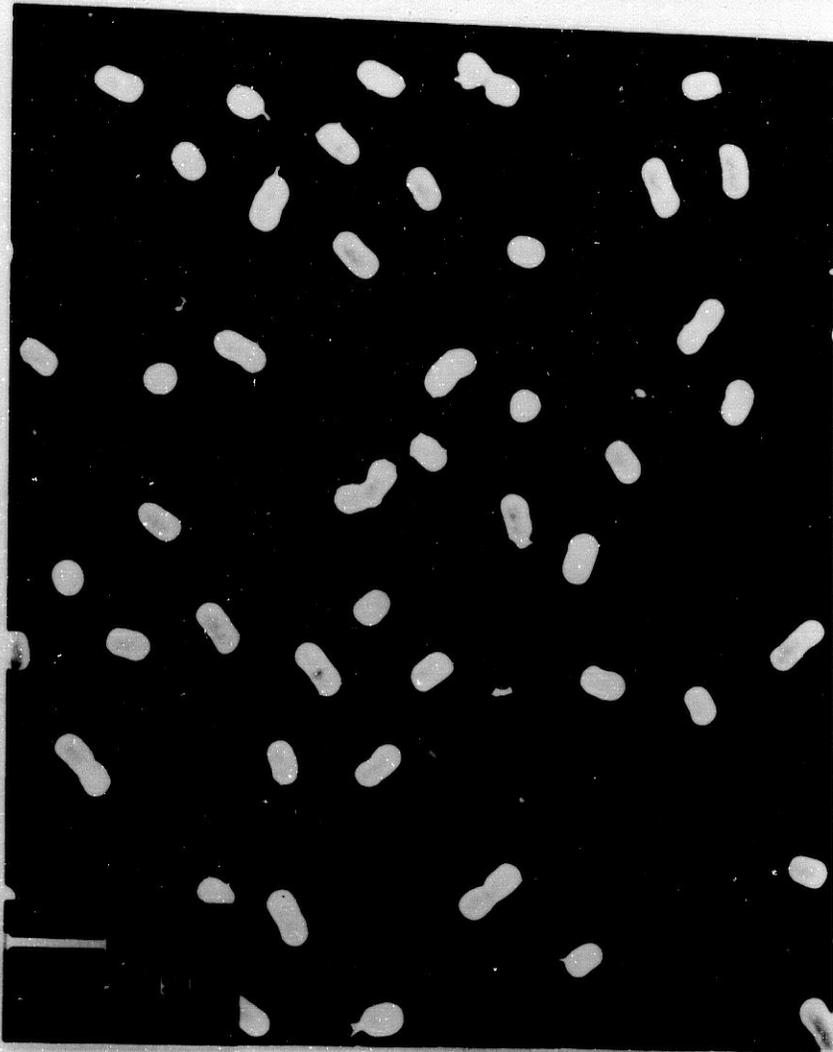
f



g



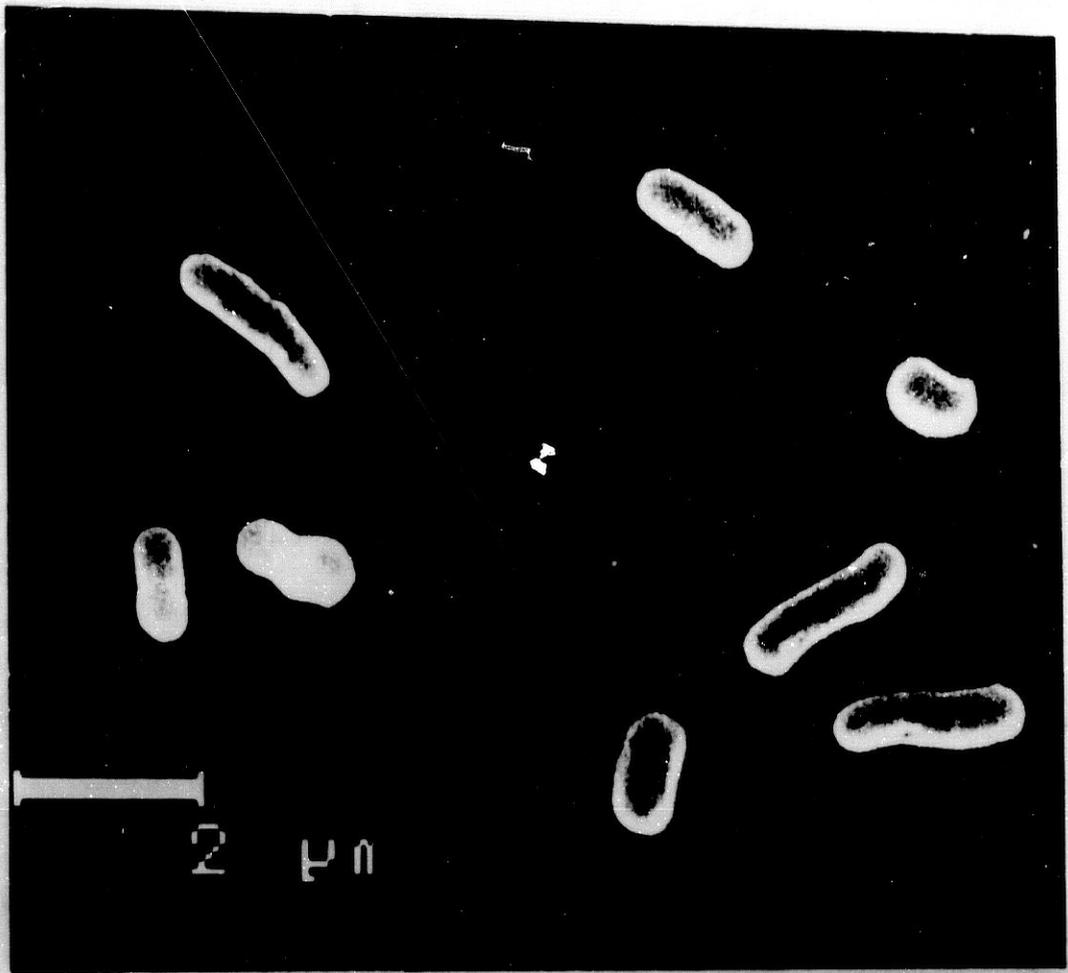




A



B



A



B

III.5.1. CONCENTRACION OPTIMA DE SAL PARA EL CRECIMIENTO

Los resultados de los estudios de la respuesta de los microorganismos frente a la sal se presentan en las Tablas y Figuras siguientes:

Tablas III.7 a III.10: Tasas de crecimiento (μ) y Tiempos de generación (g) de las cepas F8-11 y F9-6 en distintas condiciones de cultivo

Tabla III.11: Rangos y óptimos de crecimiento salino

Figuras 6 a 16: Curvas de crecimiento de las cepas F8-11 y F9-6 en diferentes condiciones de cultivo

Figuras 17 y 18: Tasas de crecimiento (μ) de las cepas

Relación de las Figuras 6-16:

- Fig. 6 : Cepa F8-11, medio MH, temperatura 32 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 25%
- Fig. 7 : Cepa F8-11, medio MH, temperatura 22 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 20%
- Fig. 8 : Cepa F8-11, medio MH, temperatura 42 °C
concentraciones salinas del 5 al 20%
- Fig. 9 : Cepa F8-11, medio MD, temperatura 32 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 15%
- Fig. 10: Cepa F8-11, medio MD, temperatura 22 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 15%
-
- Fig. 11: Cepa F9-6, medio MH, temperatura 32 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 25%
- Fig. 12: Cepa F9-6, medio MH, temperatura 22 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 25%
- Fig. 13: Cepa F9-6, medio MH, temperatura 42 °C
concentraciones salinas del 5 al 25%
- Fig. 14: Cepa F9-6, medio MD, temperatura 32 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 15%
- Fig. 15: Cepa F9-6, medio MD, temperatura 22 °C
concentraciones salinas del 2,5 al 10%
- Fig. 16: Cepa F9-6, medio MD, temperatura 42 °C
concentraciones salinas del 5 al 15%

MH: Medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)
MD: Medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

En las Figuras sólo se han representado aquellas concentraciones salinas en las que se produjo crecimiento.

F8-II
MH 32° C

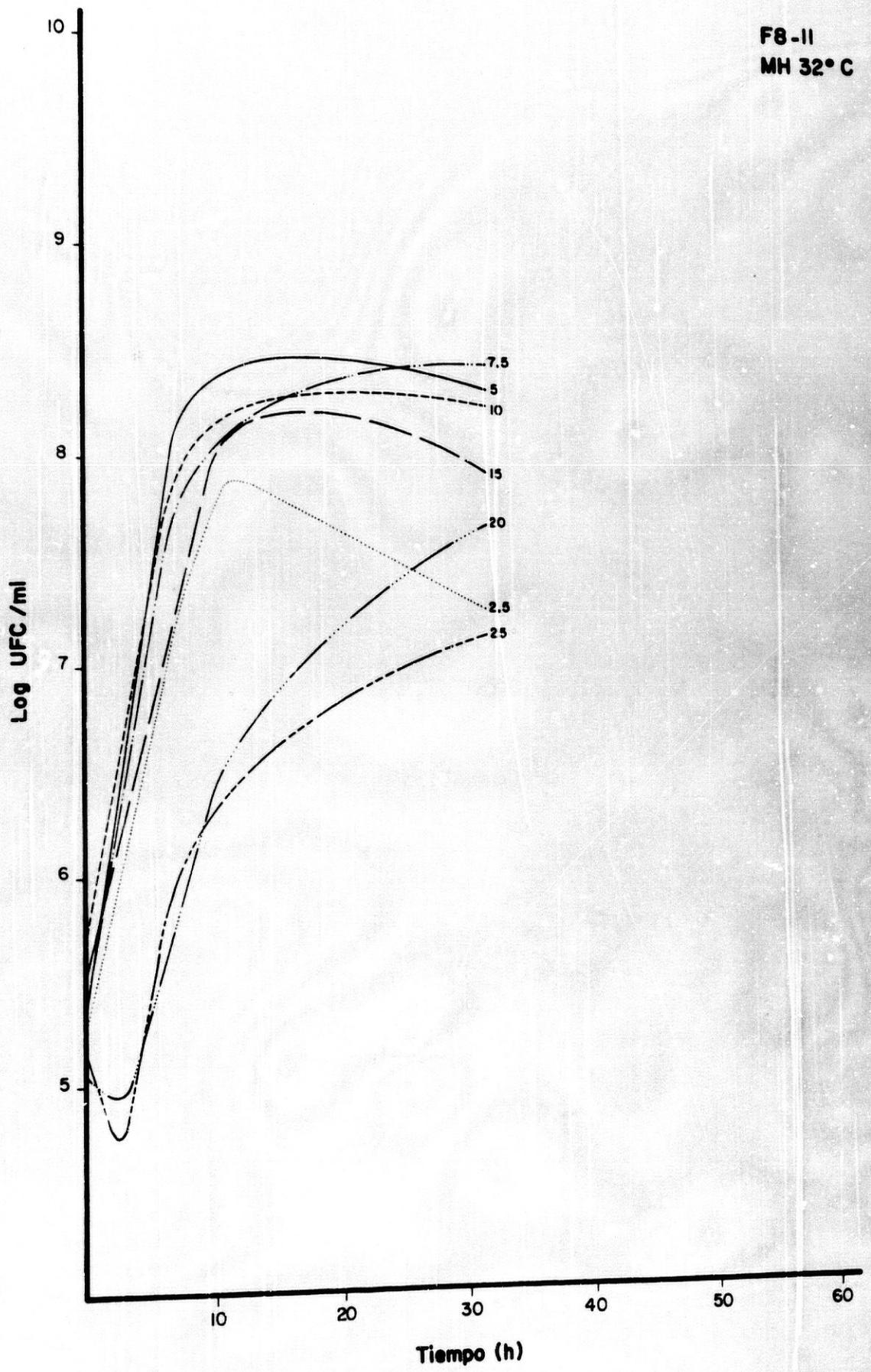


Figura nº6

F8-II
MH 22° C

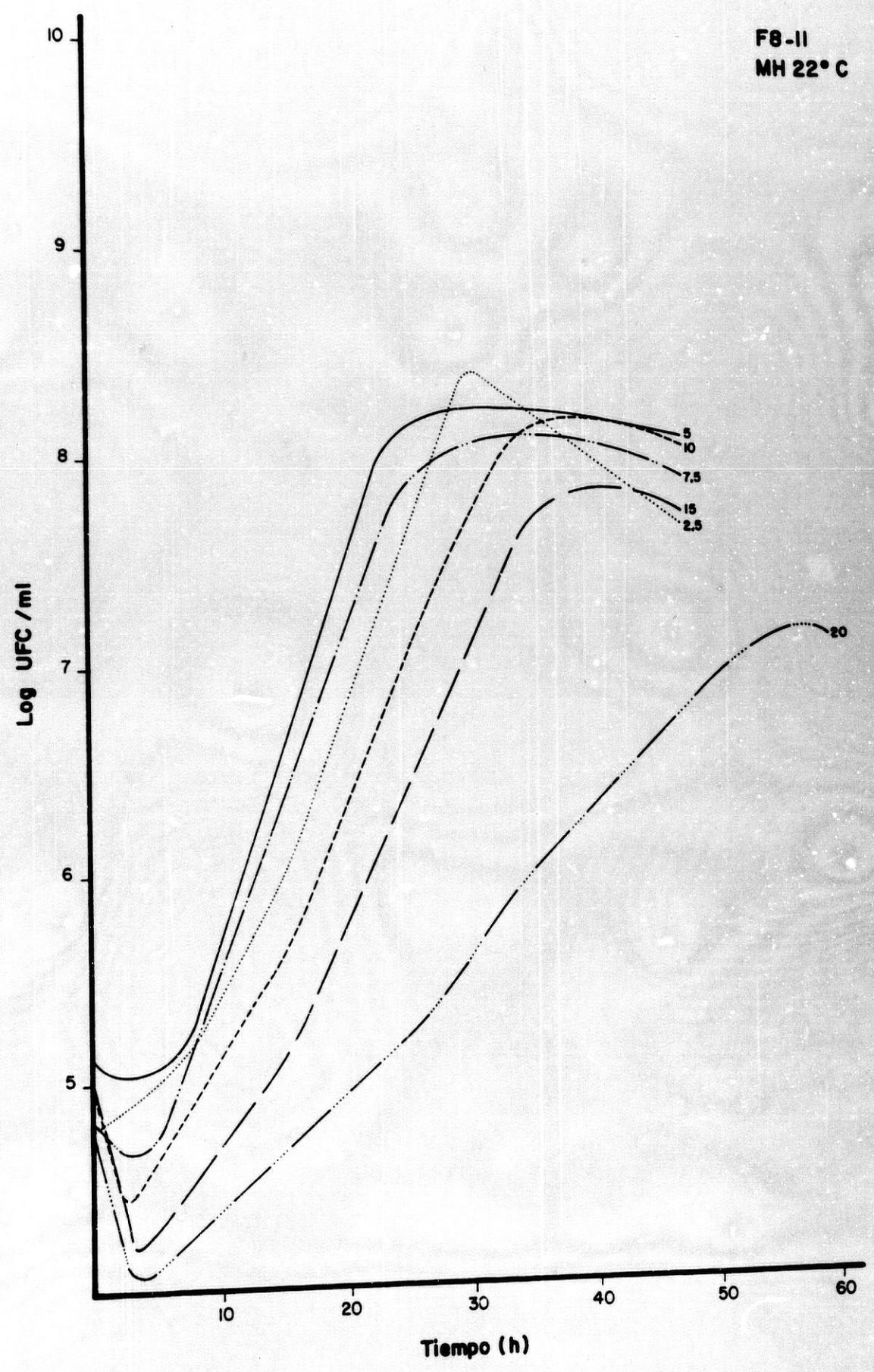


Figura nº 7

F8-II
MH 42° C

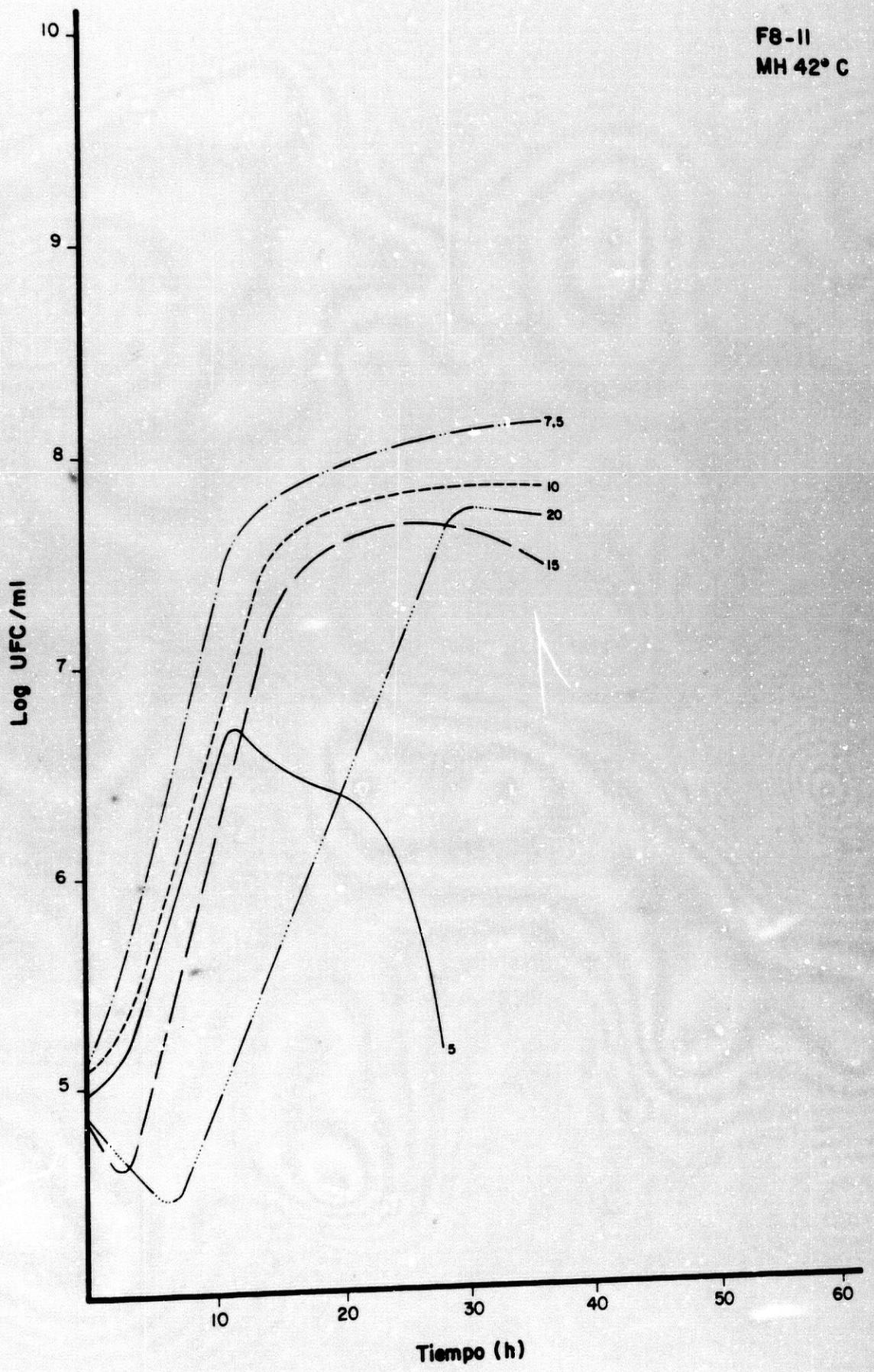


Figura nº 8

F8-11
MD 32° C

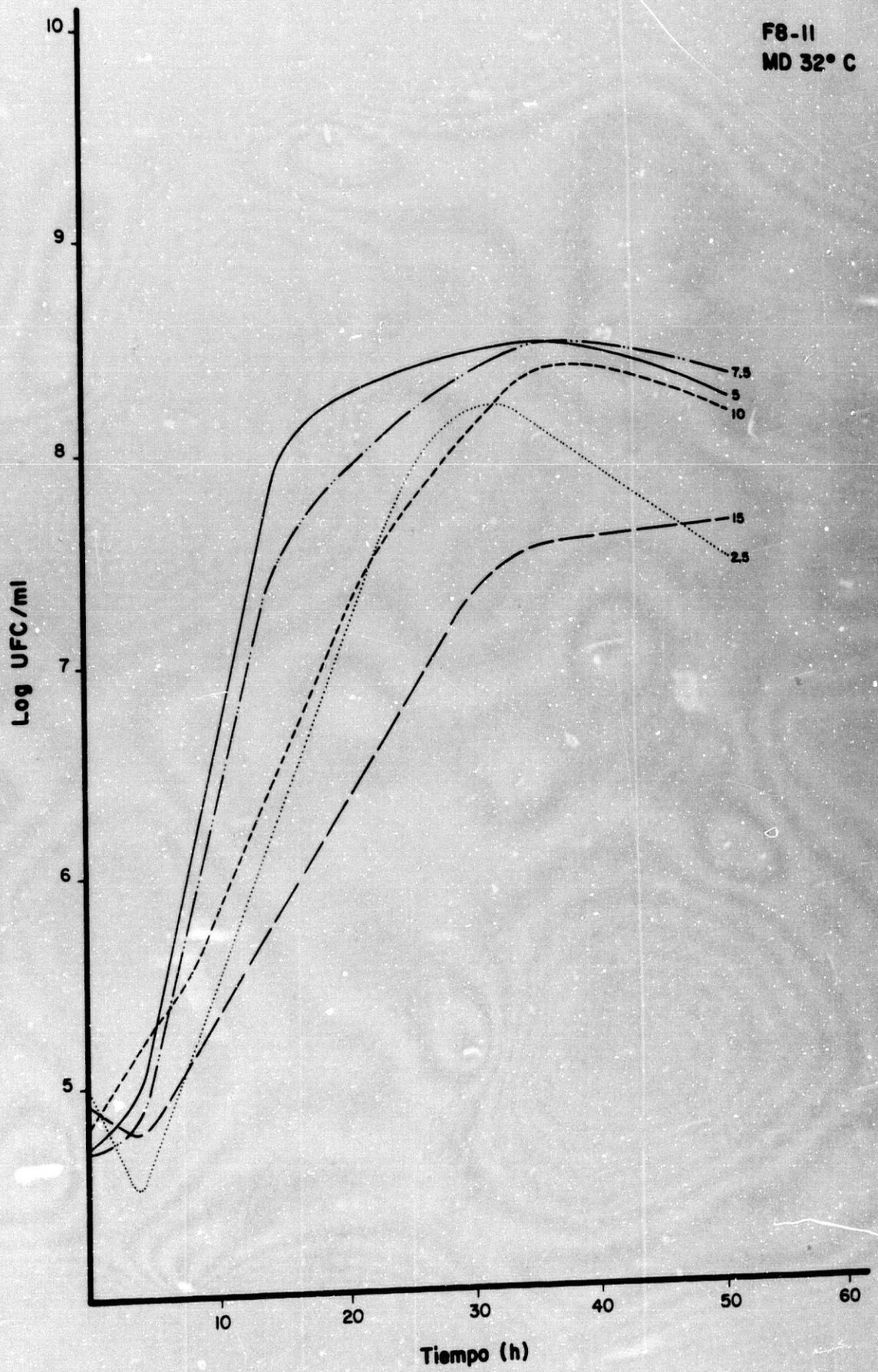


Figura nº 9

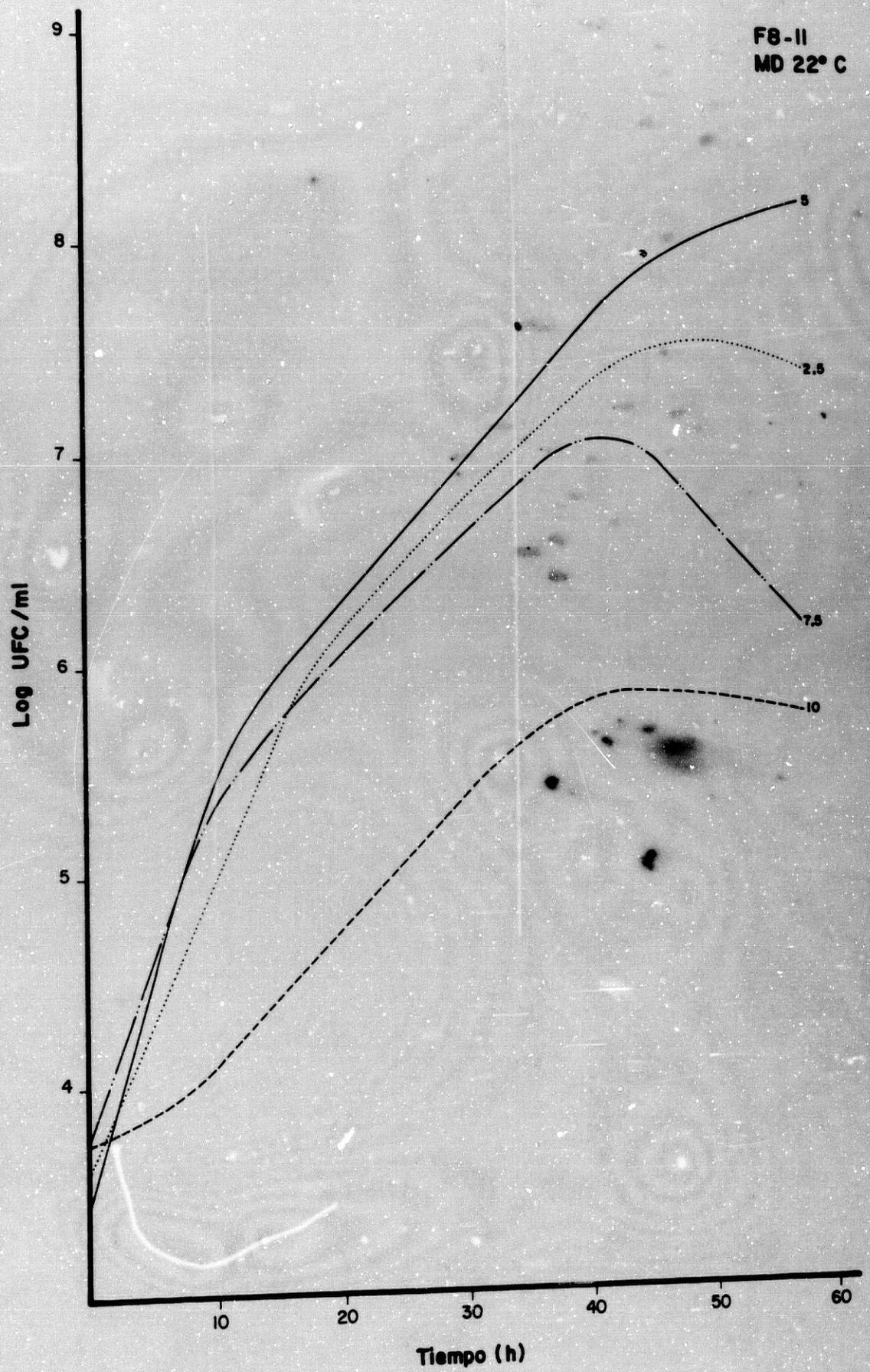


Figura n° 10

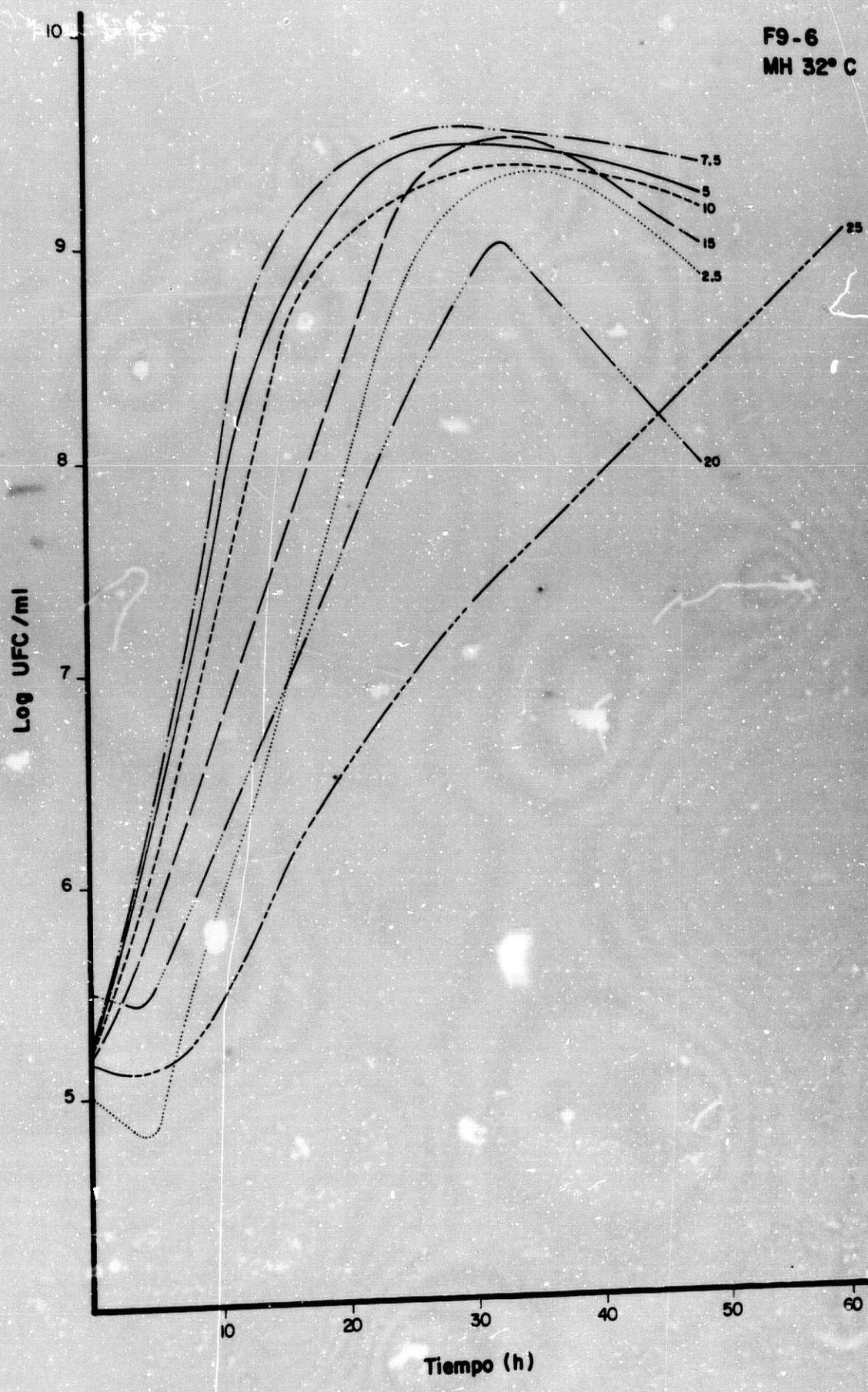


Figura nº 11

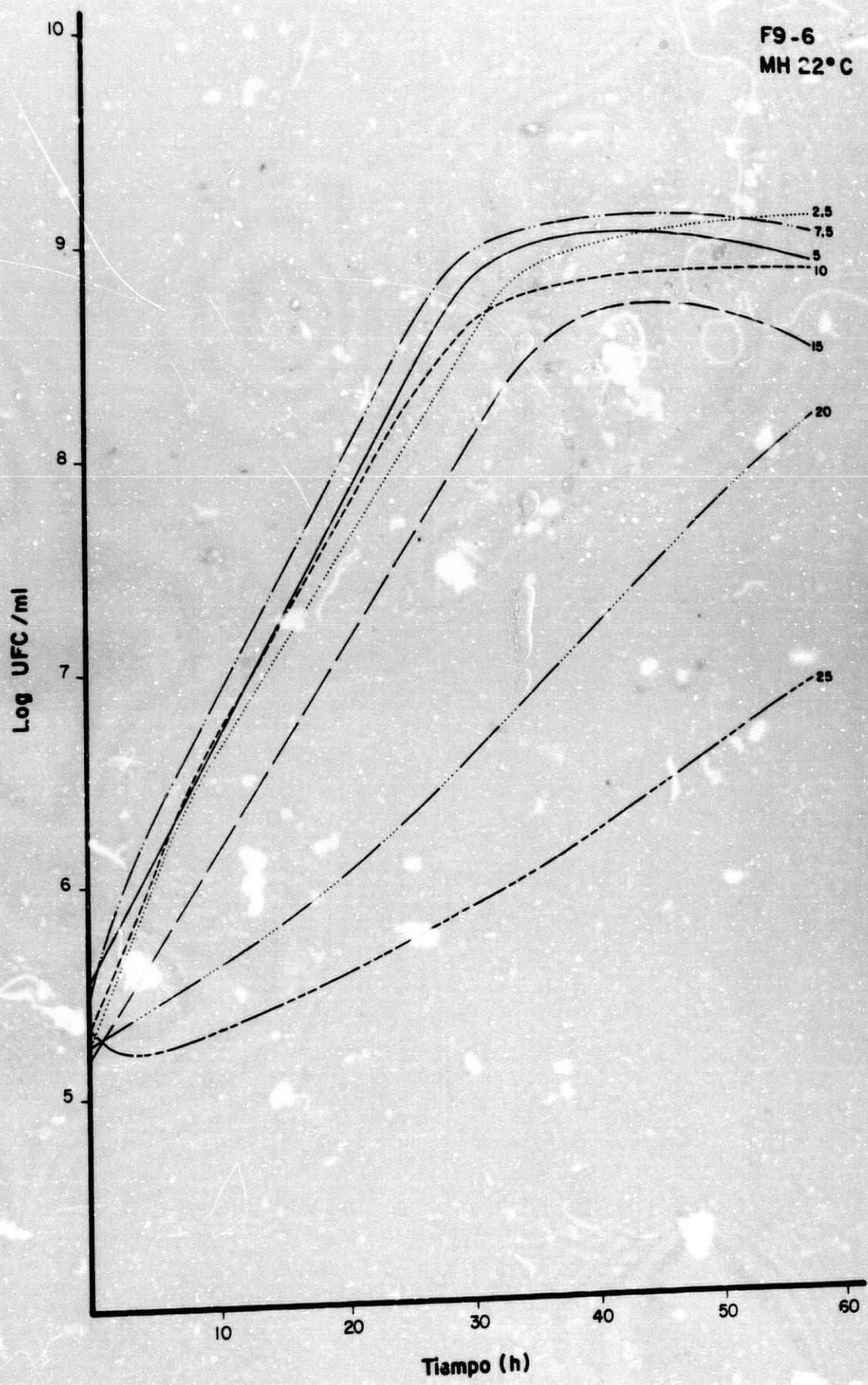


Figura n° 12

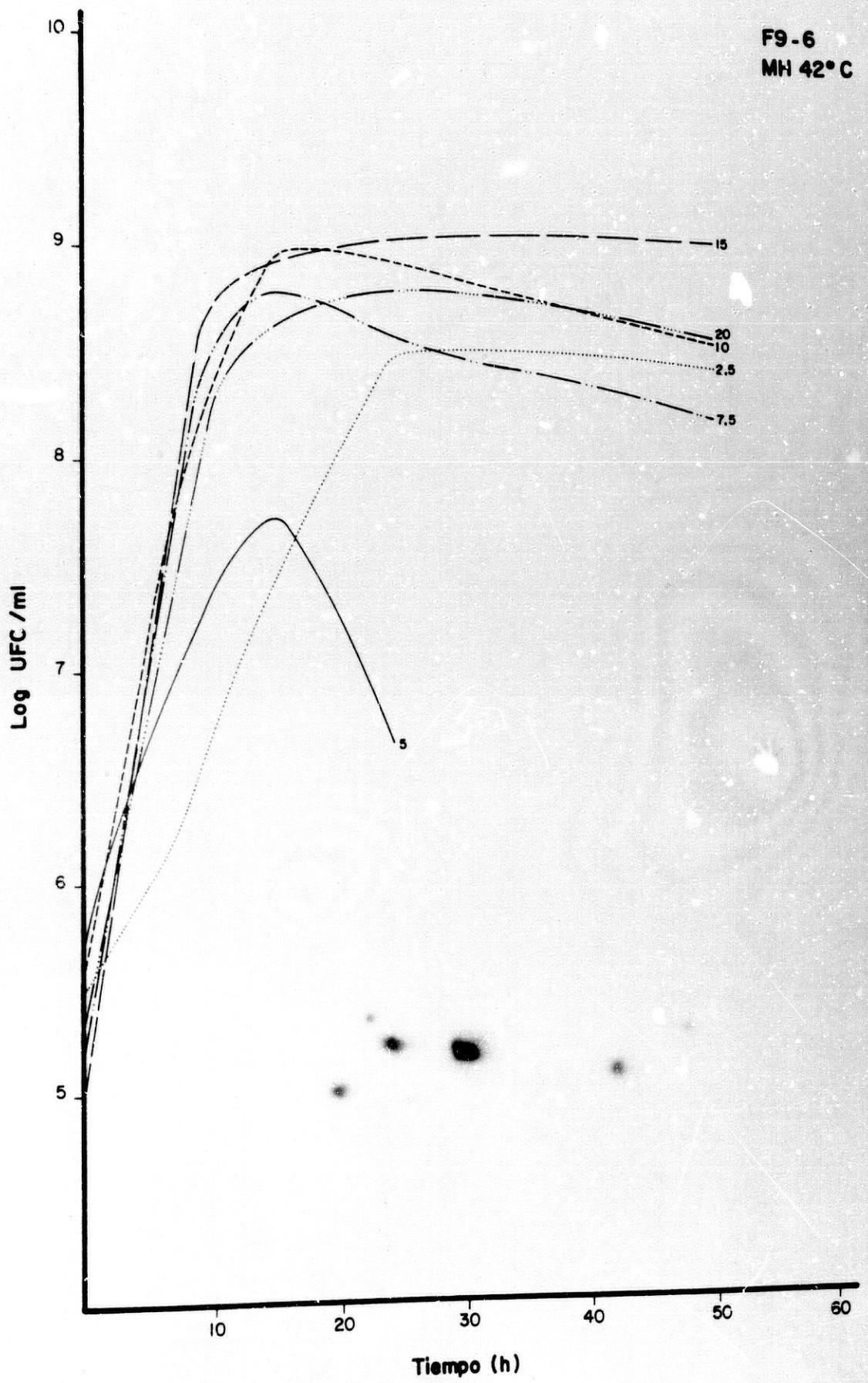


Figura nº 13

F9-6
MD 32° C

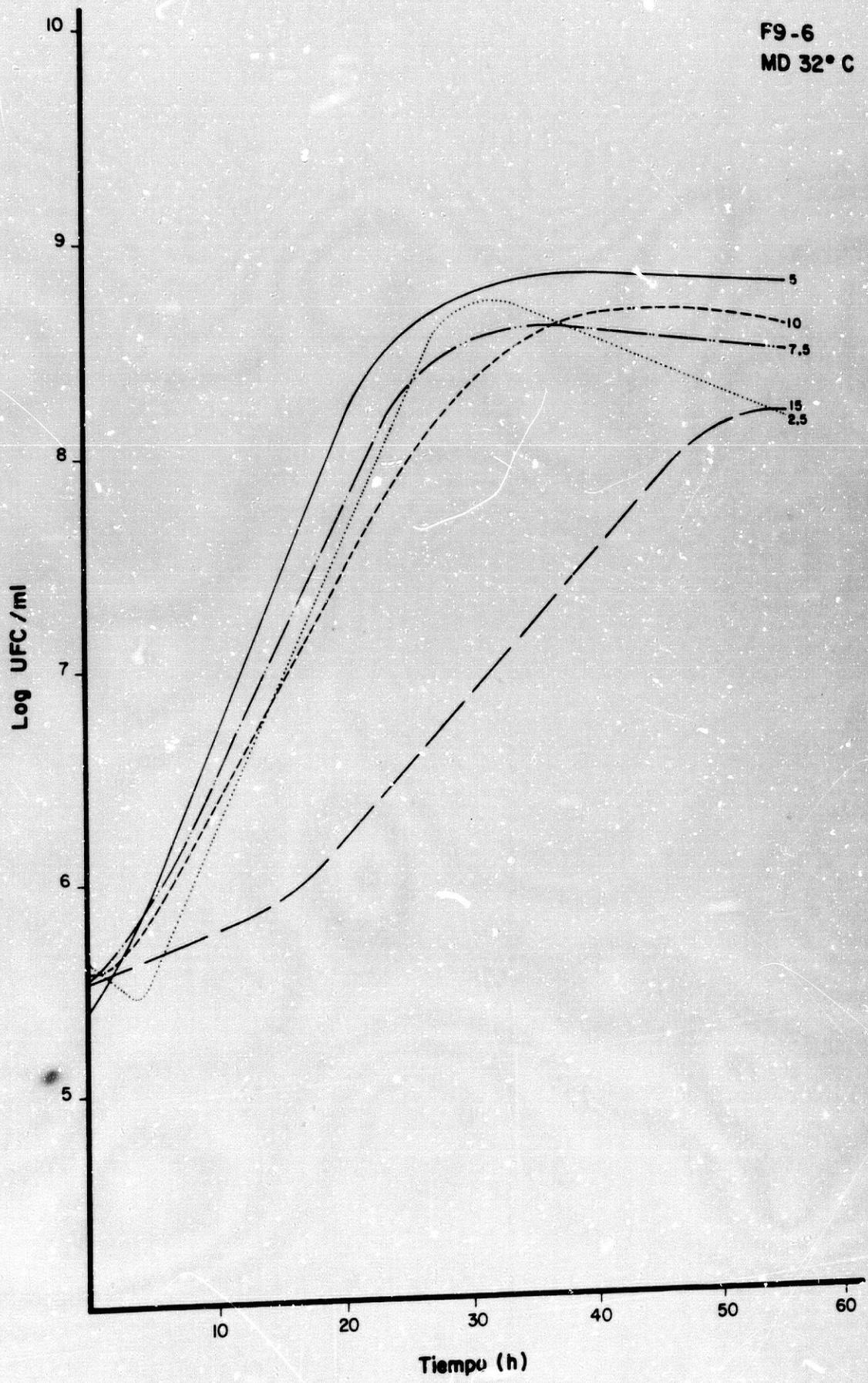


Figura nº 14

F9-6
MD 22° C

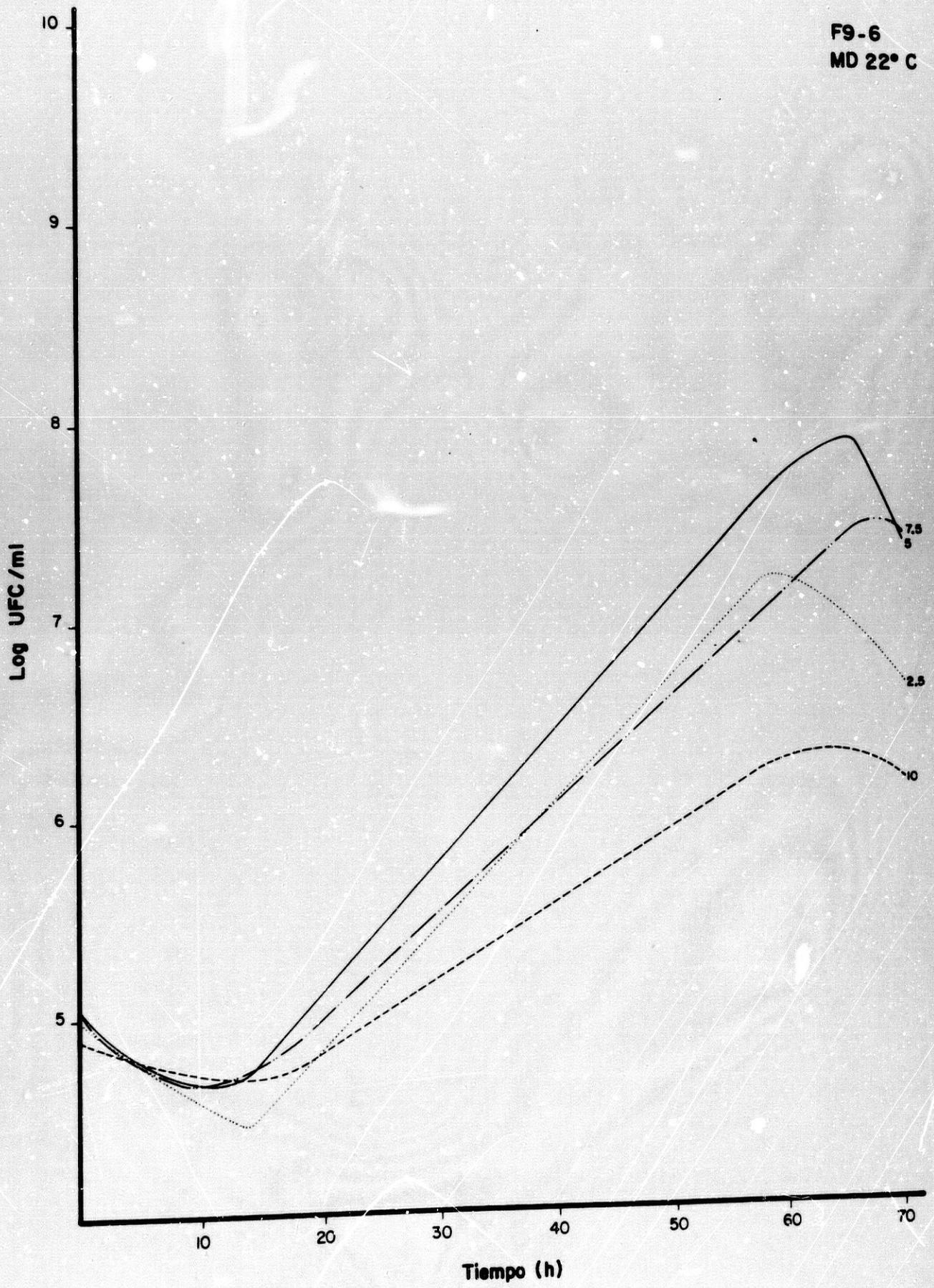


Figura nº 15

F9-6
MD 42° C

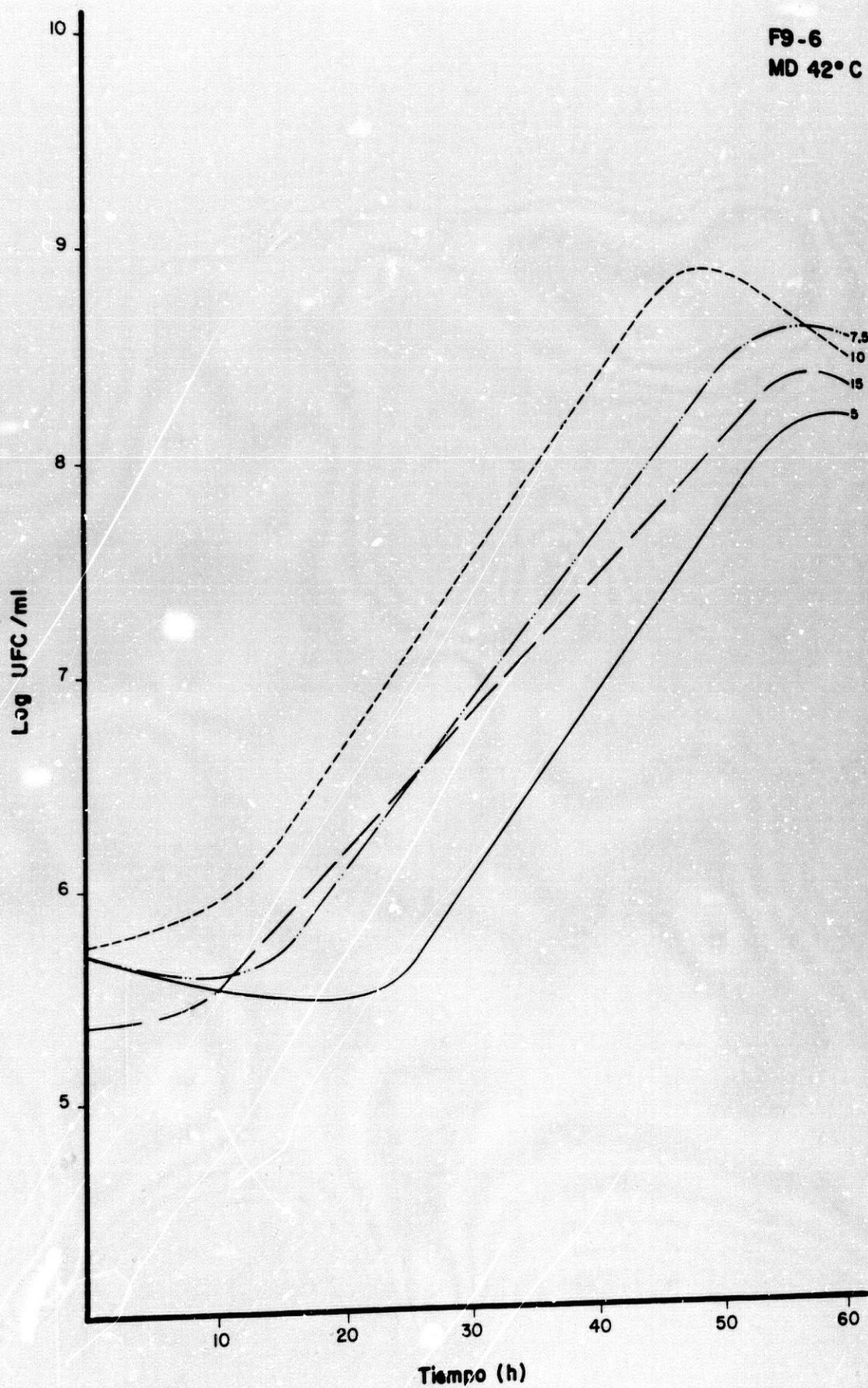


Figura nº16

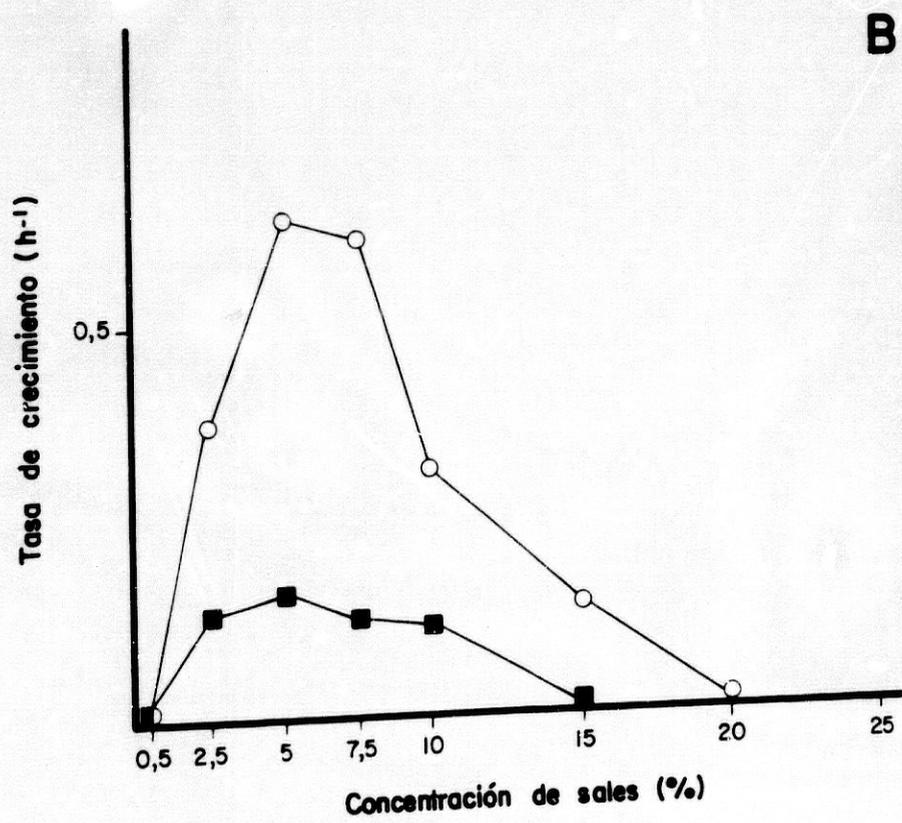
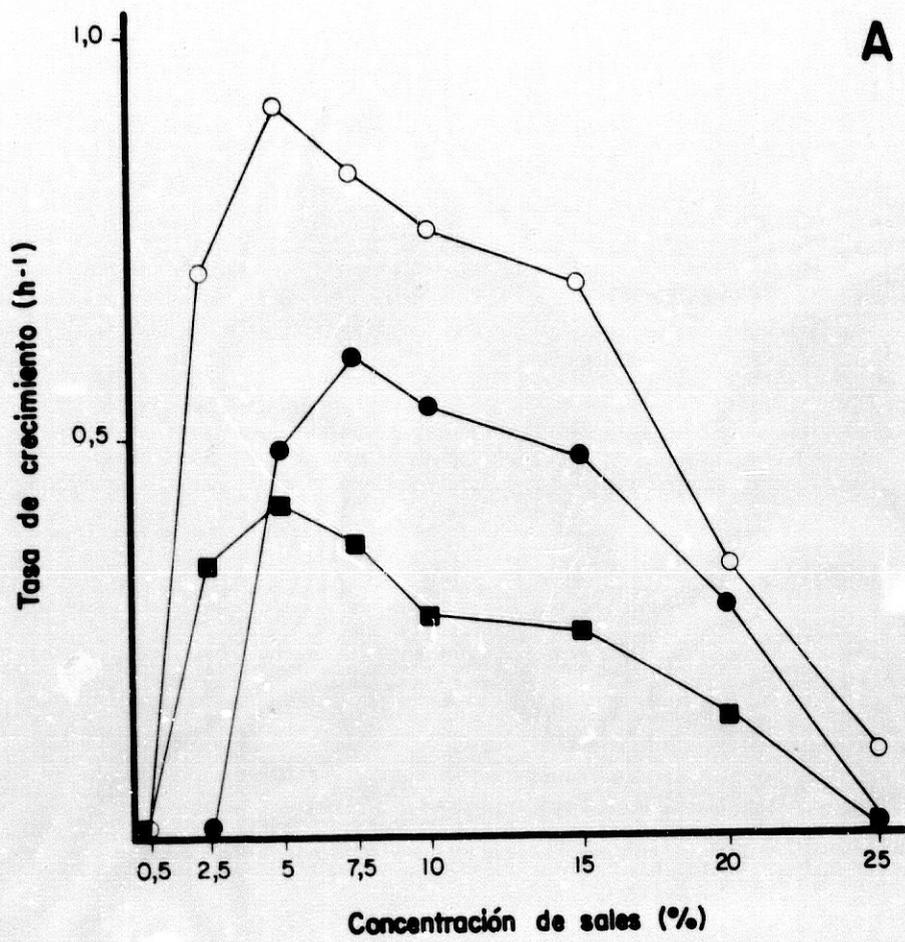


Figura nº17

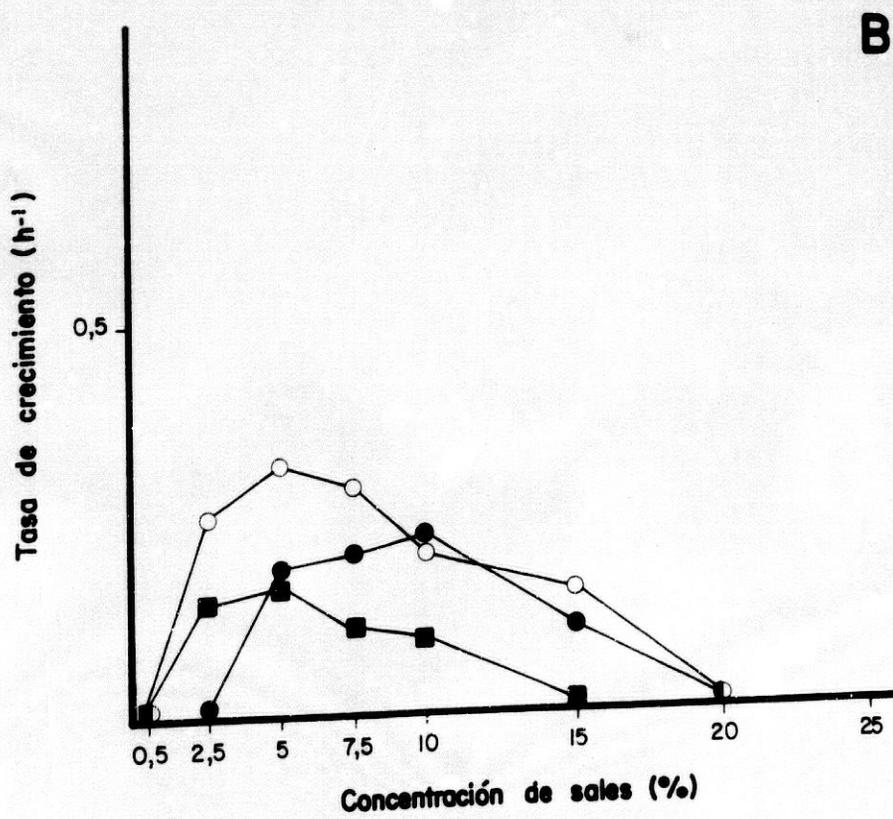
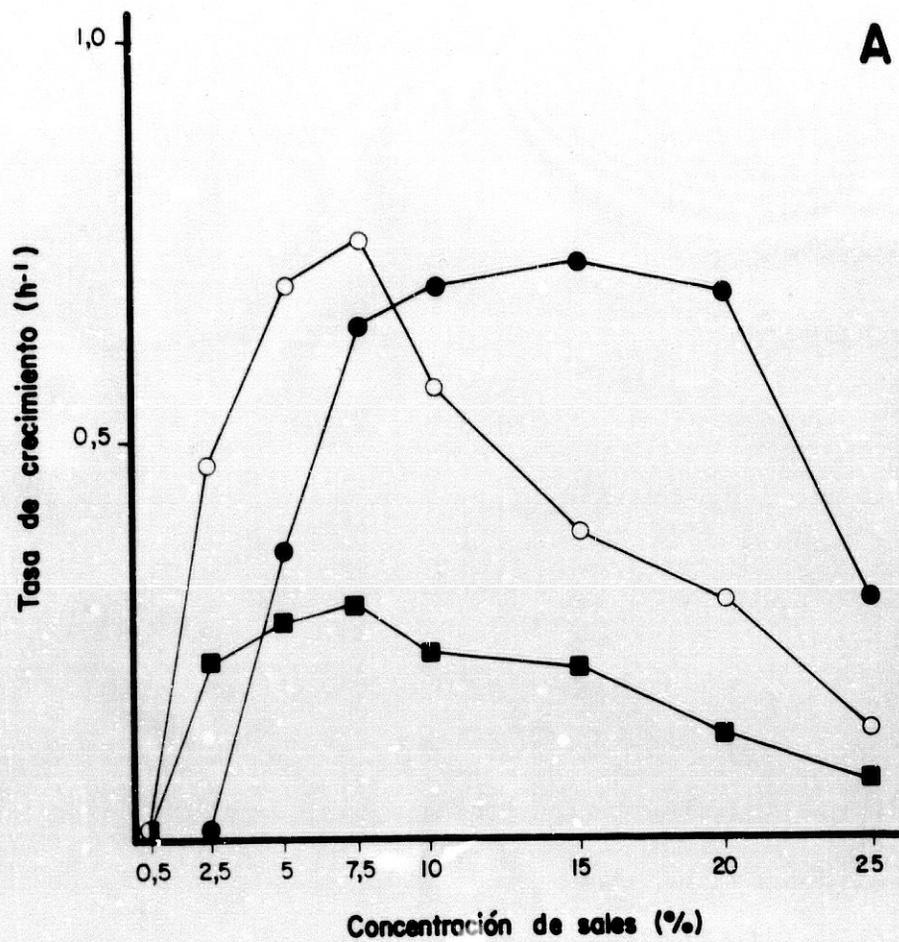


Figura nº 18

Fig. 17: Tasas de crecimiento (μ) de la cepa F8-11 en el medio de cultivo complejo MH (A) y definido MD (B)

Fig. 18: Tasas de crecimiento (μ) de la cepa F9-6 en el medio de cultivo complejo MH (A) y definido MD (B)

- : 32 °C
- : 22 °C
- : 42 °C

Tabla III.7. Tasas de crecimiento (μ , horas⁻¹) de la cepa F8-11 en distintas condiciones de cultivo.

Medio de cultivo	Concentración salina (%)	Temperatura (°C)		
		22	32	42
MH	0,5%	-	-	-
	2,5%	0,34	0,71	-
	5%	0,42	0,92	0,48
	7,5%	0,37	0,84	0,61
	10%	0,28	0,77	0,54
	15%	0,26	0,71	0,48
	20%	0,14	0,34	0,29
	25%	-	0,10	-
MD	0,5%	-	-	-
	2,5%	0,14	0,37	-
	5%	0,16	0,63	-
	7,5%	0,13	0,60	-
	10%	0,12	0,31	-
	15%	-	0,14	-
	20%	-	-	-
	25%	-	-	-

- = no crecimiento

MH= medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)

MD= medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

Tabla III.8. Tiempos de generación de la cepa F8-11 en distintas condiciones de cultivo

Medio de cultivo	Concentración salina (%)	Temperatura (°C)		
		22	32	42
MH	0,5%	-	-	-
	2,5%	2h2'	58'	-
	5%	1h39'	45'	1h26'
	7,5%	1h52'	49'	1h08'
	10%	2h29'	54'	1h17'
	15%	2h40'	59'	1h26'
	20%	4h57'	2h24'	2h23'
	25%	-	6h59'	-
MD	0,5%	-	-	-
	2,5%	4h57'	1h52'	-
	5%	4h20'	1h06'	-
	7,5%	5h20'	1h09'	-
	10%	5h47'	2h14'	-
	15%	-	4h57'	-
	20%	-	-	-
	25%	-	-	-

- = no crecimiento

MH= medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)

MD= medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

Tabla III.9. Tasas de crecimiento (μ , horas⁻¹) de la cepa F9-6 en distintas condiciones de cultivo.

Medio de cultivo	Concentración salina (%)	Temperatura (°C)		
		22	32	42
MH	0,5%	-	-	-
	2,5%	0,22	0,48	-
	5%	0,28	0,71	0,34
	7,5%	0,29	0,77	0,66
	10%	0,24	0,58	0,71
	15%	0,22	0,40	0,75
	20%	0,14	0,32	0,70
	25%	0,08	0,15	0,32
MD	0,5%	-	-	-
	2,5%	0,14	0,25	-
	5%	0,16	0,32	0,20
	7,5%	0,11	0,29	0,19
	10%	0,09	0,20	0,21
	15%	-	0,15	0,11
	20%	-	-	-
	25%	-	-	-

- = no crecimiento

MH= medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)

MD= medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

Tabla III.10. Tiempos de generación de la cepa F9-6 en distintas condiciones de cultivo.

Medio de cultivo	Concentración salina (%)	Temperatura (°C)		
		22	32	42
MH	0,5%	-	-	-
	2,5%	3h09'	1h26'	-
	5%	2h28'	58'	2h04'
	7,5%	2h23'	54'	1h03'
	10%	2h53'	1h12'	58'
	15%	3h09'	1h43'	55'
	20%	4h57'	2h10'	59'
	25%	8h40'	4h37'	2h10'
MD	0,5%	-	-	-
	2,5%	4h57'	2h46'	-
	5%	4h20'	2h10'	3h28'
	7,5%	6h18'	2h23'	3h39'
	10%	7h42'	3h27'	3h18'
	15%	-	4h37'	6h18'
	20%	-	-	-
	25%	-	-	-

- = no crecimiento

MH= medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)

MD= medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

Tabla III.11. Rangos y óptimos de concentraciones salinas de las cepas F8-11 y F9-6 en distintas condiciones de cultivo.

Cepa	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Optimo (%)	Rango (%)
F8-11	MH	22	5%	(0,5)* 2,5-20
		32	5%	2,5-25
		42	7,5%	5-20
	MD	22	5%	(0,5) 2,5-15
		32	5%	2,5-15
		42	-	-
F9-6	MH	22	7,5%	(0,5) 2,5-25
		32	7,5%	2,5-25
		42	15%	(2,5) 5-25
	MD	22	5%	(0,5) 2,5-10 (15)
		32	5%	2,5-15 (20)
		42	10%	5-15

- = no crecimiento

* = Las concentraciones que aparecen entre paréntesis no permitieron el crecimiento del microorganismo, pero sí su supervivencia al menos hasta las 72 horas de incubación

MH= medio de cultivo complejo (Quesada y col., 1983)

MD= medio de cultivo definido (Quesada y col., 1987)

III.5.2. REQUERIMIENTOS IONICOS Y SALINOS

Cepa F8-11:

- Cationes: Na^+ + Mg^{++}
- Aniones: Cl^- o SO_4^-
- Concentración mínima de Mg^{++} : 0,4% de MgCl_2 (+3,8% de NaCl)
- Concentración mínima de Na^+ : 1,5% de NaCl (+0,4% de MgCl_2)

Cepa F9-6:

- Cationes: Na^+
- Aniones: Cl^- , SO_4^- o Br^-
- Concentración mínima de Na^+ : 1,5% (NaCl)

III.5.3. COMPOSICION QUIMICA CELULAR

Los resultados de las determinaciones de proteínas, carbohidratos, FHB y ácidos nucleicos de las cepas representantes de los fenones A y B se presentan en la Tabla III.12 (cepa F8-11) y en la Tabla III.13 (cepa F9-6)

Tabla III.12. Contenido en proteínas, carbohidratos, PHB y ácidos nucleicos de la cepa F8-11 en fase exponencial de crecimiento.

	Concentración salina (% p/v)		
	2,5	7,5	20
Proteínas	35,6	11,2	1,4
Carbohidratos	1,45	0,53	0,13
PHB	17,1	1,7	1,5
ADN	14,6	8,3	10,0
ARN	10,1	6,8	3,0

Los resultados se han expresado como porcentaje respecto del peso seco.

Tabla III.13. Contenido en proteínas, carbohidratos, PHB y ácidos nucleicos de la cepa F9-6 en fase exponencial de crecimiento.

	Concentración salina (% p/v)		
	2,5	7,5	20
Proteínas	15,0	8,0	4,8
Carbohidratos	3,6	3,1	2,4
PHB	1,8	1,4	6,6
ADN	17,0	20,1	15,9
ARN	16,0	9,1	8,0

Los resultados se han expresado en porcentaje respecto del peso seco.

III.5.4. COMPOSICION CELULAR DE ACIDOS GRASOS

Los resultados del estudio de la composición en ácidos grasos celulares de las cepas representantes de los fenones A y B, así como de la influencia sobre ésta de la fase de crecimiento y de la concentración salina del medio externo se muestran en las Tablas siguientes:

Tabla III.14: Tiempos de retención y desviación estándar de los ácidos grasos patrones

Tabla III.15: Composición de ácidos grasos de la cepa F8-11

Tabla III.16: Composición de ácidos grasos de la cepa F9-6

Tabla III.14. Tiempos de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos patrones, separados por columna de SE-50 al 15% en Chromosoid.

Acido graso	Tiempo de retención (minutos)
<u>Saturados</u>	
C10:0	3,52 ± 0,005
C11:0	4,15 ± 0,006
C12:0	6,44 ± 0,009
C13:0	8,20 ± 0,011
C14:0	10,30 ± 0,012
C15:0	12,45 ± 0,013
C16:0	14,80 ± 0,015
C17:0	17,49 ± 0,023
C18:0	20,50 ± 0,030
C19:0	25,55 ± 0,046
C20:0	32,35 ± 0,091
<u>Insaturados</u>	
C16:1	13,50 ± 0,015
C18:1	19,41 ± 0,028
<u>Ramificados</u>	
i-C14:0	9,63 ± 0,012
a-C15:0	11,76 ± 0,013
i-C16:0	13,94 ± 0,014
a-C17:0	16,01 ± 0,021
<u>Con anillo ciclopropano</u>	
cy-C17:0	16,75 ± 0,020
cy-C19:0	23,25 ± 0,041
<u>Hidroxilados</u>	
2-OHC10	5,20 ± 0,006
2-OHC12	8,95 ± 0,011
3-OHC12	10,02 ± 0,012
2-OHC14	14,40 ± 0,015
3-OHC14	15,30 ± 0,018
2-OHC16	18,31 ± 0,028

Tabla III.15. Composición de ácidos grasos de la cepa F8-11

Acido graso	Concentración salina (%)								
	2,5			7,5			20		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C12:0	-	T	T	-	-	-	-	T	T
C13:0	-	T	0,4	-	0,2	-	-	0,1	T
C14:0	T	-	T	0,2	T	T	T	T	T
C15:0	0,2	1,3	1,7	0,9	2,3	1,4	-	0,3	0,8
C16:0	31,4	32,1	26,8	38,7	41,1	38,0	39,8	41,5	42,0
C17:0	-	-	-	-	T	T	0,3	-	0,5
C18:0	2,5	2,7	1,9	0,3	8,4	14,9	8,8	8,6	10,1
C19:0	0,2	T	-	-	T	-	-	-	T
C20:0	1,6	0,5	0,9	T	0,4	1,2	2,1	T	1,8
C16:1	19,1	15,9	22,6	15,2	14,2	2,1	10,4	5,4	10,2
C18:1	34,3	42,9	38,4	36,9	27,9	32,0	27,6	26,8	24,3
i-C14:0	0,2	-	-	0,3	T	-	0,3	-	-
a-C15:0	2,4	1,5	0,7	T	T	2,2	T	-	T
i-C16:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-C17:0	1,7	0,8	0,3	0,6	1,2	T	T	2,4	T
cy-C17:0	1,9	0,6	3,1	2,9	0,7	0,5	6,9	3,6	3,0
cy-C19:0	4,3	1,3	2,9	3,8	3,2	7,6	3,6	10,6	4,2

1. fase logarítmica; 2. final fase logarítmica; 3. fase estacionaria

- = no detectado; T = trazas, menos del 0,1%

No se detectaron ácidos grasos hidroxilados ni saturados de 10 y 11 átomos de carbono

Tabla III.16. Composición de ácidos grasos de la cepa F9-6

Acido graso	Concentración salina (%)								
	2,5			7,5			20		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C12:0	1,2	-	T	T	-	-	T	-	T
C13:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	T	0,2	1,2	-	T	-	T	T	-
C15:0	T	T	0,5	0,4	T	-	0,5	T	-
C16:0	43,7	28,8	40,9	36,7	48,5	46,4	41,5	37,9	37,3
C17:0	1,2	3,1	T	-	T	1,8	0,7	T	-
C18:0	4,3	1,7	9,1	11,8	1,9	4,3	6,9	5,7	9,6
C19:0	0,9	2,4	T	0,2	T	0,8	2,3	0,8	T
C20:0	1,7	0,6	1,2	T	0,7	T	T	2,4	0,3
C16:1	6,6	15,5	6,2	4,8	2,4	8,7	12,0	12,3	6,4
C18:1	28,8	42,7	31,5	36,6	37,6	30,0	24,6	26,9	40,7
i-C14:0	T	-	-	-	-	-	-	-	-
a-C15:0	3,7	0,6	T	T	0,6	1,7	T	0,4	0,3
i-C16:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-C17:0	T	T	0,7	2,3	T	T	1,3	1,6	1,2
cy-C17:0	0,7	2,5	2,4	3,8	2,4	4,4	4,0	5,3	2,7
cy-C19:0	6,8	1,5	6,3	3,3	3,5	1,6	5,9	6,4	1,4

1. fase logarítmica; 2. final fase logarítmica; 3. fase estacionaria

- = no detectado; T = trazas, menos del 0,1%

No se detectaron ácidos grasos hidroxilados ni saturados de 10 y 11 átomos de carbono

IV. DISCUSSION

Desde la perspectiva que ofrecen los conocimientos actuales acerca del halofilismo bacteriano, es posible considerar a los microorganismos halófilos moderados como un grupo fisiológicamente homogéneo, pero de manifiesta heterogeneidad bajo el punto de vista taxonómico.

Sin embargo, cuando en 1976 se inició en nuestro Departamento la línea de investigación sobre los microorganismos halófilos, dentro de la cual se ha realizado esta Tesis doctoral, ciertamente los halófilos moderados eran aún escasamente conocidos: sólo se habían descrito seis especies como tales y poco se sabía acerca de su fisiología. En los últimos años se han realizado amplios estudios sobre este tipo de microorganismos, que han conducido a la descripción de numerosas nuevas especies (hoy existen más de 20 formalmente descritas como halófilas moderadas), así como a la profundización en el conocimiento de su comportamiento fisiológico.

No obstante, existen aún algunos grupos de microorganismos que pueden ser aislados en ambientes hipersalinos y encuadrados en la categoría de los halófilos moderados, pero que no pueden incluirse en ninguna de las especies descritas como tales.

Este es el caso de los bacilos Gram negativos aerobios inmóviles objeto de estudio de este trabajo. En el planteamiento del mismo ya señalábamos que, si bien tras una caracterización inicial habían sido asignados provisionalmente a los géneros *Flavobacterium* y *Acinetobacter* (Quesada y col., 1985), podrían constituir nuevos taxa no descritos hasta ahora. Los resultados de los estudios taxonómicos que nos han llevado a confirmar esta hipótesis quedan expuestos en esta memoria.

Caracterización fenotípica

Las pruebas de caracterización de las cepas se eligieron atendiendo a las recomendaciones de la Sociedad Americana de Microbiología (Colwell, 1970), realizándose un total de 151. Este número de pruebas está de acuerdo también con los criterios de Sneath (1972) y Sneath y Sokal (1973), quienes indican como óptimo, para la posterior aplicación de las técnicas de Análisis Numérico, un número entre 100 y 200, siendo los números inferiores a 60 insuficientes para obtener una clasificación estable.

Todas estas pruebas fueron convenientemente modificadas para el estudio de microorganismos halófilos moderados según los criterios de Ventosa y colaboradores (1982) y Quesada y colaboradores (1983, 1984), quedando una vez más probada su validez por la bondad de los resultados obtenidos.

Del conjunto de datos recopilados de las pruebas fenotípicas, y para la realización del Análisis Numérico, fueron eliminados 34 caracteres, ya que todas las cepas presentaron igual resultado para los mismos, y, por tanto, no aportaban carácter discriminatorio alguno (Sneath y Sokal, 1973). Este elevado número de pruebas comunes indica, por otra parte, que los microorganismos estudiados constituyen un grupo bastante homogéneo, independientemente del hábitat salino del que fueron aislados y de su localización geográfica (Quesada y col., 1985). Así, todos ellos son bacilos Gram negativos inmóviles, aerobios, de metabolismo respiratorio, con inclusiones de PHB, productores de catalasa. En medio sólido

desarrollan colonias circulares, convexas, poco elevadas, y crecen normalmente enturbiando el medio líquido. Capaces de crecer al 5, 7,5 y 10% de sales totales, a pH 6, 7 y 8, y a 15, 20, 25, 32 y 37 °C. Ninguno produce ácidos a partir de L-arabinosa, D-celobiosa, lactosa, salicina ni D-xilosa, ni crece en anaerobiosis en presencia de fumarato; todos dan negativas las pruebas de indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer, y son incapaces de hidrolizar el almidón y la caseína; ninguno produce pirocianina ni fluoresceína, ni utiliza el benzoato como única fuente de carbono y energía, y todos son sensibles al cloranfenicol (30 µg) y a la polimixina B (300 UI).

En el análisis de semejanza se utilizaron dos coeficientes: el de Sokal y Michener (S_{SM}) y el de Jaccard (S_J). Algunos autores recomiendan utilizar el primero, por cuanto en taxonomía bacteriana ciertos caracteres pueden ser considerados alternativamente como positivos o negativos (tal es el caso del registro de la respuesta frente a un antibiótico), afectando el modo de registro a los resultados del coeficiente S_J (Sneath, 1972). En nuestro caso, si bien los resultados obtenidos mediante ambos coeficientes fueron muy semejantes, seleccionamos justamentente el de Sokal y Michener ya que al aplicar éste obtuvimos una relativa mayor separación entre los grupos y a un nivel de semejanza superior.

Para el análisis de agrupación se utilizó la técnica de asociación UPGMA, que también en estudios anteriores habíamos observado rendía mejores resultados (Quesada y col., 1983, 1984; del Moral y col., 1987). Así, la Figura 1 muestra el dendrograma obtenido con el coeficiente S_{SM} y la técnica UPGMA, para el que el valor del coeficiente de correlación cofenética resultó ser de 0,85879.

En esta Figura se observa que a un nivel de semejanza del 70% la mayoría de las cepas se agruparon en dos fenones (fenón A y fenón B), mientras que solamente 7 cepas no quedaron agrupadas a este nivel. Las cinco cepas utilizadas como referencia en este estudio no se incluyeron en ninguno de los dos fenones formados, lo que es un claro índice de la escasa relación existente entre los caracteres fenotípicos de éstas y los de nuestras cepas.

El conjunto de las características fenotípicas de las cepas que componen los dos fenones aparecen en la Tabla III.1. Se han

seleccionado además aquellos caracteres que resultan útiles para diferenciar ambos fenones, y éstos se relacionan en la Tabla III.2.

A continuación se describen las propiedades generales de estos dos fenones:

Fenón A:

Formado por 33 cepas que se agrupan a un nivel de semejanza del 70%. Son bacilos Gram negativos inmóviles, oxidasa positivos. Todos son aerobios; en la mayoría de los casos pueden utilizar nitrato o nitrito como aceptor alternativo de electrones, pudiendo entonces crecer anaeróticamente en presencia de estos compuestos. Reducen tanto los nitratos como los nitritos. No poseen actividad proteolítica, amilolítica ni fosfatásica y son sensibles a la penicilina G.

Fenón B:

Comprende 22 cepas que se agruparon a un nivel de semejanza del 75%. La principal característica que diferencia a este grupo del fenón A es que todas las cepas son oxidasas negativas. Son aerobios estrictos e incapaces de respirar sobre nitrato o nitrito. Reducen los nitratos pero no los nitritos. La mayoría de las cepas poseen actividad proteolítica y fosfatásica y resisten la penicilina G.

Hemos seleccionado también algunos caracteres que resultan de utilidad para diferenciar a ambos grupos de bacterias de otros bacilos Gram negativos aerobios; estas características se muestran en la Tabla IV.1.

La descripción de las características propias de cada uno de los fenones obtenidos tras un Análisis Numérico, así como la selección de caracteres de diagnóstico adecuados para diferenciar unos grupos de otros, aunque imprescindibles para la definición de nuevas taxa, resultan a menudo insuficientes a la hora de identificar y clasificar otros grupos por comparación con éstos. Así pues, se hace necesaria la elección de una "cepa tipo" que sirva de referencia y ejemplo permanente de la especie (Staley y Krieg, 1984). Silvestri y colaboradores (1962) sugieren que la cepa tipo debería ser la "más

Tabla IV.1. Características diferenciales de los fenones A y B y otras especies Gram negativas aerobias halófilas moderadas

Característica	<i>Flavobacterium halmeophilum</i>	<i>Deleya halophila</i>	<i>Vibrio costicola</i>	<i>Halomonas elongata</i>	<i>Halomonas subglaciescola</i>	Fenón A	Fenón B
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo curvado	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Pigmentación	amarilla	crema	blanca	blanca	blanca	amarillenta	crema
Movilidad	-	+	+	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	-
Acidos de:							
Arabinosa	+	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	ND	(-)	(-)
Lactosa	+	-	-	-	ND	-	-
Manitol	+	-	d	-	ND	(-)	-
Producción de H ₂ S	-	+	d	-	-	d	(+)
Hidrólisis del Tween 80	-	-	d	-	ND	d	d
Hidrólisis de Gelatina	+	-	+	d	-	(-)	(+)
• Caseína	ND	-	+	-	ND	-	-
• Esculina	-	+	(+)	d	-	(-)	d
• DNA	+	-	d	-	ND	(-)	d
Reducción nitratos	-	+	-	+	+	+	+
Reducción nitritos	-	-	-	+	-	d	-
Fosfatasa	+	+	d	+	-	-	(+)
Fenilalanina desaminasa	ND	-	d	-	-	d	(-)
Sensibilidad a:							
Eritromicina	(-)	(-)	+	ND	ND	+	(-)
Gentamicina	-	-	-	-	-	(+)	(-)
Penicilina G	ND	d	-	d	(-)	+	-
Tetraciclina	(-)	-	-	-	-	(+)	-

+: todas las cepas son positivas; -: todas las cepas son negativas

(+): el 80% o más de las cepas son positivas; (-): el 80% o más de las cepas son negativas

d: del 21 al 79% de las cepas son positivas; ND: no determinado.

típica de un conjunto", y denominada como "centrotipo" por ser la que ocupe el centro del grupo definido mediante el análisis de asociación. A pesar de ello es evidente que en esta elección influye el criterio subjetivo del propio investigador, y así, no es sorprendente que algunas especies bacterianas posean mayor diversidad que otras.

En nuestro caso la cepa representante de cada fenón fue seleccionada según el criterio de Silvestri (1962) por cumplir las características definidas para el grupo, es decir no sólo aquellas para las que el 100% de las cepas son positivas o negativas, sino también para las que cumplen el 90 o el 80% de las cepas del fenón. Así elegimos la cepa F8-11 como representante del fenón A y la cepa F9-6 para el B, quienes, además, se utilizaron posteriormente en los estudios genéticos y fisiológicos.

Caracterización genética

El contenido en bases Guanina y Citosina del ADN se determinó en 10 cepas del fenón A y 8 del B; los resultados pueden observarse en las Tablas III.3 y III.4. Para el fenón A el porcentaje en G+C fue del 58,2-65,4%, siendo 64,2 el de la cepa tipo F8-11; los valores en el fenón B variaron entre 57,0 y 65,7%, correspondiendo este último valor con el G+C de la cepa representante, F9-6.

En esta Tabla aparece también el valor de la temperatura media de desnaturalización del ADN (T_m), dato imprescindible para la determinación de las temperaturas de incubación en los experimentos de hibridación ADN/ADN, cuyos resultados, expresados en porcentaje de homología, se han recogido en las Tablas III.5 y III.6.

El primer hecho que llama la atención es la gran homogeneidad existente dentro de cada uno de los grupos, a la vista de los elevados porcentajes de homología entre las cepas que los componen, siendo del 71% al 99% en el fenón A y del 65 al 90% en el B. Por el contrario, el grado de relación de sus ADN con las otras bacterias Gram negativas halófilas y no halófilas utilizadas como

referencia, fue muy bajo: de 0 a 28% en el fenón A y de 0 a 43% para las cepas pertenecientes al fenón B.

Obsérvese que las dos cepas representantes del fenón A, que en un estudio previo, como ya hemos comentado, se asignaron provisionalmente al género *Flavobacterium*, no hibridaron con las dos especies de este género utilizadas en el estudio, *Flavobacterium halmephilum* (halófila moderada) y *Flavobacterium meningosepticum* (no halófila); sólo la cepa F8-5 presentó un 9% de homología con la especie *F. halmephilum*; este hecho, unido a la gran diferencia en el contenido en G+C que presentan sus ADN (49,7 para *F. halmephilum*, Callies y Manheim, 1978, frente a 58,2-65,4 de nuestras cepas), nos hace descartar definitivamente la posibilidad de relacionarlas con las especies de este género. Según el mismo criterio, tampoco guardan relación con el resto de los microorganismos de referencia, dados los bajos porcentajes de homología encontrados (0-28%), siendo la especie de origen marino *Deleya pacifica* la que presentó mayor grado de hibridación con la cepa F8-11 (28%).

Por lo que se refiere a las cepas del fenón B utilizadas en estos experimentos de hibridación, se observa una mayor homología de sus ADN con algunas de las bacterias halófilas o no halófilas usadas como referencia que con la especie *Acinetobacter calcoaceticus*, con la que el porcentaje de homología fue inferior al 22%; además, el rango de contenido en G+C para el género *Acinetobacter* es de 38-47% (Juni, 1984), mientras que el de nuestras cepas es muy superior (57,0-65,7), lo que confirma una vez más la imposibilidad de relacionarlas con las especies del género *Acinetobacter*.

Como acabamos de señalar, una de las cepas elegida como representante para este estudio (F2-12) presentó porcentajes de hibridación de alrededor del 40% con alguna de las utilizadas de referencia: *Pseudomonas putida*, no halófila, *Deleya cupida*, bacteria marina, y *Deleya halophila* y *Halomonas elongata*, halófilas moderadas. Johnson en 1973 propuso un esquema para separar grupos taxonómicos (subespecie, especie y especies relacionadas) en base a los datos de la homología de ADN. Según este esquema, los porcentajes intermedios de homología (20-60%) encontrados entre dos cepas en estudio indican que se trata de especies relacionadas; pero, según este mismo autor,

estos datos deben ser interpretados por el propio investigador en relación al conjunto de características fenotípicas de las cepas en cuestión (Johnson, 1984). En nuestro caso, cabe considerar el hecho de que las cuatro cepas de referencia mencionadas son móviles y oxidasa positivas, mientras que las cepas integrantes de fenón B son inmóviles y oxidasa negativas; estas y otras características diferenciales nos hace considerarlas como un taxón independiente (ver Tabla IV.1).

Por último, observemos la relación existente entre los dos grupos de microorganismos objeto de nuestro estudio: se compararon entre sí dos cepas representantes de cada fenón, revelándose por los bajos porcentajes de hibridación de sus ADN la escasa relación de homología entre ambos; resultados éstos que ratifican los obtenidos mediante el Análisis Numérico, el cual rindió a partir del conjunto de cepas y a un nivel de semejanza del 70%, dos fenones claramente diferenciados, como ya hemos comentado anteriormente (ver Figura 1).

Características morfológicas

La serie de estudios que emprendimos tras la caracterización fenotípica y genética de las cepas se llevaron a cabo con las elegidas como representantes, como ya hemos mencionado: la cepa F8-11 por parte del grupo de bacilos Gram negativos inmóviles oxidasa positivos, y la cepa F9-6 para los oxidasa negativos.

La morfología típica bacilar de las células en fase logarítmica de desarrollo, cultivadas a 32 °C y a la concentración salina óptima, se pierde con relativa facilidad en fase estacionaria, originando formas irregulares, más delgadas y de tamaño ligeramente inferior; este hecho, que ha sido descrito en algunos microorganismos halófilos moderados, es común para la mayoría de las células bacterianas (Matheson y col., 1976; Zeikus y col., 1983; Oren y col., 1983; Stanier y col., 1984).

Lo que en estas bacterias llama la atención es el cambio de morfología experimentado por las células cultivadas a distintas concentraciones de sales.

La cepa F8-11, que presenta un tamaño medio de $0,8 \times 2-2,5 \mu\text{m}$, al 7,5% de sales, origina casi exclusivamente formas cortas y redondeadas en concentraciones salinas inferiores (2,5%), mientras que cuando se cultiva en presencia de elevadas concentraciones de sal (20%) aparece como largos filamentos curvados, de hasta 15-18 μm de longitud (Figuras 2 y 4). El cambio de formas bacilares a cocoides, observado también en *Deleya halophila* (Quesada y col., 1987), podría ser debido a una desestabilización de las cubiertas ocurrida en baja concentración salina (Vreeland, 1987). La producción de filamentos en respuesta a la elevada concentración de sal presente en el medio externo, que, además, entre las bacterias halófilas moderadas sólo ha sido descrita en *Deleya halophila* (Quesada y col., 1987), quizás tenga su origen en cierta dificultad para dividirse en tales condiciones.

Por su parte, en la cepa F9-6, de tamaño $1,0 \times 2-2,5 \mu\text{m}$, no parece existir una relación clara entre los cambios morfológicos y la concentración salina del medio de cultivo, siendo capaz la bacteria de originar formas alargadas en cualquier condición (Figuras 3 y 5); no obstante, pudimos observar una tendencia a presentarse en mayor proporción como bacilos más cortos en presencia de elevada concentración de sales (20%), dando origen a mayor número de formas filamentosas largas al bajar esta concentración hasta 2,5% (Figura 5B), circunstancia descrita en otros halófilos moderados, como el no identificado NRCC 41227 (Matheson y col., 1976) o el anaerobio *Haloanaerobium praevalens* (Zeikus y col., 1983).

Además de estos cambios morfológicos, los estudios de microscopía electrónica de transmisión mostraron también la presencia de mayores cantidades del material polisacárido extracelular que forma una abundante cápsula, cuando los microorganismos se cultivaron a menores concentraciones salinas (Figuras 2 y 3), observaciones que concuerdan con la mayor mucosidad de las colonias originadas sobre medio MH sólido preparado al 2,5% de sales totales.

Respuesta a la sal: requerimientos salinos

Es un hecho conocido que tanto la temperatura como los nutrientes influyen de manera importante en la respuesta de los organismos frente a la sal.

Por ello, en la actualidad, los diversos autores que investigan acerca del halofilismo bacteriano coinciden en la necesidad de unificar las metodologías de trabajo para poder encuadrar de manera adecuada a los microorganismos en las distintas categorías de halófilos establecidas, e incluso, en algunas ocasiones, para definir correctamente a un organismo como halófilo (Kushner y Kamekura, 1988; Rodríguez-Valera, 1988).

Los microorganismos objeto de nuestro estudio son absolutamente incapaces de sobrevivir y desarrollarse en ausencia de sal, independientemente del medio de cultivo y de la temperatura de incubación, por lo que su calidad de halófilos es incuestionable.

Además, el fuerte carácter eurihalino que los caracteriza, les permite crecer en un amplio rango de concentraciones de sal (2,5-25% de sales totales); si bien estos márgenes pueden verse modificados, como comentaremos más adelante, las concentraciones salinas entre las que estas bacterias son capaces de crecer de forma óptima corresponden en todos los casos con las descritas para los halófilos moderados (Kushner, 1985; Kushner y Kamekura, 1988).

La Tabla III.11 muestra a modo de resumen los márgenes de concentraciones salinas entre los que crecen las cepas F8-11 y F9-6, representantes de los dos grupos de microorganismos halófilos moderados objeto de estudio, en función de la temperatura y del medio de cultivo utilizados, así como aquella concentración seleccionada como óptima para el crecimiento; entre paréntesis aparecen aquellas concentraciones en las que no hubo crecimiento, pero que permitieron la supervivencia de los microorganismos hasta al menos las 72 horas de incubación.

Se observa que a temperaturas de incubación diferentes de la óptima se modifica en distinta medida el rango de concentraciones

salinas propio del microorganismo. Así podemos ver que el límite inferior de este rango se desplaza hacia valores menores de concentración de sal a medida que desciende la temperatura de incubación; nótese que a 22 °C en todos los casos, si bien los microorganismos no son capaces de crecer al 0,5% de sales, tampoco pierden su viabilidad durante el periodo de estudio (72 horas), hecho que no ocurre a 32 ni a 42 °C; también que a esta última temperatura este margen inferior para el crecimiento se sitúa en un 5% de sales totales, mientras que a 22 y 32 °C era del 2,5%. Esta circunstancia ha sido descrita anteriormente por otros autores para distintas bacterias halófilas moderadas (Novitsky y Kushner, 1975, 1976; Chang y Leung, 1979); en otros casos, sin embargo, no se ha observado modificación en el límite inferior del crecimiento en función de la temperatura (Vreeland y col., 1980; Oren, 1983; Oren y col., 1987; Quesada y col., 1987).

En cuanto al límite superior, no parece existir un modo de comportamiento común en nuestras cepas: en algunos casos no se modifica en función de la temperatura (cepa F9-6 en el medio MH, o cepa F8-11 en medio definido), mientras que en otros sí, aunque no en la forma en que ha sido descrito globalmente para otros microorganismos halófilos moderados (ver Tabla I.5 de la Introducción y Tabla III.11).

Novitsky y Kushner (1975) sugirieron que probablemente las concentraciones de sal más altas se necesitaban para que los microorganismos pudieran crecer a elevadas temperaturas; esto explicaría el desplazamiento hacia mayores concentraciones del límite superior de crecimiento salino al aumentar la temperatura, observado en algunos casos (Chang y Leung, 1979; Quesada y col., 1987)

Sin embargo nuestros resultados son más acordes con el criterio de Chang y Leung (1979), quienes afirman que el crecimiento en un determinado rango de concentraciones salinas, en respuesta a la temperatura de incubación, parece ser altamente específico de cada microorganismo halófilo moderado.

Por lo que se refiere a la influencia del medio de cultivo en el rango de concentraciones de sal que permiten el crecimiento

bacteriano, nuestros resultados coinciden con los descritos repetidamente por otros autores y que pueden observarse en la Tabla I.5 del apartado de Introducción de esta Memoria (Forsyth y Kushner, 1970; Kamekura y Onishi, 1976; Chang y Leung, 1979; Vreeland y Martin, 1980; Hochstein y Tomlinson, 1984; Kamekura y col., 1985). En todos los casos se observa una mayor amplitud de este rango en medios de cultivo complejos que en medios químicamente definidos, hecho que nosotros hemos podido constatar en los dos microorganismos estudiados y para cada temperatura de incubación (ver Tabla III.11). La explicación a este comportamiento fue sugerida por Forsyth y Kushner en 1970: dado que muchos enzimas implicados en la síntesis de aminoácidos y otros factores de crecimiento se inhiben a elevadas concentraciones salinas, los componentes del medio de cultivo complejo, particularmente peptona y triptona, proporcionarían algunos de estos factores de crecimiento, posibilitando así el desarrollo de los organismos a concentraciones salinas superiores.

Como ya hemos expuesto anteriormente, el criterio de clasificación de los microorganismos halófilos tiene como base el rango de concentraciones salinas en que éstos son capaces de crecer de forma óptima (Kushner y Kamekura, 1988).

La realización de un espectro de crecimiento salino en medio sólido permite en general encuadrar a los distintos microorganismos en estudio en las categorías establecidas; de hecho, este fue el criterio utilizado para seleccionar las cepas de halófilos moderados que constituirían el objeto de esta Tesis doctoral. No obstante, este estudio no nos permitió conocer con exactitud la concentración salina óptima, revelándonos tan sólo que el crecimiento bacteriano se producía más rápidamente entre 3-15% de sales (Quesada y col., 1985).

La realización de las distintas curvas de crecimiento bacteriano, según la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos, nos proporcionó no sólo este dato, base para llevar a cabo posteriores estudios fisiológicos, sino también, y como ya hemos comentado, los márgenes salinos para el crecimiento en función del tipo de medio de cultivo y de la temperatura de incubación.

Las Figuras 6 a 16 corresponden a las representaciones gráficas de los resultados de estos estudios de crecimiento en las distintas condiciones de cultivo; la concentración salina óptima se determinó por comparación de las pendientes correspondientes a la fase exponencial de crecimiento de las curvas obtenidas, considerando también la existencia o no de fase de latencia y el número máximo de células alcanzado. Como resumen, las tasas de crecimiento (μ), calculadas en cada caso, pueden observarse en las Figuras 17 y 18.

Antes de comentar ciertos aspectos concretos de las cinéticas de crecimiento desarrolladas en cada ocasión, podemos hacer algunas consideraciones generales:

- En muchos casos, las concentraciones salinas intermedias (2,5 o 5 hasta 10 o 15 %) resultaron igualmente idóneas para el crecimiento de los microorganismos, por lo que las curvas obtenidas mostraron fases logarítmicas de pendientes muy parecidas; ello evidentemente dificultó la determinación de la concentración óptima, que, sin embargo, nos era necesario conocer para realizar otros estudios.

- Teniendo en cuenta lo anterior, no pudimos obtener conclusiones significativas acerca de la modificación de la concentración salina óptima para el crecimiento en función de la composición del medio de cultivo y de la temperatura de incubación. Los resultados de otros estudios de este tipo son similares y sus autores se inclinan por señalar tan sólo una concentración o un rango de concentraciones de sales en las que se produce un buen crecimiento, para cualquiera de las condiciones de cultivo utilizadas (Novitsky y Kushner, 1975, 1976; Chang y Leung, 1979; Vreeland y Martin, 1980).

- Las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron al cultivar a los microorganismos a la temperatura óptima (32 °C), en el medio de cultivo complejo (MH) y a las concentraciones salinas intermedias (2,5-10%). A 22 °C las tasas de crecimiento fueron siempre menores. Por su parte, el crecimiento de las cepas en el medio definido (MD) se produjo más lentamente que en el medio de cultivo complejo (MH), en las correspondientes condiciones de temperatura y concentración salina, generando así tasas de crecimiento (μ) significativamente

menores. Todo ello puede observarse en las Figuras 17 y 18. Estos resultados eran obviamente de esperar, conocida la influencia que ejercen la temperatura y la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de las poblaciones bacterianas.

- Por último, hacer notar que en general el número máximo de células alcanzado por los cultivos fue aproximadamente igual en las distintas condiciones ensayadas (alrededor de 10^8 células/ml para la cepa F8-11, y unas 10^9 células/ml para la F9-6). Algunos autores, sin embargo, han descrito mayores rendimientos celulares en función de la riqueza del medio de cultivo (Forsyth y Kushner, 1970; Chang y Leung, 1979), argumentando que podía deberse a que las concentraciones de NaCl en un medio complejo son ligeramente superiores y más cercanas al óptimo, que las correspondientes de un medio definido, debido a la pequeña cantidad de Na^+ que, como contaminante, contienen los medios ricos (Chang y Leung, 1979). Si bien es cierto que en ocasiones nuestras cepas no alcanzaron los números máximos de células citados, esto ocurrió a concentraciones de sales límites, es decir, aquellas por encima de las cuales el microorganismo no pudo crecer, no guardando relación este hecho con el tipo de medio de cultivo empleado (ver Figuras 6 a 16).

Las curvas de crecimiento desarrolladas por la cepa F8-11 se muestran en las Figuras 6-10; en estas Figuras (al igual que en las correspondientes a la cepa F9-6) sólo se han representado aquellas concentraciones a las que se produjo crecimiento. De ellas cabe destacar, en primer lugar, las pronunciadas pendientes de la fase logarítmica cuando el microorganismo se cultivó en el medio complejo, a 32°C y a las concentraciones salinas de 2,5-15%; nótese que sólo a 20 y 25% de sales aparecieron fases de latencia, aunque de corta duración (aproximadamente 4 horas) (Figura 6).

En el resto de las condiciones de cultivo, la cepa F8-11 originó fases de reajuste tanto mayores cuanto más se apartaban estas condiciones de las consideradas como óptimas para su crecimiento (Figuras 7 a 10). La prolongación de la fase de latencia en función de la elevación de la concentración salina también ha sido descrita por

4
otros autores (Robinson y Gibbons, 1952; Forsyth y Kushner, 1970; Matheson y col., 1976; Chang y Leung, 1979; Quesada y col., 1987).

Un comentario más sobre esta cepa: su incapacidad para crecer en un medio definido a 42 °C, en cualquiera de las concentraciones salinas ensayadas, nos induce a considerar la importancia de la composición del medio de cultivo como factor protector frente a elevadas temperaturas (Vreeland y Martin, 1980) y no sólo del papel jugado por el NaCl (Novitsky y Kushner, 1975).

Las Figuras 11 a 16 muestran las curvas de crecimiento desarrolladas por la cepa F9-6. Obsérvese que en el medio MH aparecen fases de latencia similares a las de la cepa F8-11 al adaptar el microorganismo su crecimiento a concentraciones salinas alejadas de la óptima (20 y 25%). No obstante, llama la atención las prolongadísimas fases de reajuste desarrolladas a 22 y 42 °C en el medio definido (de casi 20 horas) para todas las concentraciones salinas, si se las compara con el crecimiento ocurrido en el medio complejo MH.

Finalmente, esta bacteria, a diferencia de la cepa F8-11, toleró mejor las temperaturas elevadas, siendo capaz de desarrollarse a 42 °C, tanto en el medio MH (donde no mostró fases de latencia a las concentraciones salinas óptimas), como en el medio definido, en el que, recordemos, la cepa F8-11 fue incapaz de crecer.

Respuesta a la sal: requerimientos iónicos

Para conocer si los microorganismos halófilos moderados que nos ocupan requieren específicamente NaCl, se realizaron una serie de experimentos, similares a los descritos previamente para *Deleya halophila* (Quesada y col., 1987), en los que el NaCl era sustituido por otras sales; estos estudios se llevaron a cabo cultivando las cepas en el medio definido y a la temperatura óptima de incubación (32 °C); la concentración de cada sal ensayada fue del 5%, ya que ésta fue la concentración salina determinada como óptima para el crecimiento de los microorganismos en el medio MD y a 32 °C, según hemos indicado anteriormente. El requerimiento por el ión Na⁺ fue

investigado sustituyéndolo por cloruros de otros cationes mono o divalentes (K^+ , Li^+ , NH_4^+ o Mg^{++}), y para conocer el requerimiento por el anión Cl^- se usaron varias sales de sodio con distintos aniones (Br^- , NO_3^- , SO_4^- y $S_2O_3^-$); además se utilizó sacarosa como soluto no ionizable.

En esta ocasión comentaremos primero los resultados obtenidos para la cepa F9-6. Este microorganismo presenta un requerimiento único y exclusivo por el ión Na^+ , no siendo éste reemplazable por otros cationes; el Cl^- , sin embargo, pudo ser sustituido por SO_4^- o Br^- , si bien en presencia de este último anión la bacteria se desarrolló más lentamente, alcanzando el cultivo un número máximo de células/ml inferior al obtenido cuando se utilizaron $NaCl$ o Na_2SO_4 .

En los hábitats naturales de elevada salinidad en que se desarrollan los microorganismos halófilos, la sal mayoritaria es el $NaCl$; conocido el absoluto requerimiento por Na^+ de estas bacterias, y habiéndose estudiado el papel que este catión desempeña en las distintas funciones celulares, parece que el requerimiento por el Cl^- que lo acompaña no es específico, y que otros aniones podrían ejercer también su función. En los pocos halófilos moderados en que se ha estudiado la sustitución del Cl^- por otros aniones se han obtenido resultados diversos: en *Vibrio costicola* se puede sustituir por Br^- , SO_4^- , molibdato y fosfatos (Flanery y col., 1952), en "*Micrococcus varians* subsp. *halophilus*" por Br^- , I^- , NO_3^- y SO_4^- (Kamekura y Onishi, 1982), en *Deleya halophila* por Br^- , SO_4^- y $S_2O_3^-$ (Quesada y col., 1987) y en *Halomonas elongata* sólo por Br^- y NO_3^- (Vreeland y Martin, 1980). A la vista de estos resultados y de los obtenidos por nosotros parece que en los microorganismos halófilos moderados el requerimiento por el catión Na^+ es específico y constante, mientras que el requerimiento por el anión depende de cada especie bacteriana.

No obstante, el hecho de que con determinados aniones (Br^- para nuestra cepa F9-6; Br^- , SO_4^- o $S_2O_3^-$ para *Deleya halophila*, Quesada y col., 1987)- se produzca una disminución en el crecimiento, podría deberse al efecto tóxico propio del anión, como señalaban Flanery y colaboradores (1952) para el F^- , aniones que, por otra

parte, no se encuentran en concentraciones tan elevadas en los medios ambientes naturales.

En cuanto a la sustitución parcial del NaCl por otra sal, según la metodología descrita en el apartado de Material y Métodos, no se observó que ejerciera influencia sobre el crecimiento del microorganismo, si se lo compara con el obtenido solamente con NaCl o con las sales marinas totales al 5%: por una parte, la disminución de la cantidad de NaCl presente (de 5% a 3,8%) no tuvo ninguna consecuencia, justificación de lo cual es el hecho de que la bacteria sea capaz de crecer de forma óptima entre 2,5-7,5% de sales totales; y, por otra, destacar que la presencia de otros cationes como K^+ o Mg^{++} , que como ya hemos indicado no son requeridos por la bacteria, no produjo estímulo sobre su crecimiento, a diferencia de como se ha descrito en otros halófilos moderados (Kamekura y Onishi, 1976; Drews, 1981).

Finalmente, se determinó la concentración mínima de NaCl que necesita la cepa F9-6 para el crecimiento, conocida ya la exclusividad de su requerimiento por el Na^+ , resultando ser esta concentración del 1,5%.

Aunque en alguna de las primeras clasificaciones propuestas se consideran microorganismos halófilos aquellos que necesitan más del 3% de NaCl y se establecen las categorías de moderados y extremos en función de las concentraciones límites que permiten el crecimiento (Gibbons, 1970), parece adecuarse mejor a los conocimientos que poseemos actualmente acerca de este tipo de bacterias el criterio de clasificación de Kushner, basado en los rangos de concentraciones salinas entre los que se produce el crecimiento óptimo (Kushner, 1985; Kushner y Kamekura, 1988), como quedaba reflejado en el apartado de Introducción. Según esto, y a la vista de nuestros resultados y de los obtenidos para las diferentes especies halófilas moderadas estudiadas, la concentración mínima requerida para el crecimiento es específica para cada microorganismo en particular, situándose en términos generales entre 0,2-2% de NaCl; generalización necesaria en este caso porque no todos los estudios se han realizado en las mismas condiciones. Como datos de referencia, los correspondientes a las

distintas especies de halófilos moderados se han recogido en la Tabla I.5 de la Introducción.

Los estudios de este tipo realizados con la cepa F8-11 difirieron en algunos aspectos de los que acabamos de comentar para la cepa F9-6, debido a que presentó un comportamiento distinto a ésta.

En primer lugar, esta bacteria fue incapaz de crecer con cualquiera de las sales ensayadas por separado en el medio de cultivo definido, así como en presencia de sacarosa. Así pues, se realizaron a continuación combinaciones de NaCl con cada una de estas sales, siendo siempre la concentración de NaCl del 3,8%, y 1,2% la de la otra sal, de modo que la concentración salina total es del 5%, concentración determinada como óptima para el crecimiento del microorganismo en el medio definido a 32 °C. La cepa F8-11 creció sólo en aquel medio que contenía NaCl+MgCl₂; de ello se deduce que requiere para crecer la presencia simultánea de los cationes Na⁺ y Mg⁺⁺, siendo inefectivos tanto otros cationes (K⁺, Li⁺ o NH₄⁺) combinados con el Na⁺, como otros aniones (Br⁻, NO₃⁻, S₂O₃⁻ o SO₄⁻) en combinación con el NaCl.

Con objeto de determinar si la bacteria requería también de forma específica el ión Cl⁻, se sustituyó éste por SO₄⁻ o NO₃⁻, produciéndose crecimiento en presencia del primer anión, pero no del segundo. No se ensayaron otros aniones (Br⁻ o S₂O₃⁻) ya que las sales correspondientes de Mg⁺⁺ son muy poco solubles en agua. De nuevo podemos constatar la especificidad del requerimiento de nuestros microorganismos por el catión (en este caso, por los cationes), pero no por el anión, asumiendo para esta cepa los comentarios expuestos anteriormente para la cepa F8-11.

Una vez conocido el requerimiento cualitativo de iones para el crecimiento, y como final de este apartado, determinamos qué cantidad de Na⁺ y Mg⁺⁺ necesita como mínimo la cepa F8-11 para crecer: la concentración mínima de Mg⁺⁺ necesaria (suministrado como MgCl₂) fue del 0,4%, siendo el microorganismo incapaz de crecer por debajo de esta cantidad de MgCl₂, aunque la concentración salina total (completada con NaCl) era óptima para su crecimiento, según habíamos determinado previamente; por encima de 0,4% de MgCl₂ la bacteria desarrolló curvas de crecimiento de pendientes similares.

Desgraciadamente, no se han realizado muchos estudios específicos sobre requerimientos de cationes distintos de Na^+ , ya que, en trabajos llevados a cabo por otros autores los medios de cultivo siempre contuvieron ciertas cantidades de Mg^{++} y de K^+ (Kamekura y Onishi, 1976; Drews, 1981; Oren y col., 1987). Únicamente existen referencias de estímulo del crecimiento en presencia de iones Mg^{++} (además de una cantidad óptima de NaCl), hasta una determinada concentración de éstos, a partir de la cual no se observan beneficios superiores para el desarrollo, resultados que son acordes con los nuestros (Kamekura y Onishi, 1976; Drews, 1981), o incluso pueden llegar a ser perjudiciales, impidiendo el crecimiento bacteriano (Oren y col., 1987).

Para terminar, se determinó la cantidad mínima de NaCl requerida para crecer en presencia de 0,4% de MgCl_2 , y resultó ser de 1,5%.

Composición química celular

Los resultados obtenidos a partir de los análisis cuantitativos de proteínas, carbohidratos, PHB y ácidos nucleicos de las cepas F8-11 y F9-6, expresados en tanto por ciento del peso seco bacteriano, se recogen en las Tablas III.12 y III.13.

El contenido proteico aumentó en general con la edad del cultivo, y en ambas cepas se vio disminuido al aumentar la concentración de sales del medio externo, hecho observado también en *Deleya halophila* (Ferrer y col., 1987). El escaso contenido en carbohidratos (menor del 3%), si se lo compara con el de eubacterias no halófilas (10-30%), ya había sido descrito para otros microorganismos halófilos moderados (Smithies y col., 1956), si bien la cepa F9-6 presentó una mayor proporción (alrededor del 3%) que la cepa F8-11 (menos del 1%). Se observó, así mismo, que esta proporción disminuye ligeramente al aumentar la concentración salina y que no sufre cambios significativos a lo largo de las distintas fases del crecimiento de los microorganismos. En cuanto al contenido en ácido poli- β -hidroxibutírico, se observó una clara diferencia entre las dos

cepas estudiadas. La cepa F8-11 presentó un 15-20% de dicho polímero, cuando se cultivó al 2,5% de sales totales, proporción que se vio bruscamente disminuida hasta aproximadamente un 2% a las concentraciones salinas de 7,5 y 20%. Por su parte, la cepa F9-6, presentó un comportamiento contrario; a las concentraciones salinas de 2,5 y 7,5% el contenido en PHB fue relativamente bajo (alrededor del 2%), mientras que al ser cultivada a la concentración salina más alta, 20%, éste aumentó hasta valores próximos al 7%. Un resultado similar al de la cepa F9-6 fue descrito en *Micrococcus halodenitrificans* (Kates y col., 1961), mientras que en *Deleya halophila* no se observó variación en el contenido en este polímero en función de la salinidad externa (Ferrer y col., 1987). Ante la escasez de datos comparativos, no podemos extraer conclusiones acerca de la acumulación de PHB como sustancia de reserva. Finalmente, por lo que se refiere a los ácidos nucleicos, mientras que el ADN mostró valores constantes, el ARN disminuyó al aumentar la concentración de sales externa.

Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos celulares de las cepas F8-11 y F9-6 aparece en las Tablas III.15 y III.16.

En condiciones óptimas de cultivo (7,5% de sales y fase logarítmica de crecimiento), los ácidos grasos predominantes en ambas cepas fueron el palmítico (C16:0) y el oléico (C18:1); así mismo, existen importantes proporciones de palmitoleico (C16:1) y esteárico (C18:0). Estos resultados coinciden con los obtenidos para otros bacilos Gram negativos halófilos moderados (Ohno y col., 1975, 1976; Hanna y col., 1984; Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana, 1987b; Monteoliva-Sánchez y col., 1988). A este respecto, notar la información taxonómica que ofrecen este tipo de determinaciones, habida cuenta de las claras diferencias existentes con otros grupos bacterianos: sirvan de ejemplo los bacilos Gram negativos anaerobios halófilos moderados, en quienes uno de los ácidos grasos mayoritarios fue el ácido mirístico (C14:0) (Zeikus y col., 1983; Oren y col., 1984), no encontrado en los aerobios o anaerobios facultativos; o los

cocos Gram positivos halófilos moderados, cuya composición en ácidos grasos estuvo representada predominantemente por ácidos grasos ramificados (a-C15:0, a-C17:0, i-C16:0) (Onishi y Kamekura, 1972; Hao y col., 1984; Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana, 1987a).

Los ácidos grasos de cadena corta aparecieron en muy bajas proporciones y los ramificados no se detectaron. Sin embargo, si se observaron cantidades apreciables de ácidos grasos con anillo ciclopropano: 9,10-metilenhexanoico (cy-C17:0) y 11,12-metilenoctanoico (cy-C19:0). También en otros halófilos moderados se han detectado este tipo de ácidos grasos, representando en algún caso una elevada proporción, como en "*Pseudomonas halosaccharolytica*" (cy-C19:0, casi un 40% del total en fase estacionaria) (Ohno y col., 1976), aunque en general aparecen en cantidades menores y similares a las encontradas en nuestras cepas (Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana, 1987a; Monteoliva-Sánchez y col., 1988).

En cuanto a la influencia de la fase de crecimiento sobre la composición de ácidos grasos celulares, en términos generales no se observaron diferencias significativas, aunque realmente existe variación en la proporción de alguno de ellos; efectivamente puede destacarse un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados (C16:0+C18:0), junto a una disminución en los insaturados (C16:1+C18:1), cuando los microorganismos fueron cultivados a su concentración salina óptima.

En *Deleya halophila* se observó un comportamiento similar en todas de las concentraciones salinas ensayadas (Monteoliva-Sánchez y col., 1988). También en "*Pseudomonas halosaccharolytica*" se han descrito mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados en cultivos jóvenes, mientras que a medida que aumenta el tiempo de incubación se produce un marcado incremento en el derivado del ciclopropano cy-C19:0 (Ohno y col., 1976); un aumento ligero en los ácidos grasos de anillo ciclopropano se encontró en *Deleya halophila* en fase estacionaria de crecimiento, pero no fue tan acusado como en el caso anterior (Monteoliva-Sánchez y col., 1988). En nuestras cepas, si bien existen algunas modificaciones en estos ácidos grasos, no parecen guardar relación con la etapa del crecimiento bacteriano.

El estudio de la influencia de la concentración de sales sobre la composición de ácidos grasos celulares reveló que en ambas cepas se produce un incremento en la proporción de ácidos grasos con anillo ciclopropano (cy-C17:0+cy-C19:0), unida a una disminución en los insaturados (C16:1+C18:1), a medida que aumenta la concentración salina del medio externo, cuando los microorganismos se encuentran en fase logarítmica de desarrollo. Estos resultados son acordes con el comportamiento encontrado en "*Pseudomonas halosaccarolytica*" (Ohno y col., 1979) y *Deleya halophila* (Monteoliva-Sánchez y col., 1988). En estas bacterias, además, se observó un aumento paralelo en el porcentaje de saturación (C16:0+C18:0), al igual que en la cepa F8-11 de nuestro estudio.

El incremento en la proporción de ácidos grasos con anillo ciclopropano merece especial atención. El hecho de que la elevación de la concentración salina del medio externo produzca un aumento en este tipo de compuestos, unido a una disminución de los correspondientes monoinsaturados, sugiere que se produce una inducción o activación de la enzima ciclopropano sintetasa por las elevadas concentraciones de sal (Ohno y col., 1979).

Esta circunstancia es particularmente significativa, ya que los cambios en los citados ácidos grasos podrían actuar como mecanismo de regulación de la fase lipídica, impidiendo por ejemplo la formación de estructuras anormales en la bicapa lipídica, que alterarían la integridad de las membranas (Harwood y Russell, 1984; Russell y Kogut, 1985; Quinn, 1986).

Estudios de resonancia de spin electrónico realizados con "*Pseudomonas halosaccharolytica*" revelaron que a elevadas concentraciones salinas aumenta la viscosidad y rigidez de la superficie polar de la bicapa lipídica, lo que contribuye a mantener la estructura de la membrana en estas condiciones (Hyono y col., 1980). Además, la existencia de anillos ciclopropano a este nivel sugiere el importante papel jugado por los ácidos grasos de este tipo, no sólo para la permeabilidad del ión sodio a través de la membrana, sino también para permitir el crecimiento en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (Hyono y col., 1979).

En el planteamiento de este trabajo, señalábamos como objetivo del mismo el estudio de dos grupos de bacilos Gram negativos inmóviles halófilos moderados, previamente aislados por nuestro equipo, desde el punto de vista taxonómico y fisiológico.

Pues bien, basándonos en los resultados obtenidos, proponemos la definición de dos nuevas taxa, para albergar a los mismos y para los cuales se sugieren los nombres:

Gibbonsiella salina y
Elazariella eurihalina

y cuya descripción se realiza a continuación.

Descripción de *Gibbonsiella* gen. nov.

Gibbonsiella (gib. bon. siel'la. M.L. fem. n. *Gibbonsiella*, en honor a N. E. Gibbons, un bacteriólogo canadiense).

Bacilos cortos capsulados, de $0,8 \times 2-2,5 \mu\text{m}$ que se presentan normalmente aislados, en parejas o formando cadenas cortas. A concentraciones salinas elevadas origina filamentos largos y curvados de hasta $15-18 \mu\text{m}$ mientras que a las concentraciones más bajas sólo se observan bacilos muy cortos y formas redondeadas. Inmóviles. Gran negativos. Acumulan PHB como producto de reserva intracelular. No esporulados. Poseen un metabolismo respiratorio. Halófilos moderados capaces de crecer entre 3-10% de sales totales, con óptimo al 5%. Poseen un requerimiento específico por los cationes Na^+ y Mg^{++} suministrados como cloruro o sulfato. Quimioorganotrofos. No requieren factores de crecimiento y la mayoría son capaces de utilizar diversos compuestos como únicas fuentes de carbono y energía. Crecen bien a pH 6, 7 y 8 y a temperaturas comprendidas entre 15 y 37°C . Oxidasa y catalasa positivos. Reducen los nitratos y usualmente los nitritos. No poseen actividad fosfatasa, y muy raramente hidrolizan la gelatina.

Aislados a partir de hábitats salinos.

El contenido en G+C es de 58,2-65,4% (T_m).

La especie tipo es *Gibbonsiella salina*.

Descripción de *Gibbonsiella salina* sp. nov.

Gibbonsiella salina (sal. ina., L. adj. *salina*, salina, salada).

Las características de la especie corresponden con las citadas para el género. En medio MH sólido al 7,5% de sales, origina colonias circulares, convexas, poco elevadas, amarillentas, translúcidas y brillantes, de 1-2 mm de diámetro a las 24 horas de incubación. En medio líquido crece enturbiándolo uniformemente. Crece entre 3-20% de sales totales, a pH 6-10 y temperaturas $15-45^\circ\text{C}$. Necesita un mínimo de 1,5% de NaCl y 0,4% de MgCl_2 para crecer. Reduce el selenito. No oxida el gluconato ni crecen en Agar-Cetrimida.

Hidroliza la urea, el Tween 20 y la tirosina, pero no el almidón ni la caseína; no posee actividad DNAsa, lecitinasa, ni hemolítica. Indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer negativa; no produce piocianina ni fluoresceína y es incapaz de respirar sobre fumarato.

La mayoría de las cepas no produce ácidos de los azúcares.

Al menos el 90% de las cepas utilizan los siguientes compuestos como fuentes únicas de carbono y energía: D-fructosa, acetato, D-gluconato, DL-malato, L-aspartico. En cambio, no pueden utilizar esculina, benzoato, caprilato, o L-histidina.

El 90% o más de las cepas son sensibles al ácido nalidixico (30 µg), ampicilina (100µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cloramfenicol (30 µg), colistina (50 µg), eritromicina (15 µg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 µg), sulfamida (200 µg) y trimetoprim (1,25 µg)-sulfametoxazol (23,75 µg), y resistentes a la clindamicina (2 UI).

Aislada de hábitats hipersalinos (suelos salinos y salinas) y de agua de mar.

Su contenido en G+C es del 58,2-65,4 %.

La cepa tipo es la F8-11. Sus características coinciden con las de la especie, salvo en el crecimiento a pH 10 y en la utilización de serina como fuente de carbono y energía.

El contenido en G+C de su ADN es 64,2 %.

Fue aislada a partir de suelos salinos localizados en la provincia de Alicante.

Descripción de *Elazariella*, gen. nov.

Elazariella (e. la. za. riel'la. M.L. fem. n. *Elazariella*, en honor a Elazari-Volcani, un microbiólogo hebreo)

Bacilos capsulados, cortos de 0,8-1,0x2,5-3,0 μm . Normalmente se presentan aislados y a veces en parejas. Inmóviles. Gram negativos. Acumulan gránulos de poli- β -hidroxibutirato. No forman esporas. Poseen un metabolismo respiratorio, con el oxígeno como último aceptor de electrones. Son halófilos moderados, capaces de crecer entre 5 y 15 % de sales totales, crecen óptimamente al 7,5 %. Poseen un requerimiento único y específico por el catión Na^+ , que puede ser suministrado como cloruro, sulfato o bromuro. Quimioorganotrofos. La mayoría de las cepas son capaces de crecer en medio definido con una única fuente de carbono y energía. No necesitan factores de crecimiento. Todas las cepas crecen bien a pH 5-10, y a 15-45 °C. Oxidasa negativos y catalasa positivos. Reducen los nitratos pero no los nitritos. Normalmente poseen actividad fosfatasa, hidrolizan la gelatina y producen H_2S . Resistentes a un elevado número de antibióticos como ampicilina (100 μg), carbenicilina (100 μg), clindamicina (2 UI), estreptomycin (10 μg), gentamicina (10 UI), penicilina G (10 UI) o tetraciclina (30 μg).

Aislados de hábitats hipersalinos.

Su contenido en G+C es de 57,0-65,7 % (T_m).

La especie tipo es *Elazariella eurihalina*.

Descripción de *Elazariella eurihalina* sp. nov.

Elazariella eurihalina (euri. halina. Gr. adj. *euris*, ancho, amplio; Gr. adj. *alinos* salado. M.L. adj. *eurihalina*, que crece en amplios rangos de sal).

Las características de la especie son las que se han citado para el género. En medio de cultivo sólido MH al 7,5 % de sales origina colonias circulares, convexas, opacas, blanquecinas o crema, brillantes, de márgenes enteros, de 2-3 mm de diámetro a las 20 horas

de incubación y muy mucosas y de 4-5 mm a las 72 horas. En medio líquido crece uniformemente. La concentración de NaCl mínima necesaria para el crecimiento es de 1,5%.

Tolera el KCN, reduce el selenito e hidroliza la tirosina. No produce piocianina ni fluoresceína, ni forma indol; rojo de metilo y Voges-Proskauer negativa. No hidroliza el almidón, la caseína o la lecitovitelina, ni es hemolítica. Incapaz de respirar sobre nitrato, nitrito o fumarato.

La mayoría de las cepas son capaces de utilizar una gran diversidad de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía, incluyendo carbohidratos, ácidos orgánicos, alcoholes y aminoácidos. Los siguientes compuestos son utilizados por al menos el 90% de las cepas: lactosa, maltosa, D-salicina, citrato, D-gluconato, DL-lactato, DL-malonato, malonato, piruvato, β -hidroxibutirato, D-manitol, L-alanina, L-arginina, L-aspártico, L-glutámico, L-histidina, L-lisina y L-serina. Al menos el 90% de las cepas no pueden utilizar esculina, L-sorbose, benzoato, oxalato, D-tartrato ni L-triptófano.

El 90% de las cepas o más son sensibles al ácido nalidíxico (30 μ g), cloramfenicol (30 μ g), colistina (50 μ g), polimixina B (300 UI), rifampicina (5 μ g), sulfamida (200 μ g) y trimetoprim (1,25 μ g)-sulfametoxazol (23,75 μ g).

Un 80% de las cepas o más dan positivas las siguientes pruebas: hidrólisis de la urea y Tween 80 y crecimiento en Agar-MacConkey y Agar-Cetrimida; crecimiento al 3 y 20% de sales totales.

El 80% al menos de las cepas dan negativas las pruebas de oxidación del gluconato, fenilalanina desaminasa y producción de ácidos a partir de los azúcares.

Aislada de hábitats hipersalinos (suelos, salinas) y de mar. El porcentaje de bases Guanina más Citosina es 57,0-65,7%.

La cepa tipo es F9-6. Esta cepa posee todas las características citadas para la especie tipo, incluyendo aquellas para las que el 80 o el 90% de las cepas son positivas o negativas.

Se aisló en unos suelos salinos de la provincia de Alicante. Su contenido en G+C es 65,7%.

V. CONCLUSIONES

1. Los bacilos Gram negativos inmóviles halófilos moderados, objeto de este trabajo, no pueden incluirse en ninguna de las especies de microorganismos halófilos moderados descritas y aceptadas en la actualidad.

2. Se propone el nombre de *Gibbonsiella salina* gen. nov., sp. nov. para albergar a los bacilos Gram negativos aerobios inmóviles, oxidasa positivos, halófilos moderados.

3. Así mismo, se propone el nombre de *Elazariella eurihalina* gen. nov., sp. nov., para el grupo de bacilos Gram negativos aerobios inmóviles, oxidasa negativos, halófilos moderados.

VI. BIBLIOGRAFIA

- BAIRD-PARKER, A.C. 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30: 409.
- BAKER, F.J. 1967. Handbook of bacteriological technique. 2nd ed. Butterworths. London.
- BARRIT, M.M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naftol. *J. Path. Bacteriol.* 42: 441-445.
- BAUER, A.W., SERRIS, J.C., TURCK, M. y KIRBY, W.M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. *An. J. Clin. Path.* 45: 493-496.
- BAUMANN, P., FURNISS, A.L. y LEE, J.V. 1984. Genus *Vibrio* Pacini 1854. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. p.538. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.
- BAXTER, R.M. y GIBBONS, N.E. 1956. Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of *Micrococcus halodenitrificans* and *Pseudomonas salinaria*. *Can. J. Microbiol.* 2: 599-606.
- BENGIS-GARBER, C. y KUSHNER, D.J. 1981a. Purification and properties of 5'nucleotidase from the membrane of *Vibrio costicola*, a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 146: 24-32.
- BENGIS-GARBER, C. y KUSHNER, D.J. 1981b. Role of membrane-bound 5'nucleotidase in nucleotide uptake by the moderate halophilic *Vibrio costicola*. *J. Bacteriol.* 149: 808-815.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.P. y SMITH, N.R. (eds.). 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th ed. p.309. Williams y Wilkins Co. Baltimore.

- BROWN, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**: 803-846.
- CALLIES, E. y MANNHEIM, W. 1978. Classification of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex on the basis of respiratory quinones and fumarate respiration. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 14-19
- CALVO, C., GARCIA DE LA PAZ, A., BEJAR, V., QUESADA, E. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1988. Isolation and characterization of phage F9-11 from a lysogenic *Deleya halophila* strain. *Curr. Microbiol.* **17**: 49-53.
- CAZZULO, J.J. 1979. Las bacterias halófilas moderadas. *Revista Argentina de Microbiología.* **11**: 118-120.
- CLARKE, P.H. 1953. Hydrogen sulphide production by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **8**: 397-407.
- CLAUS, D., FAHMY, F., ROLF, H.J. y TOSUNOGLU, N. 1983. *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *System. Appl. Microbiol.* **4**: 496-506.
- COLLINS, M.D., ROSS, J.N.M., TINDALL, B.J. y GRANT, W.D. 1981. Distribution of isoprenoid quinones in halophilic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 559-565.
- COLWELL, R.R. 1970. Collecting the data. En *Methods for numerical taxonomy*. Lackart, W.R. y Liston, J. (eds.). A.S.M. Washington.
- COWAN, S.T. y STEEL, K.J. 1982. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. C.E.C.S.A. México.
- CHANG, K. y LEUNG, O.C. 1979. Nutrition and growth of the moderately halophilic bacteria *Micrococcus morrhuae* K-17 and *Micrococcus luteus* K-15. *Microbios.* **25**: 71-84.

- CHANG, K., LEUNG, O.C. y LEE, L.H. 1979. Influence of temperature on ionic sparing effect and cell-associated cations in the moderate halophilic, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. *Microbios*. 24: 81-91.
- CHRISTENSEN, W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 52: 461-466.
- CHRISTIAN, J.H.B. e INGRAM, M. 1959. The freezing point of bacterial cells in relation to halophilism. *J. Gen. Microbiol.* 20: 27-32.
- DEAL, P.H. 1974. Effect of freezing and thawing on a moderately halophilic bacterium as a function of Na⁺, K⁺, and Mg²⁺ concentration. *Criobiology*, 11: 13-22.
- DREWS, G. 1981. *Rhodospirillum salexigens* sp. nov., an obligatory halophilic phototrophic bacterium. *Arch. Microbiol.* 130: 325-327.
- DUSSAULT, H.P. 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 70: 484-485.
- ELAZARI-VOLCANI, B. 1940. Studies on the microflora of the Dead Sea. Doctoral Thesis. Hebrew University. Jerusalem.
- FALKENBERG, P., MATHESON, A.T. y ROLLIN, C.F. 1976. The properties of ribosomal proteins from a moderate halophile. *Biochim. Biophys. Acta.* 434: 474-482.
- FALKENBERG, P., YAGUCHI, M., ROLLIN, C.F., MATHESON, A.T. y WYDRO, R. 1979. The N-terminal sequence of the ribosomal 'A' protein from two moderately halophiles, *Vibrio costicola* and an unidentified moderate (NRCC 41227). *Biochim. Biophys. Acta*, 578: 207.
- FERRAGUT, C. y LECLERC, H. 1975. Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien. *Ann. Microbiol.*, 127: 223-235.

- FERRER, M.R., del MORAL, A., QUESADA, E. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987. Growth rate and some physiological features of *Deleya halophila* CCM 3662 at different salt concentrations. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138: 49-57.
- FLANNERY, W.L., DOESTCH, R.N. y HANSEN, P.A. 1952. Salt desideratum of *Vibrio costicolus* an obligate halophilic bacterium. I. Ionic replacement of sodium chloride requirement. J. Bacteriol. 64: 713-717.
- FORSYTH, M.P. y KUSHNER, D.J. 1970. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 16: 253-261.
- FRAZMANN, P.D., BURTON, H.R., McMEEKIN, T.A. 1987. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 27-34.
- FRAZIER, W.C. 1926. A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. J. Infect. Dis. 39: 302-309.
- GARCIA, M.T., NIETO, J.J., VENTOSA, A. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1987. The susceptibility of the moderate halophile *Vibrio costicola* to heavy metals. J. Appl. Bacteriol. 63: 63-66.
- GARCIA, M.T., VENTOSA, A., RUIZ-BERRAQUERO, F. y KOCUR, M. 1987. Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 251-256.
- GIBBONS, N.B. 1970. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. En Methods in Microbiology, Vol 3B. p. 169. J.R. Norris y D.W. Ribbons (eds.). Academic Press. London.
- GORDON, R.E. Y SMITH, M.M. 1955. Rapidly growing, acid fast bacteria. II. Species' description of *Mycobacterium fortuitum* CRUZ. J. Bacteriol., 2: 502-507.

- GREENBERG, E.P. y CANALE-PAROLA, E. 1976. *Spirochaeta halophila* sp. n., a facultative anaerobe from a high-salinity pond. Arch. Microbiol. 110: 185-194.
- HAMAIDE, F., KUSHNER, D.J. y SPROTT, G.D. 1983. Proton motive force and Na⁺/H⁺ antiport in a moderate halophile. J. Bacteriol. 156: 537-544.
- HAMAIDE, F., KUSHNER, D.J. y SPROTT, G.D. 1985. Proton circulation in *Vibrio costicola*. J. Bacteriol. 161: 681-686.
- HANNA, K., BENGIS-GARBER, C., KUSHNER, D.J., KOGUT, M. y KATES, M. 1984. The effect of salt concentration on the phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*. Can. J. Microbiol. 30: 669-675.
- HAO, M.V., KOCUR, M., y KOMAGATA, K. 1984. *Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell wall; and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. 30: 449-459.
- HARRISON, F.C. y KENNEDY, M.E. 1922. The red discolouration of cured codfish. Trans. R. Soc. Canada, Sect. V. 16: 101-152.
- HARWOOD, J.L. y RUSSELL, N.J. 1984. Lipids in plants and microbes. George Arun and Unwin. London.
- HASTINGS, E.G. 1903. Milchagar als medium zur demonstration der erzeugung proteolytischer enzyme. Zentbl. Bakt. Parasitenkde Abt. II, 10: 384-387.
- HERBERT, D., PHIPPS, P.J. y STRANGE, R.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. En Methods in Microbiology, Vol. 5B. pp.209-344. Morris, J.R. y Ribbons, D.W. (eds.). Academic Press. London.

-HIGA, A.I. y CAZZULO, J.J. 1978. The adenosine triphosphatase from the moderate halophile, *Vibrio costicola*. FEMS. Microbiol. Lett. 3: 157-160.

-HILL, L.R., SKERMAN, V.B.D. y SNEATH, P.H.A. 1984. Corrigenda to the approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 508.

-HIPKISS, A.R., ARMSTRONG, D.W. y KUSHNER, D.J. 1980. Protein turnover in a moderately halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 26: 196-203.

-HIRAMATSU, T., OHNO, Y., HARA, H., YANO, I. y MASUI, M. 1980. Effects of NaCl concentration on the envelope components in a moderately halophilic bacterium *Pseudomonas halosaccharolytica*. En Saline Environment. H. Morisita y M. Masui (eds.). Business Center for Academic Societies. Japan.

-HIWATASHI, T., HARA, M. y YAMADA, A. 1958. Biological properties of halophilic bacteria no. 101 and no. 203. J. Osaka City Med. Cent. 7: 550-552.

-HOCHSTEIN, L.I. y CRONIN, S.E. 1984. Electron transport in *Paracoccus halodenitrificans* and the role of ubiquinone. Can. J. Microbiol. 30: 572.

-HOCHSTEIN, L.I. y TOMLINSON, G.A. 1984. The growth of *Paracoccus halodenitrificans* in a defined medium. Can. J. Microbiol. 30: 873-840.

-HOLMES, B., HOLLINS, D.G., STEIGERWALT, M.G., PICKETT, M.J. y BRENNER, D.J. 1983. *Flavobacterium thalophilum*, a new species recovered from human clinical material. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 677-682.

-HOLMES, B., OWEN, R.J. y McMEEKIN, T.A. 1984. Genus *Flavobacterium* Bergey et al., 1923. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. p.353. Krieg, M.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

- HULL, D.L. 1970. Contemporary systematic philosophies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1: 19-54.
- HYONO, A., KURIYAMA, S., HARA, H., YANO, I. y MASUI, M. 1979. Thick viscous structures in the lipid membrane of a moderately halophilic Gram-negative bacterium. *FEBS Letters* 103: 192-195.
- HYONO, A., KURIYAMA, S., HARA, H., YANO, I. y MASUI, M. 1980. ESR studies on the membrane properties of a moderately halophilic bacterium. *J. Biochem.* 88: 1267-1274.
- IMHOFF, J.F. 1984. Reassignment of the genus *Ectothiorhodospira* Pelsh 1936 to a new family, *Ectothiorhodospiraceae* fam. nov., and emended description of the *Chromatiaceae* Bavendamm 1924. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 338-339.
- IMHOFF, J.F. 1986a. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 57-66
- IMHOFF, J.F. 1986b. Survival strategies of microorganisms in extreme saline environments. *Adv. Space. Res.* 6: 299-306.
- IMHOFF, J.F., KUSHNER, D.J., KUSHAVA, S.C. and KATES, M. 1982. Polar lipids in phototrophic bacteria of the *Rhodospirillaceae* and *Chromatiaceae* families. *J. Bacteriol.* 150: 1192-1201.
- IMHOFF, J.F., KUSHNER, D.J. y ANDERSON, P.J. 1983. Amino acid composition of proteins in halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1575-1679.
- IMHOFF, J.F. y RODRIGUEZ-VALERA, F. 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* 160: 478-479
- IMHOFF, J.F., TINDALL, B.J., GRANT, W.D. y TRUPER, H.G. 1981. *Ectothiorhodospira vacuolata* sp. nov., a new phototrophic bacterium from Soda Lake. *Arch. Microbiol.* 130: 238-242.

-IMHOFF, J.F. y TRUPER, H.G. 1977. *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. 114: 115-121.

-IMHOFF, J.F. y TRUPER, H.G. 1981. *Ectothiorhodospira abdelmalekii* sp. nov., a new halophile and alkaliphilic phototrophic bacterium. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C. 2: 228-234.

-JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. vaudoise Sci. Nat. 44: 223-270.

-JEFFRIES, C.D., HOLTMAN, D.J. y GUSE, D.G. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. J. Bacteriol. 70: 591-613.

-JOHNSON, J.L. 1973. Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 23: 308-315.

-JOHNSON, J.L. 1981. Genetic characterization. En Manual of methods for general bacteriology. pp. 450-472. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. y Phillips, G.B. (eds.). Am. Soc. Microbiol. Washington.

-JOHNSON, J.L. 1984. Nucleic acids in bacterial classification. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 8-11. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-JONES, D. y KRIEG, N.R. 1984. Serology and chemotaxonomy. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 15-18. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-JUNI, E. 1984. Genus *Acinetobacter* Briscoe y Prévot 1954. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 303-307. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

- KAMEKURA, M. 1986. Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol. Lett.* 39: 145-150.
- KAMEKURA, M. y KUSHNER, D.J. 1984. Effect of chloride and glutamate ions on in vitro protein synthesis by the moderate halophile *Vibrio costicola*. *J. Bacteriol.* 160: 385-390.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1974a. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J. Bacteriol.* 119: 339-344.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1974b. Protease formation by a moderately halophilic *Bacillus* strain. *Appl. Microbiol.* 27: 809-810.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1976. Effect of magnesium and some nutrients on the growth and nuclease formation of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. *Can. J. Microbiol.* 22: 1567-1576.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1978a. Flocculation and adsorption of enzymes during growth of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. *Can. J. Microbiol.* 24: 703-708.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1978b. Properties of the halophilic nuclease of a moderate halophile *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *J. Bacteriol.* 133: 59-65.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1979. A medium for commercial production of the halophilic *Micrococcus* nuclease. *Can. J. Microbiol.* 25: 1113-1116.
- KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1982. Cell-associated cations of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* grown in media of high concentrations of LiCl, NaCl, KCl, RbCl or CsCl. *Can. J. Microbiol.* 28: 155-161.

-KAMEKURA, M. y ONISHI, H. 1983. Inactivation of nuclease H of the moderate halophile *Micrococcus varians* var. *halophilus* during cultivation in the presence of salting-in-type salt. *Can. J. Microbiol.* 29: 46-51.

-KAMEKURA, M., ZHOU, P. y KUSHNER, D.J. 1986. Protein turnover in a moderately halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 26: 169.

-KAMEKURA, M., WALLACE, R., HIPKISS, A.R. y KUSHNER, D.J. 1985. Growth of *Vibrio costicola* and other moderate halophiles in a chemically defined medium. *Can. Microbiol.* 31: 870-872.

-KANDLER, O., KONIG, H., WIEGEL, J. y CLAUS, D. 1983. Occurrence of poli- γ -D-glutamic acid and poli- γ -L-glutamine in the genera *Xanthobacter*, *Flexithrix*, *Sporosarcina* and *Planococcus*. *System. Appl. Microbiol.* 4: 34-41.

-KATES, M. 1986. Influence of salt concentration on membrane lipids of halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 32: 95-101.

-KATES, M., SEHGAL, S.N. y GIBBONS, N.E. 1961. The lipid composition of *Micrococcus halodenitrificans* as influenced by salt concentration. *Can. J. Microbiol.* 7: 427-435.

-KEN-DROR, S., SHNAIDERMAN, R. y AVI-DOR, Y. 1984. Uncoupler-stimulated Na⁺ pump and its possible role in the halotolerant bacterium, *Bal. Arch. Biochem. Biophys.* 229: 640.

-KOCUR, M. 1984. Genus *Paracoccus* Davil 1969. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. p.399. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-KOGUT, M. y RUSSELL, N.J. 1984. The growth and phospholipid composition of a moderately halophilic bacterium during adaptation to changes in salinity. *Curr. Microbiol.* 10: 95-98.

- KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 178: 703.
- KRIEG, N.R. (ed). 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams y Wilkins Co. Baltimore.
- KROGER, A. y INNERHOFER, A. 1976. The function of menaquinone convaluty bound FAD and ion-sulfur protein in the electron transport from formate to fumarate of *Vibrio succino*. *Europ. J. Biochem.* 69: 487-495.
- KUSHNER, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En *Microbial life in extreme environments*. D.J. Kushner (ed.). Academic Press. London.
- KUSHNER, D.J. 1985. The *Halobacteriaceae*. En *The bacteria Vol. VIII: Archaeobacteria*. C.R. Woese y R.S. Wolfe (eds.) Academic Press. London.
- KUSHNER, D.J. 1986. Molecular adaptation of enzymes, metabolic systems and transport systems in halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 121-127.
- KUSHNER, D.J., HAMAIDE, F. y McLEOD, R.A. 1983. Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 153: 1163-1171.
- KUSHNER, D.J. y KAMEKURA, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. En *Halophilic bacteria*. Vol. 1. pp. 109-140. Rodriguez-Valera, F. (ed.). CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida.
- LANYI, J.K. 1979. Physicochemical aspects of salt-dependence in Halobacteria. En *Strategies of Microbial life in Extreme Environments*. M. Shilo (ed.). Dahlem Konferencem. Berlin.
- LAPAGE, S.P. y BASCOMB, S. 1968. Use of selenite reduction in bacterial clasification. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 568-580.

- LARPENT, J.P. y LARPENT-GOURGAND, M. 1957. Memento technique de microbiologie. Technique et Documentation. Paris.
- LARSEN, H. 1962. Halophilism. En The bacteria. Vol.4. The physiology of growth. I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier (eds). Academic Press. London.
- LARSEN, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective. FEMS Microbiol. Rev. 39: 3-7.
- LAW, J.H. y SLEPECKY, R.A. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82: 33-36.
- de LEY, J. y TIJTGAT, R. 1970. Evaluation of membrane filter methods for DNA-DNA hybridization. Antonie van Leeuwenhoek. 36: 461-474.
- LLOYD, D.J., MARRIOT, R.H. y ROBERTSON, M.E. 1929. "Red heat" in salted hides. J. Int. Soc. Leath. Tdes. Chem. 13: 538-569.
- LOWE, G.H. 1962. The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -D-galactosidase. J. Med. Lab. Technol. 19: 21.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.S. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218.
- MARMUR, J. y DOTY, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5: 109-118.
- MARQUEZ, M.C., VENTOSA, A. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1987. A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. J. Gen. Microbiol. 133: 45-56.

- MARTIN, E.L., DURYEA-RICE, T., VREELAND, R.H., HILSABECK L. y DAVIS, C. 1983. Effects of NaCl on the uptake of α (14 C) aminoisobutyric acid by the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. Can. J. Microbiol. 29: 1424-1429.
- MASUI, M. y WADA, S. 1973. Intracellular concentrations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ of a moderately halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 19: 1181-1186.
- MATHESON, A.T., SPROLT, G.D., McDONALD, I.J. y TESSIER, H. 1976. Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics internal salt concentration, and morphology. Can. J. Microbiol. 22: 780-786.
- MATHRANI, I.M. y BOONE, D.R., MAH, R.A., FOX, G.E. Y LAU, P.P. 1988. *Methanohalophilus zhilinae* sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 139-142.
- MAYR, E. 1963. Animal species and evolution. Harvard University Press. Mass. Cambridge.
- de MEDICIS, E. y ROSSIGNOL, B. 1977. Pyruvate kinase from the moderate halophile, *Vibrio costicola*. Can. J. Biochem. 55: 825-833.
- de MEDICIS, E. y ROSSIGNOL, B. 1979. The halophilic properties of pyruvate kinase from *Vibrio costicola*, a moderate halophile. Experientia 35: 1546-1547.
- de MEDICIS, E., PAQUETTE, J., GAUTHIER, J.J., SHAPCOTT, D. 1986. Magnesium and manganese content of halophilic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 52: 567.
- MILLES, A.A., y MISRA, S.A. 1938. The stimulation of the bactericidal power of blood. J. Hygiene, 38: 732-749.

- MOLLER, V. 1954. Diagnostic use of the braun KCN test within the *Enterobacteriaceae*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **34**: 115.
- MONTEOLIVA-SANCHEZ, M., FERRER, M.R., RAMOS-CORMENZANA, A., QUESADA, E. y MONTEOLIVA, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 199-203.
- MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987a. Cellular fatty acid composition in moderately halophilic Gram-negative rods. *J. Appl. Bacteriol.* **62**: 361-366.
- MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987b. Cellular fatty acid composition of *Planococcus halophilus* NRCC 14033 as affected by growth temperature and salt concentrations. *Curr. Microbiol.* **15**: 133-136.
- del MORAL, A., QUESADA, E. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987. Distribution and types of bacteria isolated from an inland saltern. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**: 59-66.
- MOORE, W.E.C., CATO, E.P. y MOORE, L.V.H. 1985. Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1985). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 382-407.
- MURRAY, R.G.E. 1984. The higher taxa, or, a place for everthing...? En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. pp. 31-34. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.
- NISSEN, H. y DUNDAS, I.D. 1984. *Rhodospirillum salinarium* sp. nov., a halophilic photosynthetic bacterium isolated from a Portuguese saltern. *Arch. Microbiol.* **138**: 251-256.

- NOVITSKY, T.J. y KUSHNER, D.J. 1975. Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic "*Micrococcus*" sp. *Can. J. Microbiol.* 21: 107-110.
- NOVITSKY, T.J. y KUSHNER, D.J. 1976. *Planococcus halophilus* sp. nov., a facultatively halophilic coccus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 53-57.
- OHNO, Y., YANO, I., HIRAMATSU, T. y MASUI, M. 1976. Lipids and fatty acids of a moderately halophilic bacterium no. 101. *Biochim. Biophys. Acta* 424: 337-350.
- OHNO, Y., YANO, I. y MASUI, M. 1975. Separation and identification of molecular species of phospholipids from a Gram-negative moderately halophilic bacterium. *FEBS letters.* 50: 50-53.
- OHNO, Y., YANO, I. y MASUI, M. 1979. Effect of NaCl concentration and temperature on the phospholipid and fatty acid compositions of a moderately halophilic bacterium *Pseudomonas halosaccharolytica*. *J. Biochem.* 85: 413-421.
- ONISHI, H. 1972a. Halophilic amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*. *J. Bacteriol.* 109: 570-574.
- ONISHI, H. 1972b. Salt response of amylase produced in media of different NaCl or KCl concentrations by a moderately halophilic *Micrococcus*. *Can. J. Microbiol.* 18: 1617-1620.
- ONISHI, H. e HIDAKA, O. 1978. Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. *Can. J. Microbiol.* 24: 1017- 1023.
- ONISHI, H. y KAMEKURA, M. 1972. *Micrococcus halobius* sp. n. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22: 233-236.

-ONISHI, H., KOBAYASHI, T. y KAMEKURA, M. 1984. Purification and some properties of an extracellular halophilic 5'-nucleotidase from a moderate halophile *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. FEMS Microbiol. Lett. 24: 303-306.

-ONISHI, H., MORI, T., TAKEUCHI, S., TANI, K., KOBAYASHI, T. y KAMEKURA, M. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp.: production purification and characterization. Appl. Environ. Microbiol. 45: 24-30.

-ONISHI, H. y SONODA, K. 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile *Micrococcus halobius*. Appl. Environ. Microbiol. 38: 616-620.

-OREN, A. 1983. *Clostridium lortetti* sp. nov., a halophilic obligatory anaerobic bacterium producing endospores with attached gas vacuoles. Arch. Microbiol. 136: 42-48.

-OREN, A. 1986. Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Halocanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. Can J. Microbiol. 32: 4-9.

-OREN, A. 1987. A procedure for the selective enrichment of *Halobacteroides halobius* and related bacteria from anaerobic hypersaline sediments. FEMS Microbiol. Lett. 42: 201-204.

-OREN, A., PASTER, B.J. y WOESE, C.R. 1984. *Halocanaerobiaceae*: A new family of moderately halophilic, obligatory anaerobic bacteria. System. Appl. Microbiol. 5: 71-80.

-OREN, A. POHLA, H., STACKEBRANDT, E. 1987. Transfer of *Clostridium lortetii* to a new genus *Sporohalobacter* gen. nov. as *Sporohalobacter lortetii* comb. nov. and description of *Sporohalobacter marismortui* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 9: 239-246.

- OREN, A., WEISBURG, W.G., JESSEL, M. y WOESE, C.R. 1984. *Halobacteroides halobius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic anaerobic bacterium from the bottom sediments of the Dead Sea. *System. Appl. Microbiol.* 5: 58-70.
- OWEN, R.J. y HILL, L.R. 1979. The estimation of base composition, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. En *Identification methods for microbiologists*. 2nd ed. pp. 217-296. Skinner, F.A. y Lovelock, D.W. (eds.) Academic Press. London.
- OWEN, R.J. y PITCHER, D. 1985. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En *Chemical methods in bacterial systematics*. pp.67-93. Goodfellow, M. y Minnikin, E. (eds.). Academic Press. London.
- PATEREK, J.R. y SMITH, P.H. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 122-123.
- PELEG, E., TIETZ, A. y FRIEDBERG, I. 1980. Effects of salts and ionophores on proline transport in a moderately halophilic halotolerant bacterium. *Biochim. Biophys. Acta.* 596: 118.
- QUESADA, E., BEJAR, V., VALDERRAMA, M.J. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987. Growth characteristics and salt requirement of *Deleya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbiol.* 16: 21-25.
- QUESADA, E., BEJAR, V., VALDERRAMA, M.J., VENTOSA, A. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1985. Isolation and characterization of moderately halophilic non-motile rods from different saline habitats. *Microbiología.* 1: 89-96.
- QUESADA, E., VALDERRAMA, M.J., BEJAR, V., VENTOSA, A., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1987. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative nonmotile eubacteria. *System. Appl. Microbiol.* 9: 132-137

- QUESADA, E., VENTOSA, A., RODRIGUEZ-VALERA, F., MEJIAS, L. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1983. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram negative bacteria from hypersaline soils. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2649-2657.
- QUESADA, E., VENTOSA, A., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 287-292.
- QUINN, P.J. 1986. Models of haloadaptation in bacterial membranes. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 87-94.
- RAFABLI-SKOL, D. 1968. Studies on halotolerance in a moderately halophilic bacterium. Effect of growth conditions on salt resistance of the respiratory system. *Biochem. J.* **109**: 679-685.
- ROBINSON, J. y GIBBONS, N.E. 1952. The effect of salts on the growth of *Micrococcus halodenitrificans* n. sp. *Can. J. Bot.* **30**: 147-154.
- ROBINSON, J., GIBBONS, N.E. y THATCHER, F.S. 1952. A mechanism of halophilism in *Micrococcus halodenitrificans*. *J. Bacteriol.* **64**: 69-77.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. 1978. Estudio de las relaciones entre distintos tipos de halofilismo bacteriano en medios hipersalinos. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En *Halophilic bacteria*. Vol. 1. pp. 3-30. Rodriguez-Valera, F. (ed.). CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida.
- ROHLF, F.J. 1985. Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State University of New York, Stony Brook, N.Y. U.S.A.

-RUSSELL, N.J. y KOGUT, M. 1985. Haloadaptation: salt sensing and cell-envelope changes. *Microbiol. Sci.* 2: 345-350.

-RUSSELL, N.J., KOGUT, M. y KATES, M. 1985. Phospholipid biosynthesis in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola* during adaptation to changing salt concentrations. *J. Gen. Microbiol.* 131: 781-789.

-SADLER, M., McANINCH, M., ALICO, R. y HOCHSTEIN, L.I. 1980. The intracellular Na⁺ and K⁺ composition of the moderately halophilic bacterium, *Paracoccus halodenitrificans*. *Can. J. Microbiol.* 26: 496-502.

-SALVARREY, M.S. y CAZZULO, J.J. 1980. Some properties of the NADP-specific malic enzyme from the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Can. J. Microbiol.* 26: 50-57.

-SHAW, C. y CLARKE, P.H. 1955. Biochemical classification of *Proteus-Providencia* cultures. *J. Gen. Microbiol.* 13: 155-161.

-SHINDLER, D.B. 1976. Physiology and enzymatic aspects of moderately halophilic microorganisms. Tesis Doctoral. Universidad de Ottawa. Ottawa.

SHINDLER, D.B., WYDRO, R.M. y KUSHNER, D.J. 1977. Cell-bound cations of the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. *J. Bacteriol.* 130: 698-703.

-SHNAIDERMAN, R. y AVI-DOR, Y. 1982. The uptake and extrusion of salts by the halotolerant bacterium, *Bal. Arch. Biochem. Biophys.* 213: 177-185.

-SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 15-22.

-SILVESTRI, L., TURRI, M., HILL, L.R. y GILARDI, E. 1962. A quantitative approach to the systematic of actinomycetes based on overall similarity. *Sym. Soc. Gen. Microbiol.* 12: 333-360.

-SKERMAN, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed. Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V. y SNEATH, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.

-SMITH, F.B. 1938. An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic vibrios. (n. spp.). *Proc. Roy. Soc. Queensland.* 49: 29-52.

-SMITHIES, W.R., IBBONS, N.E. y BAYLEY, S.T. 1956. The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 1: 605-613.

-SNEATH, P.H.A. 1984. Numerical taxonomy. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. pp. 5-7. Krieg, N.F. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-SNEATH, P.H.A. y JOHNSON, R. 1972. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological test. *J. Gen. Microbiol.* 72: 377-392.

-SNEATH, P.H.A. y SOKAL, R.R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, W.H. y Co. San Francisco.

-SOKAL, R.R. y MICHENER, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438.

-STACKEBRANDT, E. y WOESE, C.R. 1981. The evolution of prokaryotes. En Molecular and cellular aspects of microbial evolution. pp. 1-31. Carlile, Collins y Moseley (eds.) Cambridge University Press. Cambridge.

-STALEY, J.T. y KRIEG, N.R. 1984. Classification of Prokaryotic organisms: an overview. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 1-3. Krieg, N.R. y Holt, J.G. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.

-STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A. e INGRAHAM, J.L. 1984. Microbiología. Ed. Reverté Barcelona.

-SUBOV, N.N. 1931. Oceanographical tables. Commissariat of agriculture of USSR. Hydrometeorological committee of URSS. Oceanographical Institute of URSS. Moscow.

-TURK, V. y MARKS, N. 1977. Intracellular protein catabolism, II. Plenum Press, New York.

-UNEMOTO, T., HAYASHI, M. y HAYASHI, M. 1977. Na⁺-dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V. costicola*. J. Biochem. 82: 1389-1395.

-VAN QUA, D., SIMIDU, U. y TAGA, N. 1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas*. Can. J. Microbiol. 27: 505-510.

-VENTOSA, A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterotrophic eubacteria. Vol. 1. pp71-84. Rodriguez-Valera, F. (ed.). CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida.

-VENTOSA, A., QUESADA, E., RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., y RAMOS-CORMENZANA, A. 1982. Numerical Taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. J. Gen. Microbiol. 128: 1959-1968.

- VENTOSA, A., RAMOS-CORMENZANA, A. y KOCUR, M. 1983. Moderately halophilic Gram-positive cocci from hypersaline environments. Syst. Appl. Microbiol. 4: 564-570.
- VREELAND, R.H. 1987. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. CRC Critical Rev. Microbiol. 14: 311-356.
- VREELAND, R.H., ANDERSON, R. y MURRAY, R.G.E. 1984. Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. J. Bacteriol. 160: 879-883.
- VREELAND, R.H., LITCHFIELD, C.D., MARTIN, E.L. y ELLIOT, E. 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 485-495.
- VREELAND, R.H. y MARTIN, E.L. 1980. Growth characteristics, effect of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. Can. J. Microbiol. 26: 746-752.
- VREELAND, R.H., MIERAU, B.D., LITCHFIELD, C.D. y MARTIN, E.L. 1983. Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. Can. J. Microbiol. 29: 407-414.
- WEEKS, O.B. 1974. Genus *Flavobacterium*. En Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. pp. 357. Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (eds.). Williams y Wilkins Co. Baltimore.
- WOESE, C.R., MAGRUM, L.J. y FOX, G.E. 1978. Archaeobacteria. J. Mol. Evol. 11: 245-252.
- WYDRO, R., KOGUT, M. y KUSHNER, D.J. 1975. Salt response of ribosomes of a moderately halophilic bacterium. FEBS Lett. 60: 210-215.
- WYDRO, R.M., MADIRA, W., HIRAMATSU, T., KOGUT, M. y KUSHNER, D.J. 1977. Salt-sensitive in vitro protein synthesis by a moderately halophilic bacterium. Nature. 269: 824-825.

-YABUUCHI, E., KANEKO, T., YANO, I., MOSS, C.W. Y MIYUSHI, N. 1983. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov. and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose non-fermenting Gram-negative rods in CDC groups I1K-2 and I1b. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 580-598.

-YU, I.K. y KAWAMURA, F. 1987. *Halcmethanococcus doii* gen. nov., sp. nov.: an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 303-310.

-ZEIKUS, J.G., HEGGE, P.W., THOMPSON, T.E., PHELPS, T.J. y LANGWORTHY, T.A. 1983. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. Curr. Microbiol. 9: 225-234.

-ZHILINA, T.N. 1983. New obligate halophilic methane-producing bacterium. Microbiology. 52: 290-297.