

ESTUDIO TAXONOMICO DE 28 CEPAS DEL GENERO *HALOCOCCUS* PROCEDENTES DE UNA SALINA SOLAR

F. RAMON y F. RODRIGUEZ-VALERA
Colegio Universitario de Alicante

F. RUIZ-BERRAQUERO y A. RAMOS-CORMENZANA
Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Granada.

El presente trabajo, pretende contribuir a un mejor conocimiento de la taxonomía del Género *Halococcus*. Se han estudiado 28 cepas de cocos halófilos extremos rojos, aislados de un medio seminatural las salinas solares "Bras del Port" sitas en la localidad de Santa Pola de la provincia de Alicante. Estas salinas funcionan mediante un sistema de balsas-comunicadas en las que se va incrementando paulatinamente la concentración de la sal hasta llegar a los estanques llamados cristalizadores en los que se recoge el producto. Se ha de hacer notar que las oscilaciones anuales no sobrepasan nunca el 10% de la concentración media.

MATERIAL Y METODOS

1.—*Microorganismos*

25 de las 28 cepas de cocos halófilos extremos rojos seleccionadas (Tabla I) se obtuvieron de diferentes zonas de los estanques de alta concentración de sales anteriores a los cristalizadores.

Estos estanques alcanzan una concentración aproximada del 28% de peso seco de sales.

TABLA I.—ORIGEN Y CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

CEPA	MEDIO AISL.	HABITAT	DIAS INCUB.	N.º COLON
A	Eimhj.	Costra Salina	7	100
B	"	" "	7	60
C	"	Capa Superf. suelo	7	1
D	"	" " "	12	Confluente
E	"	" " "	10	Confluente
F	"	Fango Salino	6	8
G	Agar Sal	Costra Salina	10	40
H	"	" "	10	90
I	Eimhj.	Capa Superf. suelo	10	100
J	"	Costra Salina	6	1000
K	"	Capa Superf. agua	6	2
L	"	Capa Superf. suelo	6	200
LL	"	" " "	6	100
M	"	" " "	6	30
N	"	Capa Superf. agua	7	80
Ñ	Agar Sal	Costra Salina	10	100
O	Eimhj.	Fango Salino	10	40
P	"	" " "	10	40
Q	"	Capa Superf. suelo	7	250
R	"	" " "	10	30
S	"	Capa Superf. agua	6	4
T	"	" " "	6	50
U	"	" " "	6	5
V	Agar Sal	" " "	10	1
W	"	Costra Salina	7	40
X	Eimhj.	Medio enriquecimiento	7	20
Y	"	" "	7	30
Z	"	" "	7	10

Tres cepas: (X, Y, Z), se han obtenido a partir de una muestra de agua de salina tras una etapa de enriquecimiento previo.

Todas las cepas aisladas son de halófilos estrictos; no crecen en medios con menos de un 5% de ClNa.

2.—Medios de aislamiento

Como medios de aislamiento se han utilizado: el medio Eimhjellen (1), y un medio desarrollado en nuestro laboratorio con la siguiente composición:

Peptona: 15,6 g; extracto de levadura: 2,8 g; D (+) glucosa: 1,0 g; sal de salina 250 g; agar: 12 g, H₂O dest. c. s. p. 1000 ml.; pH 7.

3.—Medio de enriquecimiento

Para la obtención de las cepas X, Y, Z, se inoculó una muestra de agua de la salina en un recipiente de 500 ml conteniendo un 25%

incubó a 38° con agitación y aireación durante una semana. De la población en crecimiento se obtuvieron las cepas, X, Y, Z.

4.—Medios y reactivos empleados en las pruebas de identificación.

Para el estudio de la *morfología* se ha empleado el método de tinción de Dussault (2) específico de halófilos extremos.

Para determinar la *actividad proteolítica y lipolítica* se ha utilizado el medio modificado de Norberg-Hofsten (3). A los seis días de incubación (37°C) se le añadió a las placas una solución de Cl_2Hg contrastando la aparición de un halo transparente en las bacterias proteolíticas con el opaco producido por las bacterias lipolíticas.

La *hidrólisis de la caseína* se ha determinado por el método descrito por C. González et al (4) interpretándose como positivas las cepas que presentan a su alrededor un halo traslúcido de una longitud no menor de 0,2 mm.

La *producción de SH_2* se ha detectado por el método de Clarke, P. H. (5) mediante tiras de papel impregnadas con acetato de plomo.

La presencia de *indol* por el procedimiento descrito por Gilliers R. R. (6) que utiliza igualmente tiras de papel:

La *reducción de nitratos a nitritos* se determinó inoculando los organismos en placas con medio Eimhjellen (1) adicionado de un 0,1% de NO_3K . Se empleó el reactivo de Griess Ilosvay, según el método descrito por Cowan S. T. y Steel K. J. (7).

La *utilización de glucosa* fue detectada en un medio base de acidificación de glúcidos (8) al que se añadió un 20% de ClNa .

La *Catalasa* es determinada por adición de H_2O_2 al 3% sobre placas con cultivos de 3 a 4 días de crecimiento.

La producción de *oxidasa* ha sido determinada según el método de Gaby, W. L. y Hadley, C (9) y la *hidrólisis del almidón* siguiendo el método descrito por Gibbons, N. E. (10).

RESULTADOS

Características morfológicas

Todas las cepas estudiadas resultaron ser cocos Gram negativos. Los cocos aparecen dispuestos en tetradas aisladas o en grupos irregulares de tetradas algunos aislados.

Todas las cepas estudiadas son inmóviles y no esporuladas.

Características culturales

El tamaño medio de las colonias oscila entre 0,2 y 1,5 mm. Todas presentan un pigmento rosado o rojo característico.

La morfología de las colonias responde a dos tipos; 4 de las cepas (C, N, V, Z,) forman colonias irregulares, rugosas y mates; las 24 restantes forman colonias circulares, convexas, lisas y brillantes.

Características fisiológicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas se relacionan en la tabla II.

DISCUSION

La gelatina fue hidrolizada por 15 de las 28 cepas ensayadas (54%), resultado que coincide con los consignados por Schoop, G. (11) y Kocur, M. et al (12). Estos autores señalan que un 55% de las cepas son positivas para esta prueba.

La caseína es hidrolizada solo por 4 de las 28 cepas. Según Kocur, M. et al (12) y Gibbons, N. E. (10) la caseína es hidrolizada en raras ocasiones por los cocos halófilos siendo las formas bacilares las que presentan más frecuentemente esta propiedad.

La presencia de lipasa en el 89% de las estirpes ensayadas parece indicar que en los cocos halófilos, se encuentra habitualmente la enzima palmitato-esterasa. A este respecto, González, C. et al (13) describen la actividad lipolítica de una cepa de *Micrococcus morrhuae* que al tercer día de incubación hidroliza los cuatro tweens ensayados (tween 20, 40, 60, 80). Por otra parte Kocur, M. et al (12) al definir las características generales de

TABLA II.—RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

CEPA	Gelatina	Tween-40	Nitratos	Almidón	Caseína	SH ₂	Indol
A	—	—	++	—	—	—	—
B	—	+++	++	—	—	—	++
C	—	—	++	—	—	—	++
D	—	++	—	+++	—	++	++
E	++	+++	+++	+++	—	—	—
F	+	+	+	+	—	—	—
G	+++	+++	++	+	—	—	—
H	++	+++	+	+++	+++	—	—
I	—	+++	++	+++	—	—	—
J	++	+	++	++	—	—	—
K	—	+	++	+++	—	++	++
L	+++	+++	++	+	+++	—	—
LL	++	++	++	+++	++	—	—
M	++	+++	++	—	++	++	++
N	++	+++	++	—	—	—	—
Ñ	—	+++	++	—	—	+++	—
O	—	+	++	—	—	—	—
P	—	+	++	+++	—	—	—
Q	—	+	++	—	—	++	—
R	++	+++	++	—	—	—	++
S	—	++	+	++	—	—	++
T	++	+	+++	+++	—	—	++
U	++	+	++	++	—	—	++
V	—	++	++	—	—	—	—
W	—	+	++	—	—	—	—
X	++	—	+++	—	—	—	++
Y	++	+++	+	—	—	—	—
Z	+++	+++	+++	+++	—	—	—
Positivo	15	25	27	15	4	5	10
Negativo	13	3	1	13	24	23	18

la cepa tipo *Halococcus morrhuae* apunta que el tween 80 puede ser hidrolizado en un 50% de los casos.

Estos resultados dejan una puerta abierta para posteriores trabajos que puedan establecer diferencias de valor taxonómico entre diferentes especies.

La formación de SH_2 es producida solo por 5 de las 28 cepas coincidiendo en todo con los resultados de Kocur, M. et al (12) y Gibbons, N. E. (10).

En 10 de las 28 cepas ensayadas se observó producción de indol (38%). Los resultados de Kocur, M. et al (12), apuntan que el 60% de las cepas son indológenas y Gibbons, N. E. (10), describe dos cepas de *Micrococcus morrhuae* y *Sarcina morrhuae* que son fuertemente indológenas a una concentración de sal del 15-20% pero que no forman indol a concentraciones del 25-30% de sal. Esta puede ser la razón del bajo porcentaje de nuestras cepas que dan positiva la reacción de indol.

La reducción de nitratos a nitritos se verifica para 27 cepas (100%) resultado coincidente con el de Kocur, M. et al (12).

El almidón, uno de los pocos carbohidratos utilizados por las bacterias halofílicas fue hidrolizado por 15 de las cepas. Esta prueba ha sido utilizada normalmente como diagnóstico para la clasificación de bacterias halófilas; no obstante existen entre los autores algunas discrepancias. Así, Sreenivasan, A. et al (14) aluden a que 5 de 10 cepas ensayadas hidrolizan el almidón; Gibbons, N. E. (10), señala como positivas 5 de 13 y en el trabajo de Kocur, M. et al (12) de las 22 cepas ninguna fue capaz de hidrolizar el almidón. Para Gibbons, N. E. (10), la diferencia de estos resultados podría deberse a una pérdida de la capacidad de hidrolizar el almidón como consecuencia del mantenimiento de las cepas en el laboratorio durante un largo periodo de tiempo.

El resto de las pruebas bioquímicas realizadas: catalása (100% positivas), oxidasa (100% positivas) y glucosa (negativa en todas las cepas) coinciden con los resultados de Gibbons, N. E. (10), González, C. (13) y Kocur, M. et al (12).

CONCLUSIONES

De acuerdo con el Manual de Bergey en su 8.^a edición (15) "los cocos halófilos pigmentados rojos, no han sido extensamente estudiados como los correspondientes de forma bacilar. Sin embargo, se sabe lo suficiente para colocarlos en un género separado como ha sido propuesto por Venkataraman y Sreenivasam (1956), Larsen (1962) y Kocur y Hodgkiss (1973)". Este género es el género *Halococcus* Schoop 1935, 817.

A fin de encuadrar nuestras estirpes de *Halococcus*, dentro de la especie tipo de *Halococcus morrhuae* (Farlow) acudimos a las características principales que de dicha especie describen Kocur, M. et al (12) y que son las siguientes: morfología en tetradas y grandes grupos irregulares de tetradas; inmóviles; no forman endosporas; Gram negativos; halófilos extremos, crecen bien en medios con 15-20% de ClNa; quimiorganotrofos de metabolismo respiratorio; no se producen ácidos y gas a partir de glucosa y otros carbohidratos; Actividad catalásica presente (100%); oxidasa positiva (100%); producen indol (60%); SH₂ negativo; reducción de nitratos (100%) y no de nitritos; el almidón puede ser hidrolizado (50%); puede utilizarse el tween 80 (50%); hidrólisis de la gelatina (40%); la caseína es hidrolizada rara vez; producción de un pigmento rosa-rojo; aerobios; buen crecimiento entre 30 y 37°%.

A la vista de la Tabla II que presenta las pruebas fisiológicas realizadas en nuestras cepas se puede concluir que responden a las características generales de la especie *Halococcus morrhuae* (Farlow).

La considerable uniformidad de los porcentajes de respuesta a las pruebas fisiológicas, parece indicar una notable homogeneidad en el comportamiento fisiológico del género *Halococcus* puesto que el grupo de cepas estudiadas por Kocur, M. et al (12) corresponden a cepas de colección y las nuestras son todas ellas cepas salvajes, lo que parece indicar la existencia de muy pocos tipos fisiológicos dentro del género *Halococcus* lo que explicaría que grupos diferentes presentan porcentajes tan similares.

Finalmente se señala que la taxonomía del género *Halococcus* presenta actualmente ciertas lagunas que pueden dar pie a trabajos más completos en esta dirección.

RESUMEN

Se estudiaron 28 cepas de cocos halófilos pigmentados aislados de una salina solar de la provincia de Alicante.

Se describe el comportamiento fisiológico de estos organismos así como el origen y características de cultivo de cada una de las cepas.

Los resultados son considerablemente coincidentes con los de un trabajo previo de Kocur sobre 25 cepas de colección.

Esta coincidencia parece indicar una marcada homogeneidad dentro del género.

RESUME

On étudient 28 souches de coques halophiles pigmentées isolées d'une saline de la province d'Alicante.

On décrit le comportement physiologique de ces organismes, ainsi que l'origine et caractéristiques de culture de chacune des souches.

Les résultats sont considérablement coincidentes avec un travail préalable de Kocur sur 25 souches de collection.

Cette coincidence de résultats semble indiquer une marquée homogénéité dedans du genre.

SUMMARY

Twenty eight strains of pigmented halophilic cocci, isolated from solar-salt ponds located near Alicante, were studied.

The physiological behaviour, the origin, and the culture characteristics are described.

The results are considerably coincident with a previous paper from Kocur on 25 collection strains. This coincidence seems to indicate a marked homogeneity inside the genus.

BIBLIOGRAFIA

- (1) EIMHJELLEN, K. Anreicherungskultur und Mutantenaslese p. 126. Fischer Verlag. Stuttgart (1965).
- (2) DUSSAULT, H. P. J. Bacteriol. 70: 484-485 (1955).
- (3) NORBERG, P. and HOFSTEN, B. V. J. Gen. Microbiol. 55: 251-256 (1969).
- (4) GONZALEZ, C. and GUTIERREZ, C. Can. J. Microbiol. 16, 1165-1166 (1970).
- (5) CLARKE, P. H. J. Gen. Microbiol. 8, 397 (1953).
- (6) GILLIES, R. R. J. Clin. Path. 9.368 (1956).
- (7) COWAN, S. T. and STEEL, K. J. Identification of Medical-Bacteria. Cambridge University Press (1970).
- (8) Subcommittee on taxonomy of staphylococci and micrococci Recommendation. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxn. 15: 109-110 (1965).
- (9) GABY, W. L. and HADLEY, C. J. Bacteriol. 74: 356-358 (1957).
- (10) GIBBONS, N. E. Can. J. Microbiol. 3: 249-255 (1957).

- (11) SCHOOP, G. Deut. Tieraeztl. Wochenschr. 43: 817-820 (1935).
- (12) KOCUR, M. and HODGKISS, W. Int. J. of Sist. Microb. 23: 280-282 (1973).
- (13) GONZALEZ, C. y GUTIERREZ, C. Microb. Española 23: 223-231 (1970).
- (14) SREENIVASAN, A. and VENKATARAMAN, R. J. Sci. Ind. Res. 15-c: 210-211.
- (15) BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Eight Ed. Williams and Wilkins. Company. Baltimore, 1974.