

# Aislamiento de microorganismos halófilos procedentes de ríos, pantanos y aguas residuales de la provincia de Granada

Isolation of halophilic microorganisms from rivers, reservoirs and waste waters of Granada

INCERTI, C. y RAMOS-CORMENZANA, A.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071. Granada. España.

## RESUMEN

El presente trabajo se planteó con el objetivo de aislar microorganismos halófilos a partir de hábitats atípicamente salinos, tales como ríos, pantanos y aguas residuales de la provincia de Granada, realizando además una determinación del número de aerobios totales mediante recuento de heterótrofos. Tras seleccionar 130 cepas al azar, el espectro salino nos confirmó que el número de bacterias halotolerantes era notable, el 37.7% y se aislaron principalmente de ríos. Los microorganismos halófilos hallados se clasificaron generalmente como moderados constituyendo el 60.8% de las cepas estudiadas, por lo que se confirma su presencia en dichos ecosistemas. Es importante señalar que el 69.2% del total son bacilos y cocos Gram positivos, el 11.5% presentaron un Gram variable y el 19.3% resultaron ser bacilos Gram negativos, distribución totalmente distinta a la descrita por numerosos autores al realizar estudios ecológicos de la microbiota halófila en medios hipersalinos.

**Palabras claves:** Microorganismos halófilos. Aislamiento. Ríos. Pantanos. Aguas residuales.

## ABSTRACT

The purpose of this study was the isolation of halophilic micro-organisms from atypically saline environments located in different areas of Granada, Spain; we tried also to know the number of viable cells per mL in these tested water samples. A total of 130 halophilic microorganisms was examined: 37.7% strains selected were halotolerant rods and they were isolated from rivers; 60.8% of isolated strains was classified as halophilic microorganisms and, in contrast of the majority ecologic studies concerning moderately halophilic bacteria, strains studied are grouped as Gram-positive.

**Key words:** Halophilic microorganisms. Isolation. Rivers, fresh-waters. Waste-waters.

Recibido: 23-11-1995.

Aceptado: 11-5-1996.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:2; 253-260]

## INTRODUCCIÓN

Debido a los problemas de salinización de grandes zonas terrestres la información acerca de los microorganismos halófilos es de gran valor y no es menos en cuanto a su potencial biotecnológico, como señalan diversos estudios sobre biotransformación de residuos y producción de compuestos útiles por parte de arqueas y eubacterias halófilas (1).

Siguiendo el criterio de Kushner y Kamekura (2), los microorganismos pueden ser clasificados teniendo en cuenta la concentración de sal en la que crecen de forma óptima, de esta forma se pueden agrupar en:

— Microorganismos no halófilos, si crecen mejor en medios que contienen menos del 1% de sal, incluyendo aquí a los halotolerantes que, sin embargo, son capaces de crecer a altas concentraciones salinas.

— Microorganismos halófilos débiles, aquellos capaces de crecer mejor en medios con 1-3% de sal, constituidos por bacterias marinas principalmente, por lo cual suelen denominarse como bacterias marinas.

— Microorganismos halófilos moderados, aquellos cuyo crecimiento óptimo oscila entre 3-15% de sal. Desde el punto de vista taxonómico, constituyen un grupo amplísimo de microorganismos pertenecientes a géneros muy diversos.

— Microorganismos halófilos extremos débiles, su óptimo de crecimiento oscila entre 9-23% de concentración salina.

— Microorganismos halófilos extremos, aquellos que tienen el crecimiento óptimo entre 15-32% de sal. Estos microorganismos están incluidos en el grupo de las arqueas. Hace pocos años se describen como reino independiente, separado de los eucariotas y procariotas (3). Filogenéticamente constituyen un nuevo "reino primario", con una posición única en la historia de la vida (4, 5) y taxonómicamente se les sitúa en el dominio Arquea (6).

Los microorganismos halófilos se encuentran ampliamente distribuidos en ecosistemas tales como salinas solares, lagos hipersalinos, suelos salinos y agua de mar, donde las condiciones de salinidad son las apropiadas para su crecimiento y desarrollo (7, 8, 9, 10). Por tanto, los hábitats naturales de los microorganismos halófilos son los medios hipersalinos que dadas sus características de pH, concentración salina, elevadas temperaturas e intensa iluminación, suelen definirse como medios extremófilos. Debido a tales condiciones de vida, la microbiota halófila se ha de adaptar a condiciones desfavorables para la mayoría de los microorganismos, y en este sentido la sal ejerce el principal efecto inhibitorio.

El presente trabajo se planteó con el objetivo de aislar microorganismos halófilos a partir de hábitats naturales atípicamente salinos, realizando además una estimación del número de aerobios totales mediante un recuento de heterótrofos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Toma de muestras*

Se eligieron diversos hábitats ecológicos de la provincia de Granada, tales como ríos (ver: tabla 1. Estaciones de muestreo), embalses (de los Bermejales, Quéntar y Cubillas) y aguas residuales (afluentes de "Los Gemelos", Monachil y Beiro). Las tomas de muestras se realizaron desde marzo de 1988 a enero de 1990, en ocho campañas.

Se recogieron 500 mL de agua de los distintos puntos, y por triplicado. El muestreo se realizó utilizando frascos de vidrio neutro, con tapón de rosca, limpios y esterilizados al autoclave. Según la naturaleza del agua y el punto elegido, varió la técnica de obtención de las muestras. En ríos y pantanos se consideraron diversos factores, como profundidad y distancia a la orilla. Por ejemplo, las muestras de aguas de ríos fueron cogidas del centro de la corriente y a unos 20 cm de profundidad; las de embalses se realizaron desde una embarcación neumática. Inmediatamente, y en menos de 24 horas, las muestras se remitieron al laboratorio donde se procesaron.

Tabla 1.—Estaciones de muestreo

13 puntos en el Río Genil	1 punto en el Río Tocón
1 punto en el Río Maitena	1 punto en el Arroyo Vilano
3 puntos en el Río Aguas Blancas	2 puntos en el Río Monachil
1 punto en el Río Darro	2 puntos en el Río Dílar
1 punto en el Río Beiro	1 punto en el Arroyo Salado
1 punto en el Río Juncaril	1 punto en el Río Noniles
1 punto en el Río Bermejo	7 puntos en el Río Cacin
5 puntos en el Río Cubillas	4 puntos en el Río Alhama
5 puntos en el Río Colomera	1 punto en el Río Salar
1 punto en el Embalse de Cubillas	1 punto en el Río Manzanil
3 puntos en el Río Velillos	1 punto en el Río Genazal
1 punto en el Arroyo Escoznar	3 puntos en Riofrio

### *Recuento bacteriano*

Se efectuaron diluciones seriadas en solución salina que se inocularon, por triplicado, en TSA (Tripticasa Soja Agar, de *Difco*), según la técnica de diseminación superficial. La incubación se realizó en estufa a 22°C durante tres días, y a 37°C 48 horas, expresándose los resultados, a ambas temperaturas, en número de unidades formadoras de colonias.

### Medios de cultivo

Para el aislamiento y conservación de las cepas, así como para el espectro salino, se utilizó el medio HM (7) que contiene en % (p/v):

Proteosa-peptona n.3 (Difco) .....	0.5 g
Extracto de levadura (Difco) .....	1.0 g
Glucosa (Panreac) .....	0.1 g
Bacto-ágar (Difco) .....	2.0 g

Este medio fue suplementado con una solución de sales al 30% (p/v) para conseguir las distintas concentraciones salinas requeridas. Para el aislamiento y conservación de cepas se utilizaron concentraciones del 0.5, 3, 10 y 25% (p/v) de sales; para el espectro salino las siguientes: 0, 0.5, 0.9, 3, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25 y 30% (p/v).

La composición de la solución de sales es la siguiente (11):

NaCl .....	234.0 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	41.6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	59.8 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	1.1 g
KCl .....	6.0 g
NaBr .....	0.7 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0.2 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (0.5%) .....	IX
Agua destilada .....	c. s. p. 1000 mL

El cloruro férrico se utilizó en solución acuosa al 0.5% (p/v) y el pH del medio se ajustó a 7.0 con una solución 1 N de NaOH.

### Aislamiento

Las muestras de agua, se sembraron en placas de HM, sin hacer ninguna dilución. En el aislamiento se emplearon cuatro concentraciones de sales, al 0.5, 3, 10 y al 25% (p/v). Las placas de menor salinidad se inocularon siempre con 0.1 mL de agua tomada con pipeta estéril y haciendo una extensión sobre el medio con una espátula de vidrio previamente flameada. Para las placas al 25% (p/v) de sales se utilizó el método de filtro de membrana, incubándose con filtros Millipore de 0,22 m de porosidad (40 mm de diámetro), previamente esterilizados y sometidos a la filtración de 200 mL de agua.

Las placas ya inoculadas, se incubaron en estufa a 32°C, durante un intervalo de tiempo entre 7 y 14 días. Para evitar la excesiva desecación de las mismas, se introdujeron en bolsas de plástico cerradas a la llama.

### *Microorganismos control*

Como control de calidad del presente trabajo, se ensayaron las siguientes cepas marinas, moderadas y extremas de colección:

Eubacterias marinas: *Deleya pacifica* NCMB 1977, *D. cupida* NCMB 1978, *D. venusta* NCMB 1979, *D. aquamarina* NCMB 1980, *Pseudomonas náutica* DSM 50418.

Eubacterias halófilas moderadas: *Chromohalobacter marismortui* ATCC 17056, *Deleya halophila* CCM 3662, *Halomonas halmophila* CCM 2833, *Micrococcus halobius* CCM 2571, *Pseudomonas halosaccharolytica* CCM 2851, *Marinococcus halophilus* NRCC 14033, *Vibrio costicola* NCMB 701, *Volcaniella eurihalina* ATCC 49336, *Deleya salina* ATCC 49509.

Arqueas halófilas extremas: *Halobacterium halobium* CECT 396, *H. halobium* CCM 2090, *H. salinarium* CCM 2088, *H. salinarium* CCM 2084, *H. saccharovororum* ATCC 29252, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, *Halococcus morrhuae* NCMB 757, *Halococcus morrhuae* CCM 537, GCA<sub>19</sub>, 3.s rp4,, Y<sub>8</sub>, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960, Ma 2.25, Y<sub>19</sub>, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715, *Haloarcula californiae* ATCC 33799, Aa 1.50, Y<sub>33</sub>.

Todas se conservan y mantienen en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

Las siglas de las colecciones de procedencia corresponden a:

- ATCC: American Type Culture Collection.
- CCM: Czechoslovak Collection of Microorganisms.
- DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.
- NCMB: National Collection of Marine Bacteria.
- NRCC: National Research Council Collection.

### *Espectro salino*

En principio, la elección de las cepas se realizó al azar a partir de las placas del medio HM, siendo preciso conocer los requerimientos salinos de las cepas aisladas, y por tanto su posible clasificación halófila.

Para ello se prepararon baterías del medio base HM, tanto líquido prescindiendo del agente solidificante, como sólido, y a las distintas concentraciones indicadas. Para el medio líquido se utilizaron tubos de hemólisis, y para el sólido placas Petri. Las placas y los tubos sembrados con las cepas elegidas, se dejaron hasta 10 días en una estufa a 32°C. La lectura de los espectros se realizó cada 24 horas y durante estos días, observando el crecimiento de la gota sobre el medio sólido.

Como control de calidad se realizó el espectro salino a las cepas marinas, moderadas y extremas de colección.

### *Medios para el espectro salino:*

1.—Se preparó el medio descrito anteriormente como HM al 0.5, 3, 10 y 25% (p/v) de sales en tubos de hemolisis. Las colonias elegidas al azar se inocularon en dichos tubos respetando la concentración de procedencia, y se dejaron incubar 24 horas en agitación a 32°C.

2.—Se prepararon placas de HM a las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 0.9, 3, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25 y 30% (p/v) de sales. A partir de los tubos inoculados que tras 24 horas de incubación presentaron turbidez, es decir crecimiento, se sembraron las distintas placas y a las diferentes concentraciones descritas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de microorganismos contenidos en las aguas es extremadamente variable, por ello, la simple estimación cuantitativa constituye un primer procedimiento de apreciación de su calidad. Los valores obtenidos por la técnica de recuento de bacterias en medio TSA nos proporcionó una cierta evaluación de la población microbiana. El promedio de las cifras totales de aerobios fue, para aguas de ríos:

TSA a 22°C:  $3,04 \cdot 10^5$  (ufc/mL)

TSA a 37°C:  $2,92 \cdot 10^5$  (ufc/mL)

Hay que destacar que el número de colonias, así como su tamaño aumenta con el tiempo de incubación, no siendo la diferencia de temperatura tan determinante: los valores medios de los recuentos a 22°C son ligeramente superiores a los de 37°C.

En este estudio se aislaron y seleccionaron 130 cepas: 12 de aguas residuales, 28 de embalses y 90 de ríos.

El espectro salino nos confirmó que el número de microorganismos halotolerantes era considerable, el 37.7% de las cepas seleccionadas eran capaces de crecer al 0.5%, presentando según la concentración de procedencia rangos salinos de crecimiento mayores para las procedentes de placas al 10%, y menores para las del 0.5% y 3%. El 91.8% de las cepas halotolerantes aisladas a partir de HM al 10% presentaron rangos salinos extraordinariamente amplios, hasta un 20, 25 o 30% (p/v) de concentración salina. La mayoría de estas cepas se aislaron prácticamente de ríos, estando presentes en menor cuantía en aguas residuales y menos aún en embalses.

Tal vez, y debido a una mayor competencia de estos microorganismos entre sí, el número de bacterias halófilas moderadas se hace notable, sobre todo las colonias elegidas de las placas al 10%. Por ello, los microorganismos halófilos

aislados a partir de las muestras de aguas, se clasificaron principalmente como bacterias halófilas moderadas ya que al realizar el espectro salino su crecimiento óptimo osciló entre 5 y 15% de sales. El 60.8% de todas las cepas estudiadas resultaron ser halófilas moderadas. En concreto, se consiguieron aislar 79 bacterias halófilas moderadas a partir de muestras de aguas tomadas de los distintos hábitats ecológicos descritos, por lo que se confirma la presencia de estos microorganismos en ecosistemas naturales distintos a los tradicionalmente estudiados (salinas solares, suelos hipersalinos, lagos salados, etc), donde las condiciones de salinidad son las apropiadas para su crecimiento y desarrollo. Taxonómicamente constituyen un grupo muy heterogéneo y pretendemos en un futuro cercano proceder a su clasificación.

En este trabajo sólo conseguimos aislar dos cepas con márgenes de crecimiento salino relativos a halófilos extremos, lo que supone un 1.5% del total, por lo que pensamos que o bien existen pocas, o bien tendríamos que desarrollar una metodología diferente y más selectiva que nos proporcionara nuevos datos. Hay que destacar que ambas cepas se aislaron del pantano de Quéntar cuyos datos de conductividad oscilan entre 650 S/cm, en las aguas abajo de dicho embalse (12), y 458 S/cm, en las aguas de la cola del mismo embalse (13).

Es importante señalar además que el 69.2% de todas las cepas estudiadas son bacilos y cocos Gram positivos, el 11.5% presentaron un Gram variable y el 19.3% resultaron ser bacilos Gram negativos. Estos resultados nos muestran que las distintas condiciones ambientales de cada hábitat afectan drásticamente al tipo de microorganismo halófilo presente ya que la distribución encontrada es totalmente distinta a la descrita por numerosos autores al realizar estudios ecológicos de la microbiota halófila en medios hipersalinos.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) VENTOSA, A. NIETO, J. J.: "Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms". *W J Microbiol Biotechnol* (1995), **11**: 85-94.
- (2) KUSHNER, H., KAMEKURA, M.: *Halophilic bacteria* (1988) vol. 1: 109-140. Rodríguez-Valera (ed.), CRC Press Inc, Boca Raton.
- (3) POOL, R.: "Pushing the envelope of life". *Research News, Science* (1990), **24**: 158-160.
- (4) WOESE, C. R.: "Archibacterias". *Investigación y Ciencia* (1981), **8**: 48-61.
- (5) WOESE, C. R.: "Bacterial Evolution". *Microbiol Rev* (1987), **51**: 221-271.
- (6) WOESE, C. R., KANDLER, O., WHEELIS, M. L.: "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya". *Proceeding of the National Academic of Sciences USA* (1990), **87**: 4576-4579.
- (7) VENTOSA, A., QUESADA, E., RODRÍGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., RAMOS-CORMENZANA, A.: "Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods". *J Gen Microbiol* (1982), **128**: 1959-1968.
- (8) QUESADA, E., VENTOSA, A., RODRÍGUEZ-VALERA, F., MEJÍAS, L., RAMOS-CORMENZANA, A.: "Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram negative bacteria from hypersaline soils". *J Gen Microbiol* (1983), **129**: 2649-2657.