

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PERTENECIENTES A LA FAMILIA *Halobacteriaceae* EN LAS MINAS DE SAL DE SAL DEL MUNICIPIO DE ZIPAQUIRÁ, CUNDINAMARCA, COLOMBIA

Identification of microorganism belonging to the *Halobacteriaceae* family in the salt mine of Zipaquirá, Cundinamarca, Colombia

V. BECERRA, D. M. CORTÉS, J. C. GIRALDO.

Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas Naturales.
Universidad Incca de Colombia, Bogotá, Colombia.

Presentado en octubre 8 de 2003, aceptado en noviembre 21 de 2003.

RESUMEN

Este estudio busca identificar microorganismos halófilos en muestras de las minas de sal de Zipaquirá. Se identificaron dos géneros representativos *Halobacterium* sp. y *Halococcus* sp. y se determinó la concentración óptima de crecimiento de NaCl: 2.5 M.

Palabras clave: *Halococcus* sp., *Halobacterium*, mina de sal

ABSTRACT

This study was designed to identified halophytus microorganisms on samples from the salt mines of Zipaquirá, Colombia. We identified two representative genre *Halobacterium* sp. and *Halococcus* sp. which grew at an optimal NaCl concentration of 2.5 M.

Key words: *Halococcus* sp., *Halobacterium*, salt mine

INTRODUCCIÓN

A los microorganismos que toleran o que requieren de altas concentraciones de sal se les denomina halotolerantes o halófilos. Condición que los caracteriza, ya que otros géneros de microorganismos son afectados por la presión osmótica que se genera en soluciones salinas hipertónicas, debido a que las concentraciones elevadas producen una desnaturalización e inactividad biológica de las proteínas. El género *Halobacterium* sp, es una arqueobacteria aerobia heterótrofa que se caracteriza por ser halófila estricta, consigue su equilibrio osmótico con concentraciones elevadas de cloruro potásico, carece de mureína y por tal razón su pared celular requiere de iones de sodio para lograr la estabilidad y un equilibrio isosmótico con su entorno. Debido al poco conocimiento y a la dificultad en su mantenimiento en condiciones de laboratorio, se planteó su aislamiento y caracterización como objetivo del presente estudio. Además el trabajo con micro organismos de ambientes extremos resulta de gran importancia por su aplicaciones en bioprospección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el muestreo mediante raspado de sal de de las paredes ubicadas en los estanques de purificación, en 5 tubos que contenían caldo nutritivo con una concentración de NaCl al 4.3%, incubádo a una temperatura de 37° C por 5 horas. Las muestras iniciales que presentaron mayor turbidez fueron seleccionadas se realizaron las tinción de gram correspondiente, para observación de las características morfológicas, en donde se evidenciaron bacilos de diferentes tamaños y algunos cocos, se reconocieron diferentes tipos de microorganismos, que fueron sembrados y aislados en medio de cultivo Agar Sal Manitol 0.75%, 0.13 M. Las colonias formadas fueron sometidas a la prueba de luminiscencia, utilizando una fuente de rayos UV (Model-uvs-54). En cada medio utilizado, se realizó una incubación mínima de 24 horas a 37° C, dicho tiempo fue aumentado según el crecimiento presentado. Se comenzó a modificar la concentración de sal, teniendo en cuenta que el crecimiento inicial, no fue muy rápido y el número de colonias reducido. Se utilizó Agar Nutritivo con NaCl 1.78 M (10%). Para estandarizar la concentración óptima de NaCl a utilizar, se realizó una prueba por triplicado de las siguientes concentraciones de NaCl 1.5 M (8.8%), 2.5 M (14%) y 3.5 M (19.6%). Se obtuvo un mejor crecimiento con la concentración de 2.5 M, por lo cual esta concentración fue manejada en los siguientes medios, ya que el objetivo era descartar pruebas falsas, por inhibición de crecimiento. Empleando Agar Nutritivo con Almidón al 1%, se realizó la prueba de hidrólisis. Se utilizaron medios para la determinación del comportamiento metabólico bacteriano tales como: E.M.B, prueba de hidrólisis de gelatina, Agar Baird Parker suplementado con extracto de yema de huevo (Oxoid), para evidenciar lipólisis. Agar Simmons Citrato para determinar la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, el Agar T.S.I para determinar la fermentación de carbohidratos. Medio SIM, para determinar producción de H₂S, motilidad y producción de indol. Caldo rojo de Metilo, Voges-Proskauer y caldo nitrato. Para la prueba de producción de alcoholes con anillo bencénico, se utilizó el caldo lactosado. Igualmente se realizaron pruebas de: peroxidasa, oxidasa, ureasa, caseinasa (utilizando el Agar Peptona de Caseína). Para complementar la tipificación, se realizaron test de sensibilidad de antibióticos, de acuerdo a lo reportado en la literatura, utilizando Agar Plait Count (Bergey *et al.*, 1984; Bergey *et al.*, 1984b; Brock y Madison, 2000; Black, 1995; Ahag y Bartle, 2001; McFaddin, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados positivos obtenidos para el género *Halobacterium sp*, corresponden a las pruebas bioquímicas de peroxidasa, catalasa, oxidasa, hidrólisis de gelatina, producción de indol, rojo de metilo, caldo lactosado, reducción de nitrato a nitrito, las negativas son pertenecientes a manitol, hidrólisis de almidón, producción de H₂S, utilización de citrato, Voges-Proskauer, caseinasa, triptona y fermentación de carbohidratos. Este género presenta resistencia a: eritromicina 15 Mg, ampicilina 10 mg, tetraciclina 30 mg, amikacina 30 mg, amoxicilina 25 mg, gentamicina 10 mg, bacitracina 10 unidades (B), además de sensibilidad a cefalexina (Cl) 30 mg, cepradina (CE) 30 mg

y ácido nalidixico (NA) 30 mg. Para el género identificado como *Halococcus* sp. presenta pruebas positivas para peroxidasa, catalasa, oxidasa, ureasa, rojo de metilo, caldo lactosado, reducción de nitrato a nitrito, de igual manera los resultados negativos para manitol, hidrólisis de almidón y gelatina, producción de H₂S, producción de indol, utilización de citrato, Voges Proskauer, caseinasa, triptona y fermentación de carbohidratos. La prueba de sensibilidad a antibióticos para clindamicina 2 mg (DA), bacitracina 10 unidades (B), cefalexina 30 mg (CI), cepradina 30 mg (CE) y ácido nalidixico 30 mg (NA) y resistencia a: eritromicina 15 mg, ampicilina 10 mg, tetraciclina 30 mg, amikacina 30 mg, amoxicilina 25 mg, gentamicina 10 mg, streptomina 10 mg y chloranfenicol 30 mg.

Los microorganismos pertenecientes al género *Halobacterium* sp, presentan afinidad metabólica por los grupos carboxilo pertenecientes a proteínas encontradas en el medio en tanto que, el género *Halococcus* sp. presenta mayor afinidad por los grupos amino liberando los carboxilo. Los resultados de las pruebas, son similares, sin embargo, se presentan diferencias en cuanto a hidrólisis de gelatina y producción de indol, la hidrólisis puede generar algunas variaciones según el metabolismo de los microorganismos, además dicha hidrólisis se puede realizar en tiempos prolongados que pueden variar el resultado final, la producción de indol, evidenció con la presencia de metabolitos indólicos al no presentar la enzima triptofanasa que cataliza la reacción de desaminación. Los dos géneros identificados presentan sensibilidad variable ante bacitracina 10 unidades, no todos los antibióticos fueron comparados con base bibliográfica, ya que la información respecto a sensibilidad es reducida, el anillo de sensibilidad observado igualmente fue variable en los dos géneros amarillo-naranja, además de poseer una consistencia cremosa, con algunas estrías, lobuladas o redondas.

CONCLUSIONES

Se realizó la identificación de dos géneros representativos *Halobacterium* sp. y *Halococcus* sp., se identificó la concentración óptima de crecimiento de NaCl 2.5 M (14%), requerimiento de luz, crecimiento a temperatura ambiente 12-15° C, característica de ser aerobios facultativos, requerimiento de una fuente proteica o de aminoácidos como propiedad básica para bioprotección en condiciones de laboratorio, además de una reducida síntesis o metabolismo de carbohidratos. Cabe señalar la importancia de simular las condiciones ambientales de donde se toman las muestras, debido a que el mantenimiento de factores físicos es esencial para un buen desarrollo. Con el presente estudio, se propone la evaluación de una investigación más detallada, para la confirmación de los parámetros fisicoquímicos y nutricionales, de los géneros encontrados a través de técnicas o marcadores moleculares respecto a proteínas de membrana y caracterización de material genético.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue realizada en los laboratorios de la Universidad Incca de Colombia, agradecimientos al personal de laboratorio por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

- BERGEY'S., R. N. KRIEG, J. G.HOLT. 1984. Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 1. Editorial Williams & Wilkins. 2216-2233.
- _____, J. STALEY, M. BYANT, N. PFENNIEG. 1984b. Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 3. Editorial Bood. 2630-2653.
- BROCK, T., M. MADIGAN. 2000. Biology of Mycrobiology. Sexta edición. Prentice Hall. 795-810.
- BLACK, J. 1995. Principles and Aplications. Mycrobiology Third Edition. By Pretice Hall. 214-220.
- ATLAG, M. R., R. BARTHA 2001. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Editorial Addison Weesy. 298-315
- McFADDIN. 1986. Análisis de Pruebas Biquímicas.
- The Oxoid Manual of Culture Medio, Ingredients and Other Laboratory Services.1982. (Fifth Edition). Oxoid Limited.