

SARCINA SREENIVASANI, n. sp. BACTERIA PRODUCTORA DEL "ROJO" EN LAS SALAZONES DE PESCADO, EN EL URUGUAY

VICTOR H. BERTULLO Y FERNANDO PEREZ HETTICH *

Entregado para su publicación el 14 de noviembre
de 1957.

INTRODUCCION

En el estudio sistemático de los agentes productores del "rojo" en las distintas salazones de pescado que se preparan en el Uruguay, hemos encontrado un agente bacteriano del orden de las **Micrococcales** que por sus características fisiológicas, estimamos que es una nueva especie, a la cual proponemos el nombre de *A. Sreenivasani*, bacteriólogo Indú, que con sus trabajos sobre bacterias rojas halofílicas, ha contribuido al mejor conocimiento de este importante grupo.

El "rojo" de las salazones de pescado es una entidad, en cuya producción concurren distintas bacterias —entre las cuales ya aislamos **Pseudomonas salinaria** (3) —que en la forma visual de ataque, no marca diferencias notorias y que muchas veces se presentan en perfecta asociación, sólo detectable por una cuidadosa investigación.

MATERIAL Y METODO

(1) Como material dispusimos de salazones secas de Brótola (**Urophysis brasiliensis**) que presentaban un fuerte color rojo en toda su superficie. Las piezas fueron obtenidas del secadero al aire libre de un

* Departamento de Investigaciones Pesqueras y Biología Marina

REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

pescador del puerto La Paloma (Rocha), quien no pudo identificar el origen de la sal utilizada, por haber adquirido distintas partidas a diferentes personas que representaban otras tantas firmas importadoras de ese producto.

(2) Se efectuaron raspajes con bisturí esterilizado, en la zona de mayor coloración, colocándose el material en solución fisiológica estéril.

No creímos conveniente usar una salmuera de mayor concentración, por tener las piezas saladas un exceso de cloruro de sodio que daba un porcentaje conveniente de esa sal.

Homogeneizado el sustrato, se efectuaron distintas diluciones las que se sembraron en medio de Dussault y Lachance (7) en caja de Petri.

El crecimiento fue efectivo a las 48 horas, repitiéndose en el mismo medio hasta su total purificación.

El examen microscópico se efectuó partiendo de los cultivos en medio sólido diluidos convenientemente en solución estéril de NaCl al 20%, o bien partiendo de los medios líquidos por extensión directa sobre el porta-objetos.

Utilizamos el método de Gram recomendado por la Sociedad Americana de Bacteriólogos (11) aunque cuando tuvimos dudas de la Gram negatividad de la bacteria, recurrimos a la técnica preconizada por Venkataraman y Sreenivasan. (16).

Todos los medios de cultivo, ingredientes y azúcares utilizados son de los laboratorios Difco de Estados Unidos.

Los pH fueron determinados con un potenciómetro Beckman modelo G.

La temperatura de cultivo en los resultados expresados, fue de 37°C. a no ser que se especifique de otra manera.

La esterilización se llevó a cabo a 121,5°C. (15 lbs.) durante 15 minutos.

CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS Y CULTURALES

El organismo se presenta según la concentración salina en que crezca, bajo la forma de cocos, diplococos y sarcina. Generalmente tiene un diámetro de 1u, aunque cuando crece en altas concentraciones de sal, alcanza hasta 1,5u. Es Gram negativo, pero muchos elementos aparecen, teñidos como Gram positivos, característica que desaparece cuando se tiñen con el método de Venkataraman y Sreenivasan (16) que efectúan la fijación del material con alcohol metílico, agregando los colorantes del Gram sobre el alcohol en el porta-objetos.

Cuando se agrega Saponina u Oleato de sodio al medio de cultivo, no se afecta el crecimiento, predominando la forma cocacea, aunque los elementos aparecen como hinchados, presentando en sus bordes una refringencia similar a la producida por una cápsula (3).

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

Crecimiento del organismo a distintas concentraciones de sal

En una primera etapa preparamos el siguiente medio: $MgSO_4$, 7 H₂O, 0,5 %; $Mg(NO_3)_2$, 6 H₂O, 0,1 %; $FeCl_3$, 7 H₂O, 0,025 %; KCl 50 p.p.m.; Proteosa Peptona N° 3 (Difco) 0,5%; Glicerina, C. P., 1%, Agar 3 %, adicionando concentraciones de NaCl puro (Merck) en cantidades del 15, 20, 25 y 30%.

Tomamos como base para la preparación de este medio, el de Dussault y Lachance (7) además de lo recomendado por Brown y Gibbons con respecto al ión potasio (6).

El crecimiento es bueno en todas las concentraciones, haciéndose visible a las 24-36 horas, para manifestarse abundantemente a las 48-72 horas. En todas las concentraciones se encontró gran predominio de cocos y menor cantidad de tetradas en paquetes de ocho elementos.

A la observación en gota pendiente, previa dilución en cloruro de sodio al 20%, esteril, se comprobó el mismo panorama aunque fue dable encontrar mayor cantidad de tetradas.

Utilizando los mismos elementos, excepto el agar-agar preparamos medio líquido, entubando y esterilizando, para luego sembrar.

A los cuatro días se procedió a examinar los cultivos, encontrándose buen crecimiento en todas las concentraciones, que al frotis teñido al Gram, dieron cocos abundantes y tetradas. El tamaño de los primeros elementos fue en aumento para alcanzar 1,5 μ en la concentración del 30%.

Comprobamos muchos elementos en etapas de división y en muchos de ellos, una marca equatorial, claramente visible. Para ratificar lo expuesto, sembramos en medio de Dussault y Lachance (7) el cultivo de todos los medios líquidos, los que a los 3 días habían crecido perfectamente presentando su color rojo característico.

Para conocer si el elemento en estudio era una halófila moderada o extrema, según la definición de Baxter y Gibbons (2), preparamos el medio líquido ya mencionado al cual se le agregó concentraciones variables de cloruro de sodio puro (Merck) al 2, 4, 6, 8 y 10 %.

En todas las concentraciones se obtuvo crecimiento, el que hacía más efectivo a medida que aumentaba el NaCl.

Igual crecimiento fue comprobado con el medio sólido descrito a principios de este trabajo.

Todos los cultivos en todas las concentraciones, crecieron luego en el medio de Dussault y Lachance (7). Tanto en el medio líquido como en el sólido el mejor crecimiento de organismo, se obtuvo entre el 15 y 20% de NaCl.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

Temperatura óptima de crecimiento.

El organismo creció tanto a temperatura ambiente (23°-25°C.) como a 37°C. siendo más exuberante a esta temperatura que a aquella. Su crecimiento a 45°C. fue más bien pobre y escaso.

Estimamos que 37°C es la temperatura que más lo favorece.

Aerobiosis.

El coco es anaerobio facultativo. Sembrado en agar y gelatina en profundidad, crece lentamente hacia la superficie extendiéndose luego sobre ésta, hasta cubrirla totalmente, formando una película adherente y viscosa. La observación en el medio de Büchner, dió también resultado positivo.

Movilidad.

La bacteria es móvil, habiéndose constatado este hecho tanto en gota pendiente, como en gelatina y con el medio de Tittsler y Sandholzer (14), previamente adicionado de NaCl al 15%.

Cromogénesis.

Los cultivos produjeron desde el principio un color rojo fuerte. A los efectos de mejor definición del color, utilizamos la escala de colores de Villalobos y Villalobos (17) leyendo por la misma para el organismo descrito, "S 10-11" y para *Sarcina litchralis* (cepa tipo Lockheed, enviada gentilmente por el Dr. Gibbons, desde Canadá), "S 12°-14".

El color fue siempre más vivo con el medio de cultivo utilizado por nosotros que en el medio de Dussault y Lachance, creyendo que ello sea debido a la presencia del ión potasio.

La temperatura no parece influenciar la cromogénesis. Tanto a 37°C. como a 23°-25°C. no encontramos diferencia que merezca anotación.

El organismo es incapaz de teñir el medio líquido en el cual crece perfectamente, al que sólo enturbia, formando luego un depósito rojo en el fondo del tubo de ensayo. Sin embargo, tan pronto se le replica a medio sólido, cultiva con su color rojo característico.

Utilización de otros medios de cultivo.

(a) **Papa.** — La papa mantenida toda la noche en solución de NaCl al 20% fue colocada en tubos de Roux, agregándose al depósito, hasta tocar el extremo inferior del tubérculo, la siguiente solución:

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

MgSO₄, 7H₂O, 0,5%; Mg (NO₃)₂·3H₂O, 0,1%; FeCl₃·7H₂O, 0,025%; KCl 50 p.p.m. y NaCl puro, 20%.

El crecimiento es rápido haciéndose visible a los tres días, dando luego colonias rojo-brillantes, adherentes a la superficie, formando filamentos al quererlas despegar con el asa o espátula de platino.

(b) **Producción de H₂S.** — Utilizamos el Lead-acetate-agar, adicionándole como vehículo el medio líquido mencionado en (a). También usamos el método de Anderson (1). Luego de quince días de cultivo, el resultado fue **negativo**.

(c) **Reducción de Nitratos.** — Agregamos 0,5% de nitrato de potasio al medio sólido ya descrito, así como también a agar-leche y agar-extracto de levadura, según lo preconizado por Gibbons (8). Utilizamos el reactivo de Griess-Ilosva para su investigación. Resultado: **Positivo**.

(d) **Producción de Indol.** — Adicionamos 1 % de Bacto-Tryptone al medio y luego se efectuó la prueba de Kovacs que dió: **Positivo**. Igual resultado obtuvimos con el medio de Sreenivasan y Venkataraman (12).

(e) **Hidrólisis del Almidón.** — Fue investigada agregando 0,2% de almidón soluble, al medio sólido y luego de 21 días de cultivo, inundación de la superficie con solución Lugol. Probamos asimismo, el medio "A" de Lockheed (10). Resultado: **Negativo**.

(f) **Hidrólisis de la gelatina.** — Utilizamos las técnicas de Gibbons (8) y Venkataraman y Sreenivasan (16). El organismo a una temperatura de 23°-25°C. produce liquefacción napiforme, dando resultado positivo con una solución al 5% de ácido tricloroacético (16). La hidrólisis es lenta y se hace manifiesta luego de 70 días de cultivo. Resultado: **Positivo**.

(g) **Prueba de la Catalasa.** — Cultivos bien desarrollados de más de 15 días fueron tratados con H₂O₂ a 10 vols. Resultado: **Positivo**.

(h) **Acción denitrificante.** — Probamos con el medio de Fred y Waksman N° 56, que utiliza en nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno y la glucosa como única fuente de carbono, que responde a la siguiente fórmula: KNO₃, 0.1%; K₂HPO₄, 0.05%; CaCl₂, 6H₂O, 0.05%, Glucosa, 1%, recomendado por Venkataraman y Sreenivasan (13). Hubo buen crecimiento, sin formación de gas. Resultado: **Negativo**.

(i) **Acción sobre los "azúcares".** — La prueba fue llevada a cabo con Bacto-phenol-red-agar, adicionado del 15% de sal y el 1% del azúcar a probar, que fue previamente esterilizada por pasaje por bujía, e incorporada al medio luego que este fue esterilizado. Hubo buen crecimiento pero no, producción de ácido ni gas en los siguientes: Dextrosa, Manitol, Esculina, Lactosa, Arabinosa, Sorbitol, Sacarosa, Galactosa, Asparagina, Maltosa, Levulosa y Rafinosa.

REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

(j) **Acción quitinolítica.** — Preparamos la quitina con la técnica de Benton, modificada por Hock (9), la que fue incorporada al medio. Buen cultivo, pero acción sobre la quitina: **Negativo.**

(k) **pH.** — El crecimiento se obtiene dentro de un pH que varía desde 5,5 a 9,0, aunque se ve favorecido por uno variable entre 6,6-6,8.

DISCUSION

El organismo aislado parece tener características propias que nos permiten presentarlo como una nueva especie. Vive en simbiosis con otras bacterias halófilas y se le aisló de los materiales en que éstas comúnmente se encuentran. El aspecto de los cultivos, presenta el color rojo característico.

Frente a sustancias batótonas, en concentraciones tales del 0,5% crece perfectamente, aumentando su tamaño y presentando un borde refringente, habilidad que no posee **Pseudomonas salinaria**, y que en los presentes momentos es objeto de estudios.

Su crecimiento es favorecido con una concentración del 15 al 20% de sal, pero es capaz de desarrollarse en cantidades que van del 2 al 30%. No podemos, de acuerdo a Baxter y Gibbons (2) clasificarla como halófila moderada, porque si bien cultiva con el 2% de sal, sobrepasa el límite del 20% que se establece para este grupo y tampoco como halófila extrema porque si bien cultiva en 30% de NaCl, también lo hace en menores cantidades del 15%, que es su límite mínimo, por lo que, debido a sus características consideramos que estamos en presencia de una **Sarcina eurihalina**. No es capaz de crecer en concentraciones menores del 2% de cloruro de sodio, lo que ratifica el concepto de Baxter y Gibbons (2) que afirman que: "El halofilismo de las bacterias abarca dos fenómenos que no están necesariamente relacionados: tolerancia de sal bajo un cierto máximo y exigencias de sal sobre un cierto mínimo".

Crece con facilidad en medios líquidos, enturbiándolos y formando depósito rojo, aunque no los colorea. Su posterior pasaje a medio sólido, con desarrollo inmediato de su color, indicaría que la cromogénesis en esta bacteria, tiene o parece tener una estrecha relación con la facie sólida. Efectivamente, en los cultivos en profundidad en gelatina, en evidente anaerobiosis, o con el método de Buchner, se detectaba fácilmente el color rojo de **Sarcina**, por lo que pensamos que ciertos fenómenos de tensión superficial, pueden influir sobre aquella característica.

La presencia de los iones magnésico, potásico y férrico son fundamentales para un buen desarrollo; aun más, hemos encontrado que la papa humedecida siempre con una solución que los contenga, produce

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

un mejor y más rápido desarrollo del organismo. Las investigaciones de Brown y Gibbons (6) sobre este punto, han sido fundamentales.

La facilidad de crecimiento tanto en medio líquido como en sólido, le otorga otra característica interesante, máxime cuando en general, las bacterias halófilas no desarrollan bien en el primero.

La apreciación del color utilizando el método de J. y L. Villalobos (17), lleva sólo la finalidad de dar una idea aproximada de los diferentes matices de rojo de **Sarcina sreenivasani** y **S. littoralis**, aunque no lo tomamos como básico por compartir las objeciones que Bowers (5) efectúa con toda precisión con respecto a su uso en la ornitología y que en nuestra investigación se han puesto de manifiesto repetidas veces.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º) Hemos aislado de los productos pesqueros salados del Uruguay, una bacteria halófila, que por sus características, aparece como una nueva especie, para la cual proponemos el nombre de **Sarcina sreenivasani**, en honor del bacteriólogo Indú Sr. A. Sreenivasan.

2º) **Sarcina sreenivasani**, es Gram negativa, móvil, anaerobia facultativa, no produce H₂S, reduce los nitratos, produce indol, no hidroliza el almidón pero sí la gelatina, tiene catalasa positiva y acción denitrificante negativa. No fermenta ni acidifica los azúcares. No ataca la quitina.

3º) Crece en concentraciones de sal que varían desde el 2% al 30%, por lo que consideramos que es una **eurihalina**. Su desarrollo es favorecido entre el 15% y 20% de Cloruro de sodio. Se desarrolla tanto en medio líquido como en sólido. Crece dentro de una variación del pH desde 5,5 a 9,0 pero le resulta más favorable un pH de 6,6-6,8.

4º) Exige para su desarrollo la presencia de iones magnésico, potásico y férrico.

5º) Cultiva a 22º-25ºC.; 37ºC. y 45ºC. aunque la temperatura que más le favorece es la de 37ºC.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1º -- In Uruguayan salted fishery products, we have found a halophilic bacterium which would appear to be a new species. We have proposed for it the name *Sarcina sreenivasani* in honour of the Hindu bacteriologist A. Sreenivasan.

2º -- *Sarcina sreenivasani* is Gram negative, mobile, a facultative

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

anaerobe, does not produce H_2S , reduces nitrates to nitrites, produces indole, hydrolyzes gelatin but not starch, contains a positive catalase, and has a negative denitrifying action. It does not ferment or acidify sugars, or attack chitin.

3° — It grows in concentrations of salt ranging from 2% to 30%, for which reason we consider it to be a euryhaline. Growth, which takes place in both liquid and solid media, is favored by 15% to 20% of sodium chloride. The pH may range from 5.5 to 9.0, but the most favorable is 6.6 to 6.8.

4° — Growth requires the presence of iron, magnesium and potassium ions.

5° — *Sarcina sreenivasani* cultivates at 22° C., 25° C., 37° C. and 45° C., although the most favorable temperature is 37° C.

RESUME ET CONCLUSIONS

1° — Nous avons isolé dans les produits de pêche salés de l'Uruguay une bactérie hallophile qui, par ses caractéristiques apparaît comme nouvelle espèce, pour laquelle nous proposons le nom de *Sarcina sreenivasani*, en l'honneur du bactériologue hindou M. A. Sreenivasan.

2° — La *Sarcina sreenivasani* est Gram négative, mobile, anaérobie facultative, elle ne produit pas de H_2S , réduit les nitrates en nitrites, produit de l'indol, n'hydrolyse pas l'amidon et hydrolyse par contre la gélatine, a une catalase positive et une action dénitrifiante négative. Elle ne fermente ni n'acidifie les sucres. Elle n'attaque pas la chitine.

3° — Elle croît dans des concentrations de sel variant entre le 2% et le 30%; c'est pourquoi nous la considérons comme une euryhaline. Son développement est favorisé entre le 15% et le 20% de chlorure de sodium. Elle se développe aussi bien dans des milieux liquides que dans des milieux solides. Elle croît dans une variation de pH entre 5.5 et 9.0, mais le pH le plus favorable est 6.6-6.8.

4° — Elle exige pour son développement la présence d'ions magnésique, potassique et ferrique.

5° — Elle se cultive à 22° C., 25° C., 37° C et 45° C, mais la température qui la favorise le plus est celle de 37° C.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1) ANDERSON, H. — The reddening of salted hides and fish. Appl. Microbiol. 2:64-72. 1954.
- 2) BAXTER, R. M. y GIBBONS, N. E. — Effects of sodium and po-

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

- tasium chloride on certain enzymes of *Micrococcus halodenitrificans* and *Pseudomonas salinaria*. *Can. J. of Microbiol.* **2**:599-606. 1956.
- 3) BERTULLO, VICTOR, H. — *Pseudomonas salinarias*, agente productor del "rojo" en los productos pesqueros salados. *An. Fac. Vet. Montevideo* **6**(2):39-50. 1954.
 - 4) y PEREZ HETTICH, F. — Acción de algunas substancias batotonas, sobre las bacterias rojas halofílicas (Trabajo sin publicar).
 - 5) BOWERS, D. E. — Methods of color determination. *Systematic Zoology.* **5**(4):147-161. 1956.
 - 6) BROWN, H. J. y GIBBONS, N. E. — The effect of Magnesium, Potassium and Iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Can. J. of Microbiol.* **1**:486-494. 1955.
 - 7) DUSSAULT, H. B. y LACHANCE, R. A. — Improved medium for red halophilic bacteria from salt fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **9**(3):157-163. 1952.
 - 8) GIBBONS, N. E. — Studies on salt fish. Bacteria associated with the reddening of salt fish. *J. Biol. Bd. Can.* **3**(1):70-76. 1937.
 - 9) HOCK, CH. W. — Descomposición de chitin by marine bacteria. *Woods Hole Ocean. Inst. Collected Reprints. Contribution N° 231.* 1940.
 - 10) LOCKHEAD, A. G. — Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Canad. J. Res.* **10**:275-283. 1934.
 - 11) SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. — The manual of methods for pure culture study of bacteria (Leaflet IV, May 1939) 1939.
 - 12) SREENIVASAN, A. y VENKATARAMAN, R. — Media for the study of red halophilic bacteria. *J. of Sc. & Ind. Res.* **15C**(9):210-211. 1956.
 - 13) — Marine denitrifying bacteria from south India. *J. Gen. Microbiol.* **15**:241-247. 1956.
 - 14) TITSLER, A. y SANDHOLZER, L. A. — *J. Bact.* **31**:575. 1936. Citados por *Difco Manual* 9th. edition. 1955.
 - 15) VENKATARAMAN, R. y SREENIVASAN, A. — Utilization of various nitrogenous compounds by certain *Pseudomonas* cultures from marine environments. *Procc. of Indian Ac. of Sc.* **XLIII** (1) Sec. B:31-38. 1955.
 - 16) — Further studies on the red halophilic bacteria from solar salt and salted fish. *Procc. of Indian Ac. of Sc.* **XLIII** (3) Sec. B:197-206. 1956.
 - 17) VILLALOBOS, C. y VILLALOBOS, L. — Atlas de los colores. Librerías "El Ateneo". Bs. As. 1947.