

EFFECTOS DE LA SAPONINA, OLEATO DE SODIO Y ESTEARATO DE ZINC SOBRE LAS BACTERIAS ROJAS HALOFILICAS

Por los Dres. VICTOR H. BERTULLO y FERNANDO PEREZ HETTICH

Departamento de Investigaciones Pesqueras y Biología Marina.

INTRODUCCION

Las pérdidas producidas por las bacterias rojas halofílicas a la industria de la salazón en general, son realmente importantes, lo que ha llevado a diversos investigadores de distintos países a estudiar la manera de controlarlas.

Hess y Gibbons (8) utilizando preservativos y desinfectantes de uso comercial, comunican haber obtenido buenos resultados, los que no pudieron ser ratificados por Castell y Mapplebeck (5).

Boyd y Tarr (3) probaron la acción de una serie de inhibidores y antibióticos, encontrando que ninguna de las sustancias actuaba sobre los citados organismos.

Venkataraman y Sreenivasan (10) estudian la acción de la aureomicina, nitrato y ricinoleato de sodio, comprobando que la primera no tiene acción alguna, mientras que las sales restantes lo hacen en determinadas concentraciones.

Dussault (7) determina la acción de la bilis de buey sobre ambos géneros de bacterias rojas halofílicas, encontrando que es posible controlar a determinada concentración uno de los grupos.

Desde 1955 venimos trabajando con la Saponina, estudio que completamos a posteriori con el uso de Oleato de sodio y el Estearato de zinc.

Los resultados obtenidos, se incluyen en la presente comunicación.

MATERIAL Y METODO

a) **Cepas.** El estudio se llevó a cabo con las siguientes cepas: **Pseudonomas salinaria** y **Sarcina littoralis** (Cepa Lockhead, enviadas gentilmente por el Dr. Gibbons, de Canadá); **Halobacterium minutum** (H 26) (Venkataraman y Sreenivasan); **Halobacterium cutirubra** (H 48) (Lockhead) enviadas a indicación de A. Sreenivasan, por el Dr. Shewan, de la Torry Research Station, de Aberdeen, Inglaterra y **Sarcina Sreenivasani**, n. sp. descrita por los autores para el Uruguay (2).

b) **Medios de cultivo.** Durante toda la experiencia utilizamos el medio de Dussault y Lachance (6) y el que preparamos tomando en consideración lo recomendado por Baxter y Gibbons (1) en lo que respecta a las exigencias de ion potasio de las bacterias rojas halofílicas. Su fórmula es la siguiente: Mg (SO₄) 7 H₂O, 5 gr.; Mg(NO₃) 6 H₂O, 1 gr.; FeCl₃, 0,025 gr.; KCl, 0,5 gr.; Proteosa Peptona N°3 (Difco) 5 gr.; Glicerina C.P. 10 gr.; Agar 30 gr.; NaCl, puro, 200 gr.; H₂O destilada 1.000 ml. El pH se ajustó a 6,8. Esterilización durante 15 minutos a 121,5° C. (15 lbs.). Todos los productos son de los laboratorios Difco, de E.E.U.U. Las sales y otros cuerpos químicos proceden de Merck, Alemania.

c) **Sustancias investigadas.** Utilizamos Saponina, Oleato de sodio y Estearato de zinc, preparando una solución madre al 0,5% en agua destilada esterilizada. Partiendo de esta solución se hicieron las diluciones que se incorporaron a los medios de cultivo en función, se homogenizaron y se dejaron solidificar en pico de flauta.

Cuando la concentración de la sustancia investigada a incorporar, fue mayor que la de la solución madre, le agregamos directamente al medio.

El crecimiento se controló por exámenes microscópicos y repicajes en medios apropiados, luego de cada prueba.

Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37°C.

Los pH fueron determinadas con potenciómetro Beckman, modelo G.

RESULTADOS

En la primera serie de experiencias utilizamos las distintas sustancias en la concentración de 0,5 y 1%. La Saponina y el oleato de sodio se incorporaron perfectamente al medio, no así el Estearato de zinc, tratando entonces de que quedase en suspensión lo más regular posible.

Pseudomonas salinaria, **Halobacterium minutum** y **H. cutirubra**, no se desarrollaron en estas concentraciones luego de 25 días de observación.

El crecimiento de **Sarcina littoralis** y **S. sreenivasani** es visible a las 48 horas, muy bueno a los 6 días y excelente a los 10 días, en los medios que contienen Saponina al 0,5 y 1%.

Ambos organismos prosperan lentamente a las 48 horas, 6 días y bien a los 10,15 y 20 días en Oleato de sodio al 0,5 y 1%, y en Estearato de zinc al 0,5%, creciendo dificultosamente **Sarcina littoralis** y no haciéndolo **S. sreenivasani** en la concentración al 1%.

En una segunda serie buscamos los límites entre los cuales podía crecer **Pseudomonas** y **Halobacterium** utilizando entonces las sustancias en proporciones que variaron de 1 a 100 p. p. m.

Ps. salinaria frente a la Saponina crece bien entre 1 a 10 p.p. m. más lentamente a 20 p.p.m., no haciéndolo a 40 p.p.m.; crece en concentraciones de 10 p.p.m. de Oleato de sodio, pero no en 20 p.p.m.; haciéndolo perfectamente al cabo de 15 días en 10 p.p.m. y más lentamente en 20 p.p.m. y en 100 p.p.m. a los 25 días, en Estearato de zinc.

Halobacterium minutum y **H. cutirubra** crecen bien a las 48 horas en 10, 50, 70 y 100 p.p.m. en Saponina y Estearato de zinc; pero muy pobremente en las distintas concentraciones de Oleato de sodio.

A los cuatro días el panorama es similar al descrito. A los siete días el crecimiento de ambos organismos es excelente en las distintas concentraciones de Saponina y Estearato de zinc. Con respecto al Oleato de sodio, 10 p.p.m. permiten un excelente crecimiento de ambas bacterias; 50 p.p.m. muy bueno de **H. cutirubra** y bueno de **H. minutum**, 70 y 100 p.p.m. bueno en el primero y regular en el segundo, condición que se mantiene a los 25 días. 150 p.p.m. de Oleato de sodio inhiben el crecimiento de **H. minutum** y **H. cutirubra** mientras que el Estearato de zinc lo hace a 200 p.p.m. y la Saponina a 250 p.p.m.

DISCUSION

Resulta evidente que la acción de las distintas sustancias, sobre **Pseudomonas**, **Halobacterium** y **Sarcina**, marca una diferencia notable. Mientras estas crecen perfectamente en concentraciones del 0,5 y 1% en Saponina y Oleato de sodio, de 0,5% en Estearato de zinc, inhibiéndose al 1% **Sarcina sreenivasani**, las primeras son inhibidas en concentraciones que varían de 40 p.p. m. a 250 p.p.m. según la especie y el producto utilizado, hechos ra-

tificados por otra parte en las comunicaciones de Dussault (7) con respecto a la bilis del buey y por Venkataraman y Sreenivasan (10) en relación a la aureomicina, nitrato y ricinoleato de sodio.

La observación microscópica en todos los casos en que el crecimiento no se efectuó, muestra ruptura citoplasmática acompañada muchas veces de plasmoptosis.

Las sustancias probadas, tienden todas a bajar la tensión superficial y ello explicaría la acción sobre **Pseudomonas** y **Halobacterium**, según los trabajos de Werkam y Wilson (11), pero a su vez Dussault (7) comparte el criterio de Stacey y Webb (9) y el de Brodie y Shepherd (4) sosteniendo en el caso de sales biliares, que éstas alteran la permeabilidad de la pared celular de las bacterias susceptibles, facilitando la entrada de electrolitos que provocan el hinchamiento y ruptura del citoplasma.

Entendemos que ambos principios son compatibles en el sentido de que la permeabilidad de la pared celular puede ser alterada, con sus consecuencias, cuando en el medio de cultivo existen factores disturbantes tales como las sustancias mencionadas que modifican la tensión superficial.

El hecho de que los organismos afectados sean los que exigen altas concentraciones salinas, para su normal crecimiento, permitiría presumir que el equilibrio electrolítico de los distintos elementos necesarios para su nutrición, sufre una alteración que afecta profundamente su fisiología hasta producir su muerte.

Estimamos que ambos aspectos deben ser considerados en conjunto para encontrar una explicación a las reacciones tan dispares que presentan las especies halofílicas consideradas, frente a las sustancias probadas.

Como consideración final, se desprende que la distinta acción de las sustancias investigadas permite la preparación de medios de cultivo selectivos no sólo capaces de separar **Pseudomonas** y **Halobacterium** de **Sarcina**, sino que también las distintas especies de **Sarcina** entre sí.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º) Se ha estudiado los efectos que la Saponina, el Oleato de sodio y el Estearato de zinc producen sobre **Pseudomonas salinarias**, **Halobacterium minutum**, **H. cutirubra**, **Sarcina littoralis** y **S. sreenivasani**.

2º) Dichas sustancias inhiben el crecimiento de **Pseudomonas** y **Halobacterium** en concentraciones que varían de 40 a 250 p. p. m., no haciéndolo con **Sarcina** en concentraciones del 1%, excep-

to el Estearato de zinc, que en este porcentaje sí lo hace con *Sarcina sreenivasani*.

3º) Las citadas substancias pueden ser utilizadas para preparar medios selectivos que permiten la separación de las distintas especies de bacterias halofílicas.

SUMMARY

1) The effects have been studied of saponin, sodium oleate and zinc stearate upon *Pseudomonas salinaria*, *Halobacterium minutum*, *H. cutirubra*, *Sarcina littoralis* and *S. sreenivasani*.

2) These substances inhibit the growth of *Pseudomonas* and *Halobacterium* in concentrations varying from 40 to 250 per mil, not doing so in the case of *Sarcina* in concentrations of 1%, except for zinc stearate which in this concentration acts upon *S. sreenivasani*.

3) The substances mentioned can be used to prepare selective media which allow of the separation of the various species of halophilous bacteria.

RESUME

1º) Les auteurs étudient les effets de la Saponine, de l'Oléate de Sodium et du Stéarate de Zinc sur la *Pseudomonas salinaria*, l'*Halobactérium minutum*, *H. Curiturubra*, *Sarcina littoralis* et *S. Sreevasani*.

2º) Les substances enquestion inhibent la croissance des *Pseudomonas* et de l'*Halobactérium* à des concentrations variant entre 40 et 250 p.p.m. mais non celle de la *Sarcina* à des concentrations de 1%, sauf pour le stéarate de zinc, qui à ce pourcentage inhibe la croissance de la *Sarcina sreenivasani*.

3º) Les substances mentionnées peuvent être employées afin de préparer des milieux sélectifs permettant la séparation des différentes espèces de bactéries hallophiles.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1) BAXTER, R. M. y GIBBONS, N. E. — *Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of Micrococcus halodenitrificans and Pseudomonas salinaria*. Can. J. of Microbiol. 2:599-606; 1956.
- 2) BERTULLO, V. H. y PEREZ HETTICH, F. — *Sarcina sreenivasani n. sp. bacteria productora del "rojo" en las salazones de pescado en el Uruguay*. An. Fac. Vet., Montevideo; 7 (5): 73-82; 1957.
- 3) BOYD, J. N. y TARR, H. L. A. — *Inhibition of moulds development in fish products*. Pacific Prog. Rept N° 99:22-23; 1954.
- 4) BRODIE, J. y SHEPHERD, W. J. — *Gen. Microbiol.* 3:74-79; 1949. (Citado por Dussault).
- 5) CASTELL, C. H. y MAPPLEBECK, E. G. — *The survival of red halophiles in water and in brines*. J. Fish. Res. Bd. Can. 9 (8): 377-387; 1952.
- 6) DUSSAULT, H. P. y LACHANCE, R. A. — *Improved medium for red halophilic bacteria from salt fish*. J. Fish. Res. Bd. Can. 9 (3): 157-163; 1952.
- 7) DUSSAULT, H. P. — *Study of red halophilic bacteria in solar salt and salted fish. I. Effect of Bacto-oxgall*. J. Fish. Res. Bd. Can. 13 (2): 183-194; 1956.
- 8) HESS, E. y GIBBONS, N. E. — *Studies on Salt fish. X. Effect of disinfectants and preservatives on red halophilic bacteria*. J. Fish. Res. Bd. Can. 6 (1): 17-23; 1942.
- 9) STACEY, M. y WEBB, M. — *Proc. Roy. Soc. London. B.* 134:323-37; 1947. (Citado por Dussault).
- 10) VENKATARAMAN, R. y SREENIVASAN, A. — *Effect of aureomycin, nitrate and ricinoleate on red halophilic bacteria*. Curr. Sci. 25:190-191; 1956.
- 11) WERKAM, C. H. y WILSON, P. W. — *Bacterial Physiology*. Academic Press. N. Y.; 1952.