



ARTÍCULO CIENTÍFICO/ SCIENTIFIC PAPER

Volumen 8. Número 1. Enero – Junio 2021

ISSN 1390-910X edición impresa

ISSN 2773-756X edición digital

Fecha recepción 11/ene/2021 - Fecha aprobación 12/abr/2021

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS Y VIABLES PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO DEL BACILLUS SUBTILIS.

(DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE AND VIABLE CULTURE MEDIA FOR THE MICROBIAL GROWTH OF BACILLUS SUBTILIS.)

Rodríguez Cervantes Edison Geovanny¹, Gómez Gordillo Alejandra Maribel², Anaya González Jorge Luis³, Miniet Castillo Adriana Edit⁴, Velásquez Calderón Claudia Amparo⁵

¹Universidad Técnica del Norte, Ingeniero en Biotecnología, Magister en Neuropsicología y Educación, Ibarra, Código postal 100101, Ibarra, Ecuador, Orcid: 0000-0002-9287-1350, egrodriguez1@utn.edu.ec

²Universidad Técnica del Norte, Ingeniero en Alimentos, Magister en Agroindustrias con Mención en Calidad y Seguridad Alimentaria, Magister en Ciencias de la Educación, Código postal 100101, Ibarra, Ecuador, Orcid: 0000-0002-2922-8856
amgomez@utn.edu.ec

³Universidad Técnica del Norte, Médico, Especialista en MGI, Especialista en Cirugía General, Master en Urgencias Médicas, Código postal 100101, Ecuador, jlanaya@utn.edu.ec

⁴Universidad Técnica del Norte, Médico, Especialista en Medicina General Integral, Código postal 100101, Ibarra, Ecuador, Orcid: 0000-0001-8350-7816
aeminiet@utn.edu.ec

⁵Universidad Técnica del Norte, Licenciada en Nutrición y Dietética, Magister en Alimentación y Nutrición, Código postal 100101, Ibarra, Ecuador, cavelasquez@utn.edu.ec

<https://doi.org/10.53358/lauinvestiga.v8i1.472>

RESUMEN:

Los medios de cultivo se componen de: una fuente de carbono normalmente son azúcares sencillos como por ejemplo, glucosa o lactosa. El objetivo de esta investigación fue elaborar medios de cultivo alternativos y viables para el crecimiento microbiano del *Bacillus subtilis*, útiles en las prácticas de laboratorio. Se partió de la descripción de los principales medios de cultivo empleados dentro del laboratorio, se identificaron insumos de uso doméstico como, panela, azúcar, miel de bajo costo para remplazar los insumos comerciales. Se realizó el diseño experimental con las variables de fuentes de carbono y grados brix, manteniendo una estructura similar a los medios de cultivo comerciales. Una vez ejecutada su elaboración se procedió a determinar la viabilidad de los medios de cultivo, usando una bacteria en condiciones controladas dentro del laboratorio, a través de la inoculación de *Bacillus subtilis* en una dilución de 105, incubando a 25°C durante 24 y 48 horas. Como resultado se obtuvo que la mejor fuente de carbono fue el azúcar refinado y el azúcar morena que muestran mejores resultados en crecimiento de microorganismos, ya que el costo de los demás materiales sobrepasa considerablemente el valor accesible para los estudiantes. El ANOVA resultó con un p-valor menor a 0,05, lo que quiere decir que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control que fue el medio de cultivo comercial. Se logró elaborar un medio de cultivo para bacterias, con materiales caseros, resultando ser viables y de bajo costo.

Palabras clave: Bacillus subtilis, medio de cultivo, microbiología, viabilidad, bacterias.

ABSTRACT:

Culture media are made up of: a carbon source is usually simple sugars such as glucose or lactose. The objective of this research was to develop alternative and viable culture media for the microbial growth of *Bacillus subtilis*, useful in laboratory practices. It was started from the description of the main culture media used within the laboratory, household inputs such as panela, sugar, low-cost honey were identified to replace commercial inputs. The experimental design was carried out with the variables of carbon sources and brix degrees, maintaining a similar structure to commercial culture media. Once its elaboration was executed, the viability of the culture media was determined, using a bacterium under controlled conditions within the laboratory, through the inoculation of *Bacillus subtilis* in a dilution of 105, incubating at 25 ° C for 24 and 48 hours. As a result, it was obtained that the best carbon source was refined sugar and brown sugar, which show better results in the growth of microorganisms, since the cost of the other materials considerably exceeds the value accessible to students. The ANOVA resulted with a p-value less than 0.05, which means that there are no statistically significant differences between the treatments and the control that was the commercial culture medium. It was possible to develop a culture medium for bacteria, with homemade materials, proving to be viable and inexpensive.

Keywords: Bacillus subtilis, culture medium, microbiology, viability, bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es una preparación líquida o sólida utilizada para el crecimiento, transporte o mantenimiento de microorganismos, en el laboratorio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. De una forma muy general, se puede decir que los medios de cultivo se componen de: una fuente de carbono normalmente son azúcares sencillos como por ejemplo, glucosa o lactosa, pero existen también algunos organismos que usan CO₂ (en este caso serían autótrofos, al igual que las plantas). Como fuente de nitrógeno se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas u otros componentes, como sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y vitaminas. Amortiguadores de pH (soluciones tampón o buffer), son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos, por ejemplo, suelen usarse como tampones los fosfatos disódicos (Na₂HPO₄) o monosódicos (NaH₂PO₄) (1) (2).

Los laboratorios de instituciones académicas emplean medios de cultivo para la proliferación y estudio de microorganismos como las bacterias, sin embargo, alrededor del mundo el desarrollo de estos estudios se ve limitado por factores económicos, geopolíticos, geográficos, que dificultan el acceso de los estudiantes a estos medios de cultivo para continuar con investigaciones pedagógicas y académicas de cada localidad. La mayoría de medios de cultivo comerciales son de alto costo ya que no existe industria nacional y la mayoritariamente son importados. Generalmente están formulados por una serie de componentes (fuentes de nitrógeno, carbono, sales, vitaminas, minerales) que hacen a estos medios muy costosos para el sector industrial (3)(4).

Ante las dificultades de las importaciones surge la interrogante; será posible reemplazar los medios de cultivo microbiológico por medios elaborados con materias primas accesibles, que rompan las barreras económicas, geopolíticas, geográficas, con un rendimiento aceptable para tareas académicas dentro del laboratorio, para lo que se focalizaron las mejores opciones, empleando materiales diferentes pero de similar desempeño en la proliferación de microorganismos. Obtener opciones para reemplazar el cultivo tradicional de microorganismos, evitar el desabastecimiento y eludir el estancamiento de metodologías prácticas y de proyectos de investigación en los laboratorios de microbiología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica del Norte, constituyó el alcance de esta investigación, pues las prácticas son una herramienta imprescindible en el desarrollo académico de futuros profesionales (5).

El objetivo de esta investigación fue elaborar medios de cultivo alternativos y viables para el crecimiento microbiano de *Bacillus subtilis*, útiles en las prácticas de laboratorio, como herramientas pedagógicas para el análisis de alimentos y microbiología. Para lo cual se describieron las principales fuentes de carbono empleadas en la elaboración de medios de cultivo alternativo dentro del laboratorio, identificándose el costo de materias primas de uso doméstico para reemplazar los insumos comerciales, lo que permitió diseñar medios de cultivo alternativos, manteniendo una estructura funcional similar a la tradicional. Además se determinó su viabilidad.

2. METODOLOGÍA

Se utilizó un estudio experimental, de enfoque cuantitativo, para el cual se planteó un diseño DCL (Doble Cuadrado Latino). Se compararon las varianzas con la prueba estadística ANOVA y un error del 5%, determinando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

La variable independiente fue la fuente de carbono, se utilizó el azúcar en 5 tratamientos y la muestra control fue el medio de cultivo comercial. La viabilidad se evaluó verificando el crecimiento microbiano de *Bacillus subtilis* en el medio de cultivo desarrollado.

- Variables dependientes: Grados brix.
- Variables independientes: Fuentes de carbono: Azúcar

Como fuente de carbono se planificaron probar cinco tratamientos junto al control siguiendo la formulación del medio comercial, como se detalla en la tabla 1.

Tabla1. Fuente de carbono: Azúcar

Tratamiento	Concentración de fuente de carbono
P1	Concentración de azúcar 1
P2	Concentración de azúcar 2
P3	Concentración de azúcar 3
P4	Concentración de azúcar 4
P5	Concentración de azúcar 5
Control	39g en 1000mL

Para las pruebas de homologación se realizaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos como medio de cultivo, tanto comercial como alternativo, cuyas características físicas fueron equivalentes, frente al control que es el medio comercial.

Como elección de los materiales de remplazo de la fuente de carbono se revisaron materiales que se encuentren al alcance de la población estudiantil, de los cuales se verificó su calidad y costo beneficio, para ser seleccionada como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Materiales para evaluar para remplazar la formulación comercial.

Acción en el medio de cultivo	Material o agente bioquímico
Fuente de carbono	Azúcar morena
	Azúcar refinada
	Miel
	Panela

Preparación y condiciones de cultivo.

El medio de cultivo se preparó utilizando: erlenmeyer, matraz, balanza analítica de cuatro topes, caja Petri, agua destilada por osmosis inversa; siguiendo la ficha técnica del medio de cultivo comercial. El proceso de esterilización se realizó en autoclave a 125°C por 45 minutos a una presión de 3 atm y el vertido de los medios de cultivo, al interior de la cámara de flujo laminar. La inoculación del microorganismo se realizó por estriado dentro de una cámara de flujo laminar, con un asa bacteriológica previamente esterilizada, se tomó la muestra de *Bacillus subtilis*, y se realizó la siembra en estriado, es decir con el asa se ejecutó un movimiento en zigzag sobre el medio de cultivo a inocular. Para finalizar se cerró la caja Petri y se inició el proceso de incubación.

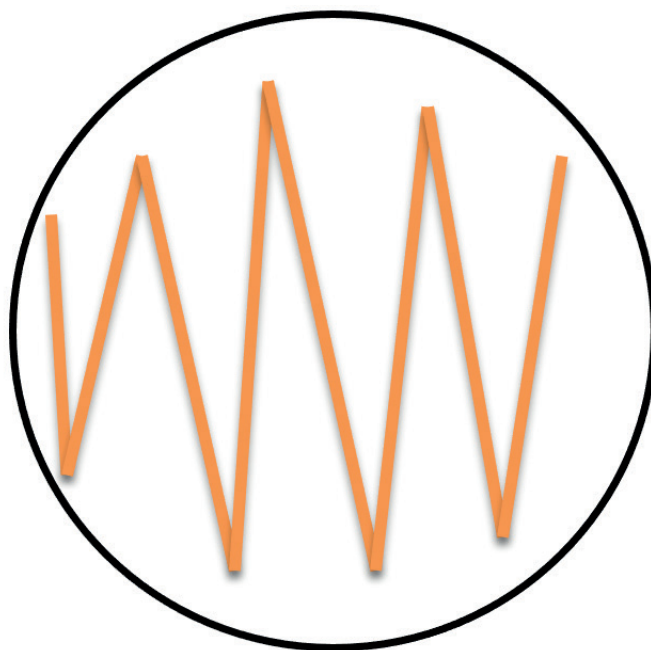


Figura 1. Esquema de la siembra por estriado

La inoculación del microorganismo en el medio alternativo y el medio comercial se llevó a cabo en la misma fecha y hora, incubándose a 25°C durante 24 y 48 horas en dos etapas respectivamente. Para realizar una comparación de la viabilidad de ambos medios de cultivo con bacterias, se empleó una dilución de 10⁵, después de los siete días de incubación se corroboró la presencia del *Bacillus subtilis* con la técnica de tinción Gram, por ser un bacilo Gram positivo.

3. RESULTADOS

Se identificaron varios insumos para el remplazo de las fuentes de carbono, tomando en cuenta materias primas accesibles, de bajo costo, disponibles todos los meses del año y que no afecten la composición nutricional del medio de cultivo alternativo.

Tabla 3. Costo de materias primas de reemplazo

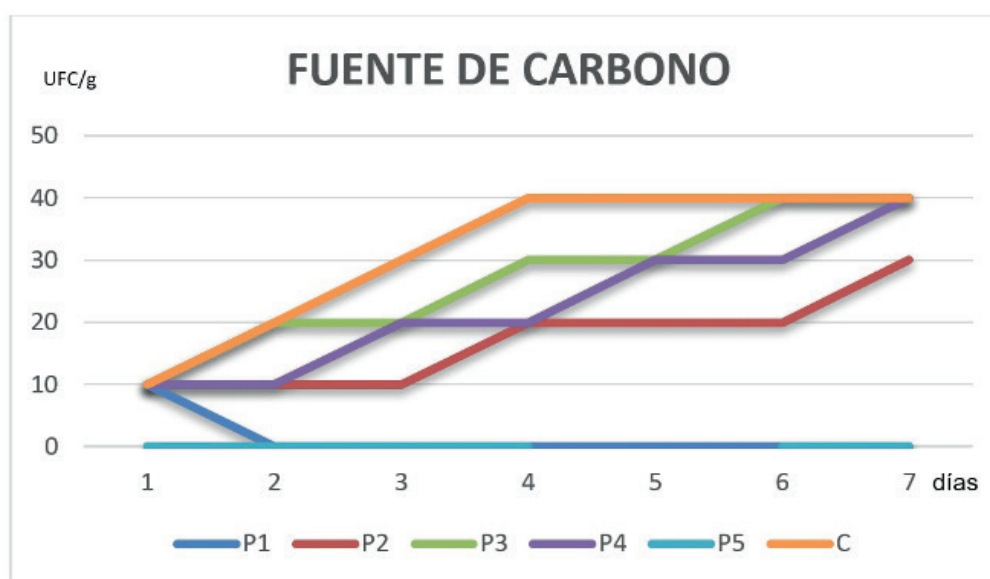
Acción en el medio de cultivo	Material o agente bioquímico	Precio en \$ por Kg (Mercado ecuatoriano)
Fuente de carbono	Azúcar morena	0.54
	Azúcar refinada	0.70
	Miel	8.75
	Panela	2.34

La **Tabla 3.** muestra que las fuentes de carbono alternativas más económicas resultaron ser los azúcares refinado y moreno, las cuales se probaron como sustrato para la preparación de medios de cultivo alternativos y su viabilidad en el crecimiento microbiano.

Tabla 4. ANOVA de la variable fuentes de carbono (azúcar). Grados Brix.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1994,278	5	398,856	652,673	,000
Dentro de grupos	7,333	12	,611		
Total	2001,611	17			

El resultado de la prueba ANOVA con un nivel de significancia de 0,05 demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y la muestra control, con un p valor menor a 0,05 como se muestra en la Tabla 4. Se midieron los grados Brix, obteniendo valores entre 20° y 40° según los tratamientos aplicados, lo cual no afectó el crecimiento microbiano. La muestra control arrojó un promedio de 8 grados Brix.

**Figura 2.** Días de crecimiento de microorganismos según UFC/g.

En la figura 2 se exhiben las UFC/g en una dilución de 10⁵ y el tiempo en días de crecimiento microbiano. Los ensayos P2, P3 y P4 resultaron viables, siendo P3 (Concentración 3 de azúcar) el que mostró mejores resultados en el momento de la formulación bioquímica y presentó suficiente carbono para sustentar la vida. P1 no contó con la suficiente concentración de carbono para una adecuada viabilidad y P5 durante la esterilización incineró el exceso de azúcar, dañando el medio de cultivo y demostrando no ser viable.

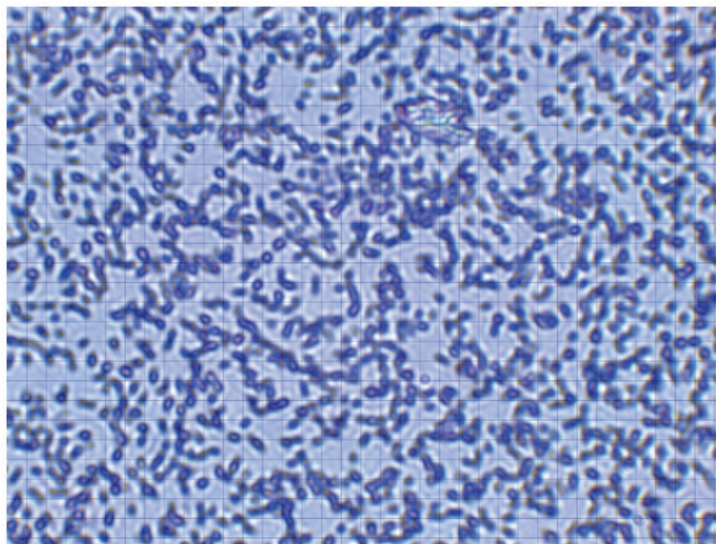


Figura 3. Vista microscópica del cultivo de *Bacillus subtilis* con Tinción Gram

El medio de cultivo alternativo resultó viable para crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*, lo que se muestra en la Figura 3 a través de la fotografía realizada con el microscopio trinocular, es una tinción Gram para corroborar si el microorganismo que creció fue *Bacillus subtilis*, obteniendo el resultado Gram positivo.

4. DISCUSIÓN

Diseñar medios de cultivo alternativos demanda tener en cuenta los requerimientos nutricionales de estos microorganismos empleándolos en la forma y proporción adecuadas. El estudio de las fuentes de carbono que emplean microorganismos heterótrofos que permite una mayor comprensión de su ecología y su comportamiento durante la producción industrial de inoculantes (5).

Los azúcares refinado y moreno como fuentes de carbono alternativas mostraron ser las más económicas, mismas que se probaron como sustrato para la preparación de medios de cultivo alternativos y su viabilidad en el crecimiento microbiano. Un estudio del 2018 muestra resultados similares en el crecimiento de *Rhizobium* sp., un microorganismo que emplea diferentes fuentes de carbono para su crecimiento, con capacidad para multiplicarse en manitol, glucosa y glicerol aprovechándose para el diseño de medios de cultivo más económicos (6).

En el presente estudio el azúcar mostró los mejores resultados en la viabilidad del crecimiento microbiano, pues la fácil liberación del carbono permite que los microorganismos no deban realizar una acción de degradación para obtenerlo, como se muestra en la tabla 4. Según Osorio, se presentaron similares resultados desde el punto de vista económico, en un estudio de reemplazos de las fuentes de carbono y nitrógeno alternativas, los medios que posibilitaron la actividad enzimática son los que contienen suero de leche (como fuente de carbono y de nitrógeno) y harina de maíz (como fuente de nitrógeno). Al ser el suero de leche un sub producto de la industria láctea que constituye un residuo para muchas empresas, resulta una materia prima favorecedora, a nivel económico, en la elaboración de los medios de cultivo (7).

Después de haber realizado los experimentos y determinar los mejores tratamientos para fuentes de carbono, el resultado de la prueba ANOVA con un nivel de significancia de 0,05 demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y la muestra control, con un p valor menor a 0,05, se midieron los grados Brix, obteniendo valores entre 20° y 40° según los tratamientos aplicados, lo cual no afectó el crecimiento microbiano. La muestra control arrojó un promedio de 8 grados Brix. En un estudio realizado en el 2015 muestra como resultado se obtuvo un medio compuesto por sacarosa y extracto de levadura fue suficiente para un crecimiento efectivo de la bacteria *B. licheniformis*, C-232, desde el punto de vista de la productividad y del costo por gramo de biomasa obtenida, lo cual se compara a nuestro estudio, en el que se utilizó una fuente de carbono como el azúcar (8).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se identificaron la gelatina sin sabor y el azúcar como insumos de uso doméstico que se obtienen a un bajo costo, como materia prima para reemplazar los medios de cultivo comerciales. De acuerdo con los resultados obtenidos, el medio de cultivo elaborado con estos materiales alternativos fue viable para el crecimiento de *Bacillus subtilis*, obteniendo un mayor crecimiento en las combinaciones de T2 (25g de gelatina sin sabor, agente solidificante), con P2 (30g azúcar, fuentes de carbono) demostraron presencia de un microorganismo bacilo gran positivo, viabilizando su desarrollo y albergándolo un tiempo posterior a los siete días de incubación a 25°C. Los demás tratamientos no fueron viables.

6. RECONOCIMIENTO

A las autoridades de la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Dra. Salomé Gordillo, Coordinadora de la Carrera de Medicina, por su apoyo a la educación y contribución a la ciencia.

REFERENCIAS

1. Barrero Cuevas L. Microbiología clínica [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 4]. Available from: www.sintesis.com
2. Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Agud Aparicio JL. Microbiología. 1999;
3. Victoria BM, Guillermo P, Bergamini H/, Viviana C. MEDIO DE CULTIVO ECONÓMICO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LACTOBACILLUS PARACASEI 90. 2017;

4. Mendez-Ubeda J, Flores Hernandez M, Paramo-Aguilera L. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACILLUS subtilis Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACILLUS subtilis AND EVALUATION OF ANTAGONISM IN VITRO AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI. Nexo. 2017;30(02):96–110.
5. Kovács ÁT, Dragoš A. Evolved Biofilm: Review on the Experimental Evolution Studies of Bacillus subtilis Pellicles. J Mol Biol. 2019 Nov 22;431(23):4749–59.
6. Suzaki T, Yoro E, Kawaguchi M. Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. Int Rev Cell Mol Biol. 2015;316:111–58.
7. Osorio A, Gómez N, Sánchez C. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho Mucor miehei Evaluation of different sources of carbon and nitrogen in the production of rennet from Mucor miehei. Vol. 45, Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º. 2008.
8. Rizo-porro M, González-fernández N, Pérez-martínez A. Diseño de un medio de cultivo con base en sacarosa. 2015;