

Índice de crecimiento absoluto (ICA) para diferentes medios de cultivo de origen natural con la bacteria *Enterobacter spp*

Parra John A, Vergara U Valentina *, Adalucy Alvarez-Aldana **

RESUMEN

Es imprescindible crear nuevas formulaciones y tipos de medios de cultivo que permitan la recuperación y aislamiento de cepas y/o aislamientos de interés de menor costo. Muchos de los que se encuentran disponibles en el mercado para el cultivo y crecimiento de gran cantidad de microorganismos presentan altos valores comerciales, por lo cual, es necesario buscar alternativas que sean económicas y que provean características nutritivas y metabólicas similares a las de los medios comerciales para el crecimiento. Por esto, existen métodos que permiten identificar la promoción del crecimiento de los diferentes tipos de microorganismos en un medio de cultivo de origen natural, o por controlar y verificar la calidad de los medios comerciales existentes disponibles en el laboratorio. El objetivo de esta práctica de laboratorio fue determinar la promoción del crecimiento (productividad) de *Enterobacter spp* en diferentes medios de cultivo de origen natural elaborados en la práctica, mediante la siembra según Mossel (prueba ecométrica) y así obtener el índice de crecimiento absoluto (ICA).

Palabras claves: *Enterobacter spp*, Medio de cultivo natural, Método

ecométrico de Mossel, Productividad, ICA.

ABSTRACT

It is essential to create new formulations and types of culture media that allow the recovery and isolation of strains or isolates of interest of lower cost. Many of those that are available in the market for the growth of microorganisms present high commercial values, therefore, it is necessary to look for alternatives that are economical and that improve nutritional and metabolic characteristics similar to those of the commercial media. Therefore, there are methods that allow to identify the promotion of the growth of different types of microorganisms in a culture medium of natural origin, or control medium and verify the quality of the media available in the laboratory. The aim of this laboratory practice was to determine promotion of the growth in natural mediums through Mossel method (ecometric test) and thus obtain the absolute growth rate (ICA).

Key words: *Enterobacter spp*, Medio de cultivo natural, Método ecométrico de Mossel, Productividad, ICA.

*Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología.

**Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvarez@unilivre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el crecimiento y desarrollo de microorganismos *in vitro* [1]. Este provee la fuente de carbono, oxígeno, nitrógeno, pH y factores necesarios para propiciar un medio ideal y satisfacer metabólicamente al microorganismo de interés.

Dentro de estos medios de cultivo, se encuentran los clasificados por su composición como naturales, los cuales son los preparados a partir de un extracto, una infusión o de tejidos orgánicos, sean de origen animal o vegetal y de los cuales se desconoce la composición química exacta, en contraposición a los medios de cultivo diferenciales y selectivos en los cuales se conoce su composición exacta [1].

Estos son usados generalmente para estudios e investigaciones académicas sencillas y para la preservación y recuperación de cepas usadas en enseñanza universitaria. Aunque muchas veces pueden proveer información valiosa para la creación de nuevos medios de cultivos que permiten la recuperación efectiva de una cepa o aislamiento.

Enterobacter spp es un bacilo de la familia Enterobacteriaceae. *Enterobacter* es un género de bacterias gramnegativas que se clasifican como anaerobios facultativos, lo que significa que pueden crecer y desarrollarse tanto en entornos aeróbicos como

anaeróbicos. Muchas especies poseen flagelos y, por lo tanto, son móviles. Características tales como la motilidad, así como ciertas propiedades bioquímicas, incluida la capacidad de sintetizar una enzima conocida como ornitina descarboxilasa, se utilizan para distinguir a bacterias del género *Enterobacter* de las bacterias del género *Klebsiella*, muy similar y estrechamente relacionada. *Enterobacter* fue nombrada así para el hábitat natural predominante de los organismos, los intestinos de animales (del enteron griego, significando "intestino") [2].

Existen métodos cuantitativos (Miles-Misra), semicuantitativos (prueba ecométrica) y cualitativos (siembra por agotamiento) para determinar la promoción del crecimiento de un microorganismo dado en un medio de cultivo particular [3].

Los métodos cuantitativos o semicuantitativos, permiten calcular la productividad de un medio de cultivo, es decir, evaluar la capacidad de este de favorecer o permitir el desarrollo del microorganismo elegido comparado a un medio de cultivo control que se sabe permitirá un crecimiento y así determinar su ICA.

El método ecométrico de Mossel es semi-cuantitativo y se realiza tomando un medio de cultivo sólido y se divide en cuatro cuadrantes. Se realizan cinco estrías en cada cuadrante y una en el centro de los cuadrantes (Ver figura1).

*Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología.

**Docente. Programa de Microbiología. Adalucy.alvarez@unilivre.edu.co. Universidad Libre Pereira.

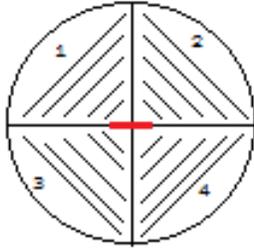


Fig. 1. Método ecométrico de Mossel para determinar mediante una forma semi-cuantitativa la capacidad de un medio de recuperar (promover el crecimiento) de una cepa u organismo de interés.

A cada estría de cada cuadrante se le da un valor de 0,2. A la estría central se le da un valor de uno. Se realizará la suma de los datos obtenidos y se obtendrá un valor. Para que el medio sea productivo o promueva el crecimiento debe presentarse ICA (Índice de Crecimiento Absoluto) por encima de 3,5 puntos [4].

El objetivo de este proyecto de aula consistió en realizar y analizar la productividad por el método ecométrico de Mossel de diferentes medios de cultivos naturales para la recuperación de *Enterobacter spp* y así determinar el índice de crecimiento absoluto.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Agar agar (OXOID)
- Agua destilada
- Asa bacteriológica redonda
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cajas de Petri desechables
- Cascara, pulpa o subproductos de frutas

- Cuchilla, cuchillo o elemento para realizar cortes
- Erlenmeyer
- Mechero
- Plancha de calentamiento
- Probeta
- Marcador
- Stomacher (
- Varilla de vidrio o agitadora

Preparación de los medios de cultivo naturales

Se tomaron diferentes frutas, vegetales, granos o cereales entre otros y se utilizó la cascara, que sería un desecho en el proceso de darle valor agregado a alguno de ellos como producir un zumo, una mermelada, un congelado ect. Esta fue cortada en proporciones pequeñas. Posteriormente, mediante un Stomacher se homogenizó la muestra y se obtuvo el extracto de la cascara de la fruta.

El medio se preparó al 10% de cascara, pulpa o subproducto del fruto. Después, se aforó a 250 mL y se añadió agar agar como agente solidificante al 2%. La solución fue homogenizada mediante agitación y agregada a un Erlenmeyer.

Este fue sometido a calentamiento hasta hervir y fue removido de la plancha. Se realizó esterilización en autoclave a 121°C a una atmósfera (15psi) durante 15 minutos.

Preparación del inóculo para determinar el ICA

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

A partir de un cultivo de *Enterobacter spp* de menos de 16 horas se preparo un inculo de patron de turbidez de 2 en la escala de MacFarland.

Comparación del medio de cultivo patrón con los diferentes medios de cultivo de origen natural

Se utilizo como medio de cultivo control Agar Nutritivo (OXOID) para comparar los ICAs de los diferentes medios de cultivo naturales y PDA (papa dextrosa agar)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

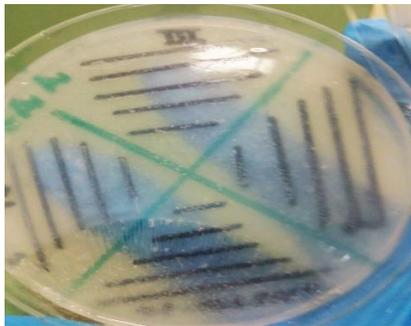


Figura 2. *Enterobacter c* en agar arroz.

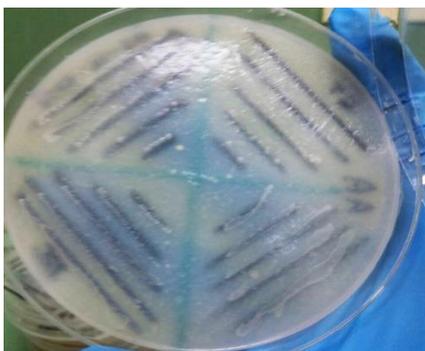


Figura 3. *Enterobacter spp* en agar avena.

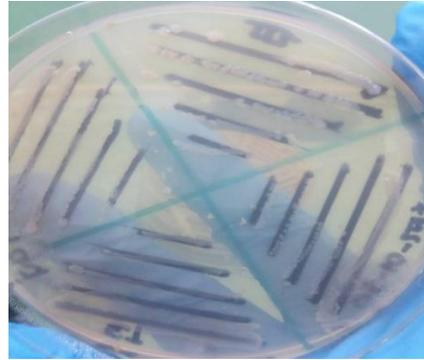


Figura 4. *Enterobacter spp* en agar guayaba agria.



Figura 5. *Enterobacter spp* en agar jugo vegetal.



Figura 6. *Enterobacter spp* en agar nutritivo.

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

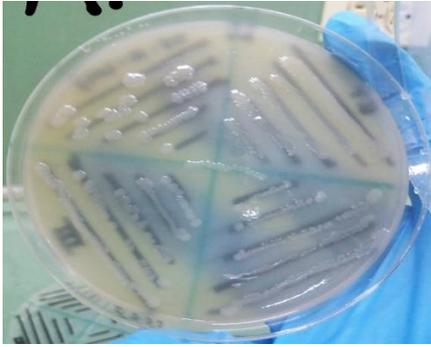


Figura 7. *Enterobacter spp* en agar papa.



Figura 10. *Enterobacter spp* en agar zanahoria.

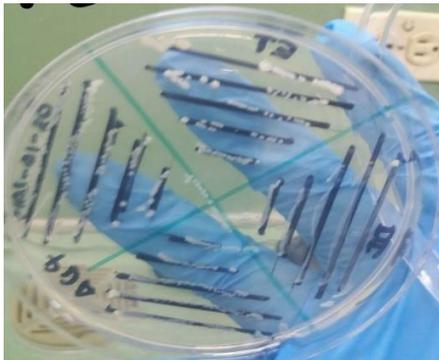


Figura 8. *Enterobacter spp* en agar PDA (Control).



Figura 9. *Enterobacter spp* en agar piña.

Tabla 1. Relación entre los diferentes medios de cultivo naturales fabricados y la productividad obtenida por el método ecométrico para *Enterobacter spp*

Medio de cultivo natural	ICA
Agar nutritivo	5.0 – ALTA
PDA	5.0 – ALTA
Arroz	3.2 – MEDIA
Avena	4.4 – MEDIA
Corazón de la piña	5.0 – ALTA
Guayaba agria	3.6 – MEDIA
Hoja de maíz	3.6 – MEDIA
Jugos vegetales	4.0 – MEDIA
Papa	4.6 - ALTA
Vaina de frijol	4.6 – ALTA
Zanahoria	4.8 – ALTA

Enterobacter spp No presenta exigencias nutricionales, por los cuales crece y se recupera en medios basales como agar nutritivo o selectivos y diferenciales como el agar EMB (Eosina azul de metileno), para su aislamiento e identificación a nivel de laboratorio [5].

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

Los agares nutritivo y PDA (*Potato Dextrose Agar*) presentan altos valores comerciales oscilando en cifras entre 120 – 150 euros, que representan en promedio entre 240 y 300 mil pesos colombianos, los cuales contendrían 500g de producto para alrededor de 7 a 20 litros de medio de cultivo preparado. Estos son usados para la recuperación e aislamiento de organismos no exigentes nutricionalmente [6, 7].

Los medios de cultivo naturales han sido uno de los ámbitos mas explorados en el campo de los agares, la recuperación y aislamiento de microorganismo de interés. Por ejemplo, el agar jugo de tomate es usado para el aislamiento de bacterias pertenecientes al genero *Lactobacillus* [8]. De allí radica la necesidad de buscar alternativas más económicas que aseguren una efectividad tan alta como la de un medio comercial.

No existe mucha información en la literatura que provea un dato exacto acerca del estudio de algún microorganismo en variados medios naturales. Este es un factor que abre grandes campos de investigación para diseño, innovación y creación de nuevos medios de cultivo. Generando la posibilidad de realizar un estudio de mercado para la producción de medios de cultivo de origen natural fabricados con desechos agroindustriales y así darle valor agregado a los residuos y termine en un emprendimiento de base tecnológica.

En general la materia prima utilizada como corazón de piña, cascara de zanahoria, vaina de frijol, hojas de maíz entre otros, le proporcionaron al *Enterobacter spp* los nutrientes mínimos necesarios para su crecimiento y desarrollo. Todos estos contienen cantidades considerables de glucosa (Molécula energética útil para la gran mayoría de organismos tanto micro como macro), vitaminas, macroelementos y minerales fundamentales para el metabolismo de los microorganismos. El único inconveniente es la necesidad de analizar el pH final, y neutralizarlo para facilitar aún más el crecimiento de los microorganismos, es ampliamente conocido que el pH es un factor limitante para el crecimiento de los mismos [9].

CONCLUSIONES

- Los medios de cultivos naturales son alternativas frente a los altos precios de los comerciales que permiten la recuperación y aislamiento de un microorganismo para su estudio.
- Uno de los principales inconvenientes presentes en los medios de cultivo naturales es que se desconoce su composición y proporción química exacta.

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

- Los medios de cultivo fabricados con corazón de piña, cascara de zanahoria, vaina de frijol y hojas de maíz son promisorios para un emprendimiento de base tecnológica.

BIBLIOGRAFIA

[1] López Tévez, L. and Torres, C. (2006). *Medios de cultivo*. [online] Universidad Nacional del Nordeste. Available at: <http://www.biologia.edu.ar/microgener-al/tp4.pdf> [Accessed 3 Nov. 2017].

[2] Rogers, K. (2017). *Enterobacter | Description, Characteristics, Species, & Drug Resistance*. [online] Encyclopedia Britannica. Available at: <https://www.britannica.com/science/Enterobacter> [Accessed 5 Nov. 2017].

[3] MONICA B. WACHSMAN. MARÍA CLAUDIA DEGROSSI. CATALINA ROMANO. GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS DE LABORATORIO. 2012. [cited 06 marzo 2018] Disponible en <http://repositorio.ub.edu.ar/bitstream/handle/123456789/3303/3943%20-%20microbiolog%C3%ADa1%20-%20waschman2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>,

[4] Laneri, J. and Cásas, R. (2001). *Manual de Procedimientos Para El Control Microbiológico de Alimentos*. [online] Google Books. Available at: <https://books.google.com.co/books?id=HcsOAQAAIAAJ&lpg=PA13&dq=me>

[todo%20ecometrico&hl=es&pg=PA13#v=onepage&q&f=false](#) [Accessed 5 Nov. 2017].

[5] Lopardo H. Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Enterobacterias. 1st ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2016.

[6] CM0309, W.L. Nutrient Agar (Medium) | Oxoid - Product Detail [Internet]. Oxoid.com. 2017 [cited 19 November 2017]. Available from: http://www.oxoid.com/UK/blue/product_detail/product_detail.asp?pr=CM0309&sec=&org=82&c=UK&lang=EN

[7] CM0139, Potato Dextrose Agar | Oxoid - Product Detail [Internet]. Oxoid.com. 2017 [cited 19 November 2017]. Available from: http://www.oxoid.com/uk/blue/product_detail/product_detail.asp?pr=CM0139&sec=&org=96&C=uk&lang=EN

[8] CM0113, Tomato Juice Agar | Oxoid - Product Detail [Internet]. Oxoid.com. 2017 [cited 19 November 2017]. Available from: http://www.oxoid.com/uk/blue/product_detail/product_detail.asp?pr=CM0113&c=uk&lang=EN

[9] Varela G, Grotiuz G. Fisiología y metabolismo bacteriano [Internet]. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. 2016 [cited 19 November 2017]. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>

¹Estudiantes de III semestre. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.

²Docente. Programa de Microbiología. Universidad Libre Seccional Pereira.