



Artículo Original

Efecto del pH en el crecimiento de *Bacillus* sp. en un medio con melaza de caña

Effect of pH on the growth of *Bacillus* sp in a culture medium with cane molasses

Lic. Dania Rosabal López, Doctora en Ciencias Biológicas, Profesora Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Manzanillo. Granma. Cuba. rosabaldania@gmail.com 

Dr. M.V. Michel Sola Vega. UEB Manzanillo, Empresa para el Cultivo del Camarón. Manzanillo. Granma. Cuba. dircontrol@eccam.alinet.cu 

Lic. Sheila Virgen Pons Delgado, Máster en Longevidad Satisfactoria, Profesora Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Manzanillo. Granma. Cuba. sheilapons@infomed.sld.cu 

Recibido: 6 de mayo 2021 | **Aceptado:** 9 de noviembre 2021

Resumen

Un número creciente de probióticos comerciales están siendo ofrecidos para satisfacer la demanda de prácticas ambientalmente amigables para el desarrollo de una acuicultura sustentable. Uno de los géneros de bacterias más frecuentemente utilizadas con fines probióticos en la acuicultura es *Bacillus*. El establecimiento de un sistema de cultivo para el crecimiento de *Bacillus* spp. hasta las concentraciones óptimas permitiría su aplicación como probiótico en la producción de larvas de camarón aumentando el porcentaje de supervivencia y la calidad del producto final. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del pH en el crecimiento de *Bacillus* sp en un medio de cultivo con melaza y salvado de arroz. Para la selección de los componentes del medio de cultivo utilizado para estimular el crecimiento bacteriano fueron probados dos bioensayos con tres réplicas cada uno. El primer bioensayo, el medio de cultivo estuvo compuesto por melaza, salvado de arroz, urea e hidróxido de sodio como modulador del pH. El segundo bioensayo estuvo compuesto por los mismos componentes que el primero, excepto por melaza. Posteriormente, se realizaron nueve experimentos del bioensayo 1 para comprobar la relación entre el crecimiento bacteriano y el pH. El rango de pH varió entre 4.2 y 5.8. El aumento del pH tiene un efecto positivo en el crecimiento de *Bacillus* sp. El medio de cultivo compuesto, principalmente, por melaza, salvado de arroz y urea estimula el crecimiento bacteriano.

Palabras claves: Bacillus; melaza de caña; efecto del pH; crecimiento bacteriano; probiótico

Abstract

A large amount of commercial probiotics is offered to the aquaculture for the development of sustainable practices. One of the genera most usable in aquaculture as probiotic is *Bacillus*. The establishment of culture system for the *Bacillus* sp. Growth until optimal concentrations would allow its application as probiotic in the production of shrimp larvae, enhancing the survival and the quality of the final product. The aim of this work is to evaluate the effect of pH in the growth of *Bacillus* sp. in a culture medium with cane molasses. For the selection of the medium components were tested two bioassays with three replicates each one. The first bioassay was composed by cane molasses, rice dust, urea and sodium hydroxide as pH modulator. The second one had the same components, except for the cane molasses. Lately, nine experiments of the first bioassay were carried out for to test the relationship between bacterial concentration and pH. The range of pH varied among 4.2 and 5.8. The increasing of pH has a positive effect on growth of *Bacillus* sp. The culture medium composed by cane molasses, rice dust and urea stimulate the bacterial growth.

Keywords: *Bacillus*; cane molasses; probiotic; pH effect; bacterial growth

Introducción

La producción de alimentos es una prioridad a nivel mundial; dentro de esta, la acuicultura es considerada una actividad exitosa generadora de alimentos. Los sistemas de cultivo con alta densidad de animales provocan el rápido deterioro de la calidad del agua, lo cual induce estrés y un aumento en la prevalencia de enfermedades en los camarones Cuéllar (2008); Morale, Ruiz, Pereira, Solís, y Conroy (2011). Por otro lado, los residuos liberados en los efluentes del cultivo pueden estimular la eutrofización en las áreas costeras, generando serios problemas ecológicos en el medio ambiente.

Prácticas ambientalmente amigables para el desarrollo de una acuicultura sustentable demandan el uso probióticos, los cuales son ofrecidos por los productores a escalas comerciales en un número cada vez mayor. Como aspectos positivos del uso de probióticos se encuentran: mejoras en las tasas de crecimiento, alta supervivencia, fortalecimiento del sistema inmunológico de los animales y mejoras en la calidad del agua Gatesoupe (2000). Las cepas bacterianas para la elaboración de probióticos deben reunir una serie de requisitos entre los que se destacan: potencial competitivo para la colonización tanto en el ambiente como en el tracto digestivo, capacidad de incremento de la inmunidad, ser inocuas para los animales y el

hombre, alcanzar un elevado crecimiento y actuar en la reducción del amonio y la materia orgánica (Díaz y Montes, 2012).

Uno de los géneros de bacterias más frecuentemente utilizadas con fines probióticos en la acuicultura es *Bacillus*. Este género comprende diversas especies de importancia industrial que por lo general se utilizan en la industria de la fermentación (Fujinami y Fujisawa, 2010).

Las bacterias del género *Bacillus* forman endosporas, que se caracterizan por formar una pared gruesa que rodea su ADN y otras estructuras celulares internas. Este rasgo las hace resistentes e inmunes a temperaturas extremas, químicos, factores ambientales e incluso algunos tipos de radiación, por tanto, se pueden utilizar en procesos industriales. Las bacterias tienen gran capacidad de mutación genética por lo que se utilizan en experimentos en el laboratorio (Ashlee, Losick y Kolte, 2008).

Las bacterias heterótrofas del género *Bacillus* son capaces de oxidar el amonio, el nitrito y el nitrato para obtener energía, promover el crecimiento y elevar la respuesta inmune de los animales Yang, Wang, Zhang y Zhou (2011). Los probióticos comerciales son costosos en el mercado internacional y su eficacia ha sido severamente cuestionada Villamil y Martínez (2009), por lo que muchas empresas que cultivan camarones buscan alternativas en cepas bacterianas aisladas del medio que los rodean.

El establecimiento de un sistema de cultivo para el crecimiento bacteriano hasta las concentraciones óptimas permitiría su aplicación como probiótico en la producción de larvas de camarón, aumentando el porcentaje de supervivencia y la calidad del producto final. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del pH en el crecimiento de *Bacillus* sp en un medio de cultivo con melaza de caña.

Materiales y Métodos

Población y muestra

El trabajo se desarrolló desde febrero hasta junio de 2020, en la Unidad Empresarial de Base (UEB) Manzanillo (Fig. 1), perteneciente a la Empresa para el Cultivo del Camarón. El centro se encuentra ubicado en la costa sur del Golfo del Guacanayabo, en la región oriental de Cuba. Las aguas de esta zona costera son ricas en nutrientes y sedimentos, la marea es semidiurna pura, con vientos fuertes y persistentes del sur al suroeste (Servicio Hidrográfico y Geodésico de la República de Cuba, 2008). La conductora de agua se adentra 700 m en el mar y la toma se realiza durante la noche.

Crecimiento de *Bacillus* sp

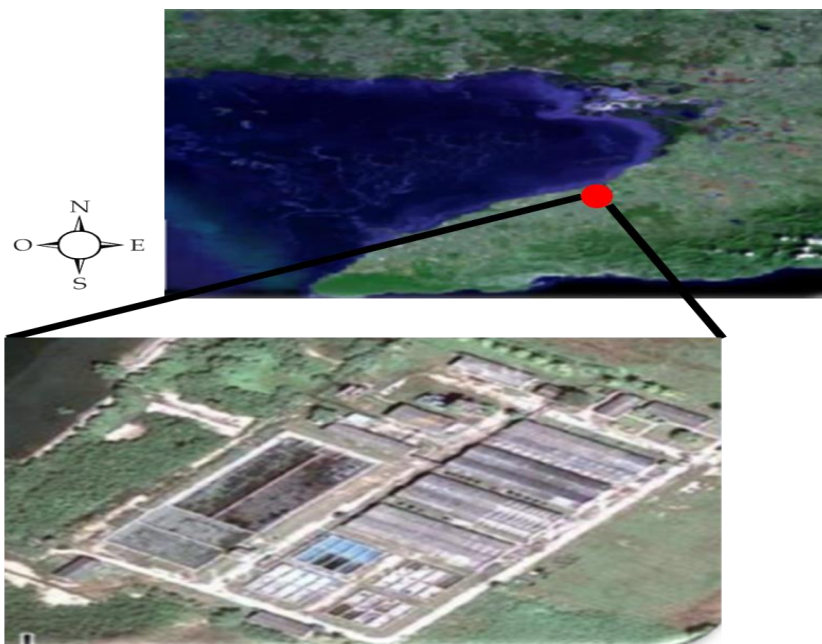


Figura 1. Ubicación geográfica de la UEB-Manzanillo, perteneciente a la Empresa para el Cultivo del Camarón

Para el diseño del experimento se aislaron cepas de bacterias del agua de cultivo de larvas de camarón producidas en la UEB Manzanillo. El medio de cultivo utilizado para el aislamiento fue Agar Triptona Soya (TSA) y las muestras fueron sembradas empleando la técnica de agotamiento por estrías. Se realizó una descripción morfológica de cada una de las cepas en base a la forma, borde, superficie, tamaño, consistencia, color y elevación de las colonias. Esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento del cultivo, incubados a 28 °C. Se aplicó la coloración de Gram para determinar la morfología de las células bacterianas, mediante observación microscópica a 100x y 1000x. Se seleccionaron las cepas Gram positivas, con forma de bacilos y que forman endospora. De las cepas aisladas se seleccionó la de mayor concentración. En dicha cepa fueron comprobadas las características bioquímicas del género *Bacillus* (Phatthongkleang, Sangnoi, O-Thong, Uppabullung y Keawtawee, 2019).

Para la selección de los componentes del medio de cultivo utilizado y la estimulación del crecimiento bacteriano fueron probados dos bioensayos con tres réplicas cada uno. La composición del bioensayo uno fue de 6 mL de melaza, 12 g de salvado de arroz, 1.5 mL de hidróxido de sodio, 2 g de urea y 1 L de agua de mar estéril a 30 ‰. Para el bioensayo dos se emplearon los mismos componentes y cantidades, excepto la melaza. A cada medio de cultivo se le añadió 100 mL de inóculo con una concentración bacteriana de 10^9 . El pH inicial de los cultivos fue de 6. Los experimentos fueron realizados con aireación permanente. Se efectuaron

siembras microbiológicas en TSA para confirmar la concentración bacteriana de células viables alcanzada en el inóculo.

Posteriormente, se realizaron nueve experimentos del bioensayo uno para comprobar la relación entre el crecimiento bacteriano y el pH. El rango de pH varió entre 4.2 y 5.8. Se aplicó la prueba Regresión lineal contenida en el paquete estadístico STATGRAPHIC Centurion v 2.0, $p < 0,05$. La concentración bacteriana se registró mediante el conteo de células en cámara de Neubauer. Además, se realizaron siembras microbiológicas en TCBS para comprobar el crecimiento de *Vibrio* y en TSA para confirmar la concentración bacteriana de células alcanzada al cabo de las 24 h.

Análisis de los resultados

En los dos bioensayos se comprobó aumento de la concentración bacteriana a las 24 h (Fig. 2). Sin embargo, se obtuvo el mayor crecimiento bacteriano en el bioensayo uno, lo que permitió seleccionar la composición óptima para la obtención del medio de cultivo: melaza, salvado de arroz, hidróxido de sodio y urea (Fig. 3). En general, las concentraciones bacterianas alcanzadas oscilaron entre 2.4 y 6.4×10^8 UFC/mL. No obstante, se pudo constatar un mayor crecimiento en los experimentos correspondientes al bioensayo uno que estuvo compuesto por melaza y salvado de arroz.

Este resultado confirma la eficiencia de las bacterias en el consumo de la materia orgánica aportada en este medio de cultivo. Según Jahns y Kaltwasser (1989), la mayor actividad de captación de la urea se observa durante el crecimiento exponencial en especies del género *Bacillus*. Este género está compuesto por especies heterótrofas, aerobias estrictas o facultativas (Yang et al., 2011). Sus capacidades en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fosfatos han incentivado el desarrollo de numerosas investigaciones que buscan dilucidar los procesos metabólicos por medio de los cuales estos microorganismos realizan dichas actividades Cortés, García, Pedroza, Martínez y Gutiérrez (2012), Corrales, Caycedo, Gómez, Ramos y Rodríguez (2017). El género aporta un amplio perfil de diversidad fisiológica (acidofilia, alcalofilia, psicofilia, termofilia y parasitismo) por lo que es de gran interés tanto en la acuicultura como en la agricultura sostenibles (Restrepo, 2015).

En el caso de la cepa estudiada crecida con la formulación optimizada, el pH del medio disminuyó en ± 2.0 , lo cual coincide con los valores reportados por diferentes autores cuando el cultivo llega a la fase de desaceleración o estacionaria en el estudio cinético de crecimiento (Lim, Rahim, Ho y Arbakariya, 2007).

Crecimiento de *Bacillus* sp

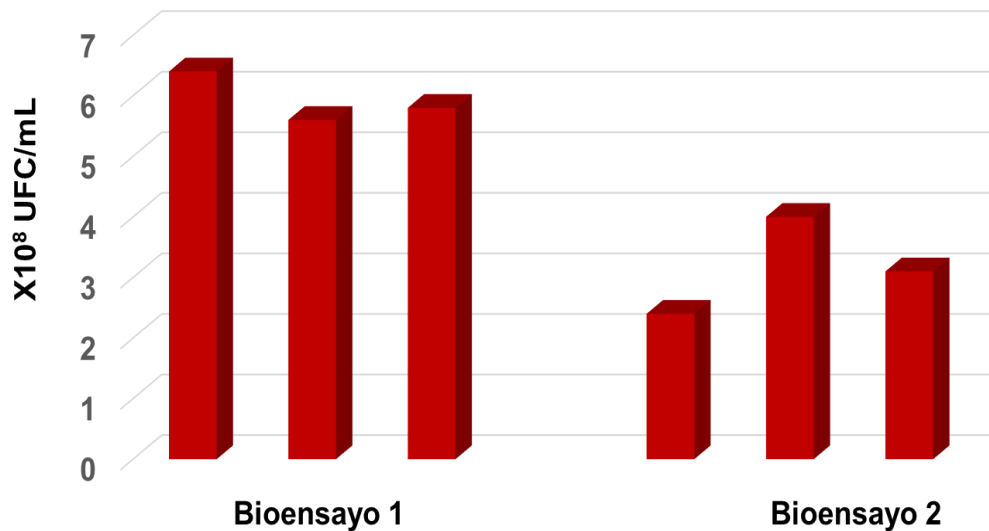


Figura 2. Crecimiento bacteriano en el medio de cultivo a las 24 h.



Figura 3. Cultivo bacteriano del bioensayo 1 a las 24 h.

El pH > 5.5 modulado por la concentración de hidróxido de sodio aportada en el preparado es el óptimo para el crecimiento de *Bacillus* spp (Tabla 1). Se comprobó que el aumento del pH incrementa el crecimiento bacteriano alcanzado a las 24 h (Coeficiente de correlación= 0.89; $p=0.001$). Este resultado concuerda con el obtenido por Jiménez, Valdés, Olalde, Abraham, García (2018).respecto al pH óptimo para el crecimiento de *Bacillus* spp. Estos autores reportan el pH óptimo en un rango de 5 a 8, el cual varía de una cepa a otra, en dependencia de sus

requerimientos. *Bacillus* es un género muy asociado a pH neutros, sin embargo, Calvo y Zúñiga (2010) encontraron que las cepas de consistencia seca poseen un mejor nivel de crecimiento a pH ácidos.

La descomposición bacteriana de la materia orgánica está influenciada por factores tales como: temperatura, pH y naturaleza de la materia orgánica. La descomposición es mayor cuando la temperatura y el pH se incrementan, respectivamente). Talavera, Zapata, y Sánchez (1996). La captación de la urea y la actividad de la ureasa en especies del género *Bacillus*, también se encuentran influenciados por el pH (Jahns y Kaltwasser, 1989).

El género *Bacillus* produce fitasas alcalinas que determinan su capacidad de solubilizar el fósforo. Estas enzimas actúan a un pH que va de neutro a básico (Corrales *et al.*, 2017). La capacidad hidrolítica que posee *B. subtilis* permite la reducción del ácido fítico impidiendo que se presente quelación de los minerales que se encuentran en la biomasa y así se evita que el fósforo y las diferentes trazas de elementos se vuelvan insolubles y se precipiten. En esto radica la importancia de la acción de estas bacterias frente al ciclo del fósforo (Haefner Knietzsch, Scholten, Braun, Lohscheidt, Zelder, 2005).

Concentración bacteriana (x10 ⁸ UFC/mL)	pH
6.2	4.2
5.2	4.3
5.6	4.4
8	4.8
7.4	4.9
8.4	5.1
8.1	5.6
10	5.8
8.8	5.6

Tabla 1. Concentración de *Bacillus* sp a diferentes valores de pH.

La composición del medio seleccionado para el cultivo bacteriano favoreció el crecimiento de *Bacillus* sp. La melaza proviene de la separación del azúcar crudo en el proceso de elaboración del azúcar refinado. Los azúcares que constituyen la melaza incluyen: sacarosa, glucosa, levulosa, maltosa, lactosa y azúcares reductoras (Talavera *et al.*, 1996). La melaza de caña ha

Crecimiento de *Bacillus* sp

sido empleada eficientemente como sustrato iniciador para el incremento de otros géneros de bacterias, como *Lactobacillus* (Ossa, Vanegas y Badillo, 2010).

El control microbiológico en TCBS fue negativo para todos los experimentos, lo cual confirma la inocuidad del producto. La concentración bacteriana registrada entre el conteo en cámara de Neubauer y la siembra en TSA fue similar.

Conclusiones

1. El aumento del pH tiene un efecto positivo en el crecimiento de *Bacillus* sp.
2. El medio de cultivo compuesto, principalmente, por melaza, salvado de arroz y urea estimula el crecimiento bacteriano.

Referencias bibliográficas

- Ashlee, M., Losick, E.R., Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Calvo, P. y Zuñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39
- Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S. y Rodríguez, J. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, 15 (27), 45-65.
- Cortés, A., García, J., Pedroza, A.M., Martínez, M. y Gutiérrez, V. (2012). *Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa*. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 43-52.
- Cuéllar, J. (2008). *Enfermedades por parásitos*. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (Eds.). (2008). *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Díaz, M.A. y Montes, M. (2012). *Efecto de probiótico a base de Bacillus sp., Enterococcus sp., Pediococcus sp. y Lactobacillus sp., en la sobrevivencia y crecimiento larval del camarón blanco Litopenaeus vannamei, en la estación de maricultura los Cóbano, Sonsonate*. [Tesis en opción al título de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia]. Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Zootecnia.
- Fujinami, S. y Fujisawa, M. (2010). *Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future*. *Environmental Technology*, 31, 845-856.

- Gatesoupe, F.J. (2000). *Uso de probióticos en acuicultura*. En: Civera, R., Pérez, C.J., Ricque, D. y Cruz, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. La Paz, B.C.S., México.
- Haefner S., Knietsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. (2005). *Biotechnological production and applications of phytases*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 588-597.
- Jahns, T. y Kaltwasser, H. (1989). *Energy-dependent uptake of urea by Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 48(1), 7-13.
- Jiménez, R., Valdés, S.E., Olalde, V., Abraham, R., García J.L. (2018). Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 256-275.
- Lim, C., Rahim, R., Ho, Y. y Arbakariya, B. (2007). *Optimization of growth medium for efficient cultivation of Lactobacillus salivarius using response surface method*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 3(2), 41-47.
- Morales, M.S., Ruiz, A., Pereira, A., Solís, V. y Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica FCV-Luz* 21 (5): 434-446.
- Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A. (2010). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de Lactobacillus plantarum*. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 13 (1): 97-104, 2010
- Phatthongkleang, T., Sangnoi, Y., O-Thong, S., Uppabullung, A. y Keawtawee, T. (2019). *The efficiency of Bacillus ssp to remove ammonia in shrimp aquaculture*. *Wichcha Journal*, 38 (1), 1-16.
- Restrepo, G., Marulanda, S., de la Fe y Díaz, A., Baldani, L., Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras defosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CE-NIC*, 46(1), 63-76.
- Servicio Hidrográfico y Geodésico de la República de Cuba (2008). *Tabla de Mareas de las Costas de Cuba*. Edimar, Agencia de Cartografía Náutica.
- Talavera, V., Zapata, L.M. y Sánchez, D. (Eds). (1996). *Las bacterias y la descomposición orgánica en los estanques de cultivo de camarón mar*. Boletín Nicovita.
- Villamil, L. y Martínez, M.A. (2009). *Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo del camarón: Reseña*. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 38 (2).

Crecimiento de *Bacillus* sp

Yang, X.P.; Wang, S.M.; Zhang, D.W. y Zhou, L.X. (2011). *Isolation and nitrogen removal characteristic of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium Bacillus subtilis* A1. *Bioresource Technology*, 102 (2), 854-862.