

Composición química de un medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) y su relación con la nutrición de los microorganismos ruminales

Chemical composition of a culture medium from bitter guava (*Psidium araca*) and its relation to the ruminants microorganisms nutrition

Cecilia Lara Mantilla¹

Resumen

En el presente trabajo se realiza una comparación entre los resultados obtenidos de la caracterización química a un nuevo medio de cultivo modificado preparado a partir del jugo de guayaba agria (*Psidium araca*) al 25% p/v, utilizado para el aislamiento y mantenimiento de microorganismos ruminales y del estiércol, y su relación nutricional. Los resultados encontrados presentan al medio de cultivo modificado como una alternativa para el desarrollo y crecimiento de esta microbiota.

Palabras clave: microorganismos ruminales, medio de cultivo, guayaba agria (*Psidium araca*).

Abstract

The present work compares the results obtained from the chemical characterisation of a new modified culture medium prepared from 25% p/v bitter guava (*Psidium araca*) juice used for isolating and maintaining microorganisms from rumen and dung and their nutritional relationship. The results suggested that the modified culture medium could be a useful alternative for this microbiota's development and growth.

Key words: Ruminal microorganisms, medium of culture, Guava (*Psidium araca*)

Recibido: noviembre 20 de 2006

Aprobado: noviembre 12 de 2008

1 Química; MSc; Ph. D.; directora Grubiodeq. Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba, km 3 vía Cereté. Montería, Córdoba. Colombia. lara_mantilla_cecilia@hotmail.com, clara@sinu.unicordoba.edu.co

Introducción

En el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos se han empleado medios de cultivo que aportan energía y elementos necesarios para la síntesis de los constituyentes celulares. Los medios de cultivo utilizados para las especies microbianas ruminales han sido preparados a partir del contenido ruminal clarificado enriquecido con fuentes de energía (carbohidratos: celobiosa, glucosa, almidón, etc.), minerales, agentes reductores y sistema buffer para mantener el pH; también han sido empleados medios de cultivo a los cuales no se les adiciona contenido ruminal clarificado pero se les agrega la totalidad de los componentes químicos requeridos por esta microbiota (Caldwell et al., 1966; Bryant, 1962); en ambas preparaciones se hace necesaria la adición, ya sea parcial o total, de sustancias químicas haciéndolas más costosas y dispendiosas en su elaboración; por otra parte, el uso del contenido ruminal en los medios de cultivo resulta molesto por el olor desagradable que despiden.

La posibilidad de evaluar medios de cultivo a partir de sustratos altamente nutricionales, que no representen un elevado costo, se hace necesaria para minimizar la demanda de los medios preparados a partir de sustancias químicas. En este sentido, y como contribución al aislamiento, multiplicación y mantenimiento de la microbiota ruminal para su estudio, se desarrolló un nuevo medio de cultivo diferente a los convencionales, utilizando como sustrato la fruta guayaba agria (*Psidium araca*); los resultados obtenidos demostraron que el medio de cultivo preparado con fruta al 25% p/v y ajustando el pH a un valor de 6,3 con solución de bicarbonato de sodio al 10%, sin adición de otras sustancias químicas, fue apropiado para el buen desarrollo, crecimiento y mantenimiento de bacterias y levaduras de rumen y del estiércol excluyendo a las celulolíticas estrictas (Lara y Chalela, 2002a; Lara Mantilla, 2005).

La guayaba agria (*Psidium araca*) es una fruta tropical promisoría muy característica de la región de Córdoba (Colombia); tiene una

producción de 1200 t/año (Gobernación de Córdoba, 2006) y, a pesar de ello, la fruta tiene una baja explotación comercial, solamente se le conocen usos en jugo y como fruta fresca. La utilización de este recurso propio para la elaboración de medios de cultivo es atractiva teniendo en cuenta que el precio de 1 kg de medio de cultivo comercial preparado a partir de sustancias químicas oscila entre \$1.000.000,00 pesos (Merck, 2002), siendo muy significativa en cuanto al medio de guayaba agria que proviene de un cultivo de cosecha permanente en la región a un precio en el mercado de \$2000,00 / kg (Sipsa, 2008).

Teniendo en cuenta la subutilización que se le ha dado a esta fruta, y sus grandes ventajas productivas y económicas con una nueva aplicación como medio de cultivo, en el presente trabajo se revisan algunos aspectos relacionados con la preparación del medio de cultivo y su caracterización química, y se hace una comparación de los nutrientes encontrados en el medio a partir de guayaba agria 25%, p/v y un medio tradicional, para finalmente establecer una relación con la nutrición de la microbiota ruminal estudiada.

Materiales y métodos

Microorganismos utilizados: los microorganismos empleados correspondieron a bacterias tipo *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp*, *Ruminococcus spp* y levaduras de los géneros *Saccharomyces spp* y *Debaryomyces spp*, aisladas del contenido ruminal y del estiércol de vacuno raza Romosinuano (oriundos del departamento de Córdoba, Colombia), con fístula en el rumen y alimentados con pastos propios de la misma región.

Medios de cultivo empleados: fueron utilizados dos medios de cultivo: a) Medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*); este medio modificado fue preparado a partir del jugo de la fruta al 25% p/v en agua destilada; luego de ser filtrado, su pH se ajustó en un valor de 6,3 con solución de bicarbonato

de sodio al 10% (Lara, 2005; Lara y Chalela, 2002a; Lara y Chalela, 2002b); y b) Medio de cultivo tradicional a partir de contenido ruminal clarificado, preparado utilizando contenido ruminal clarificado al 40% v/v en agua destilada y enriquecido con glucosa (0,05% p/v), celobiosa (0,05% p/v), almidón soluble (0,05% p/v), minerales (3,75% p/v), sulfuro de sodio noahidratado (0,025% p/v), Cisteína, HCl, H₂O (0,025% p/v), resarzurina (0,0001% p/v), carbonato de Sodio (0,4% p/v), y pH = 6,3 (Caldwel et ál., 1966; Dehority, 1963). Ambos medios (a y b) fueron esterilizados a 15 PSI, 121 °C, durante 15-20 minutos, y saturados de CO₂ mediante gaseado para luego ser utilizados.

Determinación de biomasa microbiana y análisis estadístico: los microorganismos seleccionados fueron crecidos individualmente en cada uno de los medios de cultivo bajo condiciones de anoxigenia y a una temperatura de incubación de 40 °C. La biomasa fue determinada por la técnica de turbidimetría usando un equipo Spectronic D a una longitud de onda de 640 nm (ensayos por triplicado).

Se llevó a cabo un análisis de varianza (Anova), y regresión múltiple según el modelo de Durbin-Watson, para comparar la incidencia de los medios sobre el crecimiento microbiano.

Análisis químico: el medio de cultivo a partir de guayaba agria (25% p/v) esterilizado fue caracterizado químicamente determinándose los siguientes parámetros según Bernal (1994): porcentaje de proteína, porcentaje de azúcares totales, porcentaje de azúcares reductores y no reductores, porcentaje de azúcares invertidos, grados Brix, pH e índice de refracción. Por absorción atómica (manual Perkin Elmer, 1984) se determinaron los elementos presentes: hierro (Fe), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y potasio(K).

Utilizando la técnica de cromatografía de gases descrita por Salanitro (1975), y adaptada a las condiciones del equipo del laboratorio se determinaron los ácidos acético y butírico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados y discusión

Biomasa microbiana y análisis estadístico

Los resultados previos obtenidos de la determinación de biomasa microbiana y análisis estadístico aplicados para observar la incidencia de los medios sobre el crecimiento de los microorganismos estudiados son reportados en el trabajo de Lara (2005); allí se muestra que el crecimiento de las bacterias y levaduras no se vio afectado por ninguno de los medios, ni por el tipo de microorganismo involucrado (valor de $P \geq 0,3914$). El análisis estadístico realizado para grupos de microorganismos por separado ($P \geq 0,2234$ bacilos, $P \geq 0,1042$ cocos y $P \geq 0,1262$ levaduras) mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes poblaciones microbianas con respecto a los medios. (El modelo estadístico dice que para un valor de $P \geq 0,10$, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las variables). Estos resultados permitieron sugerir que el crecimiento de las poblaciones microbianas estudiadas no varió con los medios de cultivo: guayaba agria y medio tradicional utilizado con contenido ruminal clarificado; en consecuencia, se asumió que la composición de los medios es semejante y ninguno de ellos influyó marcadamente en el crecimiento de los microorganismos, por tanto, las diferentes poblaciones crecen adecuadamente y se multiplican sin dificultad.

Análisis químico al medio de cultivo a partir de guayaba agria

El medio de cultivo a partir de guayaba agria (25% p/v) y esterilizado fue caracterizado químicamente. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1 (Lara, 2008).

En la preparación del medio de cultivo a partir de la guayaba agria para el aislamiento y mantenimiento de la microbiota ruminal se hizo necesario ajustar el pH en un valor de 6,3 con bicarbonato de sodio al 10% porque el pH del jugo de la fruta es muy bajo (2,29 - 3,17) y los microorganismos del rumen se ven afectados a este valor.

Tabla 1. Caracterización química al medio de cultivo líquido a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) al 25% p/v

Determinación	Valor (%)
Azúcares totales	1,00
Azúcares reductores	0,59
Azúcares no reductores	0,41
Azúcares invertidos	59,0
Proteínas	0,27
Grados Briz (° Brix)	4,8
pH	6,3
Índice de refracción	1,340
Ácido acético	0,7 mM
Ácido butírico	0,3 mM
Mg	22,12 mg/l
Ca	52,69 mg/l
Fe	9,8 mg/l
K	323,12 mg/l
Na	14,93 mg/l

mM= Milimolar

mg/l = partes por millón

% = porcentaje (% de cada componente en 100 ml de jugo de fruta al 25%)

La composición química del medio de guayaba agria indica que los microorganismos en estudio disponen de los mayores requerimientos nutricionales descritos en los trabajos de Russel (1998), Krause y Russel (1996) y Mackie (1990): a) carbohidratos, representados por azúcares totales y reductores que básicamente son todos los monosacáridos (por ejemplo, glucosa, maltosa, etc.) como fuente de energía; b) proteínas, como fuente de nitrógeno utilizada para la síntesis de biomasa microbiana; c) factores de crecimiento (ácidos acético y butírico) requeridos por algunas especies ruminales; d) minerales o elementos traza (Mg, Ca, Fe, K y Na) indispensables en la activación de las enzimas, respiración celular, entre otras. Aunque los nutrientes necesitados por las especies ruminales han sido identificados, los tipos, las cantidades y las combinaciones para optimizar

el crecimiento total constituyen motivo constante de investigación.

La composición química de los medios tradicionales descritos por Caldwell et ál. (1966) y Dehority (1963), es: medio I, con contenido ruminal clarificado, y medio II, sin contenido ruminal al que se deben adicionar todos los nutrientes (tabla 2).

El medio de cultivo tradicional utilizado en la presente investigación, y descrito en la sección de materiales y métodos, correspondió al medio I de la tabla 2. Una comparación entre los medios I y II (tabla 2) muestra que el contenido ruminal presente en el medio I proporciona principalmente proteína y hemina, haciéndose innecesaria la adición de hemina (0,0%), tripticasa (0,0%), y extracto de levadura (0,0%), al igual que factores de crecimiento importantes como los ácidos grasos volátiles (0,0%); el medio II carece de contenido ruminal, por lo que se hace necesario agregar la fuente de proteína (hemina, 0,001%, tripticasa, 0,2%, y extracto de levadura, 0,05), y factores de crecimiento de tipo orgánico (ácidos grasos volátiles 0,31%). Ambos medios requieren de la adición de fuentes de energía como los carbohidratos (celobiosa, 0,05%; glucosa, 0,05%, y almidón 0,05%) y algunas sales minerales (3,75%).

No se puede hacer una comparación directamente de los nutrientes existentes en el medio de guayaba agria (tabla 1) y en los medios tradicionales (tabla 2) para todos los componentes; se observa similitud en los valores de las fuentes de nitrógeno: 0,27% de proteína para el medio de guayaba, y 0,25% para el medio II (0,2% tripticasa y 0,005% de extracto de levadura); en el medio I la cantidad de proteína está incluida en el contenido ruminal como se explicó anteriormente. En cuanto a carbohidratos, el medio de guayaba posee un valor más elevado, 1% (azúcares totales), en comparación con un valor de 0,15% para los medios tradicionales (0,05% glucosa, 0,05% celubiosa y 0,05% almidón soluble); esto permite que las especies microbianas dispongan de una mayor

Tabla 2. Composición de los medios tradicionales modificados para aislamiento de microbios ruminales (Caldwel et ál. (1966) y Dehority (1963)

Componente	Porcentaje de nutrientes en el medio	
	Medio I	Medio II
Contenido ruminal clarificado	40,0	0,0
Glucosa	0,05	0,05
Celobiosa	0,05	0,05
Almidón soluble	0,05	0,05
Minerales	3,75	3,75
Sulfuro de sodio nonahidratado	0,025	0,025
Cisteína, HCl, H ₂ O	0,025	0,025
Resarzurina	0,0001	0,0001
Carbonato de sodio	0,4	0,4
Tripticase	0,0	0,2
Extracto de levadura	0,0	0,05
Ácidos grasos volátiles (a, p, b, isob, isov.)	0,0	0,31
Hemina	0,0	0,001
Dióxido de carbono (CO ₂) 100	100	

Minerales: sulfato de potasio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, sulfato de magnesio. Ácidos grasos volátiles: a = acético; b = butírico; p = propiónico; isob = isobutírico; isov = isovalérico.

fuerza de energía. Con respecto a las cantidades de ácidos grasos volátiles y la cantidad de elementos presentes en los medios tradicionales no se puede realizar una comparación con el medio de guayaba agria; para el caso de los ácidos grasos se determinó la presencia de dos ácidos; sin embargo, el ácido acético, que es el más utilizado por algunas de las especies ruminales (Caldwell, 1966) está presente. La producción y disponibilidad del ácido acético en el rumen depende de la dieta consumida por el animal, luego las cantidades precisas para la microbiota son difíciles de determinar; en el medio tradicional, preparado utilizando contenido ruminal clarificado, se asume que la cantidad de este ácido, al igual que otros, se encuentra en cantidades apropiadas para el desarrollo de los microorganismos. La cantidad de elementos presentes tampoco puede ser comparada;

solo se observa que el potasio se encuentra en gran cantidad en el medio de guayaba, y en los medios tradicionales los elementos están representados como sales siendo las de potasio las que se encuentran en mayor cantidad.

Aunque en la actualidad los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de los microorganismos ruminales se basan en medios de formulación tradicional descritos por Caldwell y Bryant (1966) y Dehority (1963), ya sea usando contenido ruminal clarificado, (medio I), o adicionando todos los componentes (medio II) (tabla 2), algunos géneros bacterianos son más exigentes que otros y requieren mayores cantidades de fuentes de energía así como ácidos grasos ramificados, vitaminas y minerales para su óptima actividad (Fondevilla, 1998). El conocimiento de las cantidades exac-

tas de nutrientes que permitan una actividad y crecimiento microbianos óptimo se conocen de manera particular y dependen de los tipos microbianos y de su hábitat.

Conclusiones

El medio de cultivo elaborado a partir de sustrato guayaba agria, totalmente diferente a los utilizados para esta microbiota, posee en forma natural sustancias nutricionales esenciales como son: fuentes de nitrógeno (proteínas), fuente de energía (carbohidratos) y factores de crecimiento (ácidos grasos volátiles: acético y butírico y elementos presentes), que les permiten un buen desarrollo y crecimiento; se propone como medio alternativo capaz de competir en sus beneficios nutricionales con medios tradicionales y de composición química teniendo la ventaja de ser mucho más barato.

La utilización de materias primas propias de la región de Córdoba se convierte en una fortaleza para enriquecer, aprovechar y aportar estrategias de sostenimiento que tienen un componente económico muy importante.

Referencias bibliográficas

- Bernal, I. 1994. Análisis de alimentos. Academia Colombia de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Colombia.
- Bryant, M. P.; Robison, I. M. 1962. Some nutritional characteristics of predominant cultural ruminal bacteria. *J Bacteriology* 4: 605-614.
- Caldwell, D.; Bryant, M. P. 1966. Medium without Rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Applied Microbiology* 14 (5): 794-801.
- Dehority, B. A. 1963. Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from *in vitro* rumen fermentations. *J. Dairy Sci.* 46:217-222.
- Elmer Perkin. 1984. Manual del equipo.
- Fondevilla, M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Rev Fac (LUZ)* 1 (87): 106.
- Krause, D. O.; Russel, J. B. 1996. **Symposium: Ruminant Microbiology: How many Bacteria are here?** *J. Dairy Sci.* 79: 1467-1475.
- Gobernación de Córdoba. Secretaría de Desarrollo Económico y Agroindustrial. Documento Excel: Evaluaciones agropecuarias 2001-2006. Departamento de Córdoba.
- Lara, C.; Chalela, G. 2002a. Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales. *Memorias III Congreso Internacional de Microbiología Industrial*, Bogotá, mayo de 2002; *Memorias I Congreso Nacional de Biotecnología*, Bogotá, junio de 2002.
- Lara, C., y G. Chalela. 2002b. Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales. *Archivos de Zootecnia* 51(196): 404-408.
- Lara, C. 2005. Evaluación de biomasa ruminal en el medio de guayaba agria. *Archivos de Zootecnia* 54 (205): 112-116.
- Lara, C. 2008. Análisis químico del medio de cultivo: *Psidium araca* al 25% p/v. *Rev Archivos de Zootecnia* 57 (217): 79-82.
- Mackie, R. 1990. **Symposium: Rumen Microbial Ecology and Nutrition.** *J Dairy Sci* 73: 2971-2985.
- Merck. *Microbiology Manual* 2002. Disponible en <http://service.merck.de/microbiology/start.html>
- Russell, J. B.; Strobel, H. J.; Martin, S. A. 1990. Strategies of nutrient transport by ruminal bacteria. *J Dairy Sci* 73: 2996-3012.
- Russell, J. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrates. *J Anim Sci* 76: 1955-1963.
- Salanitro, J. P. 1975. Quantitative Method for the Gas-Chromatography Analysis of Short-Chain Monocarboxylic and Dicarboxylic Acids in Fermentation Media. *Applied Microbiology* 29 (3): 374-378.
- Sistema de información de precios del sector Agropecuario (Sipsa), Corporación Colombiana Internacional (CCI). 2008. *Boletín Semanal* 13 (43), octubre 18 al 24.