

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efecto de los Medios de Cultivo y pHs en la Reproducción In-vitro de *Brevibacillus brevis*.

Por:

**DAVID BLADIMIR HERNÁNDEZ MÉNDEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Efecto de los Medios de Cultivo y pHs en la Reproducción In-vitro de *Brevibacillus*  
*brevis*.

Por:

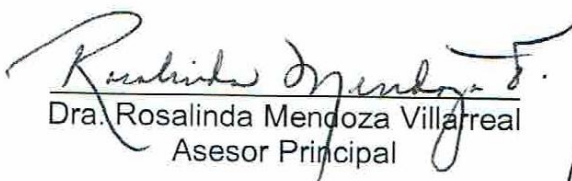
**DAVID BLADIMIR HERNÁNDEZ MÉNDEZ**

TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal  
Asesor Principal

  
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez  
Coasesor

  
Dr. Armando Hernández Pérez  
Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Porque tu amor y misericordia hacia mí no tienen fin, siempre estuviste, estas y estarás a mi lado porque me amas como a nada ni nadie en este mundo. Me has permitido ver la vida a través de tus ojos llenos de inteligencia y sabiduría, quitaste el velo que me cubrían los ojos para ver y resolver la ecuación que me llevará al éxito. Gracias mi Dios porque con tu ayuda, en este momento he resuelto una parte de la ecuación y me seguirás ayudando hasta conseguir lo que deseo. Sin ti Dios no soy nada.

### **A mi ALMA MATER**

Gracias por haberme proporcionado las herramientas para forjar mi carácter profesional y por ti he establecido mis planes y objetivos en la vida.

### **A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal**

Por haberme apoyado y aceptado como su tesista incondicionalmente para la elaboración de este proyecto.

### **Al Dr. Armando Hernández Pérez**

Gracias por tu apoyo en la corrección de los datos de esta investigación y la expresión de los mismos.

### **Al Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez**

Por el valioso tiempo que brindó en la revisión de esta investigación.

### **Al Ing. Uldarico Bigurra Quintero**

Porque siempre me dispuso de su tiempo para enseñarme los pasos de la parte experimental de este proyecto de investigación.

**Al Ing. Marco Villegas Olguín**

Gracias por haberme apoyado siempre en la parte gramatical de este trabajo de investigación y ser persistente animándome a dedicarle tiempo para la redacción de este trabajo.

**Al M.C. José Rafael Paredes Jácome**

Porque siempre estuviste dispuesto a acomodar y correr los datos de esta investigación.

**A la Ing. Martina Casillas de la Cruz**

Porque siempre estuviste presente en los momentos que necesitaba materiales de laboratorio.

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme regalado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.*

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2. Hipótesis .....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Bacteria.....	4
2.2. Identificación bacteriana .....	4
2.3. Generalidades del género <i>Bacillus spp.</i> .....	6
2.4. Generalidades de <i>Brevibacillus brevis</i> ( <i>Bacillus brevis</i> ).....	7
2.5. Medios de cultivo .....	7
2.5.1. Medio nutritivo de sábila y melaza (SM) .....	8
2.5.2. Medio nutritivo NFb (Nitrogen Free broth) .....	12
2.5.3. Medio nutritivo Luria Bertani (LB) .....	12
2.5.4. Efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Ubicación del experimento.....	15
3.2. Descripción del microorganismo .....	15
3.3. Reactivación del microorganismo .....	15
3.4. Prueba tinción de Gram .....	16
3.5. Preparación de medios de cultivo .....	17

3.5.1. Preparación de medio de cultivo NFb.....	17
3.5.2. Preparación de medio de cultivo sábila y melaza.....	18
3.5.3. Preparación de medio de cultivo LB.....	18
3.6. Inoculación e incubación del microorganismo.....	18
3.7. Diluciones.....	19
3.8. Tratamientos.....	19
3.9. Diseño experimental.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo y pH.....	21
4.2. Efecto de la interacción del pH y los medios de cultivo.....	23
5. CONCLUSIONES.....	26
6. LITERATURA CITADA.....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios y ejemplos metodológicos aplicados a la identificación bacteriana. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Componentes químicos de la planta de <i>Aloe vera</i> .....	9
<b>Tabla 3.</b> Composición de la melaza de caña de azúcar. ....	11
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y cantidades necesarias para elaborar 1 L de medio de cultivo NFb. ....	17
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos utilizados para evaluar los diferentes medios de cultivo con sus respectivos pH.....	19
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza para el crecimiento de <i>B. brevis</i> .....	21
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los medios de cultivo y pH sobre el crecimiento de <i>B. brevis</i> . 23	



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imágenes de <i>B. brevis</i> obtenidas con un microscopio óptico a 40x (a) y 100x (b).....	16
<b>Figura 2.</b> Interacción entre medios de cultivo y pH en relación a la reproducción del <i>B. brevis</i> . .....	25

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos procariotas y existen varias maneras de clasificarlas; por ejemplo, según su forma se clasifican en: cocos (esféricos), espirilos (en forma de espiral) y bacilos (bastones); según su óptimo de temperatura en: termófilas (55 °C), mesófilas (30 °C) y psicrófilas (15 °C); según el pH en el que se desarrollan: acidófilas, neutrófilas y basófilas; según la estructura de su pared: Gram positivas y Gram negativas; según su requerimiento de oxígeno: aerobias y anaerobias (Mollinedo y Gonzáles, 2014). Los requerimientos para el crecimiento bacteriano pueden dividirse en dos categorías principales: físicos y químicos. Los aspectos físicos comprenden la temperatura, el pH y la presión osmótica. Los requerimientos químicos incluyen las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánicos (Tortora *et al.*, 2007).

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae* y está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos, son anaerobios o aerobios facultativos y son de catalasa positivos. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas, sitios donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno, son también habitantes comunes de aguas frescas y estancadas (Koneman, 2008).

*Brevibacillus brevis* fue reclasificada como *Aneurinibacillus migulanus* de acuerdo a datos genotípicos y filogenéticos (Goto *et al.*, 2004). Esta especie entra en un grupo muy importante de bacterias altamente útiles como agentes de control biológico que muestra efecto antagónico frente a otros microorganismos, es productora de gramicidin S, sustancia con características de actividad antimicrobiana. Por ello se ha sugerido que el uso de esta especie (o de sus metabolitos secundarios) puede ser una alternativa o método suplementario para

la protección de las plantas contra microorganismos fitopatógenos (Reinoso *et al.*, 2012).

Tomando como referencia lo anterior es relevante indagar más sobre la especie ya que carece de estudio, por esto el objetivo del presente trabajo es evaluar la reproducción in-vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes condiciones físicas y químicas; con la finalidad de encontrar el ambiente favorable para su reproducción, hacer uso eficiente de los insumos en la preparación de medios de cultivo y, posteriormente para la elaboración de un formulado bioplaguicida que favorezca la agricultura sustentable disminuyendo así la dependencia de plaguicidas químicos.

## **1.1. Objetivos**

### 1.1.1. Objetivo general

Evaluar la reproducción in-vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes condiciones físicas y químicas.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la cinética de crecimiento de *Brevibacillus brevis* en diferentes medios de cultivo.
- Encontrar el pH óptimo para la mayor reproducción de *Brevibacillus brevis*.

## **1.2. Hipótesis**

Al menos una de las combinaciones entre los medios de cultivo y pHs logra tener mayor reproducción de la bacteria *Brevibacillus brevis*.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Bacteria

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ , son células procariotas que no presentan núcleo y poseen un solo cromosoma. Reciben su nombre según su forma, de esta manera si tienen forma alargada y cilíndrica serán denominados como *bacilos*, si tienen forma redondeada se denominarán *cocos*, los de aspecto helicoidal serán los *espirilos*, y los cortos y curvados con forma de coma se denominarán *vibrios* (Prats, 2006). Las bacterias se subclasifican en Gram negativas (-) y Gram positivas (+); las Gram (-) poseen en su pared celular una sola capa de peptidoglucanos a diferencia de las Gram (+) que presentan varias capas. En cuanto a su nutrición, la mayoría de las bacterias son heterótrofas, otras, en menor cantidad, son autótrofas, saprofitas o simbiotes (Vargas y Villazante, 2014).

### 2.2. Identificación bacteriana

La taxonomía bacteriana tiene como objetivo la construcción de sistemas que permiten clasificar a las bacterias. Dentro de la clasificación taxonómica, las categorías y definiciones más utilizadas son familia (un grupo de géneros relacionados entre sí), género (un grupo de especies relacionadas entre sí), especie (un grupo de cepas relacionadas entre sí), tipo (grupos de cepas interrelacionados dentro de las especies; por ejemplo, biotipo, serotipo) y cepa (aislamiento concreto de una especie en particular) (López *et al.*, 2015). La taxonomía bacteriana convencional permite la identificación de géneros y especies mediante la aplicación de diversos criterios basados en las características fenotípicas (Tabla 1).

La ausencia de concordancia entre las características observables se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos, la cual consiste en secuenciar el genoma del microorganismo utilizando genes como dianas moleculares para los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas que constituye el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y, en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa (Bou *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Criterios y ejemplos metodológicos aplicados a la identificación bacteriana.

Criterio	Metodología de ejemplo
Observación macroscópica	Observación e inspección de colonias: disposición, tamaños, textura, formas, pigmentos, etcétera.
Observación microscópica	Tinciones: formas, agrupación, esporas, capsula, flagelos, etcétera.
Metabolismo	Bacterias bioquímicas: uso de sustratos (oxidación/fermentación), producción de metabolitos secundarios, etcétera.
Otras propiedades	Resistencia a antibióticos: antibiograma y antibiotipos, ribotipos, fagotipos, estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias, estudio de sinergias o antagonismos, etcétera.

### **2.3. Generalidades del género *Bacillus* spp.**

El género *Bacillus* es un amplio y diverso grupo de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, capaces de formar endoesporas, ser aeróbicas, facultativas anaeróbicas y se pueden identificar por su forma de barra (Nazina *et al.*, 2001), son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentan hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 – 8.5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda y por lo general se desarrollan bien en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Layton, 2011).

Este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza e incluye bacterias termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalófilas y halófilas, que utilizan diversas fuentes de carbono para crecer, si son heterótrofas u otras fuentes si son autótrofas. Su hábitat se encuentra en diversos ambientes que incluyen rocas, polvo, ambientes acuáticos y en el interior de varios insectos y animales (Nicholson, 2002).

Se han demostrado las potencialidades del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno. En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de patógenos, buscando estrategias que permitan la disminución del uso de fertilizantes químicos, que no solo encarecen la producción, sino también, traen consigo un impacto negativo sobre el medio ambiente (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

## 2.4. Generalidades de *Brevibacillus brevis* (*Bacillus brevis*)

*Brevibacillus brevis*, anteriormente conocida como *Bacillus brevis*, es una bacteria estrictamente aeróbica, Gram-positiva, formadora de esporas (Shida *et al.*, 1996), siendo estas últimas de forma elipsoidal. La bacteria tiene forma de varilla (bacilo) y la temperatura máxima de crecimiento es de 45 a 55 °C (Takagi *et al.*, 1993). Es también una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (RPCV) la cual puede producir ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que promueve el desarrollo radical, vegetativo y producción de frutos (Chalé-Carrillo *et al.*, 2016). Por otro lado, esta especie tiene la habilidad de fijar nitrógeno (N<sub>2</sub>) atmosférico, reduciéndolo y fijándolo en formas más asimilables para las plantas, como los iones amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Restrepo-Correa *et al.*, 2017). De igual manera ha demostrado estimular el crecimiento de las plantas en más de un 70% por su habilidad de hacer disponible el hierro (Fe) (Jha y Saraf, 2012).

El interés en *B. brevis* floreció a principios de la década de 1940 con el descubrimiento de que algunas cepas de esta bacteria producen el antibiótico gramicidina (Nakamura, 1991). La gramicidina S (GS) es un decapeptido cíclico que se ha utilizado de manera prominente como un antibiótico, la cual ejerce una amplia gama de efectos antimicrobianos, incluida la actividad contra bacterias de Gram-positivos y Gram-negativos, virus, hongos y células individuales eucariotas patógenos (Berditsch *et al.*, 2007).

## 2.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son sustancias nutritivas que permiten obtener en laboratorio (es decir, *in vitro*) el desarrollo de microorganismos. Cultivar un microorganismo en un medio consiste en brindar artificialmente las condiciones óptimas para su crecimiento (Negróni, 2009). El crecimiento de una población bacteriana es influenciado tanto por factores nutricionales como de otra índole,



entre estos la temperatura, el pH, la presión osmótica y la atmósfera de incubación (Cavallini, 2005).

Según su composición de los medios de cultivo se puede clasificar en medios naturales y artificiales, los primeros hacen referencia a aquellos de origen animal y vegetal, los segundos hace mención a todo aquello que se prepara en el laboratorio. Pueden ser clasificados según su estado en líquidos (caldo) y sólidos, cuando al caldo se le agrega una sustancia capaz de solidificarse, como el agar; y de acuerdo a su función (Vanegas, 2015).

Los elementos esenciales para el crecimiento de una bacteria son: C, H, O y N en altas cantidades; S y P en menor proporción; y Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y Mo en cantidades mínimas (Pelczar *et al.*, 2010).

La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, por ello la variedad de medios de cultivo es a su vez amplia y no existe un medio de cultivo universal capaz de adecuarse a todos ellos (Diaz *et al.*, 2005).

#### 2.5.1. Medio nutritivo de sábila y melaza (SM)

La sábila (*Aloe vera*) tienen diferentes propiedades biológicas que ayudan a mejorar la salud y prevenir enfermedades. Es una de las fuentes naturales más ricas para la salud de los seres humanos. Su composición química ha revelado la presencia de más de 200 sustancias biológicamente activas diferentes (Zari y Zari, 2015). Con respecto a su composición química se ha reportado que la planta de *Aloe vera* está constituida por una mezcla compleja de compuestos como se muestra en la Tabla 2 y que más de 20 de estas sustancias poseen actividades benéficas para la salud (Domínguez-Fernández *et al.*, 2012).

**Tabla 2.** Componentes químicos de la planta de *Aloe vera*.

Composición	Compuestos
Antraquinonas	Ácido aloético, antranol, ácido cinámico, barbaloína, ácido crisofánico, emodina, aloemodin, éster de ácido cinámico, aloína, isobarbaloína, antraceno, resistanol.
Vitaminas	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B2, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, vitamina B6, betacaroteno.
Minerales	Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, cromo.
Carbohidratos	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructuosa, acemanano, sustancias pépticas, <i>L</i> -ramnosa.
Enzimas	Amilasa, ciclooxidasas, carboxipeptidasa, lipasa, bradikinasa, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superóxido dismutasa.
Lípidos y compuestos orgánicos	Esteroides (campesterol, colesterol, $\beta$ -sitosterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberelina, triterpenos.
Aminoácidos	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.

El gel de la sábila presenta acción cicatrizante, antiinflamatoria, protectora de la piel, además presenta propiedades bactericidas, laxantes y agentes desintoxicantes (Rodríguez *et al.*, 2006).

El gel está constituido principalmente de agua, mucílagos y otros carbohidratos, ácidos y sales orgánicas, enzimas, saponinas, taninos, heteróxidos antracénicos, esteroides, triacilglicéridos, aminoácidos, ARN, trazas de alcaloides, vitaminas y diversos minerales (Reynolds, 2004). Los mucílagos se caracterizan por estar formados por ácidos galacturónicos, glucorónicos y unidos a azúcares como glucosa, galactosa y arabinosa. También están presentes otros polisacáridos con alto contenido en ácidos urónicos, fructosa y otros azúcares hidrolizables. Varios polisacáridos han sido detectados y aislados desde la pulpa del *Aloe vera*, incluyendo manosa, galactosa, arabinosa, sustancias pécticas y ácido glucorónico. (Vega *et al.*, 2005).

Por otro lado, la melaza es un líquido viscoso rico en azúcares de color oscuro, es producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar, este subproducto actualmente se utiliza para la alimentación del ganado bovino, obtención de etanol y de levadura prensada (Basanta *et al.*, 2007).

La melaza es una mezcla que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali presentes en el jugo de caña. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 3) (Aguilar-Zárate *et al.*, 2012).

**Tabla 3.** Composición de la melaza de caña de azúcar.

Componentes	Constituyentes	Contenido (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azúcares reductores	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Ácido pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Rivoflavina	4.40 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

### 2.5.2. Medio nutritivo NFb (Nitrogen Free broth)

El NFb es un medio selectivo libre de nitrógeno y es utilizado para identificar bacterias con capacidad de fijar nitrógeno (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Microorganismos como del género *Azospirillum* sp. para su aislamiento se realiza con medios libres de nitrógeno, tal es el caso del medio NFb, en el cual según se modifique el pH se aíslan diversas especies (Cárdenas *et al.*, 2010). Este medio adicionado con rojo congo permite el crecimiento de *Azospirillum* identificando las colonias con un color rojo escarlata. Este medio selectivo tiene la ventaja de reducir la probabilidad de contaminación con otro tipo de microorganismo (Silva, 2017).

.

### 2.5.3. Medio nutritivo Luria Bertani (LB)

El medio LB es ampliamente usado por los bacteriólogos porque permite un rápido crecimiento y buen rendimiento de desarrollo para muchas especies bacterianas. La receta para el caldo de Luria-Bertani es el siguiente: combinar 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 litro de agua destilada. La triptona utilizada es una digestión pancreática de caseína de la leche de vaca, y el extracto de levadura es una digestión de *Saccharomyces cerevisiae*. El caldo Luria-Bertani deshidratado con la composición anterior se llama caldo LB, Miller; con 5 g/litro de NaCl se llama caldo LB, Lennox (Sezonov *et al.*, 2007).

#### 2.5.4. Efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento

El pH es una medida de la acidez, y la escala de pH va desde 0 (muy ácido) a 14 (elevada alcalinidad). Los valores de 0 a 7 son ácidos y los valores de 7 a 14 son de naturaleza básica o alcalina. Un pH de 7, neutro, indica una cantidad igual de ácido que de base o ausencia de base y de ácido (Miller y Palenic, 2000).

Los microorganismos solo pueden crecer dentro de un rango estrecho de pH, característico de cada tipo de ser vivo, que al sobrepasarlo mueren rápidamente. Teniendo en cuenta el rango de pH que toleran los microorganismos se clasifican en: Acidófilos, Neutrófilos y Basófilos. Se ha de tener presente que, generalmente, el pH del medio es inferior al pH interno de la célula y de esta forma se genera energía metabólica mediante una bomba de protones (Rodríguez, 2010).

Bello-Gutiérrez (2000) afirma que el efecto del pH sobre el desarrollo de los microorganismos viene determinado por varias circunstancias que afectan a su mecanismo de acción:

- La disponibilidad de los distintos nutrientes para un determinado valor de la concentración protónica.
- La permeabilidad de la membrana, que se ve afectada por los valores de pH, según el tipo de microorganismo. Por debajo de un cierto nivel de pH, se considera que el medio es ácido y las permeasas catiónicas se saturan de protones y limitan, o anulan, el transporte de cationes indispensables para la vida de la célula; en cambio, por encima de ese nivel, el medio resulta alcalino y serán los iones hidroxilos los que saturan las membranas impidiendo la transferencia de aniones.
- Las actividades de los sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo celular suelen estar relacionadas con un nivel óptimo del pH y cualquiera que difiera del mismo significa cambios en las cinéticas de las reacciones. En consecuencia, disminuye la actividad enzimática y se inhibe (o reduce) el crecimiento del correspondiente microorganismo.

Con frecuencia el metabolismo del propio microorganismo influencia el pH de su hábitat. Por ejemplo, las bacterias fermentadoras de la leche, que producen ácido láctico, aumentan la concentración de hidrogeniones en su medio ambiente y tienden a crecer mejor a pH moderadamente bajos. Por otra parte, las bacterias de la putrefacción, que descomponen las proteínas generan aminos y amoníaco, elevan el pH de su entorno pues crecen mejor en condiciones alcalinas (Cavallini, 2005).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del experimento**

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México.

#### **3.2. Descripción del microorganismo**

*Brevibacillus brevis* (anteriormente conocida como *Bacillus brevis*) es una bacteria con forma de bacilo, estrictamente aeróbica, Gram-positiva, formadora de esporas, presentes en el suelo, agua, aire y materia en descomposición.

#### **3.3. Reactivación del microorganismo**

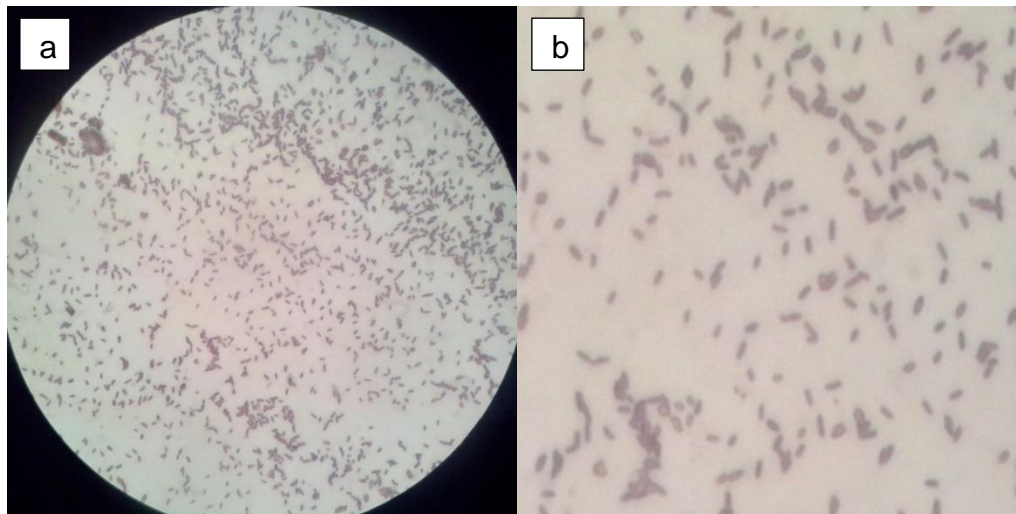
Usando una cepa bacteriana perteneciente al género *Brevibacillus* contenida en un tubo eppendorf se incubó a 32 °C por 1 hora; pasado del tiempo se tomaron 160 µL de la cepa y se inoculó en 80 mL de medio nutritivo líquido NFb (Nitrogen Free broth) a pH 7, posteriormente se incubó durante 48 horas a 32 °C. Después de dos días se hicieron diluciones seriadas 1/10 tomando 1 mL del caldo nutritivo y depositado en tubos de ensaye (kimble-KIMAX 16 x 150 mm) con 9 mL de agua destilada. Del tubo con dilución  $10^{10}$  se tomó 500 µL y fue depositado en caja de Petri (vaciado en placa) con medio NFb sólido pH 6.8, luego fue incubado durante 48 horas a 32 °C.



### 3.4. Prueba tinción de Gram

La prueba de tinción Gram se llevó a cabo luego de 48 h de haber reactivado la bacteria, para ello se colocó una gota de agua destilada en un portaobjeto y en seguida, con un asa de platino se tomó una colonia de la bacteria sembrada en caja de Petri, mezclando con la gota de agua destilada. Con la ayuda de un mechero se secó el exceso de agua en el portaobjeto pasando por encima de la flama. Una vez seco, se cubrió la muestra con cristal violeta y se dejó actuar por 1 min; se escurrió y se quitó el exceso del reactivo con agua destilada. Se secó pasando el portaobjeto nuevamente sobre la flama. Se añadió lugol cubriendo la muestra y se esperó 1 min; transcurrido ese tiempo, se escurrió y se lavó el exceso de reactivo con agua y se secó siguiendo la metodología de los pasos anteriores. A continuación, se colocaron 3 gotas de alcohol cetona por 5 segundos y se escurrió el exceso, se lavó con agua destilada y se secó. Por último, se cubrió la muestra con safranina y se dejó actuar por 1 min, se quitó el exceso y se lavó con agua destilada; se secó por último con ayuda de la flama del mechero.

Posteriormente se llevó a cabo la observación de la bacteria en el microscopio (Figura 1a y 1b).



**Figura 1.** Imágenes de *B. brevis* obtenidas con un microscopio óptico a 40x (a) y 100x (b).

### 3.5. Preparación de medios de cultivo

#### 3.5.1. Preparación de medio de cultivo NFb

El medio de cultivo NFb (Nitrogen Free broth) es carente de nitrógeno ( $N_2$ ) y permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente este elemento. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono para la bacteria (Dobereiner *et al.*, 1976). Para la preparación de un litro de medio de cultivo se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 4 y el orden en que se agregaron está dada por la posición en que se ubican en la tabla, siendo el fosfato de potasio el primero y el azul de bromotimol el último.

**Tabla 4.** Reactivos y cantidades necesarias para elaborar 1 L de medio de cultivo NFb.

Fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ )	0.04 g/L
Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )	0.5 g/L
Cloruro férrico ( $FeCl_3$ )	0.01 g/L
Molibdato de sodio ( $Na_2MoO_4$ )	0.002 g/L
Sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ )	0.002 g/L
Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )	0.2 g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	0.1 g/L
Ácido málico ( $C_4H_6O_5$ )	2 g/L
Agar bacteriológico	2 g/L
Azul de bromotimol	6 gotas/L

Posteriormente con un potenciómetro (Hanna Hi-98128) se reguló el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL del medio NFb líquido en frascos con capacidad de 100 mL, mismos que fueron llevados a esterilización en una olla de presión a 120 °C por 15 min.

### 3.5.2. Preparación de medio de cultivo sábila y melaza

Para el medio sábila y melaza (SM) se utilizó 10g L<sup>-1</sup> de pulpa de sábila mezclando con 5g L<sup>-1</sup> (0.5%) de melaza. Este medio de cultivo se realizó por triplicado. Con el potenciómetro (Hanna Hi-98128) se reguló el pH en 6, 7 y 8. Posteriormente se depositaron 80 mL de medio SM en frascos con capacidad de 100 mL. Por último los frascos fueron esterilizados en una olla de presión a 120 °C por 15 min.

### 3.5.3. Preparación de medio de cultivo LB

Este medio es utilizado de forma rutinaria para el crecimiento bacteriano en líquido. Para la preparación de 1 L se utilizaron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. Los reactivos se mezclaron de acuerdo al orden descrito en un vaso de precipitados con capacidad de 1 L utilizando agua destilada, esta actividad se hizo por triplicado. Una vez homogeneizada la mezcla se reguló el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL de medio LB en frascos de 100 mL y se esterilizaron en una olla de presión a 120 °C por 15 min.

## 3.6. Inoculación e incubación del microorganismo

Se tomaron 160 µL de la bacteria sembrada en medio NFb líquido de pH 7 y se inocularon los medios nutritivos contenidos en los frascos (NFb, LB y SM). Posteriormente fueron colocados en una incubadora con agitación (Labnet 211DS) a una temperatura de 32 °C y a 100 rpm, evaluando las muestras a las 96 h. Se emplearon 4 repeticiones por medio nutritivo con sus respectivos pH.

### 3.7. Diluciones

Para cada repetición se hicieron diluciones seriadas 1/10 tomando 1 mL del medio nutritivo con la bacteria y posteriormente depositado en un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada previamente esterilizada, se hizo el mismo procedimiento con el segundo tubo y así sucesivamente hasta llegar al undécimo tubo. Se tomó 500  $\mu\text{L}$  del tubo  $10^{-10}$ , posteriormente se llevó a cabo el vaciado en placas. Después de 48 h se contabilizaron las UFC de cada caja.

### 3.8. Tratamientos

Por cada medio de cultivo (SM, LB y NFb) se ajustó el pH a 6, 7 y 8, (Tabla 5), con 4 repeticiones de cada tratamiento.

**Tabla 5.** Tratamientos utilizados para evaluar los diferentes medios de cultivo con sus respectivos pH.

Tratamientos	Medio	PH
SM6	SM	6
SM7	SM	7
SM8	SM	8
LB6	LB	6
LB7	LB	7
LB8	LB	8
NFb6	NFb	6
NFb7	NFb	7
NFb8	NFb	8

Dónde: SM= medio de sábila (1%) y melaza (0.5%); LB= medio Luria Bertani;  
NFb= medio libre de nitrógeno.

### **3.9. Diseño experimental**

El diseño experimental fue bloques completamente al azar con un arreglo factorial (3x3). Los factores fueron medio de cultivo (con 3 niveles) y pH (con 3 niveles). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa SAS 9.4. Utilizando una prueba de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos por el ANOVA se comprueba que existen diferencias significativas en las UFC (variable dependiente) entre los tres medios de cultivo, los diferentes pHs y la interacción de ambos factores (Tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis de varianza para el crecimiento de *B. brevis*

Fuente de variación	Grados de libertad	UFC x 10 <sup>10</sup> ml <sup>-1</sup>
Medio	2	9864.08**
pH	2	628.58**
Medio * pH	4	2636.29**
Error	27	28.90
CV (%)		9.36

ns, \*, \*\*= No significativo y significativo  $P > 0.05$ ,  $P \leq 0.05$ , 0.01. UFC= unidades formadoras de colonias. CV= coeficiente de variación.

### 4.1. Crecimiento en diferentes medios de cultivo y pH

Respecto al conteo de *B. brevis* (expresadas como unidades formadoras de colonias, UFC) en diferentes medios de cultivo, en la Tabla 7 se observa que el medio de cultivo SM (Melaza al 0.5%) es el de mayor incidencia en el crecimiento de la bacteria (88.83 UFC ml<sup>-1</sup>), existiendo diferencia del 42.86% con el medio LB y el 63.22% de diferencia con el medio NFb. El medio SM fue la mejor a comparación con los otros dos medios (LB y NFb), esto puede ser debido a su composición nutricional del *Aloe vera* la cual contiene enzimas, 19 aminoácidos esenciales, necesarios para la formación y estructuración de las proteínas, que son la base de las células, y también minerales como el calcio, fósforo, cobre, hierro, magnesio, potasio y sodio, todos elementos indispensables para el

metabolismo y actividad celular (Contreras-Pinzón *et al.*, 2007). Estudio realizado por González *et al.* (2008) demostraron que el jugo de *A. vera* al 100% utilizado como sustrato para la producción de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* obtuvieron altas cuentas viables para ambas cepas ( $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC ml<sup>-1</sup> para *L. plantarum* y *L. casei* respectivamente). Por otro lado, la melaza contiene aminoácidos, altas concentraciones de carbohidratos los cuales son utilizados como fuente de carbono por gran variedad de microorganismos, además la melaza tiene minerales tales como calcio, magnesio, fósforo y potasio indispensables para el funcionamiento celular (Fajardo y Sarmiento, 2007). Ossa *et al.* (2010), reportaron que la melaza al 20% utilizado como sustrato para la producción de *Lactobacillus plantarum* obtuvieron un recuento de  $43 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. La combinación de estos dos materiales (gel de *A. vera* y melaza) es ideal ya que contiene los elementos necesarios para la fisiología de los microorganismos.

En la Tabla 7 se observa el efecto del pH el cual es significativo en el crecimiento de *B. brevis*. Siendo el pH 7 fue el de mayor influencia ( $65.17$  UFC ml<sup>-1</sup>). Para el *B. brevis* de acuerdo a los datos obtenidos en la Tabla 7 nos indica que el pH 7 o ligeramente ácido son los óptimos para el crecimiento de la bacteria ya que al considerar que el pH 7 es el 100% efectivo, comparando con el pH 6 reduce un 13.7% la efectividad, en contraste con el pH 8 reduce la efectividad en un 22.1%. Esto nos indica que el *B. brevis* tolera menos los pH alcalinos lo cual se catalogaría un organismo neutrófilo. Esto se fundamenta con lo que dice Rodríguez (2010), que generalmente el pH del medio es inferior al pH interno de la célula o microorganismo para que de esta forma se genere energía metabólica mediante una bomba de protones. Como lo cita Ossa *et al.* (2010), para algunos microorganismos cuando el medio de cultivo alcanza la alcalinidad, el crecimiento de las bacterias tiende a disminuir; es el caso de este estudio que al aumentar el pH del medio de cultivo se tendió a igualar el pH interno de *B. brevis* la cual fue afectada la permeabilidad de la membrana como resultado los iones hidroxilos saturaron las membranas de la bacteria impidiendo la transferencia de aniones (Bello-Gutiérrez, 2000).

Este resultado es similar a un estudio hecho por Ossa *et al.* (2010), donde el pH óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* es de 5.2 (por ser una bacteria ácido láctica), y al modificar el pH en 4.5 y 6, los recuentos se disminuyeron entre una o dos unidades logarítmicas.

**Tabla 7.** Efecto de los medios de cultivo y pH sobre el crecimiento de *B. brevis*.

	Tratamientos					
	Medio			pH		
	SM	LB	NFb	6	7	8
UFC x10 <sup>10</sup>	88.83a	50.75b	32.67c	56.25b	65.17a	50.83c
Tukey <sup>0.05</sup>						5.44

MS= sábila y melaza al 0.5%, LB= Luria Bertani, NFb= caldo libre de nitrógeno. Medias con diferentes letras son significativamente diferentes. UFC= unidades formadoras de colonias.

#### 4.2. Efecto de la interacción del pH y los medios de cultivo

Los medios de cultivo y los diferentes pHs que se usaron influyeron significativamente en la reproducción de *B. brevis*. En la Figura 2 se observa que el medio SM fue estadísticamente diferente obteniendo la mayor producción de *B. brevis* independientemente el pH (6,7 y 8), mientras que los medios LB y NFb disminuye la reproducción de la bacteria pero esta disminución , es aún mayor con un cambio de pH.

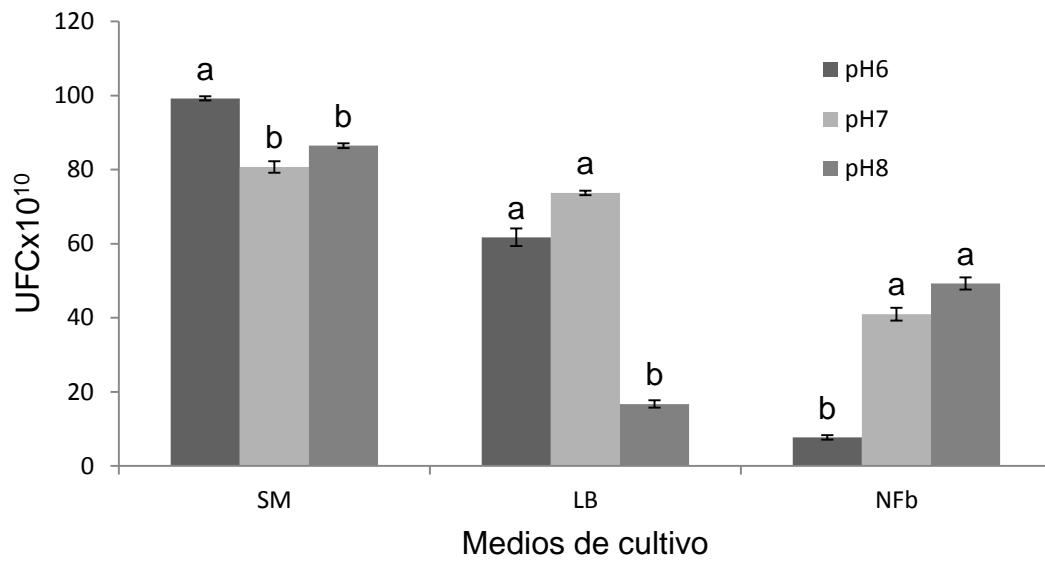
La mayor reproducción de *B. brevis* fue en el medio nutritivo SM siempre y cuando el pH sea igual a 6, pues un pH superior a este (7 y 8) disminuye la reproducción de la bacteria. El aumento de la reproducción de *B. brevis* puede ser debido a la composición de la sábila y de la melaza, pues de acuerdo con Contreras-Pinzón *et al.* (2007); Fajardo y Sarmiento (2007) indican que estos son ricos en aminoácidos, minerales y con altas concentraciones de carbohidratos



indispensables para la función y reproducción celular. La disminución de la reproducción de *B. brevis* en los pHs 7 y 8 puede ser que la bacteria no tolera pH alcalino pues está clasificada como neutrófila, además, el medio SM por su rica composición modifica el pH del medio de cultivo como lo afirma Tortora *et al.* (2007), quienes señalan que la descomposición de las proteínas y aminoácidos, el medio se hace más alcalino.

Por otro lado, el medio de cultivo LB favoreció la reproducción de *B. brevis* a pH 6 y 7, ya que no hay diferencia significativa. Sin embargo, a pH 8 disminuye significativamente la reproducción de esta bacteria, lo cual nos indica que esta bacteria no tolera los medios alcalinos. Este resultado es similar a la que reporta Mantilla y Pineda (2013), utilizaron el medio de cultivo LB para reproducir bacterias celulolíticas, donde una cepa presentó un incremento en la magnitud de su densidad poblacional pasando de  $10^7$  a  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en medios con pH 5 y 7.

El medio de cultivo NFb favoreció la reproducción de *B. brevis* a pH 7 y 8. No obstante, a pH 6 disminuye significativamente la reproducción de esta bacteria. Este comportamiento pudo ser debido a que los pHs del medio se hayan modificado por el tiempo de incubación (4 días) con la bacteria (*B. brevis*), es decir, hubo un descenso de pH. Este caso es similar a lo que reporta Martínez y Bautista (2017), utilizaron el medio NFb para aislar las bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno (BFaN) donde hubo un descenso de pH del medio después de 5 días de incubación a 30 °C con las BFaN.



**Figura 2.** Interacción entre medios de cultivo y pH en relación a la reproducción del *B. brevis*.

## 5. CONCLUSIONES

Se concluye, que esta investigación permitió evaluar el pH óptimo, dos medios de cultivo comercial (LB y NFb) y un medio de cultivo natural (SM) elaborado a partir del gel de la sábila y un subproducto de la industria azucarera, la melaza de caña, para la reproducción de *B. brevis*. Los resultados en este estudio indican que el tratamiento que permitió el máximo crecimiento del microorganismo fue el medio nutritivo natural SM a pH 6. El costo de los insumos del medio nutritivo SM es muy inferior a comparación con los medios comerciales; por esa razón se recomienda el medio nutritivo SM como sustrato para la reproducción de *B. brevis* y, más adelante hacer más estudios con otras especies de organismos antagónicos contra hongos y bacterias fitopatógenas evaluando el mismo sustrato ya que es un medio natural la cual probablemente reducirá el costo de producción de bacterias benéficas y poder realizar más investigaciones a nivel laboratorio y, posteriormente para la elaboración de formulados bioplaguicida que favorezca la agricultura sustentable.

## 6. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Zárate, P., Aguilar-Zárate, M., Inungaray, M. L. C. y Rivera, O. M. P. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 1-17.
- Basanta, R., Delgado, M. G., Martínez, J. C., Vázquez, H. M. y Vázquez, G. B. (2007). Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión sustainable recycling of waste from sugarcane agroindustry: a review. *CYTA-Journal of Food*, 5(4), 293-305.
- Bello-Gutiérrez, J. (2000). Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Díaz de Santos. Madrid, España. 573 p.
- Berditsch, M., Afonin, S. & Ulrich, A. S. (2007). The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6620-6628.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R. y Baldani, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3), 1-1.
- Cavallini, E. R. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Universidad de Costa Rica. 1ª ed. Costa Rica. 481 p.
- Chalé-Carrillo, V. M., Ruiz-Sánchez, E., Reyes-Ramírez, A., Borges-Gómez, L., Cristobal-Alejo, J. y Pacheco-Aguirre, J. (2016). Crecimiento y respuesta a

- Bemisia tabaci* en genotipos de *Capsicum annum* inoculados con *Brevibacillus brevis* cepa cbtc1. *Agrociencia*, 50(3), 323-334.
- Contreras-Pinzón, M. E., Domínguez-Espinosa, R. M. y González-Burgos, A. (2007). Proceso de biotransformación láctica del jugo de *Aloe vera*. *Tecnología, ciencia, educación*, 22(1), 35-42.
- Díaz, R., Gamazo, C. y López-Goñi, I. (2005). Manual práctico de microbiología. MASSON. 3ª ed. Barcelona, España. 264 p.
- Dobereiner, J., Marriel, I. E. & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(10), 1464-1473.
- Domínguez-Fernández, R. N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G. y Gutiérrez-López, G. F. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23-43.
- Fajardo-Castillo, E. E. y Sarmiento-Forero, S. C. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 120 p.
- González, B. A., Domínguez-Espinosa, R. y Alcocer, B. R. (2008). *Aloe vera* como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*, use of *Aloe vera* juice as substrate for growth of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei*. *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 152-157.
- Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. & Yokota, A. (2004). Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 419-427.

- Jha, C. K. & Saraf, M. (2012). Evaluation of Multispecies Plant-Growth-Promoting Consortia for the Growth Promotion of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4), 588-598.
- Koneman, E. W. y Allen, S. (2008). Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Editorial Panamericana. 6ª ed. Buenos Aires, Argentina. 1696 p.
- Layton, C. (2011). *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177-187.
- López-Hontangas, J. L., Castillo, F. J. y Salavert, M. (2015). Técnicas de identificación. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1(1), 27-41 .
- Mantilla, C. L. y Pineda, R. C. A. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 8-16.
- Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G., Peña-Venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M. y Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical*, 57(4), 915-927.
- Martínez, G. V. y Bautista, C. A. (2017). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno aisladas de la rizósfera de *Juniperus flaccida* Schlttdl. *Contribución al Conocimiento Científico y Tecnológico en Oaxaca*, 1(1) , 34-40
- Miller, C. H. y Palenic, C. J. (2000). Control de la infección y manejo de materiales peligrosos para el equipo de profesionales de salud dental. Editorial ELSEVIER. 2ª ed. Madrid, España. 361 p.

- Mollinedo, M. A. y Gonzáles, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Investigada*, 49(1), 2609-2613.
- Nakamura, L. K. (1991). *Bacillus brevis* Migula 1900 taxonomy: reassociation and base composition of DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 510-515.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarus, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E. & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.
- Negrón, M. (2009). Microbiología estomatológica. Editorial Médica Panamericana. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina. 656 p.
- Nicholson, W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 410-416.
- Ossa, J. A., Vanegas, M. C. y Badillo, Á. M. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 13(1), 97-104.
- Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. & Krieg, N. R. (2010). Microbiology: an application based approach. Tata McGraw Hill Education Private Limited. New Delhi, New York, EUA. 897 p.
- Prats, G. (2006). Microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. 1ª ed. Madrid, España. 400 p.

- Reinoso-Pozo, Y., Vaillant Flores, D., Casadesús Romero, L., García Pérez, E. y Pazos Álvarez-Rivera, V. (2012). Cepas de *Brevibacillus laterosporus* y *Brevibacillus brevis* antagonistas de bacterias y hongos fitopatógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 11(2), 79-80.
- Restrepo-Correa, S. P., Pineda-Meneses, E. C. y Ríos-Osorio, L. A. (2017). Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 335-351.
- Reynolds, T. (2004). Aloes: The Genus *Aloe*. Medical and aromatic plants-industrial profiles. Editorial CPR Press. 1ª ed. Boca Ratón, Florida, EUA. 408 p.
- Rodríguez, D, I., Santana, G, O., Recio, L, O. y Fuentes, N, M. (2006). Beneficios del *Aloe Vera* l. (sábila) en las afecciones de la piel. *Revista Cubana de Enfermería*, 22(3), 1-5.
- Rodríguez, E. G. (2010). Influencia de la temperatura y de la humedad en la dinámica de la materia orgánica de los suelos de Galicia y su relación con el cambio climático. Tesis, Universidad Santiago de Compostela, España, 735 p.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. & Komagata, K. (1996). Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 939-946.
- Silva, M, V. E. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, y evaluación de la capacidad de crecimiento en medios de cultivo a gran escala como alternativa de biofertilizante en cultivos de *Rosa* sp. Tesis, Quito:Universidad de las Américas, Ecuador, 81 p.



- Takagi, H., Shida, O., Kadowaki, K., Komagata, K. & Udaka, S. (1993). Characterization of *Bacillus brevis* with Descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 221-231.
- Takehige, K. & Ouchi, K. (1995). Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 449-452.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana. 9ª ed. Buenos Aires, Argentina. 988 p.
- Vanegas, L, M. C. (2015). Guías para el laboratorio de bacteriología. Editorial Universidad de los Andes. 1ª ed. Bogotá, Colombia. 186 p.
- Vargas, F, T. y Villazante, C, L. G. (2014). Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 44(1), 2309-2313.
- Vega, A., Ampuero, N., Díaz, L. y Lemus, R. (2005). El *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición*, 32(3), 208-214.
- Zari, S. T. & Zari, T. A. (2015). A review of four common medicinal plants used to treat eczema. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(24), 702-711.