

Efecto de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento de las especies del género *Enterococcus*

Marilyn Díaz-Pérez, Raisa Zhurbenko, Claudio Rodríguez-Martínez

Laboratorio de Investigaciones Tecnológicas, Departamento de Investigaciones de Medios de Cultivo, Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) Carretera a Beltrán, Kilómetro 1 ½, Bejucal, CP 32600, Mayabeque, Cuba, marilyn.diaz@biocen.cu

Recibido: 16 de agosto de 2016.

Aceptado: 26 de diciembre de 2016.

Palabras clave: *Enterococcus*, medios de cultivo, triptosa.

Key words: *Enterococcus*, culture media, tryptose.

RESUMEN. Los microorganismos poseen requerimientos nutricionales diferentes y específicos. Los enterococos son un grupo de bacterias nutricionalmente exigentes en sus procesos metabólicos. Para el aislamiento de estos microorganismos se deben utilizar combinaciones de diferentes hidrolizados de proteínas en proporciones definidas capaces de suplir sus necesidades metabólicas. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de hidrolizados proteicos de diferentes orígenes sobre el crecimiento de enterococos. Se ensayaron tres composiciones nutricionales donde se combinaron distintos hidrolizados proteicos de origen animal y microbiano como peptona bacteriológica Z, extracto de carne y triptosa. Las composiciones nutricionales se evaluaron utilizando microorganismos del género *Enterococcus* y de otros géneros microbianos, por diferentes métodos microbiológicos. La triptosa de BioCen resultó altamente nutritiva para el desarrollo de colonias de enterococos superiores a los 2 milímetros de diámetro a las 24 h de incubación. Los enterococos presentaron coloración rosada y la mayoría de los microorganismos de los otros géneros resultaron inhibidos por la acción del acetato de talio. La mezcla de triptosa y extracto de carne, en concentraciones de 5,0 y 3,0 g/L respectivamente, garantizó los requerimientos nutritivos y el desarrollo rápido de las diferentes especies de enterococos.

ABSTRACT. Microorganisms have different and specific nutritional requirements. Enterococci are a group of nutritionally fastidious bacteria in their metabolic processes. For the isolation of these microorganism's different combinations of protein hydrolysates must be used in defined proportions capable of supplying their metabolic needs. The aim of this work was to study the effect of protein hydrolysates from different origin on the growth of enterococci. Three nutritional compositions were tested in which protein hydrolysates from different animal and microbial origin were included (bacteriological peptone Z, meat extract and tryptose). Nutritional compositions were evaluated using microorganisms from the Genus *Enterococcus* and from other microbial genera, by different microbiological methods. Tryptose, developed in BioCen, proved to be highly nutritive components for the development of enterococcal colonies with diameters larger than 2 mm after incubation for 24 hours. Enterococci showed pink color and most of microorganisms belonging to other genera were inhibited by the action of thallium acetate. The mixture of tryptose and meat extract, at the concentrations of 5,0 and 3,0 g/L, respectively, assured favorable nutritional conditions and the fast development of different species of enterococci of diabetes.

INTRODUCCIÓN

El género *Enterococcus* es considerado un patógeno nosocomial de gran importancia a escala mundial.¹ Estos microorganismos ocasionan disímiles enfermedades, pueden incluso provocar la muerte y representan un desafío terapéutico debido a su resistencia a diferentes grupos de antibióticos.² La aparición de cepas multirresistentes como resultado del abuso en el empleo de los antibióticos ha complicado los tratamientos³, lo que convierte a estos microorganismos en una verdadera amenaza para la salud, siendo fundamental el poder detectar su presencia de manera temprana.

Los requerimientos nutricionales de los microorganismos son diferentes y en ocasiones específicos. Es importante para su cultivo suministrar todos los nutrientes esenciales en las proporciones requeridas.^{4,5}

Algunos microorganismos requieren pocos compuestos nutritivos, básicamente una fuente de carbono y una de nitrógeno⁵, mientras que otros como enterococos son nutricionalmente exigentes porque requieren aminoácidos específicos, vitaminas B, péptidos de distintos pesos moleculares y minerales en sus procesos metabólicos.⁶⁻⁸ El

cultivo de estos microorganismos se ve favorecido por la presencia de peptonas, hidrolizados y extractos proteicos de diversos orígenes, tanto animal como vegetal.⁹

Los hidrolizados proteicos, peptonas, extractos, entre otros, son los ingredientes fundamentales de la mayoría de las composiciones nutricionales y aportan compuestos nitrogenados tales como péptidos, polipéptidos y aminoácidos.^{10,11}

Estas bases nutritivas aportan, además, vitaminas, glúcidos y otros elementos nutritivos esenciales para el crecimiento de los microorganismos. Las mezclas de peptonas, provenientes de diversos orígenes, proporcionan un amplio espectro de péptidos de diferentes pesos moleculares para la mejor recuperación y cultivo de microorganismos.^{7,11,12}

Las peptonas, los hidrolizados enzimáticos de caseína (triptonas), los extractos de carne y de levadura son los hidrolizados proteicos más empleados en las composiciones para el crecimiento de enterococos.^{8,13} La diferente composición de los hidrolizados proteicos influye en la recuperación de los microorganismos obtenida con distintas composiciones nutricionales utilizadas.¹³

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento de las especies del género *Enterococcus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron peptona bacteriológica Z, extracto de carne (Biotécnica, México) y triptosa (BioCen, Cuba). Se emplearon reactivos de diferentes proveedores como xilosa, esculina y púrpura de bromocresol (MERCK; Alemania), acetato de talio (I) (FLUKA, Alemania), sustrato cromogénico 6-cloro-3-indoxil-β-D-glucopiranosido (ros-glc) (AppliChem, Alemania) y agar bacteriológico (OXOID, Inglaterra).

Microorganismos y preparación del inóculo

Se ensayaron microorganismos de distintos géneros, todos procedentes de la colección de cultivos microbianos de la *American Type Culture Collection* (ATCC): *Enterobacter aerogenes* 13048, *Enterobacter cloacae* 23355, *Enterobacter sakazakii* 29544, *Enterococcus avium* 14025, *Enterococcus faecalis* 19433, *Enterococcus faecalis* 29212, *Enterococcus faecium* 6056, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Proteus mirabilis* 12453, *Proteus mirabilis* 7002, *Proteus vulgaris* ATCC 13315. Las suspensiones microbianas se estandarizaron (DO_{550nm} 0,125) en un espectrofotómetro (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd., Reino Unido) a partir de cultivos puros, entre 18 y 24 h a 35±2 °C (1,5·10⁸ UFC/mL).

Composiciones nutricionales

Se prepararon tres variantes nutricionales (V1, V2 y V3) (Tabla 1) con peptona bacteriológica Z y triptosa, combinados con otros componentes, sobre el crecimiento de enterococos.

Tabla 1. Composiciones nutricionales.

Componente (g/L)	Variante		
	V1	V2	V3
Peptona bacteriológica Z	5,0	-	5,0
Triptosa	-	5,0	-
Extracto de carne	3,0	3,0	3,0
Esculina	1,0	1,0	1,0
Xilosa	10,0	10,0	-
Púrpura de bromocresol	0,01	0,01	-
Ros-glc	0,1	0,1	0,1
Acetato de talio (I)	0,476	0,476	0,476
Agar	13,0	13,0	13,0

ros-glc. sustrato cromogénico 6-cloro-3-indoxil-β-D-glucopiranosido.

Métodos microbiológicos

Los microorganismos diana (enterococos) se inocularon utilizando el método de siembra por inundación de la superficie a una concentración de 1,5·10⁴ UFC/mL para obtener colonias aisladas y evaluar sus características culturales (color y tamaño). Se empleó el método de siembra en placas por estrías para los microorganismos no diana, inoculando suspensiones estandarizadas de los mismos a concentración de 1,5·10⁸ UFC/mL.¹⁴

Todas las colonias rosadas, identificadas presuntamente como *Enterococcus*, se confirmaron por la prueba rápida de hidrólisis de L-pirrolidonil-β-naftilamida (prueba PYR).¹⁵

Los medios de cultivo se incubaron durante 24 h a 35±2 °C y posteriormente se realizó la lectura de los resultados.

Análisis de los resultados

Los ensayos se realizaron por duplicado. Se comparó, de manera cualitativa, el crecimiento microbiano, evaluando el tamaño (diámetro, Ø) de las colonias de las especies de enterococos, su coloración y el tiempo mínimo requerido para la observación de estas respuestas. Para evaluar el crecimiento se utilizaron los términos profuso- presencia de colonias en los cuatro cuadrantes de la placa de Petri, escaso- crecimiento solo en el primer y segundo cuadrantes de la placa de Petri e inhibidos totalmente- ausencia total de crecimiento microbiano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tres variantes (V1, V2 y V3) crecieron de manera profusa y de coloración rosada los microorganismos diana *E. faecalis* ATCC 29212 y ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 6056 y *E. avium* ATCC 14025 a la concentración de inóculo estudiada ($1,5 \cdot 10^4$ UFC/mL) (Tabla 2). El crecimiento de las especies de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Proteus* resultó ser escaso. Estos microorganismos se desarrollaron en V1 y V2 del mismo color que *Enterococcus*. Algunos de ellos (*Enterobacter* spp. y *K. pneumoniae* ATCC 13883) cambiaron, al igual que *Enterococcus*, el color del medio a amarillo en la zona de crecimiento, por lo que estos resultaron microorganismos interferentes presuntivamente (Tabla 2), confirmados como bacterias no diana por el desarrollo de una prueba PYR negativa. Se conoce que estos microorganismos muestran la misma expresión fenotípica que los enterococos por ser igualmente productores de la enzima β -glucosidasa que hidroliza el sustrato cromogénico presente en estas composiciones nutricionales.¹⁴

El púrpura de bromocresol detectó la disminución de pH en V1 y V2, producida por los productos ácidos derivados de la fermentación de la xilosa presente en ambas variantes y se tornó el medio amarillo en la zona de crecimiento microbiano, contraste que favoreció la visualización de las colonias rosadas de enterococos.

En V1 y V2 las colonias de *Enterococcus* se desarrollaron de mayor tamaño que en V3 (Tabla 2). La incorporación de xilosa en V1 y V2 favoreció el crecimiento de los enterococos debido a su metabolismo fermentativo, siendo estos microorganismos capaces de utilizar una amplia variedad de glúcidos, entre ellos la xilosa.¹⁶ En V2 (con triptosa) las colonias de *Enterococcus* presentaron mayor tamaño (>2 mm de Ø), con relación a V1 (con peptona bacteriológica Z), siendo V2 la mejor variante. La triptosa favoreció en mayor medida el crecimiento de las distintas especies de enterococos que la variante con peptona bacteriológica Z. La mayor capacidad nutritiva de la triptosa logró contrarrestar el efecto negativo de la disminución del pH del medio que se produce como resultado de los productos ácidos derivados del metabolismo de la xilosa incorporada en V1 y V2.

La triptosa (BioCen) se compone de una mezcla de triptona (hidrolizado enzimático de caseína) (40 %), extracto de levadura (20 %), peptona bacteriológica Z (20 %) y peptona bacteriológica P (20 %). Hawk *et al.*¹⁷ describieron el esquema de degradación de sustratos proteicos en función de sus pesos moleculares desde proteosomas (~5 000-10 000 Da), peptonas (~2 000 Da), polipéptidos (~1000 Da), péptidos (~200 Da) y aminoácidos (~100 Da). El contenido de diferentes fracciones proteicas en estos cuatro hidrolizados proteicos es diverso lo cual garantiza condiciones nutricionales óptimas para el rápido desarrollo de bacterias ácido lácticas como enterococos.⁷ La mezcla de los hidrolizados proteicos que componen la triptosa aporta también en cantidades apreciables aminoácidos, tales como arginina (Arg), histidina (His), leucina (Leu), metionina (Met) y triptófano (Trp) que son esenciales para el crecimiento de estos microorganismos; entre otros como cisteína (Cys), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu) que también son fundamentales para su desarrollo. Además, esta mezcla de hidrolizados proteicos constituye una importante contribución de vitaminas del grupo B que estimulan el rápido y profuso crecimiento de los enterococos.⁷

Las concentraciones de algunos aminoácidos presentes en los hidrolizados proteicos que componen la triptosa resultan superiores a la de estos componentes en hidrolizados proteicos similares.¹¹ La triptona aporta a la composición nutritiva un contenido superior de aminoácidos tales como Arg y Thr. La cistina (CySSCy), Lys y Thr son aportados en mayor cantidad por el extracto de levadura. El contenido de Arg, CySSCy, His, Met, Phe y tirosina (Tyr) resultan más elevados en la peptona bacteriológica Z. En la peptona bacteriológica P, los aminoácidos Arg, CySSCy, Glu, His, Leu, Lys, Met, Thr, Trp y Tyr son superiores.¹¹

Estudios recientes realizados por Khan *et al.*⁸ demostraron que la presencia de aminoácidos tales como Arg, glicina (Gly), His, isoleucina (Ile), Leu, Met, Trp y valina (Val) son esenciales para el crecimiento de los enterococos y que la ausencia de otros aminoácidos como Cys, Phe, serina (Ser) y Thr causó una apreciable disminución de su crecimiento. También evidenciaron que la ausencia de Lys en la composición provocó un lento crecimiento de estos microorganismos y la importancia del ácido glutámico para su desarrollo.

El contenido de macro y micronutrientes en la mezcla de hidrolizados proteicos que componen la triptosa es similar al presente en otros hidrolizados proteicos¹¹, aunque elementos como el cinc se encuentran en mayor cantidad en la triptona y algunos microelementos tóxicos para las células como el plomo (Pb)¹⁸ están presentes en menor proporción (< 0,1 ppm) en la triptona, extracto de levadura y peptona bacteriológica Z. La presencia de los macro y micronutrientes en las cantidades adecuadas incide de forma favorable en la formación del material genético, la síntesis de enzimas y otros metabolitos fundamentales, garantiza los procesos de intercambio de la célula con el medio exterior y ejerce una influencia positiva en el crecimiento profuso y mayor tamaño de las colonias de *Enterococcus* obtenidas en la variante con triptosa.¹¹

Tabla 2. Características de crecimiento de cepas de *Enterococcus* vs. otras cepas de microorganismos "no diana".*

Cepa	V1		V2		V3				
	Crec.	Φ (mm)	Color de colonias	Crec.	Φ (mm)	Color de colonias	Crec.	Φ (mm)	Color de colonias
<i>E. avium</i> ATCC 14025	++++	2	R	++++	> 2	R	++++	1-2	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	++++	2	R	++++	> 2	R	++++	1-2	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	++++	2	R	++++	> 2	R	++++	1-2	R
<i>E. faecium</i> ATCC 6056	++++	2	R	++++	> 2	R	++++	1-2	R
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	- -++	NE	R	- -++	-	R	-	-	-
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	- -++	NE	R	- -++	-	R	- -++	< 1-2	INC
<i>E. sakazakii</i> ATCC 29544	- -++	NE	R	- -++	-	R	-	NE	NE
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	- -++	1-2	R	- -++	1	R	-	NE	NE
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	++++	2	R	++++	2	R	-	NE	NE
<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002	- -++	2	R	---+	2	R	- -++	< 1-2	INC
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	- -++	2	R	---+	2	R	-	NE	NE

*V1, V2 y V3: son tres variantes diferentes de medios de cultivo. (++++): crecimiento profuso. (++++-) crecimiento menos profuso. (- -++): crecimiento escaso. (---+): crecimiento menos que escaso. (-): ausencia de crecimiento. R: color rosado de las colonias. INC: colonias incoloras. Φ: diámetro de las colonias. NE: no evaluado. La composición de los medios de cultivo y los procedimientos se describen en Materiales.

El ros-glc en la composición posibilitó el fácil reconocimiento de las colonias rosadas de *Enterococcus* en un máximo de 24 h, lo cual demostró la actividad metabólica de la enzima β -glucosidasa, presente en estos microorganismos, sobre este sustrato cromogénico, descrita por varios autores.^{19,20}

CONCLUSIONES

La combinación de hidrolizados proteicos tales como la triptosa y el extracto de carne garantiza la presencia en el medio de cultivo, de un amplio espectro de aminoácidos y fracciones proteicas que favorecen el rápido crecimiento de las especies de enterococos y la formación de colonias superiores a los dos milímetros de diámetro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Çetinkaya F, Elal Muş T, Soyutemiz GE, Çibik R. Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods. *Turk J Vet Anim Sci.* 2013;37(5):588-93.
2. Conde-Estévez D, Sorli L, Morales-Molina JA, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, et al. Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(6):342-8.
3. Ortega LM. Enterococos: actualización. *Rev Haban Cienc Méd.* 2010;9(4):507-15.
4. Zhurbenko R, Rodríguez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 2. Principales indicadores de calidad. *Sal Ciencia.* 2009;16(6):645-8.
5. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Capítulo 6. Crecimiento microbiano. Brock Biología de los Microorganismos. 10th ed. España, Madrid: Pearson Prentice Hall; 2003. p. 137-61.
6. Murray BE, Singh KV, Ross RP, Heath JD, Dunny GM, Weinstock GM. Generation of Restriction Map of *Enterococcus faecalis* OG1 and Investigation of Growth Requirements and Regions Encoding Biosynthetic Function. *J Bacteriol.* 1993;175(16):5216-23.
7. Zhao H, Bai F, Zhou F, Piotr W, Jiang X, Zhang B. Characterization of Soybean Protein Hydrolysates able to Promote the Proliferation of *Streptococcus Thermophilus* ST. *J Food Sci.* 2013;78(4):M575-81.
8. Khan H, Flint SH, Yu PL. Development of a chemically defined medium for the production of enterolysin A from *Enterococcus faecalis* B9510. *J Appl Microbiol* 2013;114(4):1092-102.
9. Devriese LA, Pot B, Van Damme L, Kersters K, Haesebrouck F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int J Food Microbiol.* 1995;26(2):187-97.
10. Entis P. Chapter 2. Culture media. Food Microbiology -The Laboratory. In: Epstein J, Klinovsky J, Nash G, editors.: The Food Processors Institute, Washington, D.C.; 2002. p. 25-48.
11. Zhurbenko R. Metodología para el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimenticia y otras proteínas en la evaluación de la calidad sanitaria de los alimentos. [Tesis doctoral]. La Habana: Universidad de la Habana; 2005.
12. Tsoraeva A, Zhurbenko R. Development and Characterization of a Mixed Nutrient Base for the Culture of a Wide Range of Microorganisms. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;42(4):155-61.
13. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Handbook of Culture Media for Food Microbiology. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2003.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997. p. 597-600.
15. Suppli, M., Aabenhus, R., Harboe, Z. B., Andersen, L. P., Tvede, M., Jensen, J. U. Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):1078-1083.
16. Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB. Taxonomic outline of the phylum Firmicutes. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., editors. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2nd ed., Vol. 3rd. Athens: Springer; 2009. p. 594-607.
17. Hawk PB, Oser BL, Summerson WH. Practical Physiological Chemistry 12 th ed. Churchill, London 1947.
18. Su X, Xing X, Lai G, Sun Y, Zhao Z, Chen J, et al. Effect of CCM3 gene defect on lead-induced cell genotoxicity in mouse embryonic fibroblasts. *Chi J Prev Med.* 2015;49(3):269-74.
19. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol.* 2000;60(2-3):205-18.
20. Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. *J Microbiol Methods.* 2009;79(2):139-55.