

# Efecto de una combinación de nutrientes e inhibidores del crecimiento bacteriano sobre el desarrollo de *Salmonella*

## *Effect of a combination of nutrients and inhibitors of bacterial growth on the development of Salmonella*

Ivonne Alfonso Valdés

Bioquímica, Centro Nacional de Biopreparados, Bejuical, Cuba

Raisa Zhurbenko, Bioquímica, Centro Nacional de Biopreparados, Bejuical, Cuba

Tamara Lobaina Rodríguez, Bioquímica, Centro Nacional de Biopreparados, Bejuical, Cuba

Claudio Rodríguez Martínez, Bioquímico, Centro Nacional de Biopreparados, Bejuical, Cuba

### Acceda a este artículo en siicsalud

[www.siicsalud.com/dato/experto.php/157223](http://www.siicsalud.com/dato/experto.php/157223)

Recepción: 13/2/2018  
Aprobación: 5/9/2018  
Primera edición, [www.siicsalud.com](http://www.siicsalud.com):  
12/9/2018

Enviar correspondencia a: Ivonne Alfonso Valdés, Centro Nacional de Biopreparados, 32600, Bejuical, Cuba  
[ivonne.alfonso@biocen.cu](mailto:ivonne.alfonso@biocen.cu)



+ Especialidades médicas relacionadas, producción bibliográfica y referencias profesionales de los autores.



[www.dx.doi.org/10.21840/siic/157223](http://www.dx.doi.org/10.21840/siic/157223)

### Abstract

*The selection of nutrient bases depends on the microorganism and the purpose of the medium. Inhibitors of bacterial growth are of great importance in selective and differential media and may interfere in the growth of the microorganism of interest.*

*An adequate balance between promoter substances and inhibitors of bacterial growth is thus required, especially for bacteria that could be found either at very low concentrations or those subject to different stress conditions during storage of the samples containing them, such as Salmonella. The aim was to evaluate the effect of a combination of nutrients of different origins and inhibitors of grampositive bacteria on the development of Salmonella serotypes. 52 Salmonella strains and a representation of other bacteria and yeasts were selected. The nutritional capacity of the composition was determined by spectrophotometric technique formulating variants with mixtures of nutritive bases, and recording the increase in biomass. Recovery capacity and inhibition of two experimental variants with different inhibitors were quantitatively tested. The productivity of the final formulation was compared with a chromogenic medium (Oxoid, England). Salmonella showed abundant growth in the variants made with different nutrient combinations. Both experimental formulations showed their ability to recover microorganisms of interest. The final composition showed productivity values higher than 0.80 in both variants. The mixture of nutrient bases and bile salts as an inhibitor of growth of grampositive bacteria was an effective combination, capable of stimulating the growth of Salmonella genus when these bacteria are found at low concentration.*

**Keywords:** *Salmonella*, chromogenic and fluorogenic diagnostician, culture media, bacterial colonization, bacterial nutrition, bacterial inhibitors

### Resumen

La selección de bases nutritivas para los medios de cultivo está relacionada con el microorganismo objeto de estudio y el propósito del medio. Los inhibidores del crecimiento bacteriano en los medios selectivos y diferenciales pueden interferir en el desarrollo del microorganismo de interés. Por ello se requiere un balance entre sustancias promotoras e inhibidoras del crecimiento bacteriano, sobre todo en bacterias que pueden encontrarse a muy bajas concentraciones o sometidas a diferentes condiciones de estrés durante el almacenamiento de las muestras que las contiene, como *Salmonella*. El objetivo consistió en evaluar el efecto de una combinación de nutrientes de diferentes orígenes y de inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas sobre el desarrollo de *Salmonella*. Se seleccionaron 52 cepas: incluyendo *Salmonella*, otras bacterias y levaduras. Se determinó la capacidad nutricional de mezclas de bases nutritivas registrando el incremento de la biomasa mediante técnica espectrofotométrica. Se comprobó la capacidad de recuperación e inhibición de dos variantes experimentales con diferentes inhibidores mediante la determinación de parámetros cuantitativos, y se comparó la productividad de la formulación final con un medio cromogénico. *Salmonella* mostró un crecimiento abundante en las variantes con diferentes combinaciones nutricionales, se logró la inhibición de un grupo de microorganismos y la productividad de la composición final fue superior a 0.80. La mezcla de bases nutritivas de diferentes orígenes y las sales biliares como inhibidor de crecimiento de bacterias grampositivas resulta una combinación eficaz para promover el crecimiento de *Salmonella* cuando estas bacterias se encuentran en baja concentración.

**Palabras clave:** *Salmonella*, medios de cultivo, diagnosticador cromogénico y fluorogénico, colonización bacteriana, nutrición bacteriana, inhibidores bacterianos

### Introducción

Las bases nutritivas, obtenidas por hidrólisis o extracción a partir de diferentes sustratos proteicos, son ingredientes principales de los medios de cultivo destinados al diagnóstico microbiológico, complementando diversos requerimientos nutricionales de los microorganismos.<sup>1</sup>

El genoma de *Salmonella* contiene más de 4000 genes que codifican varias vías metabólicas,<sup>2-4</sup> pero solo el 10% de ellos está relacionado con la capacidad de asimilar uno u otro compuesto como fuente de carbono y energía.<sup>5</sup>

Los compuestos nitrogenados amínicos son requeridos como factores esenciales de crecimiento de bacte-

rias quimiorganotrofas, según lo refiere el Manual Oxoid (1995). Entre las fuentes de nitrógeno asimilables por *Salmonella* para obtener energía se encuentran la alanina, los ácidos aspártico y glutámico, la glicina y la prolina,<sup>5,6</sup> aminoácidos presentes en una concentración mayor del 5% en las peptonas o extractos obtenidos de un sustrato de origen animal.<sup>7</sup> Otros estudios demuestran que la cisteína, aminoácido que se encuentra en las bases nutritivas en forma de cistina,<sup>7</sup> es esencial durante la respuesta de estrés oxidativo de *Salmonella*, y la tiorredoxina tiene un papel importante en su supervivencia intracelular y replicación.<sup>8</sup>

Las bases nutritivas obtenidas a partir de sustratos vegetales contienen un elevado porcentaje de glúcidos respecto de las derivadas de otras fuentes proteicas. Los glúcidos tales como dextrosa, fructuosa, maltosa, sacarosa, maltotriosa y dextrinas, encontrados en los nutrientes de origen vegetal, no se utilizan en altas concentraciones para el cultivo de bacterias debido a su preferencia respecto de las sustancias nitrogenadas.<sup>9</sup>

En una predicción del crecimiento *in silico* se detectó que *Salmonella* era capaz de utilizar 147 fuentes de carbono de un total de 191 ensayadas,<sup>5,6</sup> glúcidos que se encuentran presentes en los productos obtenidos de origen vegetal.<sup>9</sup> No obstante, varios trabajos han demostrado la variabilidad metabólica entre serotipos o cepas del mismo serotipo de *Salmonella*.<sup>10,11</sup>

La selección de las bases nutritivas tiene estrecha relación con el microorganismo que se desee cultivar y el propósito del medio de cultivo que se desarrolle.

Para la detección de *Salmonella* resulta necesario emplear composiciones altamente nutritivas debido a que este género puede encontrarse en muy bajas concentraciones y estar sometido a diferentes condiciones de estrés durante el procesamiento y el almacenamiento de la muestra a ensayar. Wang y colaboradores refieren que unas pocas células de este microorganismo en un alimento son suficientes para colonizar el tracto gastrointestinal bajo y producir síntomas clínicos en los seres humanos.<sup>12</sup>

En los medios de cultivo selectivos, la concentración de los inhibidores, además de suprimir la microbiota acompañante en la muestra de ensayo de alimentos o clínicas, debe garantizar un adecuado crecimiento del microorganismo diana.<sup>13-16</sup>

Los medios de cultivo selectivos diseñados para la detección de *Salmonella* utilizan variadas sustancias inhibidoras como: antibióticos (novobiocina en medio éster-agar cromogénico), desoxicolato de sodio (agar Rambach y medio ABC) y el tergitol 4 (agar Miller-Mallinson y agar N4), entre otros.<sup>17-21</sup> Otros utilizan una mezcla de inhibidores como: sales biliares, novobiocina y cefsulodina (*Salmonella chromogenicmedium* [SCM] o sales biliares y verde malaquita [medio SIM-ID]).<sup>17,22</sup>

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de una combinación de nutrientes de origen animal, vegetal y microbiano y de inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas sobre el desarrollo de *Salmonella*.

## Materiales y métodos

### Combinación de nutrientes de origen animal, vegetal y microbiano

Para evaluar la capacidad de la combinación de nutrientes de promocionar el crecimiento de *Salmonella* se diseñaron tres variantes experimentales con bases nutritivas de diferentes orígenes (BioCen, Cuba). La V1 contenía una mezcla de hidrolizado pancreático de tejido animal (5 g/l), extracto de levadura S e hidrolizado enzimático de caseína (3 g/l); la V2 se componía de hidrolizado papaínico de harina de soja (5 g/l), extracto de levadura S e hidrolizado enzimático de caseína (3 g/l); mientras que la V3 combinaba hidrolizado papaínico de harina de soja (5 g/l), hidrolizado pancreático de tejido animal, extracto de levadura S e hidrolizado enzimático de caseína (2 g/l).

Cada mezcla se restituyó en agua desionizada, se dispensó en cantidad de 10 ml por tubo de cultivo y se esterilizó en autoclave (Lequeux, Francia) a 121 °C por 15 min.

Se seleccionaron cuatro cepas de la ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Salmonella enterica*: *Salmonella* ser. Typhimurium 14028, *Salmonella* ser. Enteritidis 13076, *Salmonella* ser. Typhi 19430 y *Salmonella* ser. Paratyphi A 8005. Cada una se inoculó en caldo cerebro corazón (BioCen, Cuba) y se incubó a 37 ± 1 °C por 24 h (se reactivaron).

A partir del medio de cultivo opalescente se preparó una suspensión microbiana estandarizada a una densidad óptica de 550 nm (DO<sub>550</sub>) de 0.3 (espectrofotómetro T70/T70+UV-VIS PGI, Beijing, China). Se inocularon alícuotas de 0.1 ml de las suspensiones en dos tubos en paralelo de cada una de las variantes experimentales diseñadas y se incubaron a 41.5 ± 1 °C por 24 h.

La promoción de crecimiento se determinó según el incremento de la biomasa microbiana en el tiempo al medir el valor de la absorbancia, cada hora, hasta completar las 10 primeras horas de incubación y luego a las 24 h en un espectrofotómetro a 640 nm.

### Efecto de distintos inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas

Para evaluar el efecto de distintos inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas sobre el desarrollo de *Salmonella* se diseñaron dos variantes experimentales: la variante 4 (V4) con sales biliares (BioCen, Cuba), 1.3 g/l, y la variante 5 (V5) con desoxicolato de sodio (AppliChem, Alemania), 1.0 g/l. Ambas tenían una mezcla de hidrolizado pancreático de tejido animal (BioCen, Cuba), 5.0 g; extracto de levadura S (BioCen, Cuba), 3.0 g; hidrolizado enzimático de caseína (BioCen, Cuba), 3.0 g; rojo neutro (AppliChem, Alemania), 0.03 g; agar bacteriológico (AgarMex, México), 14.0 g; tiosulfato de sodio (Merck, Alemania), 2.5 g; citrato de hierro y amonio (Merck, Alemania), 0.5 g; L-lisina (Merck, Alemania), una mezcla de sustancias cromogénicas, fluorogénicas y de contraste, 14.20 g (Merck, Alemania; Biosynth, Suiza; AppliChem, Alemania) para la detección de las actividades galactosidas y glucosidas de *Salmonella* y otras especies bacterianas y 1000 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 ± 0.2 y se calentaron hasta ebullición, se dejaron atemperar hasta 50°C en reposo y se distribuyeron en placas de Petri estériles (Gooselin, Alemania).

Se seleccionaron 16 cepas de colección: cinco cepas de *S. enterica* subsp. *Enterica* y 11 bacterias grampositivas y levaduras (Tabla 1) y se reactivaron en caldo cerebro corazón.

**Tabla 1.** Microorganismos utilizados para la evaluación del efecto de la combinación de nutrientes e inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas sobre el desarrollo de *Salmonella*.

Cantidad	Microorganismo	Procedencia
2	<i>Candida albicans</i>	ATCC 17111, 1 C-UH
1	<i>Candida glabrata</i>	1 C-UH
1	<i>Candida parapsilosis</i>	1 C-UH
1	<i>Candida tropicalis</i>	1C-UH
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
1	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434
1	<i>Salmonella</i> ser. Abony	ATCC 6017
1	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	ATCC 13076
2	<i>Salmonella</i> ser. Typhi	ATCC 19430 y ATCC 7251
1	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	ATCC 14028
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29770
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 12136
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 9959

ATCC, *American Type Culture Collection*; C-UH, colección de la Universidad de La Habana.

## Combinaciones de nutrientes e inhibidores del crecimiento bacteriano

Para evaluar el efecto de las combinaciones de nutrientes e inhibidores del crecimiento de bacterianas grampositivas sobre el desarrollo de *Salmonella* se comparó la formulación experimental V4 (antes descrita) con el medio de cultivo cromogénico SCM (Oxoid, Reino Unido).<sup>24</sup>

Se utilizaron cinco cepas de referencia de la ATCC de *S. enterica*: *Salmonella* ser. Typhi 19430 y 7251, *Salmonella* ser. Typhimurium 14028 y 13311y *Salmonella* ser. Paratyphi A 8005 y se reactivaron en caldo cerebro corazón.

## Método de inoculación

Las cepas se estandarizaron a DO<sub>550</sub> de 0.125 para las bacterias y 0.3 para las levaduras, equivalentes a  $1.5 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. Se prepararon diluciones seriadas con solución salina estéril al 0.85% (p/v) hasta alcanzar una concentración microbiana teórica de 1.5 UFC/ml para *Salmonella*,  $1.5 \times 10^3$  UFC/ml para los microorganismos grampositivos y  $3 \times 10^3$  UFC/ml para las levaduras. Las composiciones preparadas se inocularon por triplicado con las cuatro últimas diluciones para *Salmonella* y con todas para el resto de microorganismos, utilizando el método de siembra por inundación de la superficie. Se incubaron a  $37 \pm 1$  °C por 24 h.

El agar triptona soja (BioCen, Cuba) se utilizó como medio de cultivo de referencia.<sup>15</sup>

## Productividad y selectividad

Se calculó la productividad de las formulaciones experimentales y del medio de cultivo SCM con respecto al medio de referencia y en la evaluación del efecto de distintos inhibidores sobre el crecimiento de bacterias grampositivas, además, se calculó la selectividad de ambas composiciones experimentales.<sup>25</sup>

## Estadística

Los datos obtenidos en la evaluación de la combinación de nutrientes de diferentes orígenes y en la combinación de nutrientes e inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas sobre el crecimiento de *Salmonella* se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con la utilización del paquete estadístico "Statistica8" (StatSoft, Inc., EE.UU., 2008). Además, se analizó la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos con la prueba de Tukey para un 95% de confianza.

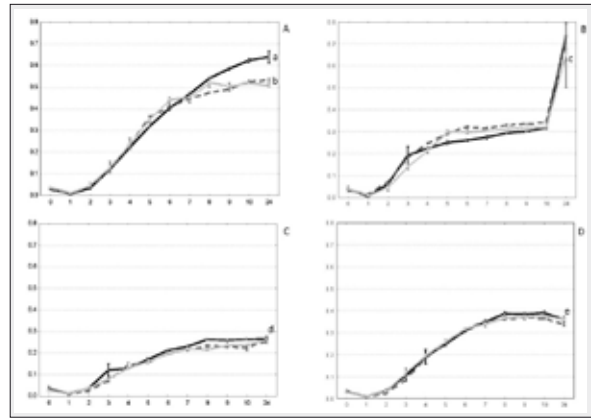
## Resultados

*Salmonella* mostró un crecimiento favorable en todas las combinaciones de bases nutritivas (Figura 1).

La V1 reveló diferencias significativas con respecto a las V2 y V3 en cuanto a la promoción de crecimiento de *Salmonella* ser. Enteritidis a las 9, 10 y 24 h de incubación, alcanzando valores de absorbancia hasta 0.640 a las 24 h, mientras que las V2 y V3 mostraron 0.530 y 0.510, respectivamente.

El crecimiento microbiano de *Salmonella* ser. Typhi y *Salmonella* ser. Paratyphi A se vio ligeramente favorecido en la V1 a partir de las 8 h de cultivo, con respecto al resto de las variantes. Sin embargo, a las 24 h de cultivo no se hallaron diferencias significativas entre ellas, siendo estos valores en las V1, V2 y V3 de: 0.270; 0.260 y 0.260, respectivamente, para *Salmonella* ser. Typhi y 0.360; 0.340 y 0.360 para *Salmonella* ser. Paratyphi A.

Las variantes V2 y V3 mostraron una mayor recuperación de *Salmonella* ser. Typhimurium comparada con la



**Figura 1.** Comparación del crecimiento de serotipos de *Salmonella* con distintas combinaciones de bases nutritivas de producción nacional.

**A:** *Salmonella* ser. Enteritidis; **B:** *Salmonella* ser. Typhimurium; **C:** *Salmonella* ser. Typhi; **D:** *Salmonella* ser. Paratyphi A con hidrolizado pancreático de tejido animal, extracto de levadura C e hidrolizado enzimático de caseína (V1 -), con hidrolizado papaínico de harina de soja, extracto de levadura C e hidrolizado enzimático de caseína (V2 ...) e hidrolizado pancreático de tejido animal, hidrolizado papaínico de harina de soja, extracto de levadura C e hidrolizado enzimático de caseína (V3 - -). Letras diferentes: existen diferencias significativas entre las variantes ( $p \leq 0.05$ ) a las 24 h de incubación; letras iguales: no existen diferencias significativas entre las variantes ( $p \leq 0.05$ ) a las 24 h de incubación.

V1 entre las 4 y 10 h de cultivo. A las 24 h de cultivo, se registraron valores de absorbancia (a 640 nm) semejantes entre las variantes, con valores de 0.730 (V1); 0.740 (V2) y 0.700 (V3).

Los mayores valores de absorbancia se registraron con el cultivo de *Salmonella* ser. Typhimurium a las 24 h de incubación, ya que, aunque *Salmonella* ser. Enteritidis presentó los mayores valores de absorbancia a las primeras 10 h de incubación, no se registró un aumento significativo de sus valores a las 24 h. Los menores valores se registraron en el cultivo de *Salmonella* ser. Typhi.

Se obtuvo un buen crecimiento de *Salmonella* en las variantes diseñadas con diferentes inhibidores del crecimiento bacteriano. No obstante, los valores de productividad en la formulación que utilizó sales biliares (V4) fueron superiores con respecto a la variante que empleó desoxicolato de sodio (V5) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Productividad y selectividad de las variantes diseñadas con diferentes inhibidores del crecimiento de bacterias grampositivas.

Microorganismo	Prm ± DE	
	V4	V5
<i>Salmonella</i> ser. Abony ATCC 6017	1.18 ± 0.06	0.88 ± 0.04
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis ATCC 13076	0.91 ± 0.01	0.80 ± 0.07
<i>Salmonella</i> ser. Typhi ATCC 19430	0.80 ± 0.17	0.75 ± 0.10
<i>Salmonella</i> ser. Typhi ATCC 7251	0.82 ± 0.07	0.77 ± 0.05
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	0.90 ± 0.08	0.68 ± 0.08
	S <sub>F</sub>	
<i>Candida albicans</i> ATCC 17111	4	5
<i>Candida albicans</i> C-UH	5	5
<i>Candida glabrata</i> C-UH	5	5
<i>Candida parapsilosis</i> C-UH	5	5
<i>Candida tropicalis</i> C-UH	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	5	5
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29770	5	5
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12136	5	5
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 9959	5	5

P<sub>m</sub>, media de la relación de productividad; S<sub>F</sub>, factor de selectividad; DE, desviación estándar; V4, con sales biliares; V5, con desoxicolato de sodio.

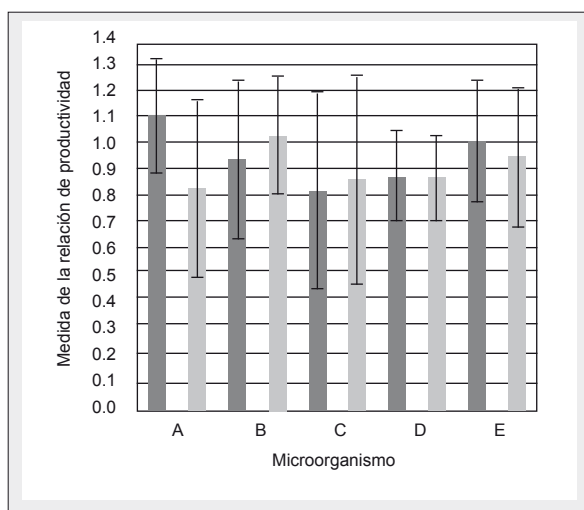
Cada sustancia inhibidora evaluada impidió totalmente el crecimiento de las bacterias grampositivas utilizadas en el ensayo, por lo que su factor de selectividad resultó igual a cinco.

El crecimiento del género *Candida* en todas las diluciones ensayadas resultó inhibido totalmente en ambas formulaciones, exceptuando dos especies que mostraron un crecimiento de inhibido a escaso, a las 48 h de incubación. *Candida albicans* tuvo un crecimiento escaso en la V4, en las placas inoculadas con la primera dilución cuyo factor de selectividad resultó igual a cuatro, mientras que para *Candida tropicalis* se observó, en ambas variantes, un crecimiento pequeño de colonias (< 1 mm de diámetro) en todas las diluciones ensayadas, por lo que el factor de selectividad resultó ser 0 (Tabla 2).

Aunque la variante que utilizó desoxicolato de sodio (V5) se caracterizó por una mayor selectividad sobre los microorganismos no diana, la V4 pudo inhibir todas las bacterias grampositivas evaluadas y la mayoría de las levaduras (Tabla 2), por lo que puede ser empleada en composiciones que requieran inhibir el crecimiento de estos microorganismos.

En el medio de referencia todos los microorganismos mostraron un crecimiento abundante en todas las diluciones inoculadas.

La capacidad de recuperación de *Salmonella* en el ensayo comparativo entre los dos medios de cultivo que utilizan diferentes combinaciones nutricionales e inhibidores del crecimiento bacteriano y el agar triptonsoja resultó igual o superior al 85% (Figura 2).



**Figura 2.** Comparación de los valores de productividad de los medios de cultivo V4 (CNB, Cuba) y SCM (Oxoid, Reino Unido) para los diferentes serotipos de *Salmonella*. V4 CromoCen SALM (CNB, Cuba), SCM (Oxoid, Reino Unido); A: *Salmonella* ser. Typhi ATCC 19430; B: *Salmonella* ser. Typhi ATCC 7251; C: *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028; D: *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 13311; E: *Salmonella* ser. Paratyphi AATCC 8005. \*Existen diferencias significativas entre las variantes (IC  $\leq$  95 %,  $p \leq$  0.05).

La media de la relación de productividad de *Salmonella* ser. Typhi ATCC 19430 fue de  $1.12 \pm 0.09$  para la V4, mostrando diferencias significativas con respecto a SCM, que fue de  $0.85 \pm 0.14$ .

A pesar de que en la media de la relación de productividad calculada para el resto de los serotipos no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, se observaron ligeras diferencias. Para *Salmonella* ser. Typhi ATCC 7251 y *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028 la producti-

vidad resultó ligeramente superior para SCM con valores de  $1.05 \pm 0.09$  y  $0.88 \pm 0.16$ ; respectivamente, en comparación con la V4 en la que se obtuvieron valores de  $0.96 \pm 0.12$  y  $0.84 \pm 0.15$ ; respectivamente. Con *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 13311 y *Salmonella* ser. Paratyphi A ATCC 8005 la formulación experimental ( $0.90 \pm 0.07$  y  $1.03 \pm 0.10$ ) superó ligeramente a la formulación comercializada por Oxoid ( $0.89 \pm 0.07$  y  $0.97 \pm 0.11$ ).

## Discusión

El aumento en la producción de biomasa microbiana en el tiempo puede estar relacionado con el porcentaje de nitrógeno amínico y total, contenidos en forma de polipéptidos, péptidos y aminoácidos, imprescindibles para el crecimiento microbiano.<sup>26,27</sup>

La peptona bacteriológica y la de corazón contienen mayor porcentaje de nitrógeno amínico (2.4%-4.0% y 2.8%-4.8%) y nitrógeno total (13.0%-17.0% y 9.8%-12.3%) que la peptona de soja (1.71%-1.73% y 8.34%-8.85%),<sup>27,28</sup> lo que demuestra que las peptonas de origen animal contienen mayor número de péptidos de bajo peso molecular que son asimilables por la mayoría de los microorganismos.<sup>9</sup>

La peptona bacteriológica contiene mayor cantidad de arginina, mientras que la peptona de corazón contiene elevadas concentraciones de ácido glutámico, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.<sup>27</sup>

Las bases nutritivas de origen animal proporcionan al medio de cultivo mayor cantidad de manganeso que las de origen vegetal, micronutriente fundamental en la activación de muchas enzimas. La peptona de corazón contiene mayor cantidad de fósforo que la peptona de soja, compuesto considerado como macronutriente y de gran importancia en la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos.<sup>27,29</sup>

Las bases nutritivas desarrolladas en BioCen presentan concentraciones bajas de ion cloruro. Esto favorece el crecimiento de los microorganismos, ya que altas concentraciones de cloruros romperían el equilibrio osmótico entre el medio de cultivo y la célula provocando la lisis de esta última.<sup>27,28</sup> Además, estas bases nutritivas contienen una baja concentración de plomo, elemento tóxico para la célula.<sup>30</sup>

Los menores valores de absorbancia obtenidos con el cultivo de *Salmonella* ser. Typhi podrían estar relacionados con que estos microorganismos se caracterizan por un metabolismo lento.<sup>20</sup>

Los resultados obtenidos coinciden con lo informado por otros autores, los cuales utilizan estas mezclas de bases nutritivas en una gran variedad de medios de cultivo destinados a este género. Rambach utiliza peptona y extracto de levadura para el desarrollo de *Salmonella*, mientras que Cooke y colaboradores emplean peptona y triptonsoja. Otros medios, como el caldo Rappaport-Vassiliadis con soja, contiene peptona de soja como fuente de carbono y nitrógeno para el enriquecimiento selectivo.<sup>7,15,16,31</sup>

En un estudio realizado sobre la influencia de la combinación de bases nutritivas e inhibidores sobre el crecimiento de *Salmonella*, se demuestra que la mezcla de bases nutritivas de diferentes orígenes favorece una mejor recuperación en el tiempo, de los serotipos del género con respecto a la composición que contiene una sola fuente de nutrientes.<sup>32</sup>

El extracto de levadura constituye una fuente de vitaminas como la B1, B2, niacina (B3) y ergosterol, precursor



biológico de la vitamina D. Por ello esta fuente de nutrientes de origen microbiano se encuentra en la mayoría de medios de cultivo para diferentes propósitos.<sup>33</sup>

El hidrolizado enzimático de caseína brinda a las composiciones compuestos nitrogenados de un origen diferente, además de calcio, hierro y cinc, elementos fundamentales en el metabolismo celular.<sup>27,29</sup>

La mezcla de nutrientes de diferentes orígenes garantiza que exista una amplia variedad de componentes esenciales para una adecuada recuperación y crecimiento de *Salmonella*, incluso cuando estas bacterias se encuentran en baja concentración (1.5 UFC/ml).

Merritt y Donaldson destacan que las sales biliares pueden causar daños en el ADN, proteínas y membrana celular de un gran número de bacterias. Sin embargo, se ha detectado una variedad de genes y mecanismos involucrados en la resistencia de *Salmonella* a este compuesto. También informan que la activación de *marRAB* actúa reduciendo la transcripción de la porina *ompF*, la cual reduce la entrada de sales biliares a la célula, mientras que *acrAB* podría promover la excreción de sales biliares fuera de la célula, creando así un mecanismo de resistencia para el efecto dañino de las sales biliares. Además, otras proteínas como RecA, RecBCD, DinB y PolV actúan sobre la reparación del daño del ADN.<sup>34</sup>

Jang y colaboradores informan que las sales biliares actúan sobre el enlace entre el ácido murámico y la alanina del peptidoglicano que conforma la pared celular, por la activación de la enzima amidasa que depende de la presencia de colina en el ácido teicoico, impidiendo el crecimiento de un grupo de bacterias grampositivas.<sup>35</sup>

Las levaduras, para su crecimiento, requieren una composición rica en glúcidos como fuente fundamental de nutrientes y en las formulaciones evaluadas los hidratos de carbono se encuentran en poca concentración afectando su desarrollo.<sup>9</sup>

Según la ISO 11133-2 (2003) las composiciones cumplen con el criterio de selección de los medios de cultivo selectivo. Ambos inhibidores pueden ser considerados adecuados para formar parte de la composición final de medios de cultivo destinados para la detección de *Salmonella*, pero la composición con sales biliares garantiza un mayor valor promedio de productividad.

Los valores cercanos de productividad de la V4 y SCM pueden deberse a que la peptona especial, fuente de nutrientes del medio de cultivo SCM, es una mezcla de hidrolizado enzimático de caseína, hidrolizado enzimático de proteínas de tejido animal y en menor proporción de peptona de soja. Esta base nutritiva mixta tiene una composición fisicoquímica y un contenido de aminoácidos y minerales semejante a las bases nutritivas que componen la variante experimental, solo se destaca una mayor concentración del cinc,<sup>27</sup> microelemento que tiene un papel estructural en determinadas enzimas, según lo referido en *Merck Manual Microbiology* en su duodécima edición.

El uso de antibióticos en los medios de cultivo<sup>22,31,36,37</sup> para aumentar su selectividad disminuye el período de vida útil de estos listos para el uso.

Estos resultados demuestran que se logró un equilibrio en la formulación experimental entre los nutrientes y los inhibidores de las bacterias grampositivas, elemento importante a tener en cuenta para el diseño de diagnósticos.

## Conclusión

La mezcla de hidrolizado pancreático de tejido animal, extracto de levadura e hidrolizado enzimático de caseína y las sales biliares como inhibidor de crecimiento de bacterias grampositivas resulta una combinación eficaz, capaz de promover el crecimiento del género *Salmonella* cuando estas bacterias se encuentran en baja concentración.

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2018  
www.siic.salud.com

*Los autores no manifiestan conflictos de interés.*

## Bibliografía

1. Vielma RA, Sánchez K, Márquez E, Rial L. Estudio preliminar del uso de la harina de lombriz de tierra (*Eiseniafetida*) como fuente nutricional para el cultivo de microorganismos. *Rev Fac Farm* 54(1):12-16, 2012.
2. Haley B, Luo Y, Wang C, Brown E, Allard M, Karns J, et al. Genome sequences of *Salmonella* enteric subsp. Enteric Serovar Kentucky sequence type 152 isolated from dairy cows in the United States. *Genome Announc* 5(42):e01119-1117, 2017.
3. Terabayashi Y, Juan A, Tamotsu H, Ashimine N, Nakano K, Shimoji M, et al. First complete genome sequence of *Salmonella* enteric subsp. Enteric serovar Typhimurium strain ATCC 13311 (NCTC 74), a reference strain of multi drug resistance, as achieved by use of Pac Bio single-molecule real-time technology. *Genome Announc* 2(5):e00986-914, 2014.
4. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. Complete genome sequence of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852-856, 2001.
5. Gutnick D, Calvo JM, Klopotoski T, Ames BN. Compounds Which Serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella* typhimurium LT-2. *J Bacteriol* 100(1):215-219, 1969.
6. Abu Oun M, Suthers PF, Jones GI, Carter BR, Saunders MP, Maranas CD, et al. Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model. Comparison of similarity and diffe-

rences with a commensal *Escherichia coli* strain. *J Biol Chem* 284(43):29480-29488, 2009.

7. Jo Zimbro M, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA. Difco & BBL. Manual of Microbiological Culture Media. 2nd ed: Becton, Dickinson and Company. Sparks, Maryland, USA, 2009.

8. Dandekar T, Fiesemann A, Fischer E, Popp J, Hensel M, Noster J. *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Front Cell Infect Microbiol* 4(191), 2015.

9. Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Caracterización de un extracto de *Ipomoea batatas* para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. *Rev Cubana Med Trop* 59(3):218-226, 2007.

10. Chai L, Kong B, Elemfajeri O, Thong K. Variable carbon catabolism among *Salmonella* enteric serovar Typhimurium isolates. *PLoS One* 7(5):e36201, 2012.

11. Nolle N, Felsl A, Heermann R, Fuchs T. Genetic characterization of the galactitol utilization pathway of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 199(4):e00595-616, 2017.

12. Wang H, Gill VS, Cheng CM, Gonzalez-Escalona N, Irvin KA, Zheng J, et al. Evaluation and comparison of rapid methods for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated pine nuts using different pre enrichment media. *Food Microbiol* 46:58-65, 2015.

13. Jasson V, Jacsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol* 27:710-730, 2010.
14. Suo B, Wang Y. Evaluation of a multiplex selective enrichment broth SEL for simultaneous detection of injured *Salmonella*, *Escherichiacoli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Braz J Microbiol* 44(3):737-742, 2013.
15. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñiz VJ, Lobaina Rodríguez T, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, et al. Manual de Medios de Cultivo. 3ra ed. BioCen, La Habana, Cuba, 2004.
16. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56(1):301-303, 1990.
17. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol* 60:205-218, 2000.
18. Mallinson ET, Miller RG, De Rezende CE, Ferris KE, De Graft-Hanson J, Joseph SW. Improved plating media for the detection of *Salmonella* species with typical and atypical hydrogen sulfide production. *J Vet Diagn Invest* 12:83-87, 2000.
19. Perry JD, Ford M, Taylor J, Jones AL, Freeman R, Gould FK. ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* 37(3):766-768, 1999.
20. Gonzalez Pedraza J, Pereira Sanandres N, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villarreal Camacho J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte* 30(1):73-94, 2014.
21. Miller RG, Mallinson ET. An improved medium for the detection of *Salmonella* and *Shigella* species. *Clin Microbiol Newsletter* 32(5), 2010.
22. Cassar R, Cuschieri P. Comparison of *Salmonella* chromogenic medium with DCLS agar for isolation of *Salmonella* species from stool specimens. *J Clin Microbiol* 41(7):3229-3232, 2003.
23. Rodríguez Martínez C, González Ruiz J, Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Brito González AI, López Hernández M, et al. Method for simultaneous detection, recovery, identification and counting of bacteria and fungi and three-dimensional structure arrangement for the implementation of said method. Europa, 2017.
24. Bridson EY. The Oxoid Manual. 9th ed. Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England, 2006.
25. ISO 11133-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-Parte 2: Practical guidelines on performance testing of culture media. ISO, Geneva, 2003.
26. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: parte 1 - Procesos tecnológicos. *Salud(i)Ciencia* 16(4):420-425, 2008.
27. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: parte 2 - Principales indicadores de la calidad. *Salud(i)Ciencia* 16(6):645-651, 2009.
28. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Díaz Pérez M, Durán Vila A, López Hernández OD, Viera Oramas DR. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Rev Cubana Med Trop* 58(2):109-118, 2006.
29. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid, España, Pearson Prentice-Hall; 2003.
30. 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* 49(3):269-274, 2015.
31. Cooke VM, Miles RJ, Price G, Richardson AC. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol* 65(2):807-812, 1999.
32. López Ricardo Y, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Efecto de la combinación de bases nutritivas con el inhibidor sobre la recuperación de salmonelas. *Rev Cubana Invest Bioméd* 35(1):24-35, 2016.
33. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, López Hernández OD. Obtención y evaluación del extracto de levadura *Saccharomyces revisiae*. *Rev Latinoam Microbiol* 41(4):285-290, 1999.
34. Merritt M, Donaldson J. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J Med Microbiol* 58:1533-1541, 2009.
35. Jang KI, Ahn JB, Kim KY. Rapid and simple biochemical detection for *Salmonella* spp. Using modified LB broth and the MUCAP test. *Food Sci Biotechnol* 20(1):201-207, 2011.
36. Gaillot O, Di Camillo P, Berche P, Courcol R, Savage C. Comparison of CHRO Magar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of *Salmonellae* from stool samples. *J Clin Microbiol* 37(3):762-765, 1999.
37. Bridson EY. Natural and synthetic culture media for bacteria. In: Rechcigl M, editor. Handbook series in nutrition and food. III. Cleveland. Ohio CRC. Press Inc. pp. 91-281; 1978.

**Información relevante**

## Efecto de una combinación de nutrientes e inhibidores del crecimiento bacteriano sobre el desarrollo de *Salmonella*

### Respecto a la autora

**Ivonne Alfonso Valdés.** Licenciada en Microbiología, Máster en Microbiología Clínica, Investigador Agregado. Desde 2010 está vinculada al proyecto de desarrollo de nuevos diagnosticadores microbianos, iniciándose en el año 2012 en la novedosa temática de nanodiagnosticadores. Es autora de una patente, más de cuatro artículos científicos e informes publicados, y ha participado en más de 17 congresos científicos. Ha asistido a más de diez cursos de posgrado. Ha estado vinculada en la formación de profesionales impartiendo conferencias, formando parte de tribunales, brindando asesoramiento, tutoría de tesis de grado y oponencia. Es miembro de sociedades científicas y ha recibido reconocimientos y premios en diferentes marcos.



### Respecto al artículo

La mezcla de bases nutritivas de diferentes orígenes y las sales biliares como inhibidor de crecimiento de bacterias grampositivas resulta una combinación eficaz para promover el crecimiento de *Salmonella* cuando estas bacterias se encuentran en baja concentración.

### La autora pregunta

Un equilibrio entre promotores, presentes en una mezcla nutritiva de diferentes orígenes, e inhibidores del crecimiento bacteriano es esencial en el diseño de un nuevo diagnosticador para la detección de microorganismos, y en especial para *Salmonella*, que puede encontrarse en muy bajas concentraciones y estar sometida a diferentes condiciones de estrés durante el procesamiento y el almacenamiento de la muestra a ensayar.

¿Qué criterio debe tenerse en cuenta para diseñar un medio de cultivo destinado a la detección de *Salmonella*?

- A) Evaluación de la composición con los microorganismos diana.
- B) Evaluación de la composición con los microorganismos no diana.
- C) Equilibrio adecuado de nutrientes e inhibidores.
- D) Las tres respuestas anteriores son correctas.
- E) Ninguna de las tres primeras respuestas es correcta.

Corrobore su respuesta: [www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/157223](http://www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/157223)

### Palabras clave

*Salmonella*, medios de cultivo, diagnosticador cromogénico y fluorogénico, colonización bacteriana, nutrición bacteriana, inhibidores bacterianos

### Keywords

*Salmonella*, culture media, chromogenic and fluorogenic diagnostician, bacterial colonization, bacterial nutrition, bacterial inhibitors

### Lista de abreviaturas y siglas

SCM, *Salmonella chromogenic médium*; ATCC, *American Type Culture Collection*; DO, densidad óptica; V, variante.

### Cómo citar

Alfonso Valdés I, Zhurbenko R, Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C. Efecto de una combinación de nutrientes e inhibidores del crecimiento bacteriano sobre el desarrollo de *Salmonella*. *Salud i Ciencia* 23(2):127-33, Ago-Sep 2018.

### How to cite

Alfonso Valdés I, Zhurbenko R, Lobaina Rodríguez T, Rodríguez Martínez C. Effect of a combination of nutrients and inhibitors of bacterial growth on the development of *Salmonella*. *Salud i Ciencia* 23(2):127-33, Ago-Sep 2018.

### Orientación

Diagnóstico

### Conexiones temáticas

Los informes de *Salud(i)Ciencia* se conectan de manera estricta (i) o amplia (▶) con diversas especialidades.

