

Artículo Original

Estudio preliminar del uso de la harina de lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) como fuente nutricional para el cultivo de microorganismos

Preliminary study of the use of earthworm (*Eisenia fetida*) flour as a nutritional source for the cultivation of microorganisms

Vielma Rosa Alba¹, Sánchez Kiralba², Márquez Elil¹, Rial Leandra¹.

¹Departamento de Ciencia de los Alimentos (Grupo Ecología y Nutrición). ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida – República Bolivariana de Venezuela.

Recibido mayo 2012 - Aceptado septiembre 2012

RESUMEN

La harina de lombriz de tierra (HL) (*Eisenia fetida*) contiene proteínas (> 60 % p/p, base seca), aminoácidos y ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales importantes en la nutrición humana y animal. Con la finalidad de evaluar la utilidad de esta harina como promotor del crecimiento microbiano, la misma fue sometida a una hidrólisis enzimática con papaína. Los productos obtenidos de este procedimiento se utilizaron para la formulación de medios de cultivo sólidos y líquidos, sustituyendo la peptona comercial. Para valorar el crecimiento en los medios elaborados, se emplearon suspensiones ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) con las cepas microbianas de referencia para ensayos de aseguramiento de la calidad de los medios, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 4768. El medio de cultivo de referencia se preparó con peptona de soya comercial (OXOID). La evaluación reveló que los hidrolizados de la HL aportaron los nutrientes necesarios para la promoción del crecimiento de los microorganismos ensayados, lo que indica que esta harina podría ser una fuente alternativa de peptonas para la elaboración de bases nutritivas con fines microbiológicos.

PALABRAS CLAVE

Eisenia fetida, harina de lombriz, medios de cultivo, microorganismos.

ABSTRACT

The earthworm flour (WF) (*Eisenia fetida*) contains proteins (> 60% w/w, dry weight), amino acids and essential fatty acids, vitamins and minerals important for human and animal nutrition. In this study, the utility of this flour as supporter of microbial growth was evaluated. For that reason, it was subjected to an enzymatic hydrolysis with papain. Products obtained from this procedure were used for the formulation of solids and liquids culture media, replacing the commercial peptone. To estimate the growth in the elaborated medium, suspensions ($1,5 \times 10^7$ CFU/mL) with the microbial reference strains were used for testing the quality assurance of the medium, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 and *Streptococcus agalactiae* ATCC 4768, were tested. Commercial soy tryptone (OXOID) was used for the reference medium. The evaluation revealed that the hydrolysates from the WF provided the necessary nutrients for promoting the growth of the microorganisms tested. The results indicate that this flour could be an alternative source of peptones for the elaboration of nutritious bases for microbiological purposes.

KEY WORDS

Eisenia fetida, earthworm, flour, culture medium, microorganisms.

INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo son mezclas de nutrientes, factores o sustancias que proveen las condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para el desarrollo, aislamiento y mantenimiento de los microorganismos [1]. La mayoría de las bacterias de importancia clínica requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. En virtud de esto, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se agregan otros micronutrientes. Estas bases se obtienen mediante extracción o hidrólisis de fuentes de alto valor nutritivo para el hombre, como la carne de vacuno proveniente de animales jóvenes y la leche descremada de alta calidad [2].

Algunos grupos de investigación han desarrollado métodos para la obtención de fuentes proteicas alternativas a partir de extractos vegetales, como la papa, maíz, cebada, soya, arroz, batatas, entre otras, con el fin de sustituir los subproductos procedentes de animales en la elaboración de bases nutritivas, dado el riesgo de transmisión al hombre de enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina y la fiebre aftosa [3]. Estudios al respecto, han demostrado que los hidrolizados vegetales a determinadas concentraciones pueden promover el crecimiento microbiano con resultados comparables a los obtenidos en medios de cultivo de referencia [3,4].

En los últimos años, la investigación sobre las propiedades biológicas y funcionales de la proteína de *Eisenia fetida*, ha demostrado su alto valor nutricional, gracias a su elevado contenido en proteínas (>60% p/p, base seca), aminoácidos y ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales [5, 6, 7]. Se ha comprobado con base al análisis físico-químico, la superioridad de la proteína de la lombriz de tierra *E. fetida* con respecto a las derivadas de extractos vegetales [3]; así mismo, han resultado equivalentes a las proteínas de alta calidad de origen animal [8].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de los medios de cultivos formulados con los hidrolizados de la harina de lombriz (*E. fetida*) para la promoción del crecimiento microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Se recolectaron aproximadamente dos kilos de lombrices de tierra *E. fetida* provenientes de la Estación Experimental de Lombricultura “Circuito de la Universidad de Los Andes para el Manejo Integral de los Desechos” (CIULAMIDE), ubicado en Santa Rosa,

Estado Mérida-Venezuela. La harina de lombriz (HL) fue elaborada siguiendo la metodología de Boulogne y col. [9]. Esta harina fue conservada en frascos de vidrio tapados a temperatura de refrigeración (4°C), hasta el momento de su uso.

Análisis físico-químico de la HL: La determinación de proteínas (Kjeldahl), grasa (Soxhlet), humedad y cenizas fueron realizadas según los Métodos Oficiales de la AOAC [10].

Análisis microbiológico de la HL: Se determinaron los indicadores sanitarios: coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF); contaje estándar de bacterias aerobias-mesófilas (BAM), mohos y levaduras establecidos por la APHA [11].

Preparación del hidrolizado de HL (HHL): Con la harina de lombriz se prepararon soluciones al 2% y 5% (con relación al contenido al contenido total de proteínas), para ello se pesaron 3,1 g y 7,72 g de HL respectivamente. El preparado al 2 % fue sonificado aproximadamente a 10 pulsaciones durante 4 min de acuerdo al procedimiento descrito por Vielma y col. [12].

Para la elaboración de la suspensión al 5%, se seleccionó una metodología diferente a la anterior debido a la cantidad de harina correspondiente para esta concentración (7,72 g). La HL fue mezclada con 50 mL de agua milli-Q, se licuó por 5 min y luego se trasvasó a un balón aforado de 100 mL.

Ambas suspensiones fueron transferidas a vasos de precipitado de 250 mL y tratadas con papaína (actividad enzimática: 0,124 Ucas/mL), a una concentración de 10 mg/g de sustrato a pH 6 y temperatura de 50 °C por 4 horas [13]. Posteriormente, se procedió a centrifugar cada preparado a 4000 rpm x 15 min. El sobrenadante se recolectó en frascos plásticos para su conservación en refrigeración. A cada producto se le determinó el Nitrógeno total (AOAC) [10].

Preparación de medios de cultivo: Se elaboraron medios de cultivo sólidos y líquidos, empleando los hidrolizados al 2% y 5%, en sustitución de la peptona de soya comercial según las concentraciones siguientes: en el caso de los medios sólidos, se utilizó hidrolizado enzimático de caseína (15 g/L), HHL al 2% y 5% (50 mL/L) respectivamente, cloruro de sodio (5 g/L) y agar (15 g/L). Para los medios líquidos se agregaron los siguientes ingredientes: hidrolizado enzimático de caseína (17 g/L), HHL al 2% y 5% (50 mL/L) respectivamente; dextrosa (2,5 g/L), fosfato básico de potasio (2,5 g/L) y cloruro de sodio (5 g/L). Como control se prepararon medios líquidos y sólidos con los ingredientes anteriormente señalados, adicionándoles la peptona de soya comercial (Oxoid)

en lugar de los HHL. El pH se ajustó entre 6,8 y 7,2 utilizando pHmetro (Microprocessor pHMeter Hanna Instruments pH 211). La esterilización se efectuó a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 min. Previo a la utilización de los medios de cultivo, se procedió a realizar el control de esterilidad y luego estos fueron refrigerados hasta el momento de su uso.

Promoción del crecimiento microbiano: Para la evaluación del desempeño de los medios de cultivo en función del crecimiento microbiano, se utilizaron cepas de referencia provenientes de la American Type Culture Collection: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 4768; así mismo, se ensayaron *Streptococcus pneumoniae* (aislamiento clínico, suministrado por el Laboratorio de Microbiología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes) y *Candida albicans* (aislamiento clínico, cedido por el Laboratorio de Micología de la Escuela de Bioanálisis, Universidad de Los Andes). Con cada cepa microbiana se preparó una suspensión en solución salina estéril (0,85%) equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, luego se hizo una dilución 1:10 y a partir de ésta se inoculó 10 µL sobre el agar, extendiéndose mediante la técnica de siembra por estría sobre superficie, tanto en los medios de cultivo experimentales como de referencia; luego se incubaron a una temperatura de 35°C, bajo condiciones aeróbicas, por 18-24 horas [14]. La valoración del crecimiento microbiano se realizó por medio de pruebas cualitativas [15]. En este sentido, en los medios de cultivos sólidos ésta se efectuó mediante la observación de colonias sobre la superficie del agar hasta último trazado, y en los medios líquidos por aumento de la turbidez al compararlos con un tubo con medio experimental sin inocular y con el caldo de referencia. Posterior a la incubación, a todos los medios de cultivo líquidos inoculados se les practicó subcultivo en agar sangre y extendidos para tinción de Gram. La experiencia se llevó a cabo por duplicado para cada medio de cultivo preparado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Química de la harina de lombriz (HL): La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos del análisis proximal de la HL. Estos valores indican el potencial que tiene esta harina como materia prima para la formulación de medios de cultivo, debido a que el contenido de nitrógeno total requerido en las bases nutritivas oscila entre 5 y 20 % [13].

TABLA 1
Composición Química de la HL

Muestra	% Humedad	% Cenizas	% Grasa	% Proteína	% N total
HL	7,63 ± 0,18	6,08 ± 0,29	7,54 ± 0,07	64,76 ± 0,17	10,36 ± 0,04

HL: harina de lombriz. N: nitrógeno

Análisis microbiológico de la harina de lombriz (HL): En la Tabla 2, se señalan los datos de calidad sanitaria de la HL, los cuales se encontraron dentro de los parámetros permitidos para harinas de consumo humano o animal [16]. Resultados similares fueron encontrados por Vielma y col. [12]. Este hallazgo aunado al bajo contenido de humedad (7,63%), garantizaron los estudios de promoción del crecimiento microbiano sin riesgo de contaminación durante la elaboración de los medios de cultivo.

TABLA 2
Análisis microbiológico de la harina de lombriz (HL)

BAM (UFC/g)	Coliformes Totales (NMP/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)
4,6x10 ⁴	<3	<3	2 x10 ²	4x10 ²

BAM: Bacterias aerobias mesófilas. NMP: número más probable. UFC: unidades formadoras de colonias.

Características de los medios de cultivo elaborados con HHL al 2% y 5%: Los medios de cultivo sólidos formulados con HHL fueron de color beige y de aspecto opaco; mientras que, los medios líquidos preparados con HHL presentaron ligera turbidez, debido a la presencia de materia orgánica insoluble; este hecho imposibilitó la valoración del crecimiento microbiano por densidad óptica. Es importante resaltar, que la transparencia es un aspecto relevante desde el punto de vista microbiológico en la mayoría de los medios de cultivos, por lo que se recomienda la filtración, evaporación y secado por aspersion para eliminar sustancias insolubles [13]. No obstante, este aspecto no fue considerado primordial en este estudio preliminar.

Evaluación microbiológica de los medios de cultivo: Las formulaciones con HHL sólidas, soportaron el desarrollo de todos los microorganismos probados, excepto *S. pneumoniae*, representante de las bacterias de requerimientos nutricionales exigentes, que no desarrolló colonias detectables a simple vista en estos medios (Tabla 3). En los medios líquidos suplementados con la HHL al 2% y al 5%, todos

los microorganismos ensayados desarrollaron un aumento en la turbidez, del caldo, comparados con los medios de referencia. A partir de cada medio se realizó subcultivo en agar sangre y extendidos en láminas portaobjeto para teñir con Gram. En todos los casos se obtuvo desarrollo bacteriano y se observaron microorganismos en la tinción compatibles con la cepa ensayada.

TABLA 3

Resultados del crecimiento microbiano en medios sólidos experimentales

Microorganismos	HHL 2%	HHL 5%	Agar con peptona comercial (control)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	2	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	2	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 4768	1	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	1	1	1

HHL: hidrolizado de harina de lombriz.

2: hubo crecimiento hasta cuarto cuadrante de la placa de agar.
1: hubo crecimiento entre primer y segundo cuadrante de la placa.
0: no hubo crecimiento

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de factores de crecimiento microbiano en los subproductos de la HL (*E. fetida*). Este hallazgo resalta la utilidad de esta fuente de compuestos nitrogenados, carbono y otros factores para la elaboración de medios de cultivo con diferentes propósitos. Originalmente, todas estas sustancias se suministraban en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, durante la preparación de los medios de cultivo muchos de estos componentes se desnaturalizaban durante el calentamiento. Actualmente, la forma más extendida de aportar estos factores a los medios es utilizando peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbono ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona [17].

En este trabajo no se observaron diferencias en cuanto a la promoción del crecimiento microbiano empleando los HHL tanto al 2% como al 5%. En tal sentido, se recomienda caracterizar desde el punto de vista físico-químico los productos obtenidos y evaluar

el costo-beneficio que significa la utilización de uno u otro subproducto como una fuente proteica alternativa para la preparación de bases nutritivas.

Es importante señalar que estos resultados preliminares, forman parte del estudio sobre la diversificación del uso de la harina de lombriz de tierra; por lo tanto, el presente trabajo ofrece un aporte interesante en la fabricación de bases nutritivas sin ningún tipo de riesgo microbiológico.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este ensayo, los hidrolizados de la HL (*Eisenia fetida*) proporcionaron los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos exigentes y no exigentes. Se sugiere eliminar las partículas insolubles de estos hidrolizados, para obtener medios de cultivo conforme a las exigencias de los ensayos microbiológicos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes (Proyecto N° ZG-ITS-FA-01-94-07) y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) Caracas (proyecto N° 200-5000-869).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] García E. Medios de cultivo. Clasificación y aplicación. En: Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J. Manual práctico de bacteriología general. 1ª ed. Mérida:Editorial Venezolana, C.A.; 2006. p 57-67.
- [2] Bridson EY. The OXOID Manual. 8va Ed. OXOID Limited. United Kingdom (Basingstoke): Wade Road; 1998. p. 389-395.
- [3] Rodríguez T, Rodríguez C, Rodríguez 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. 2007; 59:218-226.
- [4] Zhurbenko R, Rodríguez C, Díaz M, Durán A, López O, Viera, D. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58:109-118.
- [5] Vielma R, Ovalles J, León A, Medina A. Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y

derivatización precolumna. *Ars Pharmaceutica*. 2003a; 44:43-58.

[6] Vielma R, Usubillaga A, Medina A. Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz *Eisenia foetida* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Rev Fac Farmacia*. 2003b; 45:39-42.

[7] Vielma, R, Carrero, P, Rondón, C, Medina, A. Comparación del contenido de minerales y elementos trazas en la harina de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) utilizando dos métodos de secado. *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela. 2007; 19(1): 25-29.

[8] García M, Macías M, Martínez V, Rodríguez M, Mastrapa L, Domínguez P. Composición química de dos especies de lombrices de tierra (*Eisenia foetida* y *Eudrilus eugeniae*) obtenidas a partir de residuales porcinos. *Rev Comp de Produc Porcina*. 1997; 4(2):45-52.

[9] Boulogne S, Márquez E, García J, Medina A, Cayot P. Optimización de la operación de secado de la carne de lombriz (*Eisenia andrei*) para producir harina para el consumo animal. *Rev Ciencia e Ingeniería*. 2008; 29(2):91-96.

[10] AOAC Association of Official Analytical Chemists of AOAC international. *Official Methods of Analysis*. 18va ed. Current Through (Maryland, 20877-2417-USA): 2005. p. 24.

[11] American Public Health Association (APHA). *Compendium of methods for the examination of food*.

3ra Ed. (Washington): 1992. p. 25-245.

[12] Vielma R, Rosales D, Rosales Y, Medina A, Villareal J. Perfil electroforético y calidad microbiológica de la harina de lombriz *Eisenia foetida*. *Rev Chil Nutr*. 2008; 35:225-228.

[13] 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-Cuba: Universidad de La Habana; 2005.

[14] Nieves M. Preparación de medios de cultivo. En: Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J. *Manual práctico de bacteriología general*. 1ª ed. Mérida: Editorial Venezolana, C.A.; 2006. p 67-76.

[15] Norma ISO/TS 11133-2:2000. Aseguramiento de la calidad de medios de cultivo. Disponible en: URL: http://www.scientificainc.com/aseguramiento_calidad_medios_cultivo.html. [Consulta 2010, Octubre 23].

[16] Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). *Harina Integral de trigo (2703)*. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio de Desarrollo Social. Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Caracas, Venezuela. 1995.

[17] Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock. *Biología de los microorganismos* 8ª ed. Madrid:Prentice Hall; 1998.