



AgEcon SEARCH
RESEARCH IN AGRICULTURAL & APPLIED ECONOMICS

The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*



Elaboración de probiótico a base de suero de leche de vaca, para combatir infecciones de *Vibrios sp.*, en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental.

MSc Claudia Herrera Sirias
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Laboratorio Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA)
[Email: claudiahs13@yahoo.com](mailto:claudiahs13@yahoo.com)

Ing. Fernando José Canales Chamorro
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Laboratorio Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA)
[Email: evenormg1@yahoo.com](mailto:evenormg1@yahoo.com)

Dr. Evenor Martínez González
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León
Laboratorio Investigaciones Marinas y Acuícolas (LIMA)
[Email: evenormg1@yahoo.com](mailto:evenormg1@yahoo.com)

Recibido 02 Octubre 2014

Aceptado 02 noviembre 2014

RESUMEN

Los probióticos son alternativas viables para competir por espacio con las bacterias gran negativas, Una fuente de bacterias que funcione como probiótico puede generarse a partir del suero de la leche devaca. de En este trabajo se pretende verificar la eficacia del probiótico elaborado a base de suero de leche de vaca, para combatir infecciones de *Vibrios sp.*, (*V. Alginolítico* y *V. parahemolítico*) en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental. Para llevar a cabo este experimento se procedió a verter el suero en un frasco durante 48hrs, se distribuye en los medios de cultivo a diferente diluciones con melaza, las cuales serán de 8-1,10-1,12-1, estas diluciones tuvieron tres repeticiones cada una. se medieron temperatura y pH como los factores que pudieran influir mas en la dinámica poblacional de las bacterias de *Lactobacillus acidophilus*. Se prepararon los medios de cultivo y conteo de bacteria. Como resultados se obtuvo que la temperatura en el experimento varió entre 30°C a 40°C, el pH presentó valores menores a 4.5. La dilución 8:1 fue la que presento un mayor crecimiento población de bacterias alcanzando 431,8 millones de cel/ml de *L. acidophilus*, seguidamente de la dilucion10:1 con 394,7 millones de cel./ml y en la dilución 12:1, 302 millones de cel/ml. La mejor dilución fue 8:1 dando en colonias verdes un halo de 9mm, en colonias amarillas el halo fue de 1 cm, ambos con una concentración de 30ul.

PALABRAS CLAVES: Probióticos, camarones.



1- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacteriales que atacan a los camarones en cultivo, debido principalmente a *Vibrio*, que han sido reportadas son: *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterranei*, *V. logei*.^[5]

La tendencia actual es de restringir o reducir el uso de antibióticos debido a la aparición de resistencia bacteriana, problemas ecológicos, restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de camarones y su incidencia en la salud humana. Las estrategias de control han sido encaminadas hacia el uso de técnicas mejoradas en larvicultura, programas de selección genética, uso de tolerinas, aplicación de lipopolisacáridos, β -glucanos y peptidoglicanos para incrementar el rendimiento y resistencia a enfermedades de origen viral o bacteriano^[8].

Una estrategia de control bacteriológico, muy interesante y con resultados prometedores, se enfoca al empleo de probiótico (bacterias benéficas), como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de exclusión competitiva. El uso de probiótico es una herramienta viable, ya que las bacterias probióticas, colonizan el tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos,^[3].

En este trabajo se pretende verificar la eficacia del probiótico elaborado a base de suero de leche de vaca, para combatir infecciones de *Vibrios* sp., (*V. Alginolítico* y *V. parahemolítico*) en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación Marino Acuícola (LIMA), de la UNAN, León, ubicada en Poneloya - Las Peñitas, a 20 kilómetros de la ciudad de León - Nicaragua.

El suero de leche para realizar esta investigación se elaboró a partir de leche comprada a expendedora de leche en la Ciudad de León. Se tomaron dos frascos de vidrios de un volumen de 4L de capacidad. En cada frasco se le colocó 3L de la muestra del suero de leche.

Estos frascos se pusieron a fermentar en un cuarto cerrado donde se enumeró F1 y F2. Se tomó el frasco número dos y una vez pasado 48hrs, se distribuyó en los medios de cultivo a diferentes diluciones con melaza, las cuales fueron de 8-1, 10-1, 12-1, estas diluciones tuvieron tres repeticiones cada una. El frasco F1 se dejó como testigo del suero puro.^[5]

Factores Físico química (pH, Temperatura).

En este trabajo y para determinar cuánto influyeron los factores físico químicos en el comportamiento de las bacterias se midieron temperatura y pH como los factores que pudieran influir más en la dinámica poblacional de las bacterias de *Lactobacillus acidophilus*.^[2]

El pH diario se registró dos veces por día a las 7am y 5pm, con un pH-metro marca HANNA, y la temperatura se registró a las mismas horas con un Termómetro de mesa.

Conteo de *Lactobacillus Acidophilus*. (NEUBAUER).

El conteo de las bacterias *Lactobacillus acidophilus* se realizó desde el día cero, cada 24hrs hasta que la muestra presentó indicios de disminución en el crecimiento bacteriano o decadencia.

Las muestras fueron obtenidas utilizando una pipeta de 10 ml de capacidad, se toma 1 ml de muestra de suero y se colocó en un tubo de ensayo, luego se agregan 9 ml de agua filtrada. A esta dilución se le toma 1 ml que sirve para llenar la cámara de NEUBAUER.



Para calcular cuantos Lactobacilus tenemos en los frascos se procedió de la siguiente manera. Con un microscopio binocular compuesto marca I-4 LW Scientific y con el lente objetivo 43X se procede a realizar el conteo de bacteria en cada una de las 25 cuadrículas del Centro de la Cámara. Las expresiones matemáticas para el cálculo son los siguientes:

Fórmula de conteo de Lactobacilos acidophilus.

Lactobacilus (Cel/ml) = $N \times 50,000 \times 10$.

N = Número de L. acidophilus cuantificados en la muestra.

50,000 = Volumen de las cuadrículas de la cámara.

10 = Factor de dilución del suero.

Los valores obtenidos de la cámara se expresan en Millones de células / mililitro (cel/ml).^[5]

Preparación de medios de cultivos específicos (Agares).

Para la preparación de estos Agares de cultivo se procedió de la siguiente manera:

Los agares MRS, Lactobacilus, Bacto agar, TSA, Mueller Hinton, se prepararon en una hoya autoclave marca Aquatic M 25-1, a 15 lb de presión, temperatura de 121 °C

Para la preparación del medio TCBS, se utilizó un erlenmeyer de 500 ml, una cocina de gas marca ANCHOR, papel aluminio y un mechero y asa de siembra

Preparación del caldo MRS, para lactobacilos.

Se pesaron 52.2 gramos de agar MRS y se completó a 1 litro con agua destilada. Se preparan solamente 100 ml para su uso.

Bacto agar: para uso solidificante. Se pesaron 1.5 gramos de Bacto Agar.

Agar glucosa 4% según Sabouraud: para la identificación y crecimiento de otras bacterias.^[1]

Conteo de las colonias de Lactobacilos acidophilus.

Se realizó el conteo de las colonias (entre 24 a 36 horas después de iniciada la siembra, según la temperatura), de la siguiente manera de acuerdo con el diámetro del ojo del aza de siembra se multiplicara el número total de las colonias y será expresado en unidades formadoras de colonias /mililitro (UFC/ML). Los datos se anotaran en el formato del laboratorio del LIMA. Este conteo se realiza para confirmar las poblaciones de bacterias vistas al microscopio.

Aislamiento de cultivo de Vibrio sp.

Para el aislamiento del cultivo de vibrio, se tomaron muestras de camarón el cual se le extrajo del hepatopancreas con una pinza, posteriormente se sembraron en su medio de cultivo específico de agar TCBS.

Agar TCBS, para aislamiento y cultivo selectivo de vibrio. Se pesan de 88gramos y se completa a 1 litro con agua destilada. Se preparan solamente 100 ml para su uso.

Prueba de antibiograma.

La prueba de antibiograma se realizó tres veces en crecimiento de los *Lactobacillus* hasta cuando estos decaigan, el cual se utilizaron los siguientes materiales: Una micropipeta de 10-200ul, para determinar la concentración mínima inhibitoria a este vibrio. Y el grado de sensibilidad esta tiene ante estas cepas para probiótico.

Agar con Soja Triptica (TSA), Medio agar con digeridos de soja y caseína, USP. Para enriquecimiento. Se pesaron de 40 gramos y se completa a 1 litro con agua destilada. Se prepararon solamente 100 ml para su uso.

Agar Mueller Hinto, para examinar la sensibilidad de patógenos clínicos. Se pesaron 34gr, y se completa a 1 litro con agua destilada. Se prepararon solamente 100 ml para su uso.

Las diferentes dosis que se aplicaran a los medios de cultivo de vibrios sp (*V. parahemoliticus* y *V.alginoliticus*) en las diferentes diluciones son las siguientes:

8-1: 10ul, 20ul, 30ul, 10-1: 10ul, 20ul, 30ul, 12-1: 10ul, 20ul, 30ul.^[4]

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factores Físico químicos

Temperatura.

Las variaciones de temperaturas durante el período del estudio se mantuvieron en los intervalos aceptables para un crecimiento óptimos bacteriano, en el cual el grafico G, 1 nos muestra que la temperatura por la tarde se mantuvo a 33 T°C y disminuye a 32T°C por causas ambientales (lluvia) el día ocho. De igual manera las temperaturas por la mañana se mantuvieron en los intervalos óptimos de crecimiento en la cual estaba en 31T°C de igual forma disminuye 30T°C el día ocho por causa ambientales.

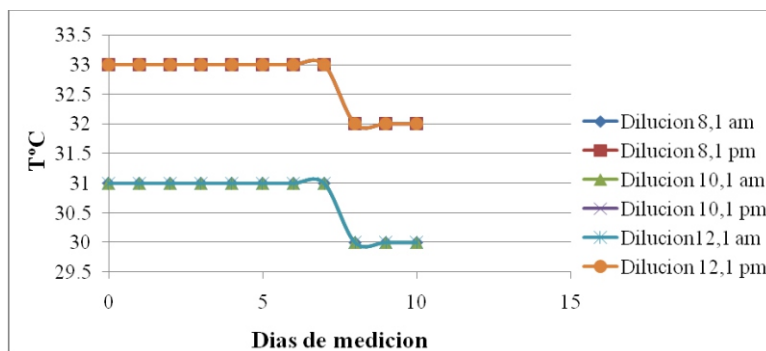


Grafico G, 1. Variables de temperaturas (am, pm) de las diferentes diluciones del suero

Podemos resumir que las temperaturas imperantes durante este experimento estuvieron en los intervalos adecuados para el crecimiento de las poblaciones de las bacterias *Lactobacillus acidophilus*,^[6]



PpH.

Las variaciones de pH durante el periodo del estudio se mantuvieron en los intervalos óptimos de crecimiento, en el cual el grafico G, 2 nos muestra que el pH por la tarde se mantuvo en un promedio de pH de 4 e igual forma el pH por la mañana se mantuvo a pH4.

Los pH nos muestran las condiciones de acidez o basicidad del medio, en este caso los valores registrados muestran que las bacterias tuvieron las condiciones adecuadas para su crecimiento poblacional^[2]

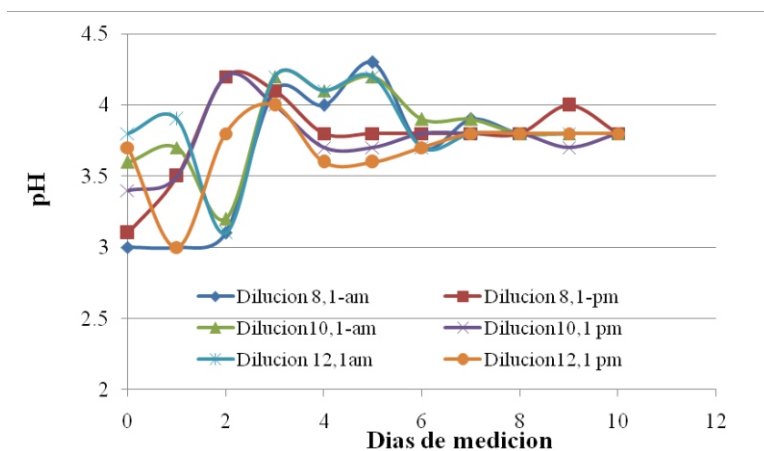


Grafico G, 2. Variables de pH (am, pm) de las diferentes diluciones del suero.

Crecimiento Poblacional.

La población de *L. acidophilus* presenta un crecimiento leve entre el día 0 al día 1. La fase exponencial se presenta desde el segundo día de conteo hasta su máximo alcance el quinto día. El día sexto presenta decaimiento hasta culminar la pendiente negativa de la curva el día 10. El grafico G,3 nos muestra que la dilución 8:1 fue la que presentó un mayor crecimiento poblacional alcanzando 431,8 millones de cel./ml de *L. acidophilus*. Seguidamente de la dilución 10:1 presentó una población promedio de 394,7 millones de cel./ml de *L. acidophilus* y la dilución 12:1, registraron los valores menores con 302 millones de cel./ml de *L. acidophilus*.

El comportamiento de las poblaciones de *L. acidophilus* en todas las diluciones son aceptables, independientemente que en 8:1 se halla expresado el valor máximo de 431 millones de Cél/ml. Teniendo una diferencia significativa con la dilución de 12:1. Estas poblaciones guardan el mismo comportamiento de crecimiento que las de las bacterias en general^[6].

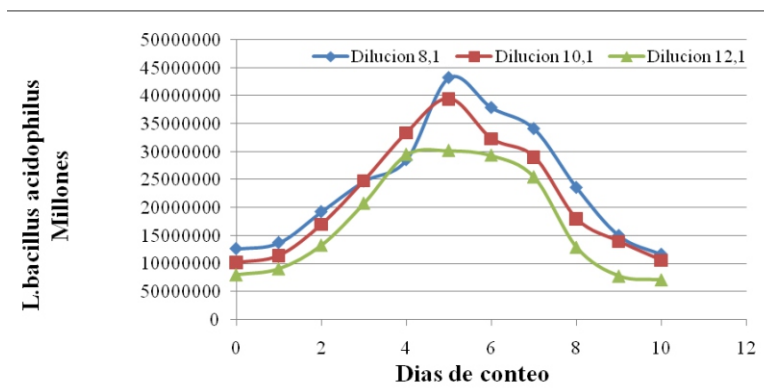


Grafico G, 3. Crecimiento poblacional de bacterias en las diferentes diluciones del suero.



Prueba de sensibilidad.

Los resultados obtenidos a las pruebas de sensibilidad del probiótico elaborado y conteniendo *Lactobacillus acidophilus* ante cultivos microbiológicos conteniendo colonias de *Viriones parahemolíticos* y *V. alginoliticus* presentaron sus mejores resultados de repelencia cuando se aplicó el producto con al quinto día de crecimiento de las poblaciones bacterianas de *L. acidophilus*.

En la cual la dilución 8,1 con una población de 431, 833,333 mill de cel. /ml de *L. acidophilus* en colonias verdes con una dosis de 30ul tubo un halo de 9mm, en colonias amarillas igual dosis tuvo un halo de 1cm, la dilución 10,1 con una población de 394, 666,666 mill de cel. /ml de *L. acidophilus* en colonias verdes con una dosis de 30ul tubo un halo de 5mm, en colonias amarillas con una dosis de 30ul tubo un halo de 9mm, la dilución 12,1 con una población de 302, 000,000, mill de cel. /ml de *L. acidophilus* en colonias verdes con una dosis de 30ul tubo un halo de 5mm, en colonias amarillas con una dosis de 30ul tubo un halo de 9mm.^[1]

C. verde dilución 8.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	9mm	431333333
20ul	6mm	431333333
10ul	4mm	431333333

C. amarilla dilucio8.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	1cm	431333333
20ul	5mm	431333333
10ul	3mm	431333333

C. Verde dilución 10.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	5mm	394500000
20ul	2mm	394500000
10ul	1mm	394500000

C. amarilla dilucion10.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	9mm	394500000
20ul	5mm	394500000
10ul	3mm	394500000

C. verde dilución 12.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	5mm	301833333
20ul	3mm	301833333
10ul	2mm	301833333

C. amarilla dilución 12.1		
dosis ul	Halo	Población(Millones)
30ul	9mm	301833333
20ul	6mm	301833333
10ul	1mm	301833333



4- CONCLUSIONES

- 1.- La temperatura en el experimento varió entre 30°C a 40°C, el pH presentó valores menores a 4.5.
- 2.- La dilución 8:1 fue la que presentó un mayor crecimiento población de bacterias alcanzando 431,8 millones de cel./ml de *L. acidophilus*. Seguidamente de la dilución 10:1 con 394,7 millones de cel./ml y en la dilución 12:1, 302 millones de cel/ml.
- 3.- De acuerdo a la prueba de sensibilidad los halos obtenidos en las colonias verdes y amarillas dieron mejores resultados al quinto día a continuación se concluye con el siguiente cuadro:

. Dilución	Color Colonia	Dosis	Diámetro halo
8:1	Verde	30ul	9mm
	Amarilla	30ul	1 cm
10:1	Verde	30ul	5mm
	Amarillas	30ul	9mm
12:1	Verde	30ul	5mm
	Amarilla	30ul	9mm



5- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Calvo M. 2009. Probióticos, Prebióticos y Nutracéticos en la alimentación. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, (Barcelona). España. 36 p.
- 2.- Carvajal J. 2009. Mecanismos de acción del pH en los microorganismos. Universidad de Navarra. Pamplona, España. 7 p. <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/09-factores%20de%20supervivencia.htm>
- 3.- Cedeño R. 2005. Probiótico y sus aplicaciones en el cultivo del camarón. Departamento de biología CENAIM – ESPOL. 34 p.
- 4.- Higa T. 2010. Los microorganismos eficaces: aliados en el cultivo sostenible de camarones. San Ignacio, Municipio Falcón, Tinaquillo, Estado Cojedes, Venezuela. 46 p. www.ecotecnologias.com.ve
- 5.- Medina M. 2006. Infección experimental del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* con *Spiroplasma penaei* y respuesta de la enfermedad ante tres antibiótico y un probiótico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Industrial Bogotá Colombia. 52 p.
- 6.- Ronsón J.y Medina C. 2001. Probióticos en la acuicultura. *Laboratorio Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela. España 46,47 p.
- 7.- Venkateswara A. 1998. Vibriosis en el cultivo del camarón. Centro de Investigación Bacteriológica. Bogotá, Colombia. 58 p.
- 8.- Villamil L y Martínez M. 2009. Probiótico como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo lozano, grupo de investigación en cultivo y manejo de organismos acuáticos. Santa Marta, Colombia, 167-178 p.