

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León
Facultad de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Carrera de Ingeniería Acuícola



Presentación de la tesis de grado

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

Elaborado por:

Br. Fernando José Canales Chamorro.

Br. Walter José Martínez Calderón.

León, Septiembre, 2010

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León
Facultad de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Carrera de Ingeniería Acuícola



Presentación de la tesis de grado

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

Elaborado por:

Br. Fernando José Canales Chamorro.

Br. Walter José Martínez Calderón.

Tutora: Lic. Claudia Herrera Sirias.

Asesora: Lic. Brenda M^a Rosales Cárdenas.

León, Septiembre, 2010

INDICE

INDICE.	i
RESUMEN.	ii
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS.	3
III.- Literatura Revisada.	4
3.1.-Biología de camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .	4
3.1.1.-Ciclo vital.	4
3.1.2.-Camaronicultura en Nicaragua.	4
3.2.- Vibriosis sp.	5
3.2.1.-Patogenicidad del <i>Vibrio</i> .	5
3.2.2.-Estado actual de vibriosis.	5
3.2.3.- Transmisión, signos de la Vibriosis y estrategias de control.	6
3.2.3.1.-Transmisión.	6
3.2.3.2.-Signos de la enfermedad.	6
3.2.3.3.-Estrategias de control.	7
3.2.4.-Enfermedades bacterianas causadas en cultivos de camarón en cultivos de engorde y postlarva.	7
3.2.4.1.-Bacterias Gram positivas.	7
3.2.4.1.1.-Mycobacteriosis.	7
3.2.4.1.2.-Septicemia Bacteriana.	7
3.2.4.1.3.-Necrosis del Hepatopáncreas (NHP).	8
3.2.4.1.4.-Enfermedad de la Mácula Oscura.	8
3.2.4.1.5.-Enfermedades asociadas con bacterias filamentosas.	8
3.2.4.2.-Bacterias Gram negativas.	8
3.2.4.2.1.-Vibriosis Sistémica.	8
3.2.4.2.2.-Camarón manchado.	9
3.2.4.2.3.-Síndrome de la gaviota.	9
3.2.4.2.4.-Síndrome de la zoea II.	9

3.2.4.2.5.- Síndrome de las bolitas. -----	9
3.2.4.2.6.-Vibriosis Luminiscentes. -----	10
3.3.-Antecedente, Origen de los Probióticos. -----	10
3.3.1.-Probiótico en la acuicultura. -----	11
3.3.2.-Definiciones de probiótico por varios autores. -----	12
3.3.3.-Mecanismos de acción de los probiótico. -----	12
3.3.4.-Uso de probiótico en el cultivo del camarón. -----	15
3.3.5.-Características del probiótico. -----	15
3.3.6.-Microorganismos de mayor aplicación como probióticos. -----	16
3.3.7.-Bacteria <i>Lactobacillus acidophilus</i> . -----	17
3.3.7.1.- <u>Clasificación científica</u> . -----	17
3.3.7.2.-Fisiología de <i>Lactobacillus acidophilus</i> . -----	17
3.3.7.3.-Caracteres morfológicos. -----	17
3.3.7.4.-Pared celular y ultra estructura. -----	17
3.3.7.5.-Caracteres culturales y de las colonias. -----	18
3.3.7.6.- Nutrición y condiciones de crecimiento. -----	18
3.3.7.7.-Condiciones ecológicas. -----	19
a).-pH. -----	19
b).-Necesidades de Oxígeno. -----	19
c).-Temperatura de crecimiento. -----	19
d).-Metabolismo. -----	20
3.4.-Crecimiento microbiano. -----	20
3.4.1.-Fases de crecimiento microbiano. -----	20
a).-Fase de latencia. -----	20
b).-Fase exponencial. -----	20
c).-Fase estacionaria. -----	20
d).-Fase de muerte. -----	21
3.4.2.-Factores que intervienen en el crecimiento microbiano. -----	21
3.4.3.-Factores ambientales y crecimiento microbiano. Temperatura, pH, agua. Nutrientes, oxígeno. -----	21

3.4.4.- Efectos del pH a los microorganismos. -----	23
3.4.5.- El pH en Bacterias no formadoras de Esporos. -----	23
3.5.-Equipos de trabajo de un laboratorio microbiológico. -----	24
3.5.1.-Esterilización y desinfección del material de microbiología. -----	27
3.5.2.-Uso de la Cámara Neubauer o Hemacitometro. -----	27
3.5.3.-Métodos de conteo en la cámara neubauer. -----	28
3.5.4.-Antibiograma. -----	28
3.5.4.1.-Tipos de antibiograma. -----	28
3.5.4.2.-Concentración mínima inhibitoria (CMI). -----	28
3.5.4.3.-Factores que influyen en el antibiograma. -----	29
3.5.5.-Agares utilizados en cultivo microbiológicos. -----	29
3.6.-Utilización de melaza en estanques de cultivo de camarón. -----	31
3.7.-Suero de leche de vaca. -----	32
3.7.1.-Clases de sueros líquidos. -----	32
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS. -----	33
4.1.-Área de estudio. -----	33
4.2.-Dispositivo experimental. -----	33
4.3.-Diluciones de inóculo o suero puro F2. -----	33
4.4.-Factores Físico-Químico (pH, Temperatura). -----	33
4.4.1.- pH. -----	34
4.4.2.- Temperatura. -----	34
4.5.-Conteo de Lactobacillus Acidophilus. (NEUBAUER). -----	34
4.5.1Fórmula de conteo de lactobacilos Acidophilus. -----	34
4.6.-Preparación de medios de cultivos específicos (Agares). -----	34
4.6.1.-Agar con Soja Triptica (TSA). -----	35
4.6.2.-Agar Mueller Hinto. -----	35
4.6.3.-Agar TCBS. -----	35
4.6.4.-Caldo MRS, para Lactobacilos. -----	35

4.6.5.-Bacto agar. -----	35
4.7.-Conteo de las colonias de Lactobacilos acidophilus. -----	35
4.8.-Aislamiento de Vibrio sp. -----	35
4.9.-Prueba de antibiograma. -----	36
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN. -----	37
5.1.-Factores físico- químico. (Temperatura, pH). -----	37
5.1.1.-Temperatura. -----	37
5.1.2.-pH. -----	37
5.1.3.-Crecimiento Poblacional. -----	38
5.1.4.-Prueba de sensibilidad. -----	39
5.1.4.1.- Resultados de Halos. -----	39
VI.- CONCLUSIONES. -----	42
VII.- RECOMENDACIONES. -----	43
VIII- BIBLIOGRAFÍA. -----	44
IX.-ANEXO. -----	46

RESUMEN.

La camaronicultura es una de las actividades productivas más rentables y generadora del importante recurso que ayuda principalmente a mejorar la economía y la calidad de vida de los habitantes de la zona donde se realiza esta actividad, Pero en la actualidad, el mayor problema que enfrenta la industria de la acuicultura en el ámbito mundial, son las enfermedades causadas por varios agentes biológicos y no biológicos. La realización de este trabajo investigativo de tesis, pretende dar solución a varios problemas e incógnitas que se tienen con el uso inadecuado del probiótico, como por ejemplo pretende dar respuesta al sector de la camaronicultura que no tiene acceso a esta tecnología en el uso del probiótico, el efecto que tiene para contrarrestar los Vibrios, la administración, dosis correcta y mejor aplicación. Para dar mejores resultados en las producciones del cultivo. Para esto se requirió de suero de leche de vaca comprada en una expendedora de leche en la Ciudad de León. Se tomaron dos frascos de vidrios de un volumen de 4L de capacidad, con tapadera de rosca. Los frascos se rotularon como frasco N°1(F1) Y frasco N°2(F2). En cada frasco se le coloco 3L de la muestra del suero de leche. Posteriormente se sellaron herméticamente con plástico negro, para el proceso de fermentación en un cuarto cerrado. Una vez pasada las 48 hrs se mantuvieron el F1 como testigo del suero puro, y, el F2 se realizara 3 tipos de diluciones (inoculo o suero puro, melaza y agua), las cuales consisten en dilución 8-1, 10-1, y 12-1. Cada dilución tendrá tres repeticiones para mayores datos probabilísticos. Las variaciones de temperaturas durante el periodo del estudio se mantuvieron en los intervalos óptimos de crecimiento, 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. 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. 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 presento un mayor crecimiento población alcanzando 431,8 millones de cel. /ml de *L. acidophilus*. Seguidamente de la dilucion10:1 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* Los resultados obtenidos a las pruebas de sensibilidad del probiótico elaborado y conteniendo *Lactobacillus acidophilus* ante cultivos microbiológicos conteniendo colonias de *Vibriones parahemolyticus* y *V. alginolyticus* presentaron sus mejores resultados de repelencia cuando se aplicó el producto con al quinto día de crecimiento de las poblaciones bacterianas de *L. acidophilus*. Debido a esto concluimos que la realización de probiotico a base de suero de leche de vaca es eficaz a las bacterias patógenas del cultivo del camaron.

I.- INTRODUCCIÓN

La actividad de camaronicultura toma relevancia en las actividades económicas del país en 1992 y desde esa fecha, la participación del sector ha venido creciendo a un ritmo de un 10% anual en los últimos años. En ese período la producción de cultivo de camarón en Nicaragua, paso a significar el 50% de todas las exportaciones de camarón y el 30 % de todos los productos pesqueros, así como el 4% del total de las exportaciones del país (Montalván,2005). Estimaciones generales indican que la actividad de acuicultura genera cerca de 24 mil empleos, de los cuales, unos 15 mil trabajan en empresas y cooperativas camaroneras, y el restante de los empleos los generan las actividades de acopio, pesca de larvas y otras actividades relacionadas. (De Franco A, 2006).La acuicultura es el sector de producción de alimento de más rápido crecimiento en el ámbito mundial y a nivel nacional se ha establecido como una fuente de proteína para satisfacer la demanda de alimentos, debido a que los recursos naturales están sobreexplotados. Pero en la actualidad, el mayor problema que enfrenta la industria de la acuicultura en el ámbito mundial, son las enfermedades causadas por varios agentes biológicos y no biológicos. Entre los grupos de microorganismos que causan perdidas severas en el cultivo de camarón, son las bacterias, debido a los efectos devastadores que tienen sobre las granjas afectadas.

Las enfermedades bacteriales, debido principalmente a *Vibrio*, que han sido reportadas en los sistemas de cultivo de camarones , las cuales son: *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. campbelli*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii*, *V. mediterrani*, *V. logei*.(Venkateswara A,1994).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. 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 (Moriarty, 1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001; Gullian 2001). (Sotomayor A. y Balcázar L.J.2003).

Para el mejoramiento de la producción camaronera se han introducido tecnologías, para esto una de ellas es el utilizar probioticos para su mejoramiento como una biorremediacion, el cual mejora la calidad del agua y el bio control del estado de salud del camarón. Debido a su alto costo económico de producción estos no son accesibles a todos los productores camaroneros. El saber si las formas metodológicas de preparación y aplicación de las dosis son las adecuadas para su efectividad contra las enfermedades producidas por las bacterias *Vibrios* sp para un buen rendimiento productivo.

La realización de este trabajo investigativo de tesis, pretende dar solución a varios problemas e incógnitas que se tienen con el uso inadecuado del probiótico, como por ejemplo pretende dar respuesta al sector de la camaronicultura que no tiene acceso a esta tecnología en el uso del probiótico, el efecto que tiene para contrarrestar los vibrios, la administración, dosis correcta y mejor aplicación. Para dar mejores resultados en las producciones del cultivo.

II.- OBJETIVOS.

Objetivo general:

Valorar la eficacia del probiótico elaborado a base de suero de leche de vaca, para combatir infecciones de *Vibrios* sp., (unidad formadoras de colonias amarillas y unidad formadoras de colonias verdes) en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental en laboratorio.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar temperatura del ambiente y pH del medio de cultivo de *Lactobacilos acidophilus* (suero de leche de vaca), durante el experimento.
- 2.- Evaluar el crecimiento de las bacterias de *Lactobacilos acidophilus*, al microscopio mediante la cámara Neubauer (población y tiempo en 10 días).
- 3.- Determinar la dosis óptima aplicable y su efecto del probiótico, (mediante el método de sensibilidad), sobre las bacteria del género *Vibrión* (unidad formadoras de colonias verdes y unidad formadoras de colonias amarillas).

III.- LITERATURA REVISADA.

3.1.-Biología de camarón *Litopenaeus vannamei*.

3.1.1.-Ciclo vital

La especie del genero *Litopenaeus* son catadromas ,es decir, se reproducen en el mar pero regresan a lagunas litorales para su crecimiento y su desarrollo.los adultos copulan y desovan en aguas oceánicas a profundidades entre 18 y 27mts.el macho se une a la hembra abrazándola por el frente y deposita el espermatoforo (conjunto de espermatozoide) a la salida de la abertura genital de la hembra ,la cual desova y se rompe el espermatoforo para que se efectúe la fecundación conforme van siendo expulsados los óvulos. Los huevos fecundados son expulsados al agua en cantidad de 500,000 a 1, 000,000, con un diámetro individual de aproximadamente 300 micras.los huevos se van al fondo y eclosiona en nauplio en 24 horas (Auro A. Y Ocampo L., 2006).Este nauplio presenta 5 subestadios y se alimenta de las reservas contenidas en el vitelo, posteriormente se transforma en una larva protozoa (zoea primitiva) que sufre tres mudas; se alimenta de micro algas y permanece en aguas oceánicas alrededor de 3 semanas. La siguiente fase es la mysis que también sufre tres mudas y que es carnívora, por lo general se alimenta de nauplios de otro micro crustáceos como ejemplo *Artemia salina*. Finalmente sufren metamorfosis para dar lugar a la postlarva, que se considera ya un camarón completo con sus estructuras anatómicas definitivas. La postlarva alcanza los sistemas estuarios (esteros o estuario, en los que el agua es salobre) y aquí se desarrolla hasta juvenil, esta fase es omnívora. En los estuario los camarones alcanzan una talla de 4 a10cm, en 4 a 10 semanas respectivamente, posteriormente salen al océano en donde cumplen su maduración para comenzar de nuevo el ciclo .todo el proceso requiere de al menos 12 meses. (Auro A. Y Ocampo L., 2006).

3.1.2.-Camaronicultura en Nicaragua.

La Camaronicultura es una industria que constantemente requiere innovar sus sistemas de producción. Nicaragua tiene tal vez el mayor potencial de la región de

Centroamérica en la producción de camarón, al tener una costa amplia en el Pacífico, (Navas L, 2003). La Camaronicultura es una actividad importante en la producción de alimentos y en la generación de empleos y divisas, principalmente en vías de desarrollo. Sin embargo, ésta se ve afectada por diversos factores, incluyendo el ataque de enfermedades infecciosas en su mayoría de origen bacteriano y viral, así como presiones del medio como variaciones en temperaturas, salinidad, cantidad de oxígeno disuelto, presencia de metabólicos, etc. (Navas, 2003).

3.2.- Vibriosis sp.

Las bacterias del género *Vibrión* son los patógenos oportunistas más reportados en camarones en larvicultura y engorda. Se puede definir como una enfermedad ocasionada por bacterias del género *Vibrión* en organismos acuáticos. Son organismos unicelulares, procariontes, capaces de replicarse automáticamente, se pueden exterminar o al menos controlar con antibióticos, pero tienen una resistencia rápida al antibiótico. Sin embargo el rol de las bacterias en un estanque de camarón no sólo debe ser enfocado desde el punto de vista de las enfermedades, pues estos microorganismos también cumplen un papel importante en el reciclamiento de los nutrientes y la degradación del detritus en el estanque y contribuye por lo tanto a mantener la calidad del agua (Lightner & Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1996; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Chen et al., 2000).

La vibriosis es una enfermedad más problemática en la acuicultura de mariscos y peces. La vibriosis es una enfermedad bacteriana responsable de la mortalidad en cultivos de camarón en todo el mundo (Lightner & Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1996; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Chen et al., 2000). Las especies *Vibrión* están ampliamente distribuidas en las instalaciones de cultivo de todo el mundo. Las infecciones relacionadas con el *Vibrión* frecuentemente se dan en los criaderos, pero las epizootias también se dan en los estanques de crianza de las especies de camarones. Vibriosis es

causada por una bacteria gran-negativa de la familia Vibrionaceae. Las especies de *Vibrio* son parte de la microflora natural en los camarones silvestres y de cultivo (Sinderman, 1990) y se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos (Brock and Lightner, 1990).

3.2.1.-Patogenicidad del Vibrión

No hay especies patógenas

Si hay cepas patógenas

Está mediada por factores ambientales (Salinidad, Temperatura, etc.)

Oportunistas y probablemente patógenos primarios

Cepas: Es un grupo de bacterias (aisladas) que tienen características en común y diferentes a otras cepas, pero perteneciente a la misma especie por compartir características en común

3.2.2.-Estado actual de vibriosis.

La vibriosis está presente en todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluido los camarones que son los más susceptibles. Las epizootias ocurren todos los estadios de vida. Las mayores epizootias de vibriosis han sido reportadas para *L. monodon* en la región Indo-Pacífico, *L. japonicus* de Japón, y *L. vannamei* de Ecuador, Perú, Colombia y América Central (Lightner, 1996). La vibriosis se expresa de diferentes formas de síndromes. Estos incluyen: vibriosis oral y entérica, vibriosis de los apéndices y cuticular, vibriosis localizadas en las heridas, enfermedad de la concha, vibriosis sistémica y hepatopancreatitis séptica (Lightner, 1996). patogénica de *Vibrio* sp. Esta emergiendo y continua causando mortalidades entre el camarón en cultivo (Le Groumellec et al., 1996).

3.2.3.- Transmisión, signos de la Vibriosis y estrategias de control.

3.2.3.1.-Transmisión.

Todos los estadios de vida están expuestos a *Vibrio* sp. La vibriosis puede presentarse luego de una fuerte colonización de bacterias en la cutícula superficial

del camarón, especialmente en heridas; por el consumo de un gran número de bacterias que pueden estar en el agua de cultivo, en el detritus orgánico, en tejidos de otros camarones o en partículas de alimento, principalmente en nauplios de *Artemia*. (Le Groumellec et al., 1996).

3.2.3.2.-Signos de la enfermedad.

La vibriosis larval y de adulto puede reconocerse fácilmente por examen al microscopio de monturas húmedas de larvas moribundas a 10X o 40X. Las larvas y adultos de camarón afectadas pueden presentar algunas o todas las anormalidades siguientes:

Tracto digestivo vacío (la larva y adulto no comen)

Aletargamiento

Flexión dorsal abdominal

Fuerte colonización bacteriana en la cutícula

Opacidad en la musculatura abdominal

Altas mortalidades

Cromatóforos visibles en la base de apéndices

Nódulos melanizados en el hepatopáncreas

Heridas melanizadas en punta de apéndices μ

Bacterias bacilares móviles en hemolinfa (10^3 ufc /ml)

Retardo en la coagulación de hemolinfa (>1 min.)

Reducción de hemocitos (de 20 mil hasta mil/ml).

Hemolinfa turbia

Camarones moribundos con nado errático en la superficie

Presencia de gaviotas en la piscina

Necrosis multifocal a nivel cuticular

Urópodos y telson con cromatóforos expandidos (cola roja) y presencia de vesículas

Antenas rugosas descoloridas, cortadas (aparición de quemadas, necrosis)

El diagnóstico presuntivo está dado por la suma de todos los signos

macroscópicos y en fresco microscópico y el confirmatorio (Histología) es para el diagnóstico definitivo se puede utilizar los siguientes procedimientos:

Siembra de hemolinfa en Agar TCBS

Aislamiento de microorganismos mediante purificación con Agar TSA

Identificación de las bacterias mediante el método de API (identificación bioquímica

Antibiograma).como historial.

El aislamiento e identificación de organismos bacterianos específicos ayuda para establecer un diagnóstico clínico, pero son especialmente útiles las pruebas de sensibilidad a antibióticos para establecer un tratamiento químico correcto.

3.2.3.3.-Estrategias de control.

El control de la enfermedad en el cultivo larvario es a menudo complicado, debido a la relación de diferentes factores que pueden contribuir con la enfermedad tales como: prácticas de manejo, estado nutricional de la larva y condiciones físico-químicas del agua de cultivo. Para detectar un problema potencial, cada parte del laboratorio, así como las prácticas diarias de manejo deben ser evaluadas. La prevención de la vibriosis debe ser una práctica diaria. Estrategias de manejo, registros detallados de los procedimientos así como del estado general de las larvas y monitoreo bacterianos, son algunos de los elementos básicos determinantes para reconocer en qué momento se está propenso a la aparición de una infección bacteriana en el cultivo. Después de que la vibriosis ha afectado al cultivo, se debe proceder con urgencia. En respuestas a manipulaciones ambientales o al uso de un agente químico específico, se sugiere evaluar al menos cada hora la condición, comportamiento natatorio y actividad de alimentación de la población. Cuando las poblaciones afectadas se estabilizan, las condiciones de manejo de rutina pueden seguirse nuevamente. El uso de probiótico ha dado resultados aceptables en el control de vibriosis larval, sin embargo, estas prácticas son novedosas y por lo tanto no se tiene un conocimiento profundo de su eficacia y viabilidad. Pero pueden significar en un

futuro, una alternativa al uso de antibióticos en acuicultura, cuyo desconocimiento y abuso, da como consecuencia la aparición de cepas bacterianas resistentes a ellos.

3.2.4.-Enfermedades bacterianas causadas en cultivos de camarón (engorde y postlarva).

3.2.4.1.-Bacterias Gram positivas.

3.2.4.1.1.-Mycobacteriosis

Causada por *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* y *M. sp.* Bacteria Gram positiva, ácido alcohol resistente que se ha encontrado en todos los Litopeneidos alrededor del mundo. Los signos macroscópicos incluyen áreas melanizadas en músculo, ovario, branquias, corazón, etc. así como zonas de melanización en la cutícula. Se diagnostica por medio de la tinción de Ziehl Neelsen y se confirma por el aislamiento e identificación química de la bacteria.

3.2.4.1.2.-Septicemia Bacteriana

El síndrome de la septicemia bacteriana es una causa importante en la mortalidad de los Litopeneidos. La septicemia se detecta por opacidad de la musculatura abdominal, flexión dorsal del abdomen se torna opaco y blanquecino, a veces se detecta indicios de melanización de los filamentos branquiales y a nivel del extremo ventrolateral del caparazón puede o no haber lesiones en la cutícula. Los camarones moribundos presentan flexión dorsal del abdomen, en el cual el segundo o tercer segmento abdominal se hallan en el ápice de la flexión.

3.2.4.1.3-Necrosis del Hepatopáncreas (NHP)

La necrosis del hepatopáncreas. Es una enfermedad que fue reportada por primera vez por Johnson (1989) como hepatopáncreas granulomatoso (por la formación de granulomas) causando altas mortalidades en las granjas de la parte central y sur de Texas, posteriormente fue reportado en Perú, Costa Rica, Panamá, Brasil, Venezuela, Ecuador y México provocando mortalidades entre el

20% y 95% en los sistemas de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) y *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul). También llamada hepatopancreatitis de Texas (TNHP), Síndrome de mortalidad del estanque del Texas (TPMS) y hepatopancreatitis necrotizante del Perú (PNHP)

3.2.4.1.4.-Enfermedad de la Mácula Oscura.

Signos clínicos y manifestaciones macroscópicas: Se manifiesta principalmente por la presencia de pequeños puntos circulares o máculas en el exoesqueleto, las que se extienden y se convierten en áreas erosivas de color marrón, la mortalidad puede alcanzar el 5 % por día.

3.2.4.1.5.-Enfermedades asociadas con bacterias filamentosas.

La principal enfermedad asociada con presencia de bacterias filamentosas en camarones se debe a la presencia o colonización o contaminación de las branquias y de la superficie externa por bacterias epibiontes, es común en las poblaciones cultivadas de Litopeneidos y puede afectar a todas las fases de desarrollo y crecimiento.

3.2.4.2.-Bacterias Gram negativas

3.2.4.2.1.-Vibriosis Sistémica.

Causado por *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. fluvialis*. Afecta a *Litopenaeus japonicus* en Japón; *L. monodon* en la mayoría de las áreas del Indopacífico y a *L. vannamei* en Ecuador, Perú, Colombia y Centro América. Esta enfermedad se considera una infección generalizada que involucra varios sitios como: cutícula, hepatopáncreas, órgano linfóide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculo estriado. El agente o los agentes causales son: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium daunselae*, *V. campbelli*, *V. penaeicida* y *V. harveyi*. En engorda son: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Photobacterium daunselae*.

3.2.4.2.2.-Camarón manchado: Esta enfermedad se caracteriza por tener lesiones en la cutícula, apéndices y branquias. Las lesiones que se presentan son al iniciar de color café y posteriormente se tornan negras, generalmente desaparecen con la muda. Los agentes causantes son bacterias quitinoclásticas, se asocia con *Vibrio* spp, *Aeromonas* sp. entre otras.

3.2.4.2.3.-Síndrome de la gaviota:

Esta es una manifestación más de vibriosis y su nombre proviene de la presencia de las gaviotas que se alimentan de camarones moribundos que nadan en la superficie y en las orillas de los estanques. La bacteria más frecuente aislada de estos camarones es un *Vibrio* que produce colonias verdes en Agar TCBS. Se asocia con algunos factores ambientales como alta temperatura, cambios en la salinidad y elevadas concentraciones de nitrógeno. También se han visto involucrados factores como. Conteos inusualmente altos de bacterias en las tomas de agua, delicado estado de salud en los camarones debido a la presencia de virus y gregarinas y altos niveles de nutrientes en la entrada de agua con baja recirculación.

3.2.4.2.4.-Síndrome de la zoea II

Causa altas mortalidades en el estadio de zoea II en camarones azules y blancos. Esta enfermedad aparece de las 36 – 48 horas en la fase de zoea. Presenta interrupción en la alimentación, rápida evacuación del contenido estomacal, letargia, nado errático, permanencia en el fondo del estanque, hay muerte por inanición (no hay oxígeno). Ataca hepatopáncreas y el intestino medio y posterior. En 1993 se reportó por primera vez en México y el agente causal por algunos autores es *V. harveyi* y para otros autores son bacteria intracelulares y otros una combinación de ambos. Mortalidades entre el 60 y 100% en los laboratorios de producción de larvas, las mortalidades se presentan después de 36 a 48 horas de haber transcurrido la metamorfosis de zoea I a zoea II.

3.2.4.2.5.- Síndrome de las bolitas

Es llamada así ya que presenta unas bolitas en la parte del intestino, se puede observar por medio del microscopio con muestras al fresco. Es una vibriosis que presenta descamación de las células del epitelio del hepatopáncreas e intestino de las larvas, hay interrupción en la alimentación, cesan los movimientos contráctiles del tubo digestivo, mortalidades altas, llegan hasta el 100 % de la población.

3.2.4.2.6.-Vibriosis Luminiscentes.

La bacteria causante de la luminiscencia es el *Vibrio harveyi* y es la enfermedad predominante en los laboratorios, causando reducciones entre el 60 y 100%, en los organismos moribundos se ha identificado principalmente a *Vibrio harveyi*, como en la mayoría de las bacterias, constituye parte de la flora normal de las aguas costeras y lagunares. Se adhiere a la superficie de los crustáceos marinos o se establece en el tracto digestivo al ser ingeridos. Los camarones en la etapa juvenil son los más afectados, este tipo de bacterias daña el hepatopáncreas invadiéndolo masivamente. En los desarrollos de los cultivos larvarios las bacterias gram negativas en la descapsulación puede ser útil para acelerar el proceso de eclosión del nauplio. Las fuentes de contaminación por bacterias de los cultivos larvarios pueden ser muy diversas, por lo que es determinante establecer medidas preventivas seguras y estrategias de control efectivas para evitar o controlar el agente patógeno durante el desarrollo de los cultivos larvarios de camarones. Con lo anterior se podrá tener mayor posibilidad de incrementar las producciones, tanto en volumen como en calidad de la semilla para engorda en estanquearías, lo que repercutirá en el futuro del cultivo de camarón.

3.3.-Antecedente, Origen de los Probióticos.

Hipócrates (460 a.C- 377 a.C), el médico griego considerado como el creador de la verdadera Medicina, decía: "Haz que tus alimentos sean tus medicinas y que tus medicinas sean tus alimentos" Élie Metchnikoff (1845-1916) fue un zoólogo y microbiólogo Ruso que, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908. Pero

Metchnikoff es tanto o más conocido por otros de sus descubrimientos: trabajó en el Instituto Bacteriológico de Odessa (1886-1887) y en el Instituto Pasteur (1885-1916), del que llegó a ser su director, y la última década de su vida fijó su atención en que en Bulgaria existía un increíble número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. La razón para esa extraordinaria longevidad no podía ser tampoco la calidad de sus servicios médicos. Pero, lo que era evidente era que los búlgaros consumían grandes cantidades de yogur, que contiene bacterias fermentantes lácticas. Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur y la utilizó para sus investigaciones. Era el inicio oficial de la Probiótica.

Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando lactobacilos en forma de cápsula para ingerir oralmente denominado Lactobacillin. En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de Probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra se deriva de dos vocablos, del latín -pro- que significa por o en favor de, y del griego – bios- que quiere decir vida. Esta definición fue modificada y se redefinió el término de Probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal. En 1989 R. Fuller definió a los Probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino"

Y en 1998 el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas definió a los Probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma.

Hay que mencionar que, para ser considerada como Probiótica, una bacteria tiene que sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago y colonizar el intestino delgado y grueso.

3.3.1.-Probiótico en la acuicultura.

Actualmente en acuicultura, el termino probiótico usualmente se refiere a un suplemento bacteriano de un cultivo o la mezcla de cultivos de bacterias seleccionadas. Estas bacterias son adicionadas a los sistemas de producción acuícola para modificar o manipularlas comunidades microbianas en el agua y el sedimento, para reducir o eliminar a las especies patógenas seleccionadas, y para mejorar el crecimiento y supervivencias de las especies acuatices en cultivo (Jory.1998).

El termino probiótico ha sufrido modificaciones en su significado a lo largo de los años. De esta manera en 1968, se definió como un suplemento microbiano que se suministra a animales y humanos. Fuller (1989) lo redefinió como un microorganismo vivo que se administra al hospedero suplementado en el alimento para beneficiar el balance microbiano intestinal. Posteriormente, el término fue usado para referirse a un adyuvante dietario microbiano administrado de tal manera que se mantenga vivo dentro del tracto gastrointestinal, y que beneficie la fisiología del hospedero modulando el sistema inmune, así como mejorando el balance microbiano mediante la prevención de la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal (Gatesoupe, 1999; Naidu *et al.*, 1999). Verschuere *et al.* (2000b) dieron una definición más amplia de los probióticos como microorganismos vivos que tienen efectos benéficos en el hospedero mediante la modificación de la microbiota asociada, el incremento del aprovechamiento de la comida, el mejoramiento de la respuesta a enfermedades y de la calidad del ambiente. Sin embargo, en este punto es importante señalar que las bacterias que simplemente cumplen alguno de estos roles, tales como la producción de nutrientes esenciales para el aprovechamiento de las especies cultivadas, no deben considerarse como probiótico. La aplicación de probióticos como control biológico es una alternativa viable debido a las propiedades que

poseen las cepas seleccionadas para impedir el crecimiento de bacterias oportunistas e incluir en general en el establecimiento de la comunidad microbiana tanto en los individuos como en el agua de cultivo.

3.3.2.-Definiciones de probiótico por varios autores.

La palabra probiótico etimológicamente significa:

Pro: "a favor de" biótico: "vida"

En consecuencia probiótico estrictamente significaría "a favor de la vida" y se aplica a los microorganismos que colaboran positivamente a favorecer la microbiota intestinal y en consecuencia a la mejor calidad de vida del hombre.

La definición más tradicional de probiótico es la que lo considera como: "Suspensión de microorganismos vivos cuya ingestión es beneficiosa para la salud" fue propuesta a partir de la hipótesis del Premio Nobel, Metchnikof.

En el año 1989, Fuller R., definía a los probióticos como: "cualquier alimento suplementado con microorganismos vivos que benefician al consumidor mejorando su balance microbiano a nivel intestinal".

Havenaar y Huis (1992), propusieron: "los probióticos son microorganismos vivos que determinan al ser ingeridos un efecto beneficioso en la salud del hombre y de los animales dado que inciden de forma positiva sobre las propiedades intrínsecas de la microbiota gastrointestinal del hospedador, el efecto se puede manifestar a nivel de las mucosas gastrointestinales".

Algunos autores indican que: "Probiótico es uno o más cultivos de microorganismos vivos que administrados al hombre como productos fermentados, afectan beneficiosamente al consumidor mejorando las propiedades de la microbiota endógena."

Guarner y Schaafna, en el año 1998, han señalado que: "Los probióticos son los microorganismos vivos que después de su ingestión, ejercen en el consumidor beneficios más allá de la nutrición básica natural".

Salminen et al. En 1998, los definen como: "Los probióticos son ingredientes de los alimentos constituidos por microorganismos viables que poseen un efecto beneficioso sobre la salud"

3.3.3.-Mecanismos de acción de los probiótico.

Las publicaciones científicas existentes en el tema han facilitado el entendimiento de los modos de acción de los probióticos en el hospedero, entre ellos la competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal, entre otros que se han evidenciado en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, es necesario precisar que la eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando se administra al hospedero, dada la gran influencia de factores más complejos como la ingestión selectiva (Prieur, 1981; Riquelme *et al.*, 2000) y la muerte en el tracto gastrointestinal (Vine *et al.*, 2006) causada por la incapacidad del probiótico para mantener su fisiología bajo circunstancias de una mayor interacción microbiana (Tinh *et al.*, 2007). En general, la relación entre los experimentos *in vivo* e *in vitro* ha sido descrita en los últimos artículos de revisión científica de uso de probióticos en acuicultura (Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Tinh *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008). Entre los principales mecanismos descritos que usan los aislados probióticos para beneficiar al hospedador, se encuentran:

a. Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal.

Es bien sabido que la habilidad de las bacterias para adherirse y sobrevivir en el mucus entérico es decisiva en el establecimiento de la microbiota intestinal. La capacidad de adherencia es una característica que es aprovechada de igual manera tanto por las bacterias probióticas como por las patógenas. En el caso de las probióticas, éste ha sido uno de los criterios más importantes para su selección y aplicación en acuicultura (Salminen *et al.*, 1996; Nikoskelainen *et al.*, 2003), mientras que para las patógenas la habilidad para adherirse, se relaciona con la virulencia y se considera como el primer paso para una infección (Bengmark,

1998). En acuicultura, la información disponible indica que las bacterias aisladas de animales cultivados o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias foráneas que suelen ser transitorias, por lo que surge la necesidad de que los probióticos sean continuamente administrados, ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo (Ringó y Gatesoupe, 1998; Villamil *et al.*, 2003c). En estudios de aislados microbianos de un organismo pueden colonizar otras especies cultivadas, indicando así la falta de especificidad para la colonización del tracto digestivo (Ringó, 1999).

b. Producción de compuestos benéficos.

Las bacterias marinas y las levaduras pueden llegar a ser un recurso de proteína importante en el mejoramiento del aporte nutricional de algunas especies acuáticas cultivadas debido al perfil de aminoácidos que contienen (Brown *et al.*, 1996). En ciertos aislados de bacterias intestinales, se ha demostrado alta producción de ácidos grasos de cadena corta (Yazawa, 1996) y también su contribución al valor nutritivo de los rotíferos (Watanabe *et al.*, 1992) y peces (Clements, 1997). De la misma manera, los lípidos producidos por microorganismos marinos han sido descritos como sustancias de gran importancia para la nutrición de especies acuáticas como el rodaballo y la tilapia (Ringó *et al.*, 1992; Kihara y Sakata, 1997). Por otra parte, la producción de enzimas como lipasas, quitinasas y proteasas, por parte de microorganismos seleccionados, pueden contribuir al proceso digestivo de los organismos cultivados, especialmente en estadios larvales de bivalvos (Prieur *et al.*, 1990) y camarón (Wang *et al.*, 2000).

c. Mejoramiento de las funciones inmunes.

A pesar de que existe un amplio número de publicaciones científicas en las que se describe un aumento en la resistencia de peces tratados con prebióticos durante infecciones experimentales (Gatesoupe, 1994; Cai *et al.*, 1998, Ottessen y Olafsen, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006), existen relativamente

muy pocas en las que se estudien a fondo los mecanismos empleados en dicha defensa; sólo trabajos recientes han demostrado la incidencia de los prebióticos en las funciones del sistema inmune. Irianto y Austin (2002) describieron un incremento en parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocitos y macrófagos y un aumento de la actividad lisozímica de *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Scophthalmus maximus* alimentados con probióticos seleccionados, tanto Gram-positivos como Gram negativos. Villamil *et al.* (2002) evaluaron los efectos inmunomoduladores de varias cepas de LAB de origen terrestre, encontrando que *L. lactis* viable e inactivado por calor incrementa funciones inmunitarias de rodaballo (*S. maximus*), como quimioluminiscencia de macrófagos de riñón anterior y concentración de lisozima en suero. Más tarde, Villamil *et al.* (2003b) encontraron que, en el caso de LAB, no sólo las células enteras son capaces de inducir un aumento en la respuesta inmune, algunos productos extracelulares como la nisina, principal bacteriocina producida por *L. lactis*, pueden aumentar la quimioluminiscencia y la producción de óxido nítrico en una dosis y tiempo dependiente en rodaballo (*S. maximus*).

En camarón, Balcázar (2003) describió un aumento en la resistencia de *Litopenaeus vannamei*, alimentado con un suplemento de *Bacillus* y *Vibrio*, contra 172 *Vibrio harveyi* y el síndrome de mancha blanca, este incremento en la resistencia se correlacionó con un aumento de la fagocitosis y la actividad antibacteriana de los hemocitos. Chiu *et al.* (2007) informaron que el camarón blanco *L. vannamei* tratado con complemento alimenticio de *Lactobacillus plantarum* aumentó significativamente la actividad fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la superóxido dismutasa (SOD), así como la transcripción del mRNA de peroxinectina (PE) y profenoxidasa (proPO), lo que contribuyó a la eliminación de *Vibrio alginolyticus* durante infecciones experimentales.

d. Mejora de la calidad de agua

Se ha propuesto que las bacterias del género *Bacillus* seleccionadas como probióticos pueden convertir la materia orgánica en CO₂, en contraste con las bacterias Gram-negativas que se caracterizan por convertir materia orgánica en

biomasa bacteriana limo (Dalmin *et al.*, 2001). Laloo *et al.* (2007) comprobaron la capacidad de tres aislados del género *Bacillus* para disminuir las concentraciones de nitritos, nitratos y amonios en el agua de cultivo de peces ornamentales. Este mismo fenómeno también fue observado por Kim *et al.* (2005) en *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*, quienes atribuyen estos efectos a mecanismos tales como bioacumulación, bio-asimilación y nitrificación. Aunque la eliminación de nitrógeno es una propiedad predominante en bacterias autotróficas, se han producido varios informes que sugieren una contribución de las bacterias heterótrofas en este sentido (Abou-Seada y Ottow, 1985; Robertson y Kuenen, 1990; Sakai *et al.*, 1996, 1997;

Kim *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). De manera controversial, hay publicados varios estudios en camarón y bagre que no pudieron confirmar éstas hipótesis (Queiroz y Boyd, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998). Adicionalmente, la interacción entre bacterias probióticas y microalgas en los tanques de cultivo en general produce efectos positivos, ya que estabiliza los factores nutricionales del alimento vivo pudiendo contribuir al establecimiento de la microflora intestinal beneficiosa de los hospederos (Reitan *et al.*, 1993, 1997).

3.3.4.-Uso de probiótico en el cultivo del camarón.

La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (LAB), de los cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*. El uso de probiótico como LAB está relativamente bien establecido en otras especies animales (Wallace y Newbold, 1992; Aiba *et al.*, 1998; Kontula *et al.*, 1998; Kirjavainen *et al.*, 1999a, 1999b; Netherwood *et al.*, 1999), de ellos se destaca el aumento de tamaño y peso, el establecimiento de un equilibrio microbiano intestinal, así como la mejora de algunas respuestas inmunes, dependiendo de la concentración del probiótico.

En general, el uso de probiótico en el cultivo de camarón ha tenido buenas perspectivas; diversas publicaciones científicas han demostrado efectos positivos de la aplicación de probiótico. Sin embargo, los resultados obtenidos en algunas

granjas pueden ser variables debido a diferentes factores, que pueden afectar el resultado de las operaciones a largo plazo, como la calidad del probiótico, el modo de administración, la talla y las especies de camarón.

3.3.5.-Características del probiótico.

Según diversos autores, el probiótico destinado al consumo por el hombre o los animales debería ser en primer lugar de origen humano o animal respectivamente, ya que algunas acciones de estos cultivos vivos son específicas para el huésped del que han sido aislados. Debe ser capaz de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y resistir las secreciones digestivas (gástricas, bilis, etc.) ya que en caso contrario, no podrían ejercer su función a nivel del intestino. Debe ser capaz de adherirse al epitelio intestinal para lograr una colonización eficaz y debe inhibir el desarrollo de otras bacterias patógenas y colaborar al control de la disbiosis ya que el balance ecológico en el organismo puede verse alterado por diversas causas, entre las que podemos citar:

- La dieta, particularmente si es muy rica en grasas, azúcares o en proteínas.
- La administración de fármacos, como antibióticos, hormonas o esteroides.
- La contaminación medio-ambiental.

Asimismo debe ser capaz de desarrollarse en presencia de oxígeno o en su ausencia, es decir tener un metabolismo anaeróbico o facultativo. El efecto beneficioso de los probióticos y el tiempo de permanencia de los mismos en el organismo, depende sin duda de dos factores: La cepa bacteriana y las condiciones del hospedador

Los microorganismos que se pueden considerar como probióticos son fundamentalmente, bacterias productoras del ácido láctico, que pertenecen a los géneros: Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus y Bifidobacterium . Aunque también se incluyen especies del género Bacillus y levaduras, de las que distinguiremos principalmente especies del género Saccharomyces.

3.3.6.-Microorganismos de mayor aplicación como probióticos.

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus caseis. Paracasei

Lactobacillus casei immunitis

Lactobacillus johnsonii

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus rhammosus

Lactobacillus lactis

Lactobacillus spp.

Lactobacoccus spp.

Bifidobacterium longum

Bifidobacterium bifidum

Bifidobacterium infantis

Bacillus sp.

Saccharomyces boulardii

Lactobacillus casei s. casei

Lactobacillus casei s. tolerans

Lactobacillus fermentum

Lactobacillus paracasei

Lactobacillus reuteri

Lactobacillus silivarius

Lactobacillus bulgaricus

Bifidobacterium spp.

Bifidobacterium breve

Bifidobacterium lactis

Streptococcus thermophilus

Streptococcus spp.

Saccharomyces caereviseae

Saccharomyces spp.

3.3.7.-Bacteria Lactobacillus acidophilus.

3.3.7.1.-Clasificación científica.

Reino: Bacteria.

División: Firmicutes.

Clase: Bacilli.

Orden: Lactobacillales.

Familia: Lactobacillaceae.

Género: Lactobacillus.

Especie: L.acidophilus.

3.3.7.2.-Fisiología de Lactobacillus acidophilus.

Es una bacteria del género *Lactobacillus*. El término *Lactobacillus* es la unión de un prefijo y una raíz: *lacto* que significa leche y *bacillus* que quiere decir en forma de barra o vara. Por otro lado, *acidophilus* quiere decir con afinidad por los ácidos. Esta bacteria crece, fácilmente, en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y crece en condiciones óptimas a unos 45 °C. El *L. acidophilus* crece de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. No solo está presente en los intestinos de los animales y en el del propio ser humano, sino también en la boca y la vagina. El *L. acidophilus* absorbe la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentivas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos (hay que reseñar que el *L. acidophilus* produce exclusivamente ácido láctico). Como cualquier bacteria puede ser eliminada por un exceso de calor, humedad, o la luz solar directa.

3.3.7.3.-Caracteres morfológicos:

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes (Kandler y Weiss, citados por Bergey, 1992); lo cual hace que se puedan confundir con géneros aislados habitualmente de materiales clínicos (Marin, Bantar, Monterisi,

Smayevski, Suárez de Basnec y Bianchini, 1993). Estos bacilos se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación períttrica. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno.

3.3.7.4.-Pared celular y ultra estructura:

La pared celular de los lactobacilos, observada al microscopio electrónico es típicamente Gram positiva y contiene peptidoglicanos (mureínas) de varios quimiotipos, de ahí que el peptidoglicano del tipo Lisina-D-Asparagina sea el más ampliamente distribuido. Esta pared también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano mediante enlaces fosfodiéster, pero sólo presenta ácidos teicoicos relacionados a ella en algunas especies (Knox y Wicken, 1973; citados por Bergey, 1992). También pueden apreciarse al microscopio electrónico grandes mesosomas que caracterizan a este género.

3.3.7.5.-Caracteres de las colonias.

Las colonias de Lactobacillus en medios sólidos son pequeñas (2- 5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas. Otras, como Lactobacillus confusus, presentan colonias viscosas por excepción. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas citados por Bergey, 1992). Normalmente no, intracelulares (Law y Kolstad, 1983 reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni

digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de Nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H₂S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa.

La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Bergey, 1992). Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y vitaminas en el queso (Law y citados por Bergey, 1992). ; Kolstad, 1983

3.3.7.6.- Nutrición y condiciones de crecimiento.

Los Lactobacillus presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de Carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los Lactobacillus contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y éteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy

particulares y necesitan factores de crecimiento especiales (Bergey, 1992). Debido a que las bacterias ácido-lácticas (LAB) poseen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares; su clasificación se ha tornado difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural, fue informado por Tannock (1988). Debido a la alta variabilidad de esta región entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de bacterias ácido-lácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR (polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa) (Castellanos, Chauvet, Deschamps y Barreau, 1996).

3.3.7.7.-Condiciones ecológicas.

a).-pH: Los *Lactobacillus* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 -4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, 1992).

b).-Necesidades de Oxígeno: La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, 1992).

C.-Temperatura de crecimiento: La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de

temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos Lactobacillus termófilos que crezcan por encima de 55°C (Bergey, 1992).

d).-Metabolismo: En su metabolismo, los Lactobacillus van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas. Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación (Kandler, 1983), constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado (Kandler y Weiss, citados por Bergey, 1992).

3.4.-Crecimiento microbiano.

Es el cambio en el número de células por una unidad de tiempo determinada. Tiempo de generación (duplicación): Tiempo requerido para que una célula se divida en dos. El tiempo puede ser minutos, hora o días. El crecimiento de un cultivo microbiano se divide en tres etapas claramente diferenciables:

3.4.1.-Fases de crecimiento microbiano.

a).-Fase Inicial.

Las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la

actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos (Valera G, 2002).

b).-Fase exponencial.

Las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, se produce la liberación de exotoxinas por las bacterias que las producen.

c).- Fase estacionaria.

Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determinan el cese del crecimiento. Hay pérdida de células por muerte, la cual es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el conteo total de células aumenta levemente aunque el de las bacterias viables permanece constante. Hacia el final de esta etapa, puede ocurrir la esporulación en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia.

d).-Fase de muerte.

Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto la curva de crecimiento declina.

Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inóculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. Las condiciones físicas y químicas del medio donde el microorganismo crece afectan las actividades de éstos. La comprensión de cómo influye el ambiente en el crecimiento, nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que permitan estudiar y controlar el crecimiento bacteriano. Además, existen sistemas de cultivo abiertos que son poco usados en el laboratorio de microbiología clínica. El cultivo continuo (con aporte y salida de

nutrientes y requerimientos a una tasa constante), permite mantener a las bacterias en una misma fase de crecimiento (Valera G, 2002)

3.4.2.-Factores que intervienen en el crecimiento microbiano.

Factores intrínsecos: se refieren a las propiedades físicas y a la composición química del propio alimento: actividad de agua, pH, nutrientes, potencial de oxidación y estructura del producto alimentario. **Factores extrínsecos:** características del ambiente donde se almacena el alimento: temperatura, humedad y tensión de oxígeno. Tratamientos tecnológicos a que haya sido sometido el alimento, físicos o químicos, modifican la microbiota inicial y repercuten también en la composición del producto final. **Factores implícitos:** relaciones que se establecen entre los microorganismos presentes en los alimentos.

3.4.3.-Factores ambientales en el crecimiento microbiano. Temperatura, pH, agua.

Nutrientes, oxígeno.

a).-Temperatura:

Cada microorganismo es capaz de crecer en un rango muy determinado de temperatura. Este rango es conocido como temperaturas cardinales y establece las temperaturas mínimas, máximas y óptimas de crecimiento en función de la velocidad de crecimiento y la temperatura de incubación. La temperatura mínima, es a la que el microorganismo ya no se detecta crecimiento a valores más bajos de temperatura. La actividad metabólica es mínima, las membranas se hacen más rígidas y los procesos de transporte son limitados o inexistentes. La temperatura óptima, es cuando el microorganismo registra la máxima velocidad de crecimiento y las reacciones enzimáticas ocurren a la máxima velocidad posible. La temperatura máxima, es en la que el crecimiento no existe y se hace insostenible todo proceso bioquímico por la desnaturalización de proteínas y enzimas.

b).-Actividad del agua: Para el crecimiento microbiano es fundamental contar con diluyente universal (agua) para realizar todas las reacciones bioquímicas y enzimáticas. El agua difunde siempre desde una zona de alta concentración (baja concentración de solutos) a una zona de baja concentración de agua (alta concentración de solutos). La actividad de agua depende de la disponibilidad de ésta en el medio ambiente y de la concentración de solutos presentes en ella. Por lo que se relaciona bien con las concentraciones de NaCl (agua salada).

C.- Nutrientes: Los microorganismos que son patógenos son considerados heterótrofos. Esto significa que al igual que un ser humano, ellos requieren de, Carbono, Nitrógeno, Azufre, Microelementos. Todos estos elementos están disponibles para ellos en nuestros alimentos al igual que para nosotros. Nitrógeno Se requiere en la forma amina y se obtiene de proteínas. Carbono se obtiene de los carbohidratos y proteínas.

d).-Oxígeno: Aerobios. Microorganismos que viven en ambientes con tensiones normales de oxígeno (21 % de O₂). **Microarófilos:** Microorganismos que viven en presencia de niveles de oxígeno que están bajo la concentración presente en el aire (<21 %). **Anaerobios facultativos:** Microorganismos que pueden vivir en ausencia de oxígeno o en su presencia. **Anaerobios.** Microorganismos incapaces de crecer en presencia de O₂.

e).-Acidez y alcalinidad: Al igual que con la T ° cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del que se puede desarrollar. A diferencia de la temperatura, el pH óptimo de desarrollo suele ser un valor muy bien definido para cada microorganismo. **Acidófilo,** Son los microorganismos que viven a valores de pH por debajo de 2. En general los hongos tienden a tolerar valores de pH más ácidos que las eubacterias. **Alcalófilo,** Son aquellos microorganismos que viven a valores de pH superiores a 10. **Neutrófilo,** Son aquellos microorganismos que viven a valores de pH cercano a la neutralidad (pH 6.0 a 8.0). Independiente del pH del ambiente, el interior de la célula debe estar cercano a un valor 7

pH: Logaritmo decimal inverso de la concentración de iones hidrógeno. Informa sobre el grado de acidez o alcalinidad. La mayoría de los microorganismos crecen en pH cercanos a la neutralidad, entre 5 y 9, cosa que no excluye que existan microorganismos que puedan soportar PH extremos y se desarrollen. Según el rango de pH del medio en el cual se desarrollan pueden dividirse en:

Clasificación	pH extremo	pH interno
Acidofilo	1.0-5.0	6.5
Neutrofilo	5.5-8.5	7.5
Alcalinofilo	9.0-10.0	9.5

Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente. El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno.

3.4.4.- Efectos del pH a los microorganismos

En general, la presencia de ácidos en el alimento produce una drástica reducción de la supervivencia de los microorganismos. Los ácidos fuertes (inorgánicos) producen una rápida bajada del pH externo, aunque su presencia en la mayoría de los alimentos es inaceptable. Los ácidos orgánicos débiles son más efectivos que los inorgánicos en la acidificación del medio intracelular; se supone que esto ocurre porque es más fácil su difusión a través de la membrana celular en su forma no disociada (lipofílica) y posteriormente se disocian en el interior de la célula inhibiendo el transporte celular y la actividad enzimática. La mayoría de los microorganismos crecen a pH entre 5 y 8, en general, hongos y levaduras son capaces de crecer a pH más bajos que las bacterias. Puesto que la acidificación del interior celular conduce a la pérdida del transporte de nutrientes, los

microorganismos no pueden generar más energía de mantenimiento y, a una velocidad variable según las especies, se produce la muerte celular.

3.4.5.- El pH en Bacterias no formadoras de Esporos.

A pesar de las considerables diferencias en la composición de la pared celular de los organismos Gram Positivos y Gram Negativos, sus límites de tolerancia de pH son apenas ligeramente diferentes. Sin embargo, las bacterias responsables del deterioro de los alimentos ácidos ($\text{pH} < 4,5$) son todas Gram Positivas. Las especies más frecuentemente implicadas pertenecen al género *Lactobacillus* y aparte de su importancia en la alteración, son las que se utilizan como agentes de la fermentación en productos lácteos y vegetales. Entre los organismos Gram positivos, hay algunos particularmente resistentes a la presencia en el medio de altas concentraciones de ácido no disociados; así por ejemplo, los lactobacilos, son resistentes a los ácidos lácticos y acéticos. Además, algunos *Lactobacillus* pueden producir ácidos débiles lipofílicos en cantidades suficientes para inhibir a las enterobacterias. El crecimiento de *L. Acidophilus* en medios de laboratorio, inhibe o destruye (a $\text{pH} 3,8$) a las *Salmonella enteritidis*, *S. Typhimurium* *Shigella* son presentes en el medio de cultivo. El interés del efecto del pH sobre la resistencia térmica de los microorganismos, se centra en el comportamiento de los esporos. Sin embargo, la resistencia al calor de las células vegetativas también se ve afectada, y disminuye en forma drástica en condiciones alcalinas o ácidas. Los ácidos débiles son normalmente más eficaces que los fuertes en cuanto a reducir la resistencia térmica de las células vegetativas y se puede añadir ácido para contrarrestar el efecto protector del azúcar sobre los microorganismos expuestos al calor (Hansen y Riemann, 1963).

3.5.-Equipos de trabajo de un laboratorio microbiológico.

Un laboratorio de microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se puede, manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una técnica aséptica y por tanto se requiere un ambiente limpio y ordenado. Cuando manejamos cualquier tipo de muestra debemos evitar que

microorganismos ajenos a nuestros cultivos y presentes en el ambiente se introduzcan en ellos contaminándolos, o que los microorganismos de las muestras nos contaminen a nosotros. Por ello se debe trabajar en condiciones de estabilidad. En el laboratorio de microbiología encontraremos estas condiciones bien en campanas de seguridad biológica o bien en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas. Aunque los microorganismos que se manipulan no se han considerados patógenos todos los cultivos de todos los microorganismos deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad. En resumen, nunca debe olvidarse la necesidad de cumplir estos 2 requisitos básicos:

1.- Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de contaminarse uno mismo o a un compañero.

2.- Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en piel, pelo, aire, ropa, etc.) contaminen nuestras muestras.

Además de un ambiente microbiológico, el laboratorio de microbiología requiere una instrumentación básica para llevar a cabo estudios elementales. Son necesarios el equipo y materiales siguientes:

- Auto clave u olla a presión.
- Horno Pasteur.
- Estufa.
- Baño termostato con agitación.
- Microscopio con objetivo de aceite de inmersión.
- Mechero de bunsen.
- Asas de siembra.
- Colorantes y medios de cultivo.
- Cepas microbianas.
- Refrigeración.
- Centrifugas.
- placas petri.
- Microscopio.
- Hornos e incubadoras.
- Tubo de ensayo.
- Asa de inoculación.
- Mechero de Bunsen.
- Gradilla.
- Termómetro.
- Pipetas.

Las herramientas e instrumentos de laboratorio de microbiología son relativamente sencillos, si se les compara con los que se emplean en distintas áreas.

a).- Hornos e incubadoras:

Son gabinetes provistos de un calentador ínter construido, que nos permite obtener temperaturas más elevadas dentro del gabinete que las que hacía a fuera. La temperatura requerida puede controlarse mediante un termostato, el cual se compone de una tira metálica que opera como conmutador con interruptor eléctrico, conectada a un aparato de calentamiento. Si se sueltan entre sí 2 metales con diferentes índices de expansión el calor ara que una de ellos se expanda uno más que otro asiendo que toda la tira se doble.

Cuando se conecta esta tira a un interruptor eléctrico, se interrumpirá el circuito y el calor dejara de funcionar hasta que la temperatura descienda lo bastante para que la tira metálica tome de nuevo su forma original. La diferencia entre los hornos y las incubadoras radica entre la temperatura que deben tenerse en el interior. Un aparato capaz de soportar temperaturas de 100 C o mayores se denomina usualmente horno.

b).- Refrigeradores y congeladores.

Cada laboratorio requiere amplios servicios de refrigeración para el almacenamiento de los medios de cultivo, sueros y reactivos perecederos. Se necesitan congeladores para el almacenamiento mas prolongado de sueros y para reactivos mas delicados.

c).- Centrifugas.

Es un aparato diseñado para acelerar la separación, por gravedad, de partículas sólidas suspendidas en líquidos. La velocidad a la cual se sedimentaran las partículas en un líquido depende de varios factores. En una centrifuga, la fuerza gravitacional (G) es incrementada mecánicamente se mide el grado de incremento de la fuerza gravitacional, por comparación de una fuerza centrifuga relativa.

d).- El microscopio.

Instrumento óptico diseñado para amplificar las imágenes visuales de objetos pequeños. Para poderlo usar se necesitan conocimientos básicos relativos a sus partes y cierta habilidad y adiestramiento. Existen diferentes tipos de microscopios en el mercado.

e).- Placa de Petri

La placa de Petri es un recipiente redondo, de cristal o plástico, de diferentes diámetros (siendo más comunes los de diámetros alrededor de 10 cm), de fondo bajo, con una cubierta de la misma forma que la placa, pero algo más grande de diámetro, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente. Forma parte de la colección conocida como el (material de vidrio).

f).- Tubo de ensayo

El tubo de ensayo o tubo de prueba es parte del material de vidrio de un laboratorio de química. Consiste en un pequeño tubo de vidrio con una punta abierta (que puede poseer una tapa) y la otra cerrada y redondeada, que se utiliza en los laboratorios para contener pequeñas muestras líquidas (aunque pueden tener otras fases), realizar reacciones en pequeña escala, etc.

g).- asa de inoculación

Instrumento clásico para la transferencia de microorganismos de un medio a otro es el asa de inocular. Este es un alambre de una aleación de platino o tungsteno con un terminado circular agarrado a una base que le sujeta y que se esteriliza con calor proveniente de un mechero o de un incinerador eléctrico.

h).- Matraz

El matraz o frasco de Erlenmeyer (generalmente llamado sólo Erlenmeyer) es uno de los frascos de vidrio más ampliamente utilizados en laboratorios de química. Consiste en un frasco cónico de vidrio de base ancha y cuello estrecho. Se los

encuentra de diversas capacidades y con algunas variaciones. Suelen incluir unas pocas marcas para saber aproximadamente el volumen contenido.

i).- Mechero de bunsen

Un mechero o quemador Bunsen es un instrumento utilizado en laboratorios científicos para calentar o esterilizar muestras o reactivos químicos. El quemador tiene una base pesada en la que se introduce el suministro de gas. De allí parte un tubo vertical por el que el gas fluye atravesando un pequeño agujero en el fondo de tubo. Algunas perforaciones en los laterales del tubo permiten la entrada de aire en el flujo de gas (gracias al efecto Venturi) proporcionando una mezcla inflamable a la salida de los gases en la parte superior del tubo donde se produce la combustión.

j).- Gradilla

Utensilio que sirve para colocar tubos de ensayo. Este utensilio facilita el manejo de los tubos de ensayo. 7

k).- Termómetro.

Es un utensilio que permite observar la temperatura que van alcanzando algunas sustancias que se están calentando. Si la temperatura es un factor que afecte a la reacción permite controlar el incremento o decremento de la temperatura.

l).- Vasos de precipitados.

Son utensilios que permiten calentar sustancias hasta obtener precipitados

m).- Pipetas.

Son utensilios que permiten medir volúmenes. Las hay en dos presentaciones: Pipetas aforadas y pipetas volumétricas.

Las primeras sólo miden el volumen que viene indicado en ellas. Las segundas permiten medir volúmenes intermedios pues están graduadas.

3.5.1.-Esterilización y desinfección del material de microbiología.

En microbiología, esterilización implica la eliminación o destrucción de todo organismo vivo. Por tanto un objeto estéril está libre de todo organismo viable (vivo). Se dice que un organismo está vivo cuando es capaz de reproducirse. Hay varios tipos de esterilización posibles. En términos generales pueden clasificarse así:

1. Métodos químicos, por cuyo medio se lleva a cabo la destrucción de organismos por aplicación de un agente químico.
2. Métodos físicos, en los cuales se lleva a cabo la destrucción por calor o por radiación, o bien eliminado los organismos por filtración o centrifugación
3. Métodos biológicos, en los cuales la destrucción se lleva a cabo por interferencia en los procesos vitales, con productos biológicos.

3.5.2.-Uso de la Cámara Neubauer o Hemacitometro.

La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc. Esta cámara de conteo está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se cubre la cámara con un cubrecámaras que se adhiere por simple tensión superficial. (Hansen, 2000)

3.5.3.-Métodos de conteo en la cámara neubauer.

Método A: contar el número de células en los 4 cuadros externos.

Se calcula la concentración de la célula como sigue:

Concentración de la célula por mililitro= cuenta total de la célula en 4cuadrados*factor de la dilución*2500.

Método B: concentración de las células como sigue: concentración de la célula por mililitro = cuenta total de la célula en 5 cuadros *factor de la dilución *50,000. .

(Hansen, 2000)

3.5.4.-Antibiograma.

Es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la sensibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos. El antibiograma, una vez realizado, da la siguiente información: Grado de sensibilidad de la colonia bacteriana a un determinado antibiótico. Diferencia de sensibilidad por parte de la colonia a diferentes antibióticos. Con esta información, se clasifica el efecto del antibiótico sobre esa determinada colonia en: Resistente (R), Intermedio (I) y Sensible (S).

3.5.4.1.-Tipos de antibiograma

Disco difusor

En una placa de Petri, se siembra la bacteria por "siembra en césped" para que esta pueda crecer de manera homogénea por toda la placa. Acto seguido, se colocan los discos difusores, unas pequeñas cápsulas que contienen antibiótico, que liberan al medio. Las placas se incuban y pasado el tiempo pertinente (varía según la especie de bacteria) se observa. Las bacterias habrán crecido por toda la placa salvo en las zonas impregnadas con el antibiótico.

Dado que la concentración de antibiótico es menor a mayor distancia del disco difusor, llegará un momento en que la bacteria crecerá tolerando la ínfima concentración de antibiótico. A esta distancia se le denomina "radio de inhibición". Las propias empresas farmacéuticas que distribuyen los discos difusores tabulan, en centímetros, el radio de inhibición que debería provocar tal antibiótico para ser considerado Sensible, Intermedió o Resistente. El bacteriólogo se ocupa de medir con regla el radio y considerarlo según las tablas.

3.5.4.2.-Concentración mínima inhibitoria (CMI).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración de antibiótico necesario para provocar la inhibición del 90% de los microorganismos en el ensayo. Es el parámetro más empleado en el laboratorio de microbiología porque es el que se ha aplicado para fijar los criterios que definen a cada cepa dentro de las categorías clínicas de sensibilidad, sensibilidad parcial o resistencia. Gracias a

estudios con gran número de cepas se establecieron criterios de manera que conociendo la CMI frente a un determinado antibiótico podemos saber si el microorganismo en cuestión es o no resistente ha dicho fármaco.

3.5.4.3.-Factores que influyen en el antibiograma.

Para la correcta realización e interpretación de las técnicas de antibiograma deben considerarse los siguientes factores:

Inoculo. El número de microorganismos aplicados en el ensayo debe reproducir todas las posibles condiciones en el organismo.

Medio de cultivo. El medio de Mueller-Hinton es el estandarizado para los métodos de antibiograma. Se dispone en forma líquida y sólida.

Incubación. Las estandarizadas son 37°C y 20-24 h en atmósfera aerobia o rica en **CO₂** según el microorganismo.

3.5.5.-Agares utilizados en cultivo microbiológicos.

Agar TSA

Medio tripticaseína de soya

Medio para crecer todo tipo de bacterias.

Procedimiento:

- a) Se pesa la cantidad requerida de acuerdo al número de cajas que se desea elaborar.
- b) Para este medio se agregan 2.0 gr de NaCl por cada 100 ml.
- c) Se disuelve el medio en agua destilada en un matraz y se calienta en un termoagitador hasta el punto de ebullición para que se disuelve completamente (debe quedar cristalino).
- d) Se mide el pH el cual debe ser de 7.3 ± 0.2
- e) Se esteriliza en autoclave a 120°C por 15 minutos.
- f) Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C, y posteriormente se

vacía en cajas de petri (aproximadamente 20 ml/caja de 90x10). Se espera a que solidifique el medio y se meten a secar invertidas en un horno a 30°C durante 24 horas.

Medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS)

Medio diferencial para el género *Vibrio* sp.

Procedimiento:

- a) Se pesa la cantidad requerida de acuerdo al número de cajas que se desea elaborar, y se disuelve en agua destilada en un matraz.
- b) Se pone a calentar en un termoagitador hasta que hierva (dos veces); se deja enfriar hasta una temperatura de 45 °C.
- c) Se mide el pH el cual debe ser de 8.6 ± 0.2
- d) Posteriormente se vacía en cajas de petri (aproximadamente 20 ml/caja de 90x10). Se espera a que gelifique y se meten a secar en un horno a 30°C durante 24 horas.

Nota: Este medio no requiere de esterilización.

Caldo Muller – Hinton (MHB)

Procedimiento:

- a) Se pesa la cantidad requerida de acuerdo al número de cajas que se desea elaborar.
- b) Para MIC se emplea el medio concentrado. El doble de la cantidad indicada (gr).
- c) Se disuelve el medio en agua destilada y se calienta hasta el punto de ebullición para disolverlo completamente.
- d) Se vacía en un frasco para medio con tapón de rosca y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 10 minutos.

MRS Lactobacillus.

Procedimiento:

- 1.-Referirse a la etiqueta del envase para cantidades y volúmenes requerido.
- 2.-AUTOCLAVE A 121°C (15p.s.i.) Durante 15 minutos.
- 3.-Enfriar a50-55°C y mantener a esta temperatura. Ajustar el pH si se requiere de medio acidificado.
- 4.- preparar homogenato (muestra) usando un stomacher o un mezclador magnético y diluciones seriales posteriores de la muestra alimenticia.
- 5.-colocar 1ml de un homogenato (muestra) y cada dilución en placas petri separada. Añadir 15ml de MRS agar fundido y enfriado a 45°C a cada placa. Mezclar uniformemente y dejar solidificar.
- 6.-incubar bajo condiciones anaerobias durante 2 a 5 días a 30°C. Una temperatura más baja de 22-25°C puede ser usada para recuentos de psicrotrofos o 42°C para termófilos. Si las instalaciones son solamente para cultivo aerobico, añadir una capa de 5ml de MRS de agar a cada placa después que haya solidificado para producir una placa con capas.
- 7.- no dejar que las superficies de las placas se sequen ya que estos inhibirán los Lactobacillus debido a un incremento de la concentración de acetato de la superficie de agar.

Bacto agar.

Se utiliza como medio solidificante. El cual se requiere de 1.5 de gramos estantadarizados. Para la solidificación del medio de cultivo MRS Lactobacillus.

- 1.-Referirse a la etiqueta del envase para cantidades y volúmenes requerido.
- 2.-Autoclave a 121°C (15p.s.i.) Durante 15 minutos.
- 3.-pH 7.0 ± 0.2.

3.6.-Utilización de melaza en estanques de cultivo de camarón.

La melaza es un jarabe oscuro, viscoso que proviene de la separación de la azúcar cruda en el proceso de elaboración de azúcar refinada. Está constituido por carbohidratos del tipo polisacáridos y monosacáridos; la melaza, contiene como materia seca cerca del 94-100% y como proteína puede contener del 4-10.3%. Los azucares que constituyen la melaza incluyen: sacarosa, glucosa, levulosa,

maltosa, lactosa y azúcares reductoras. (Talavera y Sanches, 1998). En el cultivo de camarón, la melaza puede ser utilizada para la preparación de estanques como aportador de carbono orgánico. Junto con los nutrientes mayores (nitrógeno, fósforo), el carbono orgánico aportado por la melaza es requerido por las bacterias y algas, en la constitución de sus membranas y organelos y como fuente de energía principalmente en el proceso de fotosíntesis. A su vez las bacterias y algas, constituyen el eslabón inicial de la cadena trófica de alimento natural en un estanque, habitando como plancton tanto en la columna de agua y constituyendo el bentos en el suelo del estanque. (Talavera y Sanches, 1998). El carbono constituye el dióxido de carbono, que al reaccionar con el agua produce ácido carbónico; y este a la vez reacciona con los minerales disueltos para formar bicarbonatos y carbonatos. Durante la fotosíntesis, las algas absorben los componentes de carbono del agua del estanque, siendo las fuentes: (a) el aire (dióxido de carbono); (b) dióxido de carbono producido por la respiración; (c) dióxido de carbono producido por la descomposición aeróbica; y (d) carbonatos y bicarbonatos disueltos. Por otro lado, los suelos de los estanques de cultivo de camarón se distinguen por ser pobres en materia orgánica y carentes de carbono orgánico disponible (valores hallados en análisis de ALPE para estanques de camaroneras peruanas oscilan entre 0.5-2%), mientras que en el cultivo de camarones se consideran valores adecuados para proveer carbono orgánico, rangos de 5-7%, según Boyd. Por lo tanto, al aplicar melaza al fondo del estanque de cultivo de camarón durante la preparación de este y posteriormente en forma continua a la columna de agua, se está aportando con carbono orgánico. (Limsuwan, 2005). Aunque mayormente la aplicación más común de la melaza es para el control y reducción temporal de bacteria oportunistas luminosas del género *Vibrio*, a raíz de la aparición del Síndrome de la Gaviota, a nivel de estanques camaroneros en Ecuador a inicios de los años 90 La explicación posible para el fenómeno de control y reducción se ha podido obtener mediante la revisión de las características bioquímicas de las bacterias que constituyen el género *Vibrio*. Así, *V. parahaemolyticus*, quien frecuentemente es aislada en Agar TCBS, no puede utilizar la sacarosa; mientras que otros *Vibrio* spp. Aparentemente menos

patogénicos y muchas otras bacteria estuarinas, pueden utilizar el azúcar así como también los altos niveles de nutrientes (urea o nitrato) para su crecimiento, proliferación y competir a la vez con *V. parahaemolyticus*, por otros nutrientes disponibles y necesarios para su crecimiento.

3.7.-Suero de leche de vaca.

El suero de leche es un líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación de la cuajada o fase micelar. Sus características corresponden a un líquido fluido, de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5.5% al 7% provenientes de la leche

3.7.1.-Clases de sueros líquidos.

a).-Lactosuero dulce.

Procedente de fabricaciones de coagulación enzimática por uso de enzima coagulante. La precipitación de las proteínas se produce por hidrólisis específica de la caseína. Por lo tanto el pH es próximo al de la leche inicial y no hay variación de la composición mineral. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable, lo que permite estimar los valores medios de composición.

b).- Lactosuero ácido.

Obtenida de una coagulación ácida o láctica de la caseína, presentando un pH próximo a 4,5. Se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína con anulación de las cargas eléctricas que las mantienen separadas por las fuerzas de repulsión que generan, impidiendo la floculación. Conlleva una total desmineralización de la micela y la destrucción de la estructura micelar (gel muy frágil). Es un suero muy mineralizado pues contiene más del 80% de los minerales de la leche de partida. En éste, el ácido láctico secuestra el calcio del complejo de paracaseinato cálcico, produciendo lactato cálcico.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.-Área de estudio.

Esta investigación se realizó en el periodo de septiembre del año 2010, 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. Las Coordenadas UTM son 496455.8m E y 1367340.7m N.

4.2.-Dispositivo experimental

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, con tapadera de rosca. Los frascos se rotularon como frasco N°1(F1) Y frasco N°2(F2). En cada frasco se le colocó 3L de la muestra del suero de leche. Posteriormente se sellaron herméticamente con plástico negro, para el proceso de fermentación en un cuarto cerrado. Una vez pasada las 48 hrs se mantuvo el F1 como testigo del suero puro, y, al F2 se le realizó 3 tipos de diluciones con los siguientes componentes (inoculo o suero puro del F2, melaza y agua), las cuales consisten en dilución 8-1, 10-1, y 12-1. Cada dilución tendrá tres repeticiones para mayores datos probabilísticos. El *Vibrión* sp. Se obtuvo de la granja Las salinitas de la empresa SERVICONSA.

4.3.-Diluciones de inoculo o suero puro F2.

Porcentaje de inclusión	Dilución 8-1	Dilución 10-1	Dilución 12-1
10% inoculo	375ml	300ml	250ml
10 %melaza	375ml	300ml	250ml
80 %agua	2250ml	2400ml	2500ml
100%	3000ml	3000ml	3000ml

4.4.-Factores Físico-Químico (pH, Temperatura).

En este trabajo y para determinar cuanto influyeron los factores físico químicos en el comportamiento de las bacteria se midieron los siguientes factores temperatura y pH como los que pudieran influir en la dinámica poblacional de las bacterias de *Lactobacillus acidophilus*.

4.4.1.- pH.

Se tomo el pH diario dos vez por día a las 7am y 5pm, Con un pH-metro marca HANNA, a cada uno de los frascos de las diferentes diluciones, la calibración se hacía cada vez que se utilizaba con soluciones buffer de pH4 y pH7. Los datos se anotaron en el formato ubicado en anexos en este documento.

4.4.2.- Temperatura.

La temperatura se tomo diario dos veces al día 7am y 5 pm con un Termómetro ambiental. Los datos se anotaron en el formato ubicado en anexos en este documento.

4.5.-Conteo de *Lactobacillus Acidophilus*. (NEUBAUER).

El conteo de las bacterias *Lactobacillus acidophilus* se realizó desde el día cero, cada 24hrs a las diferentes diluciones en experimento hasta que la muestra presento indicios de disminución en el crecimiento bacteriano o decrecimiento.

Las muestras se obtuvieron utilizando una pipeta de 10 ml de capacidad, con esa pipeta se toman 1 ml de muestra de las diluciones y se colocan en un tubo de ensayo, luego se agregan 9 ml de agua de mar filtrada con luz ultravioleta y se procede al conteo.

Para calcular cuántos *Lactobacillus acidophilus* tenemos en las diluciones se procede de la siguiente manera. Con un microscopio binocular compuesto marca I-4 LW Scientific y con el lente objetivo 40X se procede a realizar el conteo de

bacteria en las cuadrículas de la Cámara de Neubauer. Las expresiones matemáticas para el cálculo son las siguientes:

4.5.1 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 en la cámara serán expresados en células/mililitro (cel/ml). Los datos registrados se anotaran en formato ubicado en anexos en este documento

4.6.-Preparación de medios de cultivos específicos (Agares).

Para la preparación de los agares que se utilizan como cultivo se debe usar agua de mar filtrada con filtro de cartucho y luz ultravioleta, todos los utensilios y sustancias pasaron por un autoclave marca Aquatic M 25-1, a 15 lb de presión, temperatura de 121°C.

4.6.1.-Agar con Soja Triptica (TSA)

Medio agar con digeridos de soja y caseína, USP. Para su preparación se procede de la siguiente manera, se pesa 40gramos TSA y se completa a 1 litro con agua destilada. Se preparan 100 ml para su uso.

4.6.2.-Agar Mueller Hinto

La preparación de este Agar se pesa 34gr de Agar y se completa a 1 litro con agua destilada. Se preparan 100 ml para su uso.

4.6.3.-Agar TCBS,

Para la preparación de este Agar se pesa 88gramos y se completa a 1 litro con agua destilada. Se preparan 100 ml para su uso.

4.6.4.-Caldo MRS, para Lactobacilos.

Para la preparación de este medio de cultivo se pesa 52.2 gramos de agar MRS y se completa a 1 litro con agua de mar destilada. Se preparan 100 ml para su uso.

4.6.5.-Bacto agar:

Para su preparación se pesa 1.5 gramos de Bacto Agar.

Luego los dos agares anteriores (MRS y Bacto agar) se mezclan, para una mayor rapidez de solidificación del este medio de cultivo.

4.7.-Conteo de las colonias de Lactobacillus acidophilus

Se realizó el conteo de las colonias (36 horas después de iniciada la siembra, según la temperatura), de la siguiente manera: el volumen inoculado en MRS fue de 100µl. Esta referencia se toma en cuenta cuando se calculan la cantidad de colonias existentes para un mililitro, por lo tanto los valores obtenidos de colonias formadas se multiplica por 100 y los datos se expresaron en unidades formadoras de colonias /mililitro (UFC/ML) Los datos se anotaron en el formato correspondiente, anexo a la presente. Este conteo se realiza para confirmar las poblaciones de bacterias Lactobcillus acidophillus vistas al microscopio.

4.8.-Aislamiento de Vibrión sp.

Para el aislamiento de vibrión sp se procedió de la siguiente manera: se obtuvo un camarón de la granja camaronera Las salinitas de la empresa SERVICONSA, se esteriliza el espacio de trabajo, se realizo un frotis con algodón y alcohol al 100% limpiando el camarón en la parte del cefalotórax antes de extraer el hepatopáncreas utilizando una pinza esterilizada, y un mechero ,posteriormente

se introduce el aza de siembra esterilizada en el mechero se sembró en su medio de cultivo específico de Agar TCBS.

4.9.-Prueba de sensibilidad.

Una vez extraído el vibrión sp. En Agar TCBS, se dio un tiempo de 24 hrs, para aislar en platos petri conteniendo TSA, colonias amarías y colonias verdes para un mayor enriquecimiento de las colonias, se dio un tiempo de 24 hrs y finalmente se siembra en Mueller Hinton donde se le aplicaron las dosis correspondientes 10ul, 20ul, 30ul, del probiótico en experimento.

La prueba de sensibilidad se realizó tres veces durante el crecimiento de los *Lactobacillus acidophilus* hasta cuando estos presentaron indicios de decrecimiento, el cual utilizamos, aza de siembra, un mechero, una lámpara para mantener temperatura mayor de 30°C y una micropipeta de 10-200ul, las dosis antes señaladas se le aplico a cada una de las colonias (colonias verdes y colonias amarillas) de los platos petri conteniendo Mueller Hinton que tienen Vibrión sp. Se anotó la respuesta del halo de inhibición del probiótico experimental para determinar la concentración mínima inhibitoria a este Vibrión sp. Y de su grado de sensibilidad.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.-Factores físico- químico. (Temperatura, pH).

5.1.1.-Temperatura.

Las variaciones de temperaturas de *Lactobacillus acidophillus* durante el periodo del estudio se mantuvieron en los intervalos óptimos de crecimiento, 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.

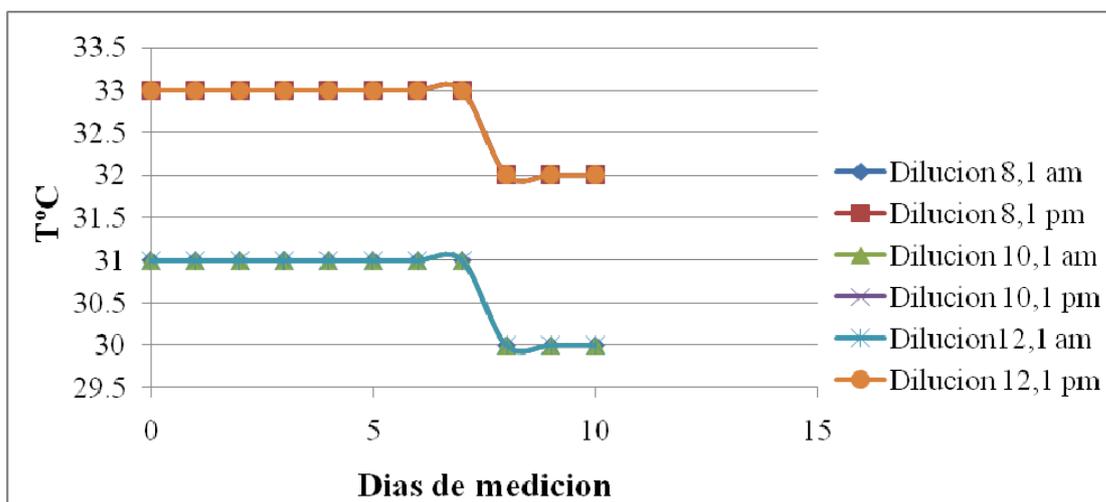


Grafico G, 1. Variables de temperaturas (am, pm) de las diferentes diluciones del suero.

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*, (Kandler y Weiss, citados por Bergey, 1992).

5.1.2.-pH.

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 (Kandler y Weiss, citados por Bergey, 1992)

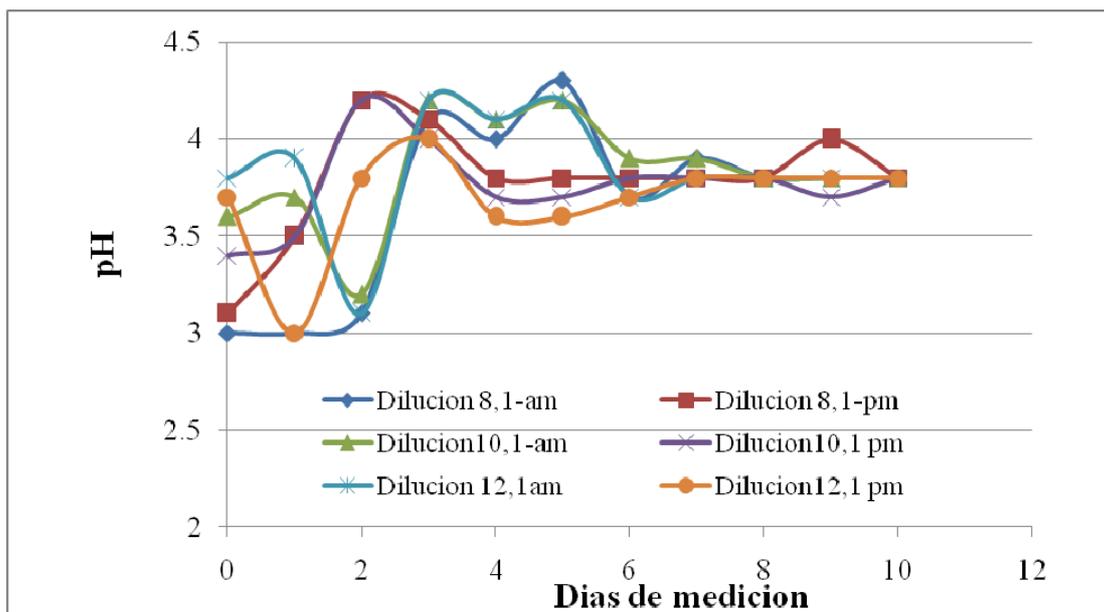


Grafico G, 2. Variables de pH (am, pm) de las diferentes diluciones del suero.

5.1.3.-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 decrecimiento 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 presento un mayor crecimiento población alcanzando 431,8 millones de cel. /ml de *L. acidophilus*. Seguidamente de la dilucion 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 *Lactobacillus acidophilus* en todas las diluciones son aceptables, independientemente que en 8:1 se halla expresado el valor máximo de 431 millones de cel. /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 (Hansen y Riemann, 1963).

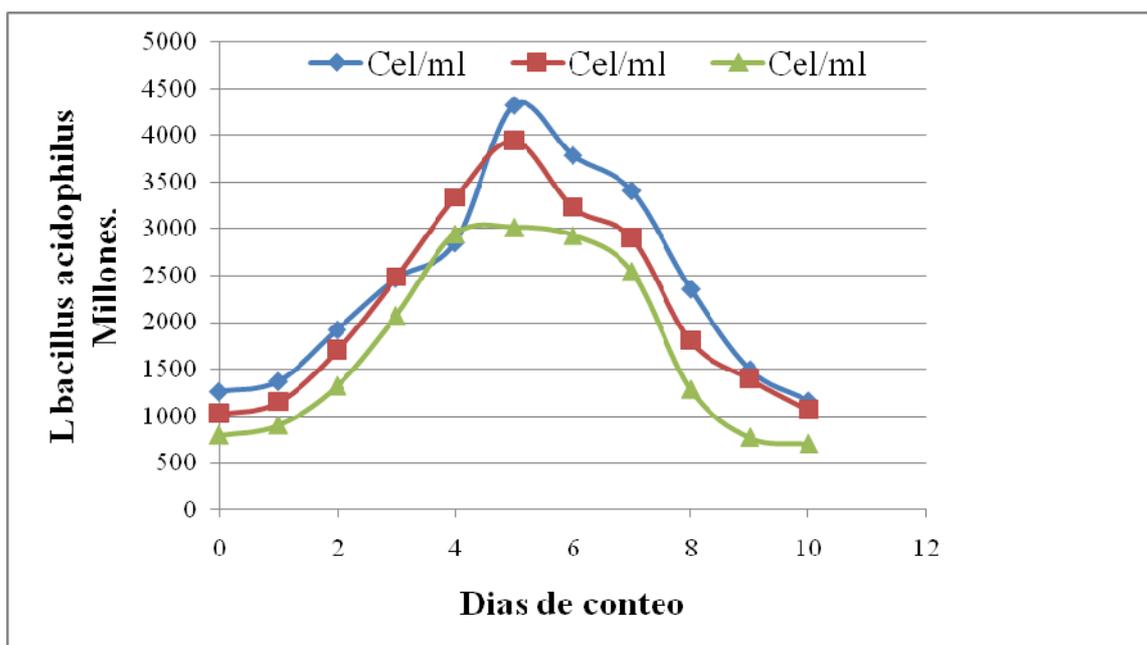


Grafico G, 3. Crecimiento poblacional de las diferentes diluciones del suero.

5.1.4.-Prueba de sensibilidad.

Los resultados obtenidos a las pruebas de sensibilidad del probiótico elaborado y conteniendo Lactobacillus acidophilus ante cultivos microbiológicos conteniendo colonias amarías y colonias verdes presentaron sus mejores resultados de repelencia cuando se aplicó el producto al quinto día de crecimiento de las poblaciones bacterianas de Lactobacillus acidophilus. Donde la dosis de 30µl presento los mayores halos en milímetros (mm) en cultivos de colonias verdes y colonias amarillas.

5.1.4.1.- Resultados de Halos:

Con dosis de 30 µl se obtuvo los siguientes:

La dilución 8:1 en colonias verde obtuvo un halo de 9mm.

La dilución 10:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 5mm.

La dilución 12:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 5mm.

La dilución 8:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 1cm.

La dilución 10:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 9mm.

La dilución 12:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 9mm.

Con dosis de 20ul se obtuvo los siguientes:

La dilución 8:1 en colonias verde obtuvo un halo de 6mm.

La dilución 10:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 2mm.

La dilución 12:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 3mm.

La dilución 8:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 5mm.

La dilución 10:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 5mm.

La dilución 12:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 6mm.

Con dosis de 10 µl se obtuvo los siguientes:

La dilución 8:1 en colonias verde obtuvo un halo de 4mm.

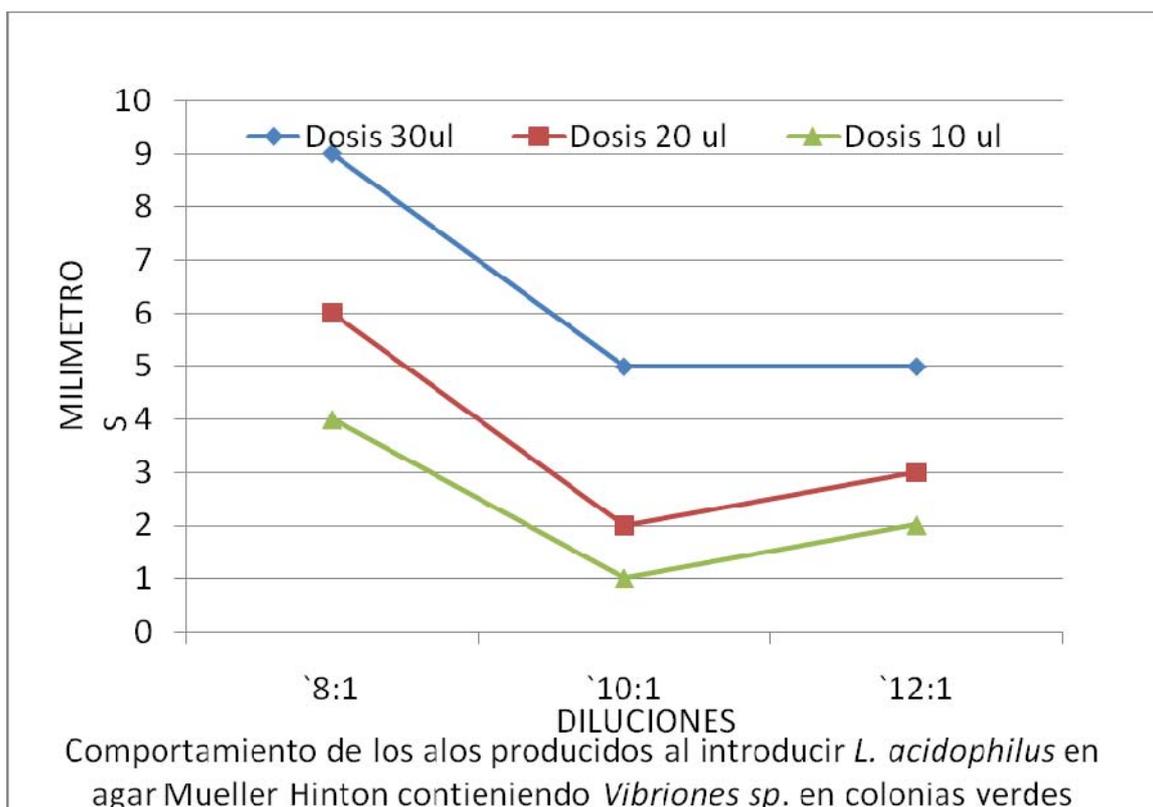
La dilución 10:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 1mm.

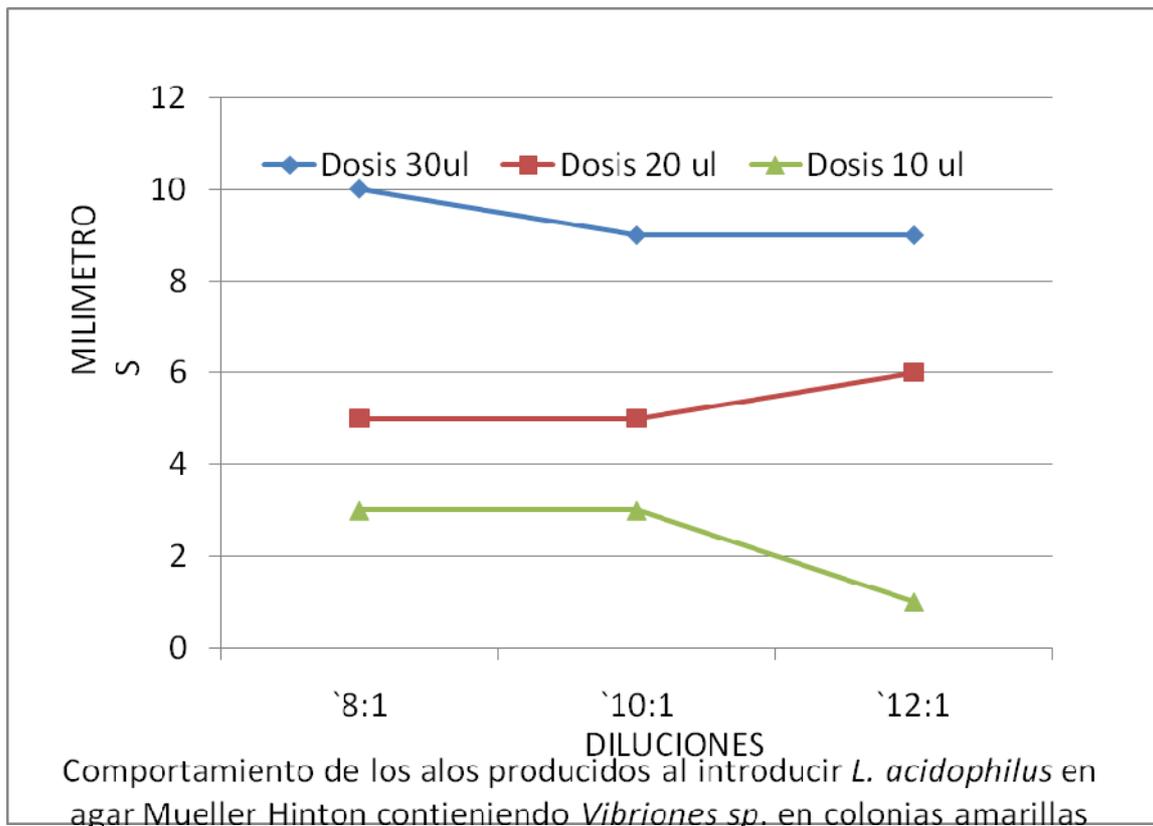
La dilución 12:1 en colonias verdes obtuvo un halo de 2mm.

La dilución 8:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 3mm.

La dilución 10:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 3mm.

La dilución 12:1 en colonias amarillas obtuvo un halo de 1mm.





VI.- Conclusiones.

1.-De acuerdo a las variaciones ambientales de los parámetros físico químico (pH, T°C) el pH se mantuvo en los intervalos de crecimiento óptimo de un promedio de pH4, tanto por la mañana como por la tarde, igualmente la temperatura se mantuvo en los intervalos óptimos de crecimiento en 31 por la mañana y 33 por la mañana.

2.- Al realizar los conteos de *Lactobacillus acidophilus* al microscopio desde el día cero hasta el día 10 se obtuvo un mayor crecimiento de la población al quinto día de conteo, con crecimiento de 300 a 400 millones 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 donde la población

presentaron su mejor crecimiento. Se registró en las diluciones menores (8:1) las mejores respuestas de halo tanto para colonias verdes (9mm) y para colonias amarillas (10mm) con una dosis de 30 μ l.

VII.- Recomendaciones.

Llevar este estudio a escala mayor (campo), para la confirmación de que es un probiótico que se pueda utilizar en las producciones camaroneras (cultivo de engorde, y de postlarvas).

Para la efectividad de este probiótico, se debe seguir al pie de la letra el protocolo de aplicación que se orienta. Adecuar un sitio (controlado) de fermentación para mantener el probiótico con respecto al pH y las temperaturas óptimas de crecimiento y no produzca bajones de estas en tiempos de invierno.

Manejar poblaciones de Lactobacillus acidophilus entre 300 millones y 400 millones de cel. /ml en los sistemas de cultivo para su mejor efectividad. Ya que no hay afectaciones a nivel del epitelio intestinal y si una buena respuesta en cuanto al control de vibrios de unidad formadoras de colonias verdes y unidad formadoras de colonias amarillas.

La aplicación de los Probióticos debe iniciarse desde el laboratorio suministrándose a tanques de cultivo de crustáceo en estadios larvales; luego en estanques de pre-cria o race ways y finalmente hacia estanques, para fase de engorde del cultivo del camarón. Es importante aplicar en todas las fases para iniciar y /o biorremediar dando buenas condiciones al ambiente de crianza y/o mejorar, evitando a si el uso de medios terapéuticos o antibiótico, compuestos químicos y/o medios mecánicos y valoración patológica de hepatopancreas, intestino y hemolinfa.

VIII- Bibliografía

Arauz H. 2000. Antibiógrama http://www.danival.org/600%20microbio/5000micro_dvf/micro_dvf_43.htm.

Auro A. y Ocampo L. 2006, El libro del camarón 1era edi. México. Junio, p9-10.

Calvo M. probióticos, prebióticos y nutracéticos en la alimentación facultad de veterinaria universidad autónoma de Barcelona bellaterra (Barcelona). España

Carvajal J. Mecanismos de acción del pH a los microorganismos <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/09-factores%20de%20supervivencia.htm>

Carvajal M. La proteína concentrada del suero de leche una súper estrella en nutrición http://www.infoleche.com/descargas/proteinas_del_suero.pdf amanda archibald,

Cedeño R. probiótico y sus aplicaciones en el cultivo del camarón departamento de biología cenaim. http://www.ptobioticos.org.ni/documentos/pnr/if_%20camaroni cultura.pdf estado actual de la camaronera en Nicaragua.

G. Varela, G. Grotiuz. Fisiología metabólica bacteriana <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/09-factores%20de%20supervivencia.htm>

Gómez G.J. 2003, Los probióticos una alternativa en el tratamiento de enfermedades microbióloga especialista en protección de alimentos Colombia

septiembre.<http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>

Hansen P. Uso del hematocitometro. Departamento de ciencia animal, universidad de florida, 2000.
<http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm>

Higa T. Los microorganismos eficaces: aliados en el cultivo sostenible de camarones sector san Ignacio, parcela n° 7, municipio falcón, tinaquillo, edo. Cojedes, Venezuela. www.ecotecnologias.com.ve email: em@ecotecnologias.com.ve

Innovador sistema de producción en la camaronicultura06marzo2003lucia navas
<http://www.midiatecavipec.com/blogmidia/?p=140>

LightnerJ.Vibriosis1999. [//www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2009/03/23/vibriosis_en_la_acuicultura_del_camaron.htm](http://www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2009/03/23/vibriosis_en_la_acuicultura_del_camaron.htm)

Medina M. 2006 Infección experimental del camarón blanco *lipenaeus vannamei* con *paraplasma penaei* y respuesta de la enfermedad de tres antibiótico y un probiótico. Pontificia universidad javeriana facultad de ciencias básicas, microbiología industrial bogota .marzo

Montalván C. Panorama acuícola, Camaronicultura de Nicaragua en crecimiento septiembre de 2005
[http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/09/23/_camaronicultura de Nicaragua encrecimiento.htm](http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/09/23/_camaronicultura_de_Nicaragua_encrecimiento.htm)

Morales C. M. et al. 2008 Guía Técnica Patología e Inmunología de camarones *penaeidos* de investigación en alimentación y desarrollo, 1era edi, panamá,.

Ronzón J. y Medina C. 2001 Probióticos en la acuicultura .Laboratorio Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela. Chile.p45, 46,47.

Rosales C. B. 2010 Asesoría, responsable del laboratorio de granja camaronera las salinitas, poneloya-Las peñitas, León. Servicios y contrataciones s.a. (SERVICONSA).

Samaniego L Y; Sosa M 2003.Lactobacilos spp.: Importantes promotores de actividad probiótico, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Matanzas, Cuba., p, 2, 3, 4,5.

Talavera V. Melaza en cultivo de camarones, Nicovita Marzo, 1998Volumen 3 [http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/09/23/_camaronicultura de Nicaragua encrecimiento.htm](http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/09/23/_camaronicultura_de_Nicaragua_encrecimiento.htm)

Venkateswara A. 1998 vibriosis en el cultivo del camarón. Colombia centro de investigación bacteriológica..

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,p167-178.

XI.-ANEXO.

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León
Facultad de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Carrera de Ingeniería Acuícola



Análisis físico-químico y conteo de probiótico.

Frasco N°_____.

Día	Fecha	Temperatura		pH		Lactobacilos.cel/ml	observación
		AM	PM	AM	PM		
0							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

8							
9							
10							

