

Original

Evaluación de la actividad antibacteriana de la melaza frente a *Vibrio* sp. Aislados de estanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón)

Evaluation of the antibacterial activity of molasses against *Vibrio* sp. isolated from culture ponds of *Litopenaeus vannamei* (shrimp)

Lic. Yudelquis Aldana Calderón, Laboratorio de la Camaronera del Litoral Sur de Granma, mbullaing@udg.co.cu , Cuba.

Lic. Jesús Armando Alvarez Hidalgo, Laboratorio de la Camaronera del Litoral Sur de Granma, mbullaing@udg.co.cu , Cuba.

M. Sc. Mijail Mijares Bullaín Galardis, Profesor Auxiliar, Universidad de Granma, mbullaing@udg.co.cu , Cuba.

Recibido: 02/09/2018 Aceptado: 12/10/2018

RESUMEN

Las cepas de *Vibrio* sp. fueron aisladas de estanques en preparación para la siembra de postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, en la Camaronera del Litoral Sur de Granma (Calisur). Las muestras de agua fueron tomadas antes y después de la aplicación de melaza, en ellas se observaron niveles de *Vibrio* totales en el orden de 10^2 . Los *Vibrios* fermentadores de la sacarosa (colonias amarillas) predominaron con respecto a los *Vibrio* no fermentadores de la sacarosa (colonias verdes). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby con modificaciones. La melaza no mostró actividad antibacteriana frente a *Vibrio* sp, aunque las cepas fueron sensibles a gentamicina y extremadamente sensibles a ciprofloxacina, antibióticos usados para contrarrestar las infecciones bacterianas en granjas camaronícolas.

Palabras clave: melaza; actividad antibacteriana; *Vibrio*; *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Strains of *Vibrio* sp were isolated from ponds in preparation for the sowing of shrimp postlarvae *Litopenaeus vannamei*, in the shrimp farm of the South Coast of Granma (Calisur). The water samples were taken before and after the application of molasses, in them total *Vibrio* levels were observed in the order of 10^2 . The positive sucrose *Vibrio* (yellow colonies) predominated with respect to the negative sucrose *Vibrio* (green colonies). For the evaluation of the antimicrobial

activity was used the Bauer-Kirby disc diffusion agar method with modifications. The molasses not showed antibacterial activity against *Vibrio* sp, although the stains were sensitive to gentamicin and extremely sensitive to ciprofloxacin, antibiotics used to counteract bacterial infections in shrimp farms.

Key words: molasses; antimicrobial activity; *Vibrio*; *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUCCIÓN

La miel o también llamada melaza es un líquido denso y viscoso de color oscuro, producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar (Talavera, Sánchez y Zapata, 1998). Para su obtención, el proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permiten la cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos, 1990), siendo este el principal componente de los azúcares de la melaza (60% - 63% en peso) (Aguilar, et al., 2015).

Entre los componentes no azúcares de la melaza se encuentran sustancias orgánicas libres de nitrógeno como ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos. Es necesario resaltar que, algunos fenoles son indeseables desde el punto de vista de la fermentación, por presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, a concentraciones de 0,5g/L (Castro, 1993). Algunos compuestos fenólicos obtenidos de extractos vegetales, se han reportado como alternativas viables a los antibióticos para el tratamiento de agentes infecciosos en la acuicultura (Citarasu, 2010).

En el cultivo del camarón la melaza puede ser utilizada para la preparación de estanques, siendo el carbono orgánico aportado por la melaza junto con los nutrientes mayores (nitrógeno, fosforo), 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 (Talavera et al., 1998).

Las enfermedades bacterianas han ganado mayor atención en los últimos años, desde que el agente causal del Síndrome de la mortalidad temprana, una enfermedad destructiva emergente, ha sido identificado como *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria sacarosa reductora negativa usualmente asociada con enfermedades en camarón (Kongchuma, Chimtonga, Chareansaka y Subpraserta, 2016). La utilización de melaza puede provocar el desplazamiento o competencia entre bacterias del género *Vibrio*. Su aplicación favorece el crecimiento de bacterias sacarosa

reductora positivas como *V. alginolyticus*, *V. damselli*, y *V. vulnificus*, las que se cree son menos nocivas para los camarones (Talavera et al., 1998).

Existen reportes de actividad antibacteriana de la melaza sobre la viabilidad de la *Salmonella typhimurium* (Gutiérrez, 1995), y del efecto en la supresión de bacterias y levaduras (Urabe, Nadamoto, Kawamura y Yasumoto, 1994). Otros estudios han demostrado actividad antibacteriana del azúcar de caña (rica en sacarosa) sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Pujol, Díaz, Rodríguez y Arias, 2008).

Este trabajo tiene como objetivo, evaluar la actividad antibacteriana de la melaza sobre *Vibrios sp* aislados de estanques de cultivo de camarón.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Recolección y traslado de las muestras

Se seleccionaron 4 estanques de cultivo semi-intensivo en etapa de preparación para la siembra pertenecientes a la Camaronera del Litoral Sur de Granma (Calisur). Las muestras fueron tomadas en abril de 2018, antes y después de la aplicación de melaza. Las muestras de agua se tomaron en frascos de vidrio previamente esterilizados en autoclave y se enviaron al Laboratorio de la camaronera en condiciones refrigeradas. La muestra se tomó sumergiendo el frasco 20 cm por debajo de la superficie del agua del estanque, dejando un espacio de 2,5 cm dentro del recipiente para facilitar la homogenización de la muestra (Suárez, Medina, Montiel, Ibarra y Salcedo, 2015).

Materiales y Métodos

Parámetros microbiológicos

Para la preparación del medio de cultivo TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) se vertieron 15 mL en placas de Petri (Alumbra, China) de 90 mm de diámetro. El medio TCBS fue inoculado con 0,1 mL de las muestras de agua por la técnica de esparcido en placa. Las placas, por duplicado, fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas (Heenatigala y Fernando, 2016). Se contaron las colonias de *Vibrio* fermentadoras de sacarosa (amarillas) y no fermentadoras de sacarosa (verdes). Se calcularon y se reportaron como UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitros).

Para la obtención de colonias puras (verdes y amarillas) fueron subcultivadas en TSA (agar triptona soya) al 2% de NaCl e incubadas a 30 °C durante 24 horas (Heenatigala y Fernando,

2016). Las cepas obtenidas se trasladaron al laboratorio del Centro Provincial de Higiene donde fueron sometidas a diversas pruebas bioquímicas, con el objetivo de realizar una correcta clasificación taxonómica de los microorganismos aislados para establecer su identidad de género bacteriano.

Evaluación de la actividad antibacteriana de la melaza

El ensayo de la actividad antibacteriana fue realizado en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma. Se utilizó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (Bauer, Kirby, Sherris y Truck, 1966), adoptado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS), con algunas modificaciones (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2009).

Los inóculos fueron preparados con solución de NaCl al 2% a partir de colonias crecidas durante 24 h y se ajustaron equivalentemente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Heenatigala y Fernando, 2016). Se realizó la siembra sobre el medio TCBS (BioCen, Cuba) (pH $8,6 \pm 0,2$) con hisopos estériles. Utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como disolvente se prepararon disoluciones stock a 82, 164, 246, 328, 410, 492 y 574 mg/mL. Se adicionaron 5 μ L de estas disoluciones a discos de papel de filtro (Whatman, Inglaterra) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, quedando aproximadamente 410, 820, 1230, 1640, 2050, 2460 y 2870 μ g/disco respectivamente. Finalmente, las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante 24 horas en una incubadora (Boxun BG-80, China) (Gracia, Orozco y Molina, 2012). Las zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de los discos se midieron en milímetros.

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, utilizando como controles negativos, discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 5 μ L de DMSO; como controles positivos se emplearon discos de los antibióticos comerciales Gentamicina y Ciprofloxacina de 10 y 5 μ g/disco, respectivamente (Sensi-Disc TM, Francia). Los resultados se declararon como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento.

Análisis estadístico de los resultados

Se empleó el análisis de regresión simple para la interpretación de los resultados de la siembra en TCBS, atendiendo a la capacidad de *Vibrio* sp de fermentar o no la sacarosa, antes y después de la aplicación de melaza, empleando para ello el Software STATGRAPHICS Centurion XVIII.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los niveles de *Vibrio* fermentadores de la sacarosa (colonias amarillas) estuvieron en el orden de 10^2 (UFC/mL), y predominaron más que los *Vibrio* no fermentadores de la sacarosa (colonias verdes) de 3.0×10 a 1.2×10^2 . Los niveles de *Vibrio* totales en el agua de los estanques se encontraron en el orden de 10^2 .

Al comparar los resultados de la siembra en TCBS, atendiendo a la capacidad de *Vibrio sp* de fermentar o no la sacarosa (colonias amarillas o verdes, respectivamente), antes y después de aplicar melaza (Tabla I), se observa un aumento de los conteos de *Vibrio* (colonias amarillas), y la disminución de los *Vibrio* (colonias verdes); lo que corrobora que una de las utilidades de la melaza es su participación en el desplazamiento o competencia entre sí de bacterias del género *Vibrio* (Talavera et al., 1998).

Tabla I. Recuento de *Vibrio sp*.

Estanques	Antes de aplicar melaza (UFC/mL)			Después de aplicar melaza (UFC/mL)		
	<i>Vibrio</i> (amarillas)	<i>Vibrio</i> (verdes)	<i>Vibrio</i> totales	<i>Vibrio</i> (amarillas)	<i>Vibrio</i> (verdes)	<i>Vibrio</i> totales
63	1.8×10^2	9.0×10	2.7×10^2	3.0×10^2	5.0×10	3.5×10^2
64	2.3×10^2	1.0×10^2	3.3×10^2	6.7×10^2	3.0×10	7.0×10^2
61	1.6×10^2	1.2×10^2	2.8×10^2	2.2×10^2	7.0×10	2.9×10^2
62	1.2×10^2	8.0×10	2.0×10^2	1.8×10^2	4.0×10	2.2×10^2

UFC: Unidades formadoras de colonias. DMSO: dimetilsulfóxido.

El análisis estadístico de estos resultados demostró que no existe una relación estadísticamente significativa entre las colonias amarillas, las verdes y totales, antes y después de la aplicación de la melaza ($P > 0.05$). No obstante, los valores de coeficientes de correlación indican una relación relativamente fuerte para las colonias amarillas, y moderadamente fuerte para las colonias verdes y totales, antes y después de la aplicación de la melaza.

La melaza no mostró actividad antibacteriana frente a las cepas de *Vibrio sp*, aun cuando se utilizaron altas concentraciones (Tabla II).

Tabla II. Evaluación de la actividad antibacteriana de la melaza frente a *Vibrio sp.*

Melaza (mg/mL)	Halos de inhibición (mm) frente a cepas bacterianas	
	<i>Vibrio (Amarilla)</i> (Salvaje) Gram-negativa ($\bar{x} \pm DS$)	<i>Vibrio (Verde)</i> (Salvaje) Gram-negativa ($\bar{x} \pm DS$)
82	-	-
164	-	-
246	-	-
328	-	-
410	-	-
492	-	-
574	-	-
DMSO	-	-
Ciprofloxacina	27,7±0,6	28,3±0,6
Gentamicina	13,7±0,6	13,3±0,6

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO: dimetilsulfóxido.

El dimetilsulfóxido usado como control negativo no inhibió el crecimiento de los *Vibrios*. Los antibióticos usados como controles positivos inhibieron el crecimiento de las cepas estudiadas. Los halos de inhibición desarrollados con ciprofloxacina fueron mayores que con gentamicina (Figura 1).

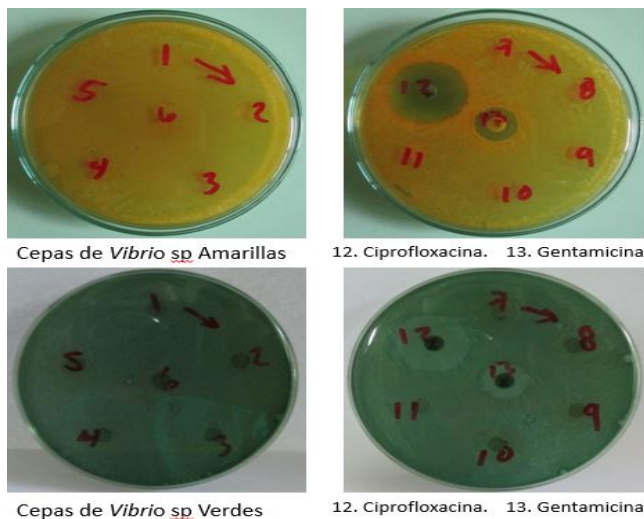


Figura 1. Halos de inhibición producidos por los antibióticos Ciprofloxacina y Gentamicina frente a *Vibrio sp.*

Discusión

La mayoría de las granjas camaroneras controlan la presencia de bacterias del género *Vibrio* en sus estanques, sin considerar su patogenicidad al camarón o al humano [15]. La distribución de *Vibrio* en ambientes acuáticos ha sido investigada y reportada por diversos autores indicando que los miembros de la familia Vibrionaceae son escasos en número pero se encuentran ampliamente distribuidos (Suárez et al., 2015).

Los resultados muestran que el agua de los estanques puede ser considerada de buena calidad teniendo en cuenta que Cuéllar et al. (2010) refieren valores $\leq 10^2$ de las siembras en TCBS para el agua de estanques listos para la siembra. Suárez et al. (2015) obtuvieron resultados similares reportando valores de *Vibrio* entre $1,2 \times 10^1$ y $7,4 \times 10^2$ UFC/mL, mientras que en estudio realizado por Heenatigala y Fernando (2016) los conteos totales de *Vibrio* estuvieron en el rango desde 0 hasta 5×10^3 UFC/mL.

La incidencia de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias es uno de los principales problemas en la producción acuícola de camarones peneidos (Gracia, et al., 2011); siendo la vibriosis, causada por *Vibrio* spp, una de las enfermedades que más prevalecen en sistemas de acuicultura a escala mundial y que puede causar pérdidas considerables (Chatterjee y Haldar, 2012). Para contrarrestar las infecciones bacterianas en las granjas camaronícolas, se emplean antibióticos como, enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFC) y oxitetraciclina (OTC), siendo este último el más utilizado (Bermúdez, Espinosa, Santiago, Barajas y Acedo, 2014). Aunque, en el mundo se emplean además, antibióticos como clortetraciclina, quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, sulfametazina, gentamicina y tiamulina (Santiago, Espinosa y Bermúdez, 2009).

De acuerdo con la clasificación de los grados de sensibilidad bacteriana a los antibióticos, en relación al diámetro de inhibición en placas (≤ 8 mm no sensible, 9-14mm sensible, 15-19 mm muy sensible, ≥ 20 mm extremadamente sensible) (Celikel y Kavas, 2008), ambas cepas resultaron sensibles a gentamicina y extremadamente sensibles a ciprofloxacina.

Resultados similares fueron obtenidos en estudio realizado por Gracia et al. (2012), en el que la respuesta de inhibición de Enrofloxacin en *V. alginolyticus* resultó extremadamente sensible.

En estudio realizado por Heenatigala y Fernando (2016) las cepas aisladas de *Vibrio* sp mostraron resistencia a la gentamicina. Desafortunadamente, la capacidad de las bacterias para mutar y reproducirse rápidamente, aunado al mal uso que se hace de los compuestos antibacterianos, han generado el desarrollo de resistencia bacteriana. Siendo este problema, en la actualidad, el mayor reto al cual se deben enfrentar las unidades de producción de camarón (Celikel y Kavas, 2008).

La melaza no mostró actividad antibacteriana sobre las cepas de *Vibrio* sp, por lo que la utilidad de la melaza en el desplazamiento de *Vibrio* sp en sistemas de cultivo de camarón puede ser solo atribuida a la capacidad que tienen unas especies de utilizar la sacarosa en su metabolismo. Su aplicación favorece el crecimiento de bacterias sacarosa reductora positivas como *V. alginolyticus*, *V. damselli*, y *V. vulnificus*, las que se cree son menos nocivas para los camarones (Talavera et al., 1998).

Resultados similares fueron obtenidos por Urabe et al. (1994) donde la melaza no mostró efecto inhibitorio sobre *Aspergillus niger*. Sin embargo, existen reportes de actividad antibacteriana de la melaza sobre la viabilidad de la *Salmonella typhimurium* (Gutiérrez, 1995), y del efecto en la supresión de bacterias y levaduras (Urabe et al., 1994). Otros estudios han demostrado actividad antibacteriana del azúcar de caña (rica en sacarosa) sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Pujol, Díaz, Rodríguez y Arias, 2008).

Estudios realizados por varios autores han reportado que la aplicación de la melaza como fuente de carbono orgánico en sistemas acuícolas, han estimulado el crecimiento de microorganismos heterótrofos, con el objetivo de remover los compuestos nitrogenados tóxicos (Panjaitan, 2010). Las bacterias heterótrofas tienen funciones relevantes en el reciclaje del carbono y el nitrógeno presentes en la materia orgánica, en la biodisponibilidad de nutrientes, el mejoramiento de la calidad del agua y la nutrición de los organismos cultivados (Miranda, Orozco, Rivas y Luna, 2015). *Bacillus* spp pueden ser inoculadas con la melaza como fuente de carbono para estimular la comunidad heterotrófica y mejorar la calidad del agua (Luna, et al., 2017).

Por otro lado, el estudio realizado por Fuentes y Guillén (2014) se demuestra la utilidad de la melaza como fertilizante, donde se obtuvo mayor floración de diatomeas, algas benéficas en el cultivo del camarón. Estudios posteriores serán realizados para evaluar el efecto de la aplicación de melaza en la precría de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) en condiciones de laboratorio y en tanques de precría.

CONCLUSIONES

1. La aplicación de la melaza favorece el crecimiento de bacterias sacarosa reductora positivas como *V. alginolyticus*, *V. damselli*, y *V. vulnificus*, las que se considera son menos nocivas para los camarones.
2. La melaza no mostró actividad antibacteriana frente a las cepas de *Vibrio sp*, aun cuando se utilizaron altas concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, J., Espinosa, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., Zutab, I., y Linares, G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*, 5(1), 37-47.
2. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., y Truck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(6), 493-496.
3. Bermúdez, M.C., Espinosa, A., Santiago, M.L., Barajas, C.J., y Acedo, E. (2014). Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 16(3), 29-37.
4. Castro, M. (1993). *Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutílica* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
5. Celikel, N., y Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 26(3), 174-181.
6. Chatterjee, S., y Haldar, S. (2012). *Vibrio* Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. *J Marine Sci Res Dev*, 1(2), 73-90.
7. Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* (M02- A10)

9. Fuentes, E.A., y Guillén, G.M. (2014). Utilización de melaza como fertilizante orgánico de estanques camareros durante la fase de engorde del camarón marino (*Litopenaeus vannamei*) (tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
10. Gracia, M.H., Ávila, L.A., Yepiz, G., Hernández, J., Mendoza, F., García, G., y Gollas, T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at -20°C for use in forced-feeding infection of Penaeus (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 31(4), 105-109.
11. Gracia, M.H., Orozco, C., y Molina, C. (2012). Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón (*Litopenaeus vannamei*). *Hidrobiológica*, 22(3), 201-206.
12. Gutiérrez, E. (1995). Efecto de los ácidos grasos volátiles del proceso resumen abomasal (in vitro) y de la melaza, sobre la viabilidad de *Salmonella typhimurium* (tesis doctoral). Universidad de Colima, Colima, México.
13. Heenatigala, P.P.M., y Fernando, M.U.L. (2016). Occurrence of bacteria species responsible for vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. *Sri Lanka J Aquatic Science*, 21(1), 1-17.
14. Kongchuma, P., Chimtonga, S., Chareansaka, N., y Subpraserta, P. (2016). Effect of Green Tea Extract on *Vibrio parahaemolyticus* Inhibition in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Postlarvae. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11(9), 117–124.
15. Luna, A., Ávila, J., Fierro, J.A., Álvarez, P., Esparza, H., Escamilla, R., Flores, M.C., Montiel, J., y López, E.S. (2017). Effects of bacilli, molasses, and reducing feeding rate on biofloc formation, growth, and gene expression in *Litopenaeus vannamei* cultured with zero water exchange. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 45(5), 900-907.