



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICO MICROBIOLÓGICO  
DE ENSILADOS DE DESECHOS DE CAMARÓN.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA CORONA VADILLO

Director de Tesis: Dra. Keiko Shirai Matsumoto



2002

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias

Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Obtención y caracterización  
químico microbiológico de ensilados de desechos de camarón."  
realizado por Diana Corona Vadillo

con número de cuenta 97 554 18-1 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Keiko Shirai Matsumoto

Propietario

Dra. Ana María Sifuentes Rincón

Propietario

M. en I.B.B. Benito Estrada Mena

Suplente

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Suplente

M. en B. Maribel Plascencia Jatomea

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

● **Agradecimientos.**

- A mis hermanos Adriana, Claudia y Jorge por la aventura que corren al ser parte de mi vida.
- A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por aceptar ser mi maestra y entregarse a la tarea de sacar adelante este trabajo. Pero sobretodo por la amistad, los conocimientos, apoyo y momentos tan gratos que hemos compartido.
- A la M. en B. Maribel Plascencia y al M. en B. Yoyi Matsumoto por ofrecerme siempre su ayuda y su amistad.
- A todos mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros por el trabajo tan armonioso que llegamos a tener y compartir instantes tan agradables.
- A la Dra. Patricia Ramos Morales por haberme formado académica y personalmente.
- A la M.V.Z. Ana Auró por ayudarme a tener una base para este trabajo.
- Al Dr. Bernardo Frontana Uribe por abrirme las puertas y facilitarme un lugar de trabajo en el Instituto de Química, UNAM.
- A la Lic. Martha Sánchez y Familia por ofrecerme una invaluable amistad.
- Al Dr. Luis A. Soto y la Dra. Irma Trejo por no olvidar que fueron alumnos y ofrecer la ayuda necesaria a quien la requiera.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa por brindarme el espacio para trabajar y realizar este trabajo.
- A la Dra. Ana María Sifuentes Rincón y a la Dra. Patricia Larralde por su cooperación y enseñanzas para este trabajo, desde Reynosa, Tamaulipas del Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

- Al Centro Nacional de Sanidad Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León por ofrecerme la oportunidad de realizar una estancia que ayudó a formar esta tesis.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por el financiamiento otorgado en parte de este trabajo a través de la Dirección General de Estudios de Posgrado y Subdirección de Becas de Intercambio Académico.
- A mis queridísimos amigos Sarita, Luis, Ursula, Alejandra, Francisco, Lluvia, Estrella, es con ustedes que he llegado hasta aquí, mil gracias por estar ahí para toda ocasión. Espero sigamos así por mucho tiempo más.
- A todos aquellos que de alguna u otra manera me ayudaron a salir adelante en este trabajo, se los agradezco de todo corazón.

- **Dedicatoria.**

Alguna vez leí en la defensa de un coche " ¡La realidad es para aquellos que les falta imaginación!". Nunca supe quien lo escribió... pero Gracias a mis padres esa frase ha tenido mucho sentido para mí. Es por eso que les dedico este trabajo que tanto esfuerzo ha costado. Ellos jamás me dejaron claudicar y les agradezco infinitamente el haberme brindado los genes para siempre tener energía, enseñarme que siempre existe una enorme posibilidad para enamorarme de mis ¡ideales!

También quisiera dedicar este trabajo a una persona que se adelantó a irse a otro mundo y prometimos que alguna vez haríamos juntos un trabajo similar... a ti Leonardo. Sé que estás cerca, no sé exactamente en donde, pero en mi corazón siempre lo estarás.

<b>• CONTENIDO.</b>	<b>Pág.</b>
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII-IX
1. Introducción.....	1
1.1 Pesca y Acuicultura en el mundo.....	1
1.2 Especies cultivadas en el mundo.....	2
1.3 Cultivo de camarón en México.....	4
1.4 Anatomía de los Crustáceos.....	7
1.5 Ciclo de vida de los Peneidos.....	8
1.6 Impacto Ambiental.....	10
1.7 Desechos de crustáceos.....	13
1.8 Ensilaje.....	15
1.8.1 Propiedades.....	17
1.8.2 Calidad.....	17
1.8.3 Ventajas con respecto a la harina de pescado.....	17
1.9 Enfermedades que atacan al camarón en el mundo.....	18
1.9.1 Enfermedades virales que atacan al camarón cultivado en México.....	19-24
1.10 Análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
2. Antecedentes.....	28-29
3. Justificación.....	30-31
4. Objetivo general.....	32
4.1 Objetivos particulares.....	32
5. Hipótesis.....	32
6. Metodología.....	33
6.1 Obtención del ensilado de desechos de camarón.....	33
6.1.1 Material.....	33
6.1.2 Microorganismos.....	33

6.1.3 Condiciones de la fermentación:	
a) Reactor Estático (RE).....	33
b) Reactor Dinámico (RD).....	35
6.2 Caracterización física, química y biológica del ensilado de desechos de camarón .....	36
6.2.1 pH.....	36
6.2.2 Acidez total titulable.....	36
6.2.3 Liofilización (Secado en frío).....	36
6.2.4 Pasteurización.....	36
6.2.5 Análisis microbiológico.....	36
6.2.6 Análisis químico proximal.....	37
6.3 Análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en ensilados de desechos de camarón.....	37
6.3.1 Reactivos.....	37
7. Resultados y Discusión.....	39
7.1 Obtención del ensilado de desechos de camarón.....	39
7.1.1 Caracterización física-química y biológica de ensilados de desechos de camarón.....	39
a) Reactor Estático (RE).....	39
b) Reactor Dinámico (RD).....	41
7.1.2 Análisis de acidez total titulable.....	43
7.1.3 pH.....	47
7.1.4 Liofilización.....	49
7.1.5 Pasteurización.....	50
7.1.6 Análisis microbiológico.....	50
7.1.7 Análisis químico proximal.....	54
7.1.8 Análisis de Patología Molecular para la detección del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en ensilados de desechos de camarón.....	59
8. Conclusiones.....	64
9. Recomendaciones para trabajos posteriores.....	65
10. Bibliografía.....	66

## Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Producción nacional de camarón cultivado contra capturado en peso desembarcado, 1990-1999.....	5
Tabla 2. Clasificación de los camarones Peneidos.....	5
Tabla 3. Principales especies comerciales de camarón en México.....	6
Tabla 4. Sistemas de cultivo de camarón en México.....	7
Tabla 5. Causa, efectos y acciones de mitigación del impacto ambiental, relacionadas con la camaronicultura durante la construcción, operación y abandono de las estanquerías.....	11-12
Tabla 6. Composición químico proximal del ensilado de cabezas de camarón.....	18
Tabla 7. Distribución geográfica de los virus más importantes que infectan al camarón.....	19
Tabla 8. Dimensiones de dos Reactores Estáticos.....	34
Tabla 9. Constantes cinéticas para experimentos de acidificación, de acuerdo con el modelo de Gompertz.....	44
Tabla 10. Análisis químico proximal del ensilado de colas de camarón en un reactor dinámico, en la fracción semi-sólida.....	57

## Lista de Figuras

		Pág.
Figura 1.	Producción mundial de la pesca y la acuicultura.....	2
Figura 2.	Producción mundial de la acuicultura por principales grupos de especies en 1998.....	3
Figura 3.	Estados productores de camarón y porcentaje de granjas de cultivo en los principales estados.....	4
Figura 4.	Vista lateral mostrando la anatomía de un camarón.....	8
Figura 5.	Desarrollo larval de los géneros <i>Litopenaeus</i> y <i>Farfantepenaeus</i> .....	9
Figura 6.	Ciclo de vida de los camarones y sus estadios de vida.....	10
Figura 7.	Diagrama general del proceso de fermentación para el aprovechamiento de desechos de crustáceos.....	15
Figura 8.	Microscopía electrónica del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV).....	23
Figura 9.	Estrategia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (PCR).....	26
Figura 10.	Reactor Estático (RE).....	34
Figura 11.	Reactor Rotatorio o Dinámico (RD).....	35
Figura 12.	Comparación de dos protocolos de PCR: estándar y optimizado.....	38
Figura 13.	Evolución de la Acidez total titulable durante la fermentación ácido láctica de desechos de camarón, en un reactor estático y dinámico.....	45
Figura 14.	Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de desechos de camarón en un reactor estático y dinámico.....	48
Figura 15.	Evolución del crecimiento de microorganismos en ensilados de desechos de camarón, durante 6 días de fermentación.....	51
Figura 16.	Análisis de Proteína Cruda en cabeza y colas de camarón a las 144 h de fermentación, en ensilados de desechos de camarón.....	55
Figura 17.	1 ° Análisis de PCR anidado para detectar el virus WSSV.....	61
Figura 18.	2 ° Análisis de PCR anidado para detectar el virus WSSV.....	62

## • Resumen.

La acuicultura ha empezado a tomar un lugar muy importante en la economía y sustentabilidad de las pesquerías en el mundo. En México, el cultivo de camarón se ha desarrollado enormemente en los últimos 30 años. No obstante su crecimiento, los costos de producción incrementan año con año, principalmente el costo alimenticio. Esto se debe a que la harina de pescado es uno de los ingredientes que conforman las dietas acuícolas y actualmente es escasa. Por ello, se realizan grandes esfuerzos por encontrar un suplemento alimenticio rico en proteína, barato y fácil de obtener.

Se ha encontrado que en otros países que el proceso de ensilado, es una alternativa para procesar y aprovechar los desechos de industrias pesqueras. Éste consiste en fermentar materia orgánica en la presencia de fuente de carbono y ácidos producidos o adicionados. Durante la fermentación el valor del pH es ácido, lo cual afecta la composición químico proximal de los desechos, disminuye la presencia de bacterias patógenas-descompositoras y probablemente virus.

Para poder conocer estos efectos, en esta tesis se estudiaron ensilados de desechos de camarón, utilizando por separado cabezas desperdiciadas y colas maltratadas o enfermas que no pudieron ser comercializadas. Los ensilados se llevaron a cabo en dos diferentes reactores, estático y dinámico, adicionándose 10 % de *Lactobacillus plantarum* y 5 % de sacarosa, durante 6 días a 30°C.

Los diseños de los reactores, rotatorio y en columna respectivamente, proporcionan distintas características para el desarrollo del ensilado. Al terminar la fermentación se pudieron separar dos fracciones: a) líquida que contiene proteínas, lípidos y pigmentos y b) semi-sólida que contiene principalmente quitina.

De las dos fracciones obtenidas de los ensilados en los dos reactores, se compararon: 1) producción de ácido láctico, 2) evolución de pH, 3) análisis microbiológico, 4) análisis químico proximal y 5) análisis de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), este último

último para detectar la presencia del virus del *Síndrome de la Mancha Blanca* (WSSV) en el producto final del ensilado.

Los resultados obtenidos muestran que en los dos reactores se produce una considerable cantidad de ácido láctico que mantiene el pH en valores entre 4-3. Sin embargo, la cantidad puede ser modificada por la materia prima utilizada como desechos (cabezas o colas) y los minerales presentes en las fracciones obtenidas para el estudio: líquida o semi-sólida.

La recuperación de proteína en fracción líquida es mayor cuando se utilizan cabezas de camarón y su recolección se facilita más en el reactor estático que en el dinámico, debido a su diseño en columna y la ausencia de movimiento.

Las cuentas microbiológicas de bacterias ácido lácticas y de aerobios totales indican que su crecimiento es amplio en ambos reactores y en ambas materias primas, no obstante su abundancia, los desechos se conservan sin descomponerse.

El análisis químico-proximal mostró que el producto final del ensilado contiene un porcentaje de proteína cruda dentro de lo requerido para la alimentación de camarón. Lo que muestra que podría ser factible su inclusión en dietas para camarón

Con los resultados obtenidos durante este trabajo se hace necesario llevar a cabo una serie de experimentos adicionales en los cuales se comparen los diferentes métodos de PCR para la detección del virus a fin de comprobar y/o validar los resultados.

## **Obtención y Caracterización Químico Microbiológico de Ensilados de Desechos de Camarón**

### **1.0 Introducción.**

#### **1.1 Pesca y Acuicultura en el mundo.**

Debido a que la demanda de alimento mundial aumenta proporcionalmente conforme el crecimiento demográfico, se ha necesitado la explotación y domesticación de cualquier ser vivo para consumo humano. Esto le ha permitido al hombre tener asentamientos en diversas partes del mundo, satisfaciendo sus necesidades fisiológicas sin tener que trasladarse. El conocimiento y manejo que ha adquirido al explotar muchas especies vegetales y animales a lo largo de la historia, le confiere la facilidad de experimentar diferentes e innovadoras maneras de explotar su medio, tal como es el caso de la pesca y la acuicultura. Éstas han aportado una fuente de alimento muy importante para satisfacer la demanda de alimento mundial, que aumenta proporcionalmente conforme al crecimiento demográfico. Asimismo han creado una mayor oferta de empleo e ingresos en muchos países y comunidades, aunque han existido fluctuaciones en la oferta y la demanda causadas por los cambios en la situación de los recursos pesqueros, el entorno económico y las condiciones ambientales (FAO, 2000).

En años anteriores, la presencia de anomalías ambientales y climáticas, por ej. derrames petroleros y el efecto climático como “El Niño” en 1997-1998, provocaron un descenso de 122 a 117 millones de toneladas en la producción mundial de pesca y acuicultura en los principales recursos de organismos marinos. Sin embargo, una estimación preliminar de 1999 muestra una recuperación de la producción de 3 millones más que en 1997, obteniendo un total de 125 millones de toneladas (FAO, 2000).

Actualmente los principales países, en orden de mayor a menor actividad pesquera en captura y cultivo de animales y vegetales (sin incluir esponjas, conchas, corales, cocodrilos y mamíferos) a nivel mundial son: China, Perú, Chile, Japón, E.U.A., India, Rusia, Indonesia y Tailandia, ocupando México. y en el 15 ° lugar se encuentra México (SEMARNAP, 2000).

En la década de los noventas se registro un aumento de 20 millones de toneladas en la producción pesquera mundial con respecto a los ochentas, debido principalmente a la acuicultura (Fig. 1).

Actualmente, la producción pesquera de captura se mantiene relativamente estable. Este estancamiento se debe a que en la mayoría de las zonas pesqueras del mundo se ha alcanzado el potencial máximo de captura pesquera, ya que las poblaciones están plenamente explotadas o están siendo aprovechadas a su máximo sustentable, es decir, al máximo de las condiciones para su uso perdurable (FAO, 2000; [www.semarnap.gob.mx/acuacultura](http://www.semarnap.gob.mx/acuacultura)).

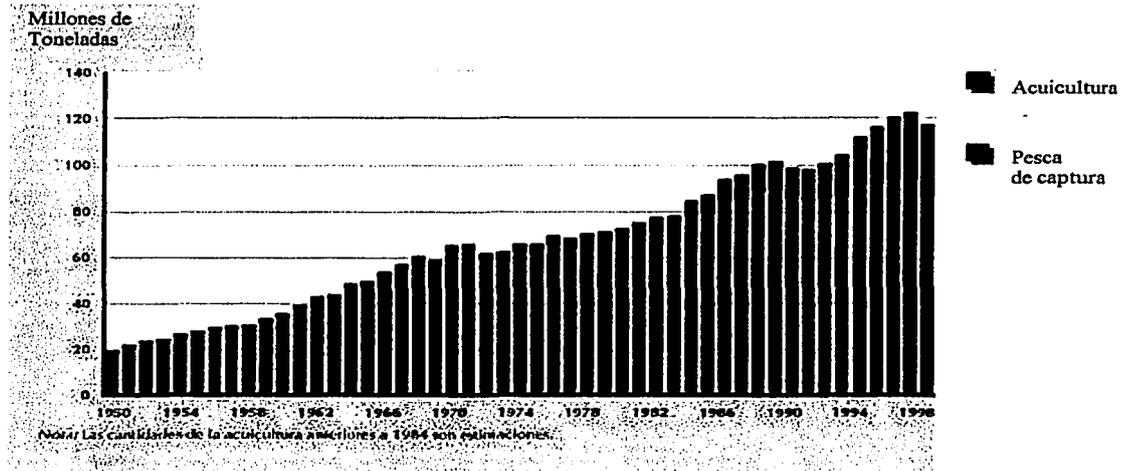


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO, 2000).

La acuicultura continental y marina ha tenido el potencial de incrementar su actividad de un 5 % anual entre 1950 y 1969, a un 8 % aprox. durante las décadas de los setenta y ochenta, aumentando a razón de un poco más del 10 % al año desde 1990 (FAO, 2000).

### 1.2 Especies cultivadas en el mundo.

Existen dos grupos de organismos acuáticos cultivados en el mundo: 1) Peces herbívoros y detritívoros como las carpas, la tilapia, la lisa, etc. 2) Peces carnívoros como el salmón y trucha; algunos peces de ornato; varios moluscos y crustáceos, entre los cuáles el camarón es probablemente el más importante. (FAO, 2000; Galicia, 2001).

El primer grupo es cultivado por su rápido crecimiento a corto plazo ganando gran cantidad de biomasa, convirtiéndose este cultivo en autoconsumo para el mercado de bajos recursos

y/o obteniéndose un producto económico y accesible para el público en general. El segundo grupo representa a los organismos con alto valor comercial, por lo que su cultivo proporciona gran remuneración económica a las empresas, generación de empleos e ingreso de divisas para los países en vía de desarrollo al explotar el producto al extranjero (Galicia, 2001).

La acuicultura debe ser una actividad que produzca alimento y promueva beneficios económicos, respetando el ambiente y fundamentada en criterios sólidos de responsabilidad. (FAO-SEMARNAP, 1998).

En los últimos 30 años, el cultivo comercial del camarón ha ocupado unos de los primeros lugares dentro de las industrias acuícolas mundiales. De hecho, el camarón es el principal producto comercializado, siendo una de las industrias productoras de alimentos con mayor velocidad de crecimiento (Galicia, 2001), la cual representa un 20 % del valor total de los productos pesqueros en el comercio internacional (FAO, 2000). En la Fig. 2 se puede observar la producción mundial acuícola y su valor de acuerdo a los por principales grupos de especies. La producción de crustáceos es la segunda con más valor en el mercado internacional, después de la producción de peces de agua dulce.

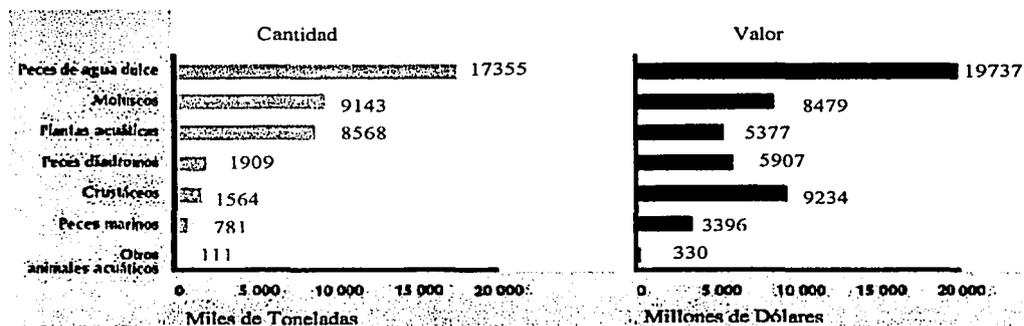


Figura 2. Producción mundial de la acuicultura por principales grupos de especies en 1998 (FAO, 2000).

La producción total de camarón cultivado en 1998 en México asciende a 80,000 toneladas y fue valuado en \$ 6.9 millones de dólares (FAO, 2000).

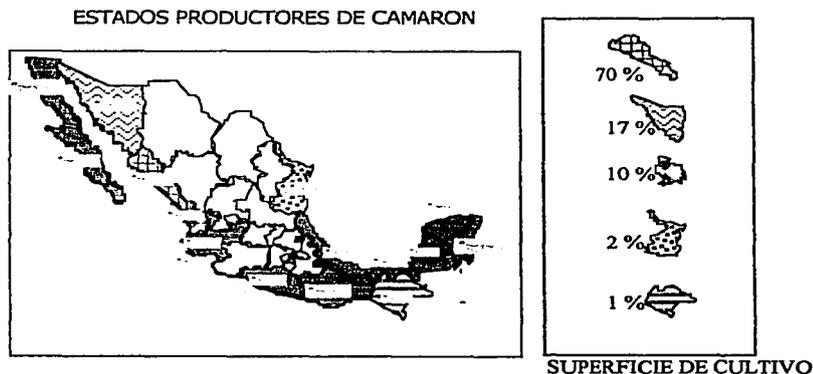
### 1.3 Cultivo de Camarón en México.

En México, la actividad acuícola como producción comercial empezó aproximadamente desde 1975 con un gran auge en 1985, siendo el cultivo más importante el de camarón.

La abundancia del camarón en el litoral mexicano ha permitido que contribuya con el 70 % de las divisas totales generadas por el sector pesquero en los ochentas con una captura entre 75 y 85 mil toneladas, colocando al país en el 7 ° lugar a nivel mundial en 1998. (Anónimo, 1997; *En*: FAO-SEMARNAP, 1998).

El esfuerzo pesquero al que ha sido sometida la captura de camarón en México como en el mundo, ha llegado al límite sustentable. Por lo tanto, el volumen de producción se ha mantenido constante a partir de los setenta, lo que impulsó el desarrollo del cultivo de camarón; para el año 1985 su aportación representó el 7 % del total pesquero y en 1999 el 30.46 % dentro del 12.93 % del total de producción acuícola. En la Tabla 1. se puede observar la evolución del aporte del cultivo de camarón en la producción total del país en los últimos años.

Para 1999 (Tabla 1, Fig. 3) se registraron 347 granjas con 26,291 ha y una producción 29, 120 toneladas. (Contreras y col., 2000; *En*: APEC/FAO/ NACA/SEMARNAP, 2001; SEMARNAP, 2000)



**Fig. 3.** Estados productores de camarón y porcentaje de granjas de cultivo en los principales estados (SEMARNAP, 2000b).

**Tabla 1.** Producción nacional total de camarón (cultivado y capturado) en el período de 1990-1999 (SEMARNAP, 2000b).

Año	Total (Toneladas)	Cultivado (Toneladas)	Cultivado %
1990	46,585	4,371	9.38
1991	48,115	5,111	10.62
1992	49,986	8,326	16.66
1993	57,579	11,846	22.82
1994	59,482	13,138	22.1
1995	67,482	15,876	23.51
1996	61,235	13,114	21.42
1997	70,144	17,570	25.05
1998	71,609	27,839	38.88
1999	78,234	28,288	36.16

En México se distribuyen varias especies de diferentes familias de camarones, entre las cuales las más importantes, desde el punto de vista comercial, son las que pertenecen a la familia Penaeidae y junto con otras cuatro familias, forman la superfamilia Penaeoidea. En la Tabla 2 se presenta su clasificación actual y en la Tabla 3 se muestran las especies cultivadas en la costa del Pacífico, en el Golfo de México y del Caribe, las cuales dependiendo de sus características podrán ser cultivados en ciertas áreas del país y rotar su cultivo para evitar principalmente enfermedades.

**Tabla 2.** Clasificación de los Camarones Peneidos (Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

Phyllum: Arthropoda  
 Subphyllum: Crustacea  
 Clase: Malacostraca  
 Subclase: Eumalacostraca  
 Superorden: Eucarida  
 Orden: Decapoda  
 Suborden: Dendrobranchiata  
 Superfamilia: Peneoidea  
 Familia: Penaeidae  
 Géneros: *Litopenaeus*  
*Farfantepenaeus*

El género **Litopenaeus** son camarones generalmente activos durante las horas de luminosidad, por lo que son capturados principalmente en el día; viven en zonas cercanas a la costa en esteros, lagunas costeras en aguas someras, lo que los hace más resistentes a las variaciones de salinidad (eurihalinos) y tienden a formar grandes concentraciones de organismos.

Por el contrario, los camarones del género **Farfantepenaeus** tienen hábitos nocturnos y son capturados durante la noche. Se distribuyen en la plataforma continental marina, desarrollándose en zonas más profundas y son más sensibles a las fluctuaciones de salinidad (estenohalinos).

**Tabla 3.** Principales especies comerciales de camarón en México (Garduño, 1999; Dore y Claus, 1987).

<b>Litoral Mexicano del Pacífico</b>		
<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Distribución</b>
<b>Género Litopenaeus</b>		
<i>L. vannamei</i>	Blanco	Del Golfo de California al norte de Perú.
<i>L. stylirostris</i>	Azul	De la costa occidental de Baja California Norte al norte de Perú.
<i>L. occidentalis</i>	Blanco del sur	Del Golfo de Tehuantepec al norte de Perú.
<b>Género Farfantepenaeus</b>		
<i>F. californiensis</i>	Café	Del Golfo de California al norte de Perú
<i>F. brevisrostris</i>	Rojo o cristal	De la costa occidental de Baja California Norte al norte de Perú.
<b>Litoral mexicano del Golfo y el Caribe</b>		
<b>Género Litopenaeus</b>		
<i>L. setiferus</i>	Blanco del Golfo	De Nueva York a Yucatán.
<b>Género Farfantepenaeus</b>		
<i>F. aztecus</i>	Café	De Massachussetts a Yucatán
<i>F. duorarum</i>	Rosado	De la Bahía Chesapeake, Virginia a Isla Mujeres, Quintana Roo.
<i>F. brasiliensis</i>	Rojo del Caribe	De Carolina del Norte, sur del Golfo de México a Yucatán hasta Río Grande do Sul, Brasil.

La camaricultura se realiza en cuatro modalidades: a) extensiva en la cual todos los requerimientos nutricionales se derivan de fuentes naturales sin intervención deliberada del hombre, b) semintensiva la capacidad de carga del sistema productivo se alcanza por medio de la fertilización intencional y/o alimento complementario, c) intensiva todos los requerimientos nutricionales se satisfacen con fuentes externas (FAO-SEMARNAP, 1998) e d) hiperintensiva, en la que se ejerce control total en cada una de las fases de producción. En la Tabla 4 se muestra

un compendio de las características de los diferentes cultivos en México, para conocer los medios a los que son sometidos los camarones de cultivo.

**Tabla 4. Sistemas de cultivo en México (Garduño, 1999).**

<b>Características</b>	<b>Extensivo</b>	<b>Semi-intensivo</b>	<b>Intensivo</b>	<b>Hiperintensivo</b>
<b>Infraestructura</b>	Bordos o encierros	Estanques rústicos	Estanques rústicos	Estanques de concreto y cubiertos
<b>Tamaño de los estanques (ha)</b>	Mayor de 10	De 5-10	De 1-5	Menor de 1
<b>Densidad de siembra (PL/m<sup>2</sup>)</b>	De 1-3	De 5-20	De 20-50	Mayor de 50
<b>Origen de la post-larva</b>	Natural	Natural y/o laboratorio	Laboratorio	Laboratorio
<b>Alimentación suplementaria</b>	Poca o nula	Alimento balanceado de 5-10 % en la biomasa	Alimento de alta calidad con 34-40% de proteína	Alimento excelente, formulado de acuerdo a la talla
<b>Fertilización</b>	Productividad natural	Orgánica e/o inorgánica	Orgánica e/o inorgánica	Ninguna
<b>Tasa de recambio diario de agua</b>	1 a 5%	10 a 15 %	20 a 30%	Agua corriente
<b>Método de recambio de agua</b>	Por mareas	Por bombeo	Por bombeo	Por bombeo y filtrado
<b>Tipo de aireación</b>	Ninguna	Ninguna	Mecánica imprescindible	Intensiva
<b>Rendimiento (peso/ha/ciclo)</b>	90 a 250 Kg	700 a 2500 Kg	6 a 15 ton	Mayor a 15 ton
<b>Número de cosechas por año</b>	1	De 1 a 2	Hasta 3	Mayor de 3
<b>Tasa de sobrevivencia</b>	Menor a 60%	60 a 80 %	Mayor de 80%	Mayor al 90%
<b>Competencia y depredación en el estanque</b>	Altas	Medias	Muy bajas	Nulas
<b>Control sobre los parámetros fisicoquímicos</b>	Nulo	Medio	Entre medio y alto	Alto

#### 1.4 Anatomía de los crustáceos.

Anatómicamente, el cuerpo de los camarones está dividido en tres regiones (Fig. 4): 1) Los apéndices del cefalotórax son: anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereopodos; 2) El abdomen está formado por 6 segmentos (pleuras) y 5 pares de apéndices llamados pleópodos, cuya función es natatoria; 3) En el télson se encuentran los urópodos que sirven también para la natación. En la región del cefalotórax, el exoesqueleto, presenta

diferentes estructuras como espinas, suturas y surcos, cuya forma, tamaño y distribución son característicos para cada especie (Hendrickx y Estrada, 1996; Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

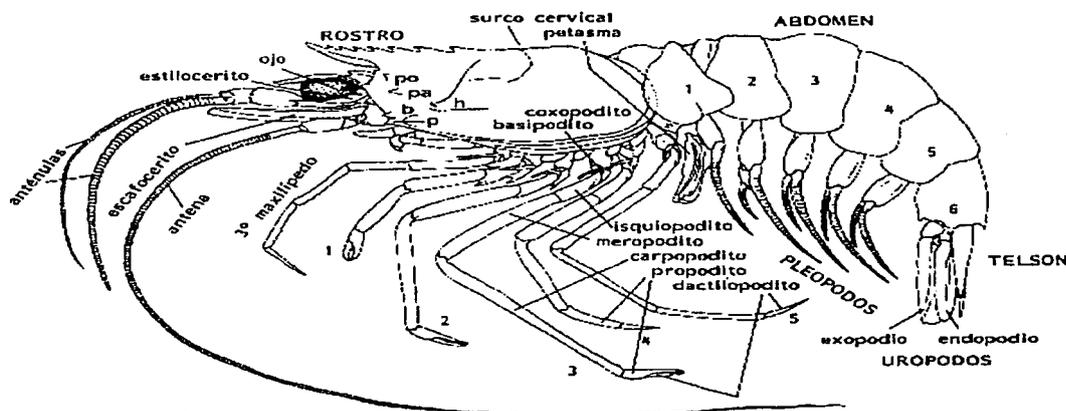


Fig. 4. Vista lateral mostrando la anatomía de un camarón. (Hendrickx y Estrada, 1996).

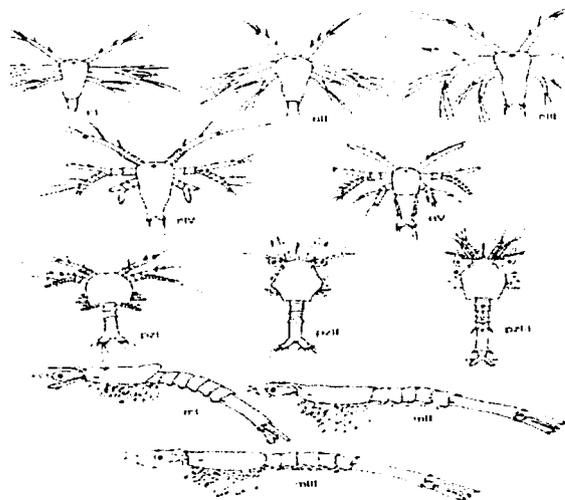
### 1.5 Ciclo de vida de los Peneidos.

El ciclo de vida de los peneidos tiene dos fases principales de desarrollo: 1) la fase marina y 2) la estuarina.

En la etapa adulta y reproductora los camarones se encuentran mar adentro, sobre la plataforma continental (fase marina), en tanto que en la etapa post-larvaria migran a los estuarios y lagunas por medio de las corrientes de las mareas, migraciones verticales de la post-larva en la columna de agua y cambios en los gradientes de salinidad.

En general todos los camarones de los géneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus* tienen un ciclo de 12 fases, incluyendo el huevecillo (Fig. 5). El ciclo total tiene una duración de dos a tres semanas, según la especie y las condiciones medio ambientales. En la etapa reproductora las hembras presentan desoves parciales, pero en conjunto tienen 1 ó 2 desoves masivos. Los huevecillos son expulsados por la hembra al medio marino donde permanecen aprox. 14 hrs. y dan origen al primer estadio larval llamado nauplio. Éste se alimenta de sus reservas vitelinas donde presenta 5 etapas (nauplio I, II, III, IV, V), hasta que se convierte en la primer Protozoa (protozoa I, II, III), alimentándose del plancton. Al pasar 4 días se convierte en la primera post-larva. Existen cambios morfológicos y fisiológicos, donde

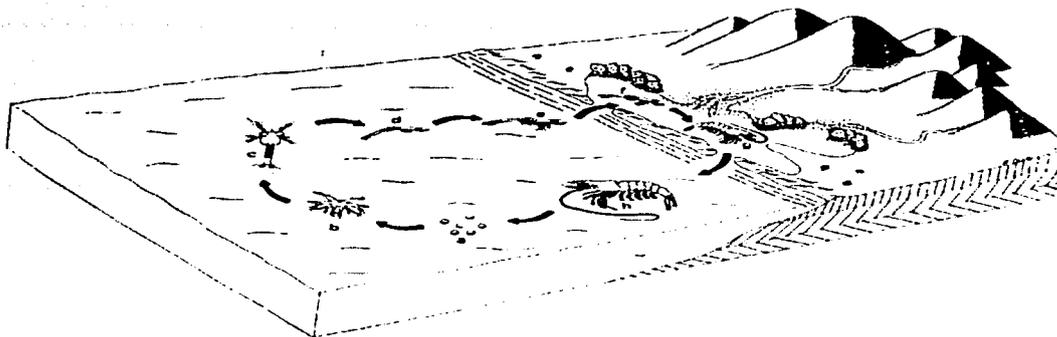
desaparecen los exopoditos en los pereiópodos. Los primeros estadios de post-larva presentan la forma de un camarón en miniatura, pero aún le falta desarrollar las espinas del rostro. Mysis I, II, III carecen de caracteres sexuales secundarios y sus branquias son pocas y pequeñas.



m= mysis; n=nauplio; pz=protozoa. Nota: no se muestra la fase de huevecillo

**Fig 5.** Desarrollo larval de los géneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus* (Williamson, D.I., 1988, Adaptado de Dobkin 1961).

Cuando las post-larvas ingresan a los estuarios, sus hábitos alimenticios cambian de planctónicas a bentónicas. El camarón permanece en el área estuarina por 4 meses antes de volver al ambiente marino para incorporarse a la población adulta; en la Figura 6 se encuentra su ciclo de vida (Gracia, 1992).



a) Huevo; b) Nauplio; c) Potozoa; d) Mysis; e) Post-larva planctónica; f) Post-larva epibentónica; g) Juvenil; h) Adulto.

**Fig. 6.** Ciclo de vida de los camarones del género **Farfantepenaeus** y **Litopenaeus** (Gracia, 1992).

### 1.6 Impacto Ambiental.

La acuicultura costera proporciona una solución a varios problemas relacionados a la producción de alimentos, al aumento de los ingresos de las poblaciones del litoral, al mejoramiento de los niveles de vida y a la generación de divisas. (FAO-SEMARNAP, 1998). Este crecimiento es una actividad basada en los recursos naturales que conlleva costos y cambios en el medio ambiente, los cuales es preciso evaluar y prevenir a fin de que la acuicultura costera sea de bajo impacto y sustentable. (FAO-SEMARNAP, 1998).

El cultivo de camarón genera impactos ambientales no deseables en los ecosistemas. La eutroficación es un efecto potencial que puede deberse al exceso de fertilización, disminuciones en el recambio de agua, o el abastecimiento con agua de mala calidad y puede favorecer la aparición de mareas rojas o especies no deseadas. La anaerobiosis es consecuencia de altas cargas orgánicas, lo cual se debe al empleo de cantidades excesivas de alimento balanceado; también es consecuencia de insuficiente recambio de agua.

La mortandad de la vegetación circundante puede ser promovida por cambios sustanciales en la salinidad del cuerpo de agua receptor, al recibir grandes volúmenes de agua de salinidad diferente. El incremento de los sólidos suspendidos favorece el azolvamiento que repercute en el incremento de la salinidad, modifica localmente los patrones de circulación y favorece la disminución de fauna bentónica.

Es importante señalar que aproximadamente el 80 % de las causas del deterioro tiene origen en la actividad humana en el continente, tal como se afirma en la "Solemne Declaración de Washington sobre la Protección del Ambiente Marino de las Actividades Realizadas en Tierra Firme" (UNEP, 1995 *En*: FAO -SEMARNAP, 1998). La acuicultura y la pesca se convierten en víctimas de un ambiente degradado, por lo que se intenta realizar acciones mitigadoras de efectos negativos, como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Causa, efectos y acciones de mitigación del impacto ambiental relacionadas con la camaronicultura durante la construcción, operación y abandono de las estanquerías. (Páez Osuna, 2001).

<b>Causa</b>	<b>Efecto</b>	<b>Acción Mitigadora</b>
<b>Durante la construcción de los estanques</b>		
Destrucción de manglares y marismas	Pérdida de hábitats y áreas de crianza; erosión costera; reducción de la biodiversidad; reducción de las capturas de especies comercialmente importantes; acidificación; y alteración de los patrones de drenaje.	Asentamiento en áreas adecuadas considerando la topografía, el régimen de mareas, el tiempo de residencia del agua, tamaño del cuerpo de agua y capacidad para asimilar afluentes; incluir zonas de buffer o de amortiguamiento, y zonas separando las granjas; mantener un balance aceptable de los manglares y el área de estanquería y /o estanques buffer y el área de estanquería camaronícola.
Conversión de tierras agrícolas arrozales y cocoteros)	Producción de suelo salino y alteración de patrón de drenaje	Requiere justificación socioeconómica y considerar el patrón de drenaje.
Conversión de salitrales	Alteración del patrón de drenaje y efectos no conocidos (?)	Considerar el papel ecológico de estos sistemas y el patrón de drenaje de la región (?)
<b>Durante la operación de los estanques</b>		
Captura de post-larva	Reducción en la post-larva silvestre y de la biodiversidad; reducción de la captura de especies comercialmente importantes.	Utilizar post-larva de laboratorio; definir áreas específicas y regular las épocas y cantidades estrictamente.

(?) Desconocido o existe una gran incertidumbre.

Descarga de los efluentes camaronícolas	Deterioro de la calidad del agua en las aguas receptoras (disminución del oxígeno disuelto, reducción de la penetración de la luz y cambios en la macrofauna béntica), eutroficación (?), mareas rojas (?)	Policultivos incluyendo peces, moluscos, manglares halófilas, artemia; eliminación o reducción de la tasa de intercambio; utilización de estanques de sedimentación-oxidación; mejoramiento en el suministro y composición del alimento.
Escape de post-larva acuícola de las poblaciones silvestres. Proliferación de enfermedades	"Contaminación Biológica" nueva tecnología. Brotes de enfermedades, infección de las poblaciones silvestres.	Optimización en el manejo e incluir buena calidad del agua y bajas densidades de siembra; control ambiental (post-larva altamente sana y control de enfermedades, buen alimento con agentes profilácticos e incluyendo probióticos).
Descarga de sustancias químicas	Desarrollo de resistencia entre los organismos patógenos y efectos desconocidos sobre otros organismos.	Las sustancias químicas deberán ser seguras; aplicación efectiva de los antibacterianos y prevenir la descarga de efluentes con niveles tóxicos en los cuerpos de agua adyacentes.
Intrusión de agua salina	Contaminación de los acuíferos	Evitar el bombeo de agua subterránea para los estanques, reducir o evitar el empleo de agua dulce; utilizar liners (fondo de plástico).
Disposición de los sedimentos	Liberación posterior de nutrientes, materia orgánica y sustancias	Usar liner y probióticos; utilizar áreas de descarga de sedimentos; esparcir los químicos en el sedimento seco que fue aireado otra vez en los estanques; recolectar el sedimento y utilizarlo para la plantación de manglares.
Excesivo uso de agua	Competencia con otros usuarios del agua (?)	Reducir o eliminar la tasa de intercambio de agua.
<b>Granjas camaronícolas abandonadas</b>		
Estanques abandonados	Competencia con otros usuarios por espacio (?)	Utilizar halófitas y/o restaurar para reforestar mangle; rehabilitar para estanquería de camarón u otras especies, para estanques "buffer".

(?) Desconocido o existe una gran incertidumbre. Fuente: Páez Osuna, 2001.

### 1.7 Desechos de Crustáceos.

Hoy en día, los desechos de crustáceos representan el volumen de desperdicios más grande dentro de los alimentos congelados, en especial los del camarón (Jonson y Peniston, 1978; *En*: Hansen e Illanes, 1994). La gran expansión y concentración de industrias procesadoras de moluscos y crustáceos en un mismo lugar, han llevado a algunos gobiernos como el de E.U.A. a legislar los impactos ambientales que producen éstas industrias, por lo que se pide como requisito considerar la búsqueda de alternativas innovadoras para sus desechos en alta mar y en tierra (Carroad y Tom, 1978; *En*: Hansen e Illanes, 1994).

Cabe resaltar que tal legislación no existe en México; por tal razón, el reciclaje de los desechos de las industrias procesadoras de moluscos y crustáceos es una necesidad y una buena opción para mantener un desarrollo sustentable.

Al ser aprovechados éstos desechos, se disminuyen costos de producción en la industria alimenticia para ganado, avícola, acuicultura, animales domésticos, etc. Además se han encontrado nuevas aplicaciones a las sustancias recuperadas de los desechos, como pigmentos (astaxantinas), quitina y quitosano, en las industrias farmacéuticas, cosméticas, alimenticias y tratamiento de aguas negras. Todo esto representa un menor costo del que las industrias implementan para adquirir nuevos insumos, ya que éstos no se tienen que fabricar, sino recuperar de desechos de otra industria. Las legislaciones ambientales que se llevan a cabo en otros países, hacen de la utilización de éstos desperdicios algo muy atractivo, pues incrementa el aprovechamiento de la industria pesquera.

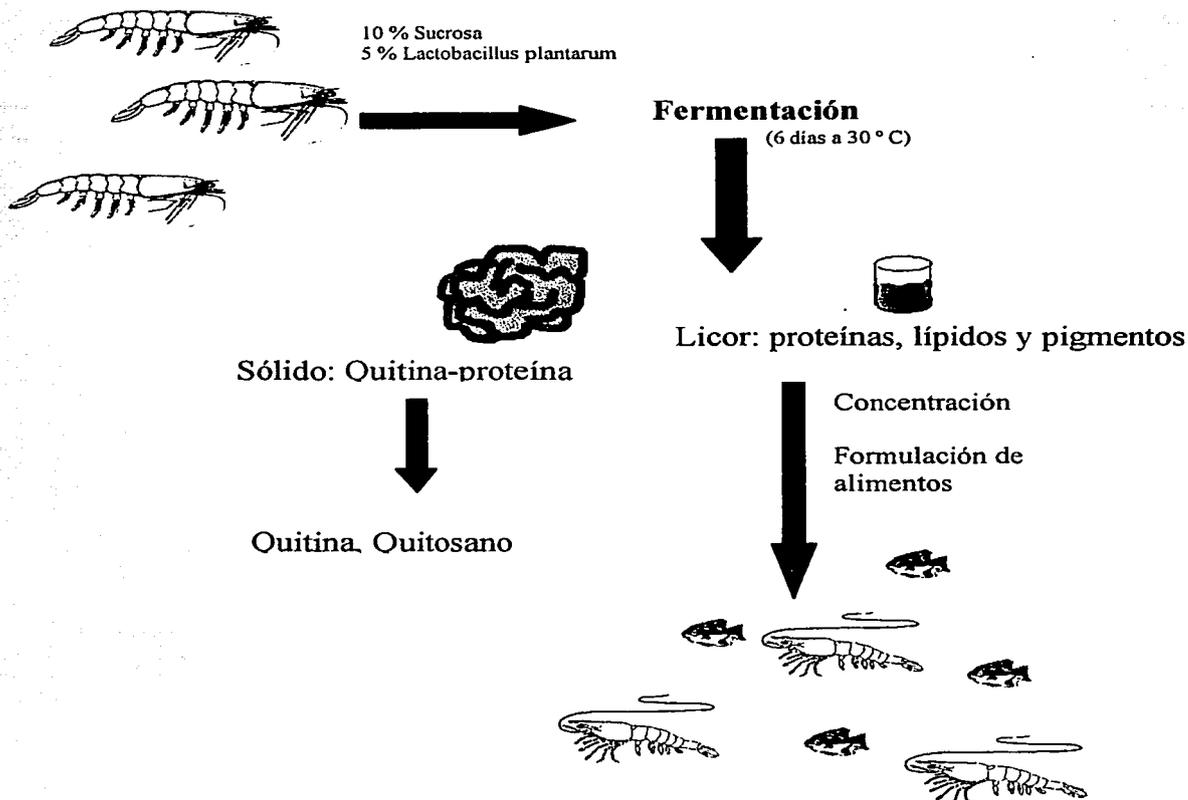
En México, una mínima parte de las cabezas de camarón son convertidas en harina 5 % (Cira y col., 2002), la mayor parte son desechadas en alta mar y por su volumen, causan un impacto ecológico que puede alterar el ambiente. En los cultivos de camarón, tampoco se aprovecha el cefalotórax, contaminando así zonas aledañas a las áreas de cultivo, con un consiguiente deterioro ambiental y proliferación de fauna nociva (Cañipa, 1994).

México es un importante productor de camarón (tanto en captura como en cultivo), lo cual provoca una enorme producción de desperdicios que se generan. El 40 % del porcentaje del cuerpo del camarón es desechado (cefalotórax), algunas veces es acompañado por colas severamente enfermas o maltratadas que no pueden ser comercializadas. Para 1990 en México se produjeron 18,634 toneladas de desechos en peso húmedo y para 1999 la producción aumentó a 31,292 toneladas (SEMARNAP, 2000), siendo un incremento de 68 % con respecto a

1990 (en peso húmedo). Lo anterior sugiere que conforme aumenta la producción de camarón en México, se incrementarán considerablemente sus desechos. Por tanto, el aprovechamiento de éstos en cualquiera de las áreas ya mencionadas tendría que estar en consideración por las industrias mexicanas.

La composición química proximal de los desechos son 53.5 % de proteína, 11.1 % de quitina, 8.9 % grasa, 22.6 % cenizas, 7.2 % calcio y 1.68 % fósforo (Meyers, 1998). Los datos indican que pueden ser adecuados para su aprovechamiento en dietas acuícolas como suplemento alimenticio, tales como la del mismo camarón. Debido a que los desechos de camarón pueden ser vectores de transmisión de enfermedades virales, no pueden ser aprovechados directamente en el área alimenticia acuícola sin antes pasar por un tratamiento adecuado. En este sentido, existen estudios previos acerca de un proceso eficiente para desechos de camarón y pescado, conocido como la fermentación ácido láctica o ensilado.

La fermentación ácido láctica (ensilado), en comparación a la fabricación de harinas de moluscos, crustáceos y pescado, ofrece atractivas ventajas tales como que se puede llevar a cabo a bajos costos de inversión en lugares en donde no se cuenta con infraestructura, se puede dar un uso integral ya que por presentar un valor nutricional puede ser empleado para alimentación animal, además de que se pueden separar otros productos de alto valor comercial como serían los pigmentos (astaxantinas), proteasas endógenas y quitina (Fig. 7), (Shirai y col., 2000).



**Fig.7.** Diagrama General del proceso de fermentación para el aprovechamiento de desechos de crustáceos (Modificado de Plascencia y col.,2002).

### 1.8 Ensilaje.

A partir de estudios previos en donde la fermentación láctica se ha empleado con la finalidad de aumentar la vida de anaquel de los alimentos, debido a la producción de ácidos orgánicos y compuestos con actividad antimicrobiana, se ha llevado a cabo la fermentación láctica para la recuperación de proteínas a partir de desechos de camarón y su aplicación en dietas para acuicultura (Plascencia y col.,2002).

El ensilado consiste en una licuefacción de materia orgánica, en este caso, cabezas de camarón, por la acción enzimática, con la consecuente inhibición de microorganismos alteradores por los ácidos producidos, extendiendo la vida de anaquel del desecho (Shirai y Hall, 1996). El empleo del ensilado como método de conservación permite evitar descomposiciones debido al incremento de sustancias volátiles y pH, acompañado de decoloración por oxidación de pigmentos y autólisis de proteínas.

El ensilaje biológico implica el uso de microorganismos que producen ácido *in situ*, mientras que en el ensilaje químico se adicionan ácidos orgánicos o inorgánicos. Se ha reportado que el ensilaje de los desechos del camarón proporciona una opción para poder preservar un producto rápidamente perecedero y permite la recuperación de productos de alto valor agregado y un mercado muy extenso como la quitina, proteínas y los pigmentos.

El ensilado de los desechos de camarón en su forma líquida es utilizado como alimento para animales y algunas veces se le llama proteína líquida. La licuefacción del tejido del camarón es el resultado de la hidrólisis de las proteínas por la acción enzimática y aumentada por la adición o producción de ácidos orgánicos. La calidad del ensilado consta principalmente del contenido de aminoácidos esenciales. El ácido orgánico que se añade o se produce, tiene como propiedades el ser bacteriostático y preservar el desecho (Raa y col., 1982).

La fermentación ácido láctica combinada con tratamientos químicos ha sido estudiada como una alternativa en la recuperación de quitina, reduciendo la cantidad de álcali y ácidos requeridos. En este proceso la proteína y el calcio son removidos por la actividad enzimática en los tejidos y por la solubilización del calcio debido a los ácidos orgánicos, respectivamente (Cira y col., 2002).

Debido a que los desechos de camarón son altamente perecederos, son arrojados a alta mar o a zonas aledañas a las industrias procesadoras y granjas de camarón, sin aprovechamiento alguno provocando problemas sanitarios y de impacto ambiental. Por lo tanto, una posible solución es fermentar el desperdicio con bacterias lácticas con el fin de estabilizarlos y conservarlos.

La acción preservativa de las bacterias ácido lácticas puede ser explicada por diversos factores: el ácido láctico que producen, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Las

bacteriocinas son proteínas producidas por diversas especies de bacterias que ejercen una acción bactericida sobre bacterias susceptibles, (Einarsson y Lauzon, 1995).

Para que el proceso de ensilaje sea efectivo, se añade una fuente de energía y un inóculo de bacterias ácido lácticas para iniciar la fermentación. La fuente de energía es indispensable para las bacterias y puede ser glucosa, sacarosa o lactosa (Shirai y col., 1996) y se agrega debido a que el desecho de camarón es una fuente deficiente de carbohidratos (Hall y De Silva, 1994; Shirai y col, 2000).

### **1.8.1 Propiedades.**

Un buen ensilado cambia de un estado semi-sólido a un estado líquido en un tiempo de 2 a 3 días; el pH se reduce y las enzimas hidrolizan las proteínas, dando como resultado altos contenidos de péptidos solubles, aminoácidos libres y amoniaco (Hall y De Silva, 1994). Si las fracciones líquida y semi-sólida (sedimento) se separan, el líquido representa alrededor del 50 % de la proteína total del desperdicio y el resto permanece en el sedimento, en el cual se queda cerca del 85 % de la quitina (Plascencia, 2000).

### **1.8.2 Calidad.**

La calidad del ensilado se determina principalmente en su contenido de aminoácidos esenciales, vitaminas, vida de anaquel, calidad microbiológica, olor, color y sabor. Una parte del desecho, constituido por la quitina, permanece sin digerirse y requiere su separación de la fracción líquida. La presencia de aminoácidos esenciales disueltos en el ensilado, se incrementan durante las primeras horas de hidrólisis. Se deben evitar periodos prolongados de fermentación, ya que esto favorece su destrucción, (Plascencia y col., 2002).

### **1.8.3 Ventajas con respecto a la harina de pescado.**

Existen ventajas que el proceso de ensilaje proporciona, a continuación se enlistan:

- a) Estabiliza y extiende la vida de anaquel del desperdicio (Shirai col., 1997).
- b) Permite dar un uso integral, ya que se puede llevar a cabo la recuperación de productos con alto valor agregado (Hall & De Silva, 1992; Shirai & Hall, 1996; Shirai y col., 1996; Shirai y col., 1997; Cira y col, 2002; Plascencia y col., 2002).

- b) Es un proceso económico que se puede realizar a bajos costos de inversión en lugares en donde no se cuenta con infraestructura disponible (Hall y De Silva, 1992; Shirai y Hall, 1996).
- c) Es de fácil realización y manejo (Meyers, 1986).
- d) Retiene la calidad nutricional del producto y por consiguiente se aumenta la explotación de esta fuente para la elaboración de alimentos acuícolas (Fagbenro y Bello-Olusoji, 1997; *En*: Plascencia, 2000).

La composición químico proximal de las cabezas de camarón ensiladas muestra una adecuada cantidad de proteína (Tabla 6), la cual cubre las necesidades nutrimentales para el rápido crecimiento y desarrollo de animales acuáticos cultivados, por lo que se ha sugerido su posible utilización como alimento para acuicultura, específicamente para camarón. Sin embargo, es indispensable conocer la inocuidad del ensilado, ya que es posible que los desechos de camarón estén infectados con protozoarios, hongos, bacterias y virus. Las enfermedades que más han afectado a los cultivos de camarón en el mundo y en México son virales. Para la detección de la presencia de virus en los camarones se utilizan varias técnicas, desde las más comunes como las pruebas histológicas, hasta análisis muy específicos de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es una tecnología basada en la detección de ADN para el diagnóstico de patógenos.

**Tabla 6.** Composición químico proximal del ensilado de cabezas de camarón (Infofish Handbook 4, 1991).

	Base Húmeda %	Base Seca %
Proteína	14.10	69.00
Extracto Etéreo	1.40	6.80
Cenizas	3.50	17.10
Calcio	1.08	5.29
Fósforo	0.30	1.47
Humedad	81.00	7.00

### 1.9 Enfermedades que atacan al camarón en el mundo.

En el mundo se encuentran siete diferentes virus que afectan el cultivo de camarón (Tabla 7), de mayor a menor importancia en pérdidas económicas son: a) *Virus del Síndrome de la Mancha Blanca* (WSSV), b) *Virus de la Cabeza Amarilla* (YHV), c) *Virus del Síndrome del Taura* (TSV),

d) *Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa* (IHHNV), e) *Parvovirus hepatopancreático* (HPV), f) *Baculovirus Monodon* (MBV) y g) *Baculovirus Penaei* (BP).

A lo largo de los años la presencia de epizootias ha cambiado expandiéndose por todo el mundo, debido en su mayoría a la falta de control en el movimiento de los animales vivos.

**Tabla 7.** Distribución geográfica de los virus más importantes que infectan al camarón (Alday, 2000).

	<b>América</b>	<b>Asia</b>	<b>Australia</b>
<b>WSSV</b> Virus del Síndrome de la Mancha Blanca	Presente ( excepto en Venezuela, Brasil, Belice, Cuba)	Presente	No descrito
<b>YHV</b> Virus de la Cabeza Amarilla	E.U.A. (1 caso aislado)	Tailandia	LOV Virus de la Vacuolización del Órgano Linfoide.
<b>TSV</b> Virus del Síndrome del Taura	Presente	Taipei-China	No descrito
<b>IHHNV</b> Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa	Presente	Presente	Presente
<b>HPV</b> Parvovirus Hepatopancreático	Presente	Presente	Presente
<b>MBV</b> Baculovirus monodon	Presente	Presente	Presente
<b>BP</b> Baculovirus Penaei	Presente	No descrito	No descrito

En 1996, las pérdidas económicas estimadas por el Banco Mundial fueron de \$3,000 millones de dólares anuales, lo que corresponde a un 40 % de la producción total en la acuicultura (Alday, 2000). Durante los últimos años no se ha podido abatir esa cifra, debido al difícil control sanitario y falta de cooperación mundial de la comunidad de la actividad acuícola. Sin embargo, hay una gran preocupación de parte de los productores privados, rurales e inclusive gubernamentales para poder controlar en alguna medida las pérdidas.

### 1.9.1 Enfermedades virales que atacan al camarón cultivado en México.

Las epizootias causadas por virus en camarón cultivado en México y en el mundo provocan la muerte rápida y pérdida de los cultivos en etapas tempranas del ciclo de vida (mysis, post-larva, juveniles), repercutiendo así en la economía de los cultivos y de las divisas destinadas a ésta actividad. La infección por virus en los cultivos de camarón representa una pérdida rápida y

segura de los mismos, ya que no existen vacunas o tratamiento para evitar su actividad. Por tanto, se sigue investigando para poder encontrar soluciones prácticas, con la ayuda de la nueva tecnología para poder disminuir el impacto que los virus provocan al atacar un cultivo de camarón.

Para el año 2000, en México la pérdida económica ocasionada solamente por el Virus del Taura y de la Mancha Blanca fue aproximadamente de \$ 28 millones de dólares (Galaviz y col., 2000). Por lo anterior la prevención de enfermedades producidas por diversos agentes patógenos debe de ser una de las prioridades dentro del cultivo del camarón, con el fin de proteger la inversión que se hace en éste producto. A continuación se enlistan los virus de mayor importancia económica que han atacado en México de 1996 a la fecha son: Virus del Síndrome del Taura (TSV)-1996, Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa (IHHNV)-1995 y Virus de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV) a mediados de 1999 (Contreras y Rodríguez, 2000).

Virus del Síndrome de Taura (TSV) se ha clasificado como un Picornavirus de forma icosaédrica, que mide 30-32 nm de diámetro. Su genoma está conformado por una sola banda de ARN (ssARN) con tres polipéptidos mayores y dos menores. El virus infecta de forma natural a las especies: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus setiferus*. Se han logrado infectar experimentalmente a postlarvas y juveniles de: *Litopenaeus setiferus*, *Farfantepenaeus aztecus* y juveniles de *Fenneropenaeus chinensis*. Las postlarvas posteriores al día 12 y juveniles de *Litopenaeus vannamei* son muy susceptibles y presentan alta mortalidad. Sin embargo, los juveniles de *Litopenaeus stylirostris* son muy resistentes, al igual que las postlarvas y juveniles de *Farfantepenaeus aztecus* y *Farfantepenaeus duorarum*.

Este virus ataca a las postlarvas de entre 14-40 días de edad y los juveniles afectados son aquellos con pesos entre 0.05 y 5 g. Los signos más significativos en la fase hiperaguda son: la expansión de cromatóforos que produce una coloración rojiza en el camarón, siendo el telson (la cola) y los pleópodos los órganos que más se tiñen de ese color. Cuando los animales muestran éstos signos mueren durante la ecdisis (muda). La mortalidad es del 80 al 95 %. Los camarones que sobreviven a la epizootia se observan con lesiones multifocales melanizadas, a veces presentan la cutícula suave y la expansión de los cromatóforos, incluso sus hábitos alimenticios pueden ser normales. La sobrevivencia de éstos camarones es de un 60 % o más (Lightner, 1996).

Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), también conocido como síndrome del rostro deformado, es un Parvovirus con genoma de una sola banda de ADN que mide un promedio de 22 nm de diámetro. Los hospederos susceptibles son *Litopenaeus stylirostris*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus occidentalis*, *Farfantepenaeus californiensis*, *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus* y *Penaeus japonicus*.

Los signos clínicos son: altas mortalidades en los juveniles. En la postlarva No. 35, (35 días de desarrollo), se observan signos y mortalidad masiva. Los juveniles infectados en forma horizontal son los más afectados; sin embargo los adultos casi no muestran signos. También se presenta el cambio de comportamiento como la inmovilidad, el hundimiento con el abdomen hacia arriba, la falta de alimentación hasta estar débiles y ser atacados y comidos por otros.

Las lesiones que presentan son manchas blancas en la epidermis cuticular. Algunos camarones se observan de un color gris azulado y con la musculatura abdominal opaca. La enfermedad en *Litopenaeus vannamei* es crónica y muestran el rostro deformado, las antenas se encogen y la cutícula se hace rugosa (Lightner, 1996).

Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) era considerado miembro de la subfamilia *Nudibaculovirinae* en la familia *Baculoviridae* por su semejanza con ésta, sin embargo, en el Sexto Reporte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (I.C.T.V.) (Murphy y col., 1995; En: Soto y col., 2001) fue clasificado como virus no asignados.

El virus tiene forma de bastón con una doble envoltura en uno de sus extremos con apariencia de cola. La cápside está compuesta de subunidades de anillos en arreglo consecutivo (Fig. 8). Estos anillos son perpendiculares al eje longitudinal de la cápside y un extremo de este cilindro de subunidades está cerrado por un segmento redondeado, el otro extremo es cuadrado (Murphy y col., 1995; En: Soto y col., 2001). El genoma del WSSV esta formado por ADN de doble cadena de aproximadamente 190-200 kilobases de largo. El virus contiene por lo menos 5 principales proteínas con pesos estimados de 28 (VP28), 26 (VP26), 24 (VP24), 19 (VP19) y 15 (VP15). VP28 y VP19 están asociadas con la envoltura del virionte y VP26, VP24 y VP15 con la nucleocápside. El papel que la envoltura y las proteínas tengan en el proceso de infección aún no está determinado (Van Hulten y col. 2001).

Se han realizado experimentos para estudiar el papel que tienen las proteínas del virionte y/o otros dominios del proceso de infección y uno de ellos es el neutralizar anticuerpos que se unan a la envoltura del virionte, lo cual permite la unión del virus a la superficie celular y con ello la entrada a la célula (Burton, y col., 2000).

El gran interés por conocer este virus es que puede provocar el 100% de mortandad de 2 a 10 días en cultivos camarónicolas, por lo que hay una gran preocupación por la posible introducción del virus en poblaciones silvestres (Soto y col., 2001). Muy poco se conoce acerca del modo de infección y morfogénesis *in vivo* de WSSV, aunque se sabe que las primeras células infectadas son las del estómago, branquias y epidermis cuticular del camarón. La infección subsecuentemente se extiende en el camarón a otros tejidos de origen mesodérmico y ectodérmico (Lightner, 1996). La replicación del ADN y la formación de la nueva envoltura se lleva a cabo en el núcleo (Durand y col, 1997; Wang y col., 2000; Van Hulst y col.; 2001). El mecanismo de entrada hacia el camarón y la manera de infectar del virus en el cuerpo de los crustáceos no es conocido.

Este virus se ha descrito como un Baculovirus con ADN de doble cadena y una morfometría de 70 x 380 nm hasta 150 x 380 nm (Lightner, 1996). Puede infectar naturalmente a: *Fenneropenaeus indicus*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *P. monodon*, *Litopenaeus setiferus*, *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus aztecus* y *Farfantepenaeus duorarum*.

Los principales signos clínicos son: letargía o nado lento sobre la superficie, coloración del cuerpo de rosada a pardo rojizo, cola roja, expansión de los cromatóforos, mueren en el fondo de los estanques, rangos altos de mortalidad acumulativa llegando al 100 % dentro de los primeros 3-10 días después de la aparición de los signos clínicos, manchas blancas de 0.5-2.0 mm de diámetro en el interior de la superficie del exoesqueleto y depósitos anormales de sales de calcio (Lightner, 1996).



Se muestran en A. Forma preinfectiosa y B. Forma infectiva del virus. La barra negra tiene una longitud de 100nm.

**Fig. 8.** Microscopía electrónica del virus del Síndrome de la Mancha Blanca(WSSV) en camarón (Fuente: Laboratorio de virus, departamento de Microbiología. Universidad de Hawaii, U.S.A. Consulta en línea <http://www2.hawaii.edu/~pilip/wsv2.htm>).

Para la detección de enfermedades virales se cuenta con métodos de diagnóstico rápidos, precisos y eficientes, como lo son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la Hibridación *in situ*, Dot Blot, Inmunofluorescencia y Técnicas Citológicas Rápidas. Existen también análisis histológicos de rutina (tinción Hematoxilina y Eosina) que son más precisos para el estudio patológico que un squash en fresco, aunque su proceso es lento, llevándose aprox. de 2-3 días de trabajo, tiempo suficiente para que un cultivo infectado por WSSV se vea altamente afectado con un 100 % de mortandad. Por lo anterior, en la necesidad de métodos de diagnóstico rápidos y sensibles ha llevado a la aplicación de pruebas basadas en la amplificación del ADN para las enfermedades de camarón, tales como el PCR. A la fecha están siendo desarrollados diferentes métodos acoplados al PCR con el fin de obtener una mejor especificidad y sensibilidad para la detección de virus en camarón. Estos métodos prometen proveer análisis de diagnóstico rápidos y que ser herramientas para investigación de una industria que sufre de epizootias catastróficas (Lightner y Redman, 1998).

El gobierno de México está trabajando junto con laboratorios privados e instituciones públicas y privadas, con el fin de conformar una sólida Red de Diagnóstico que ayude al flujo de información correcta y estandarizada, según la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SEMARNAP-PESC-1999, que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la introducción y dispersión de las enfermedades virales Síndrome de la Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus Virus(WSSV)) y Cabeza Amarilla (Yellow Head Virus (YHV)). Diario Oficial de la Federación, 19 de marzo de 1999 ([www.semarnat.gob.mx/legislación](http://www.semarnat.gob.mx/legislación)).

Existen ocasiones en que la enfermedad empieza en los estanques de cultivo, dando muy poco tiempo para tomar una decisión de cosecha de emergencia, como para realizar estudios histológicos que ayuden a un diagnóstico preciso y no confundir los signos expresados con otra enfermedad por bacterias, protozoarios u hongos. Por lo tanto, el análisis del PCR es el más efectivo y rápido para un diagnóstico definitivo y para el establecimiento de rápidos sistemas de control sanitario ya que existen cargamentos de camarón congelado, huevos de artemia, alimento vivo o fresco, fauna acompañante en los estanques que son portadores del virus, lo que los hace potencialmente fuentes de dispersión e infección de virus, no solamente del WSSV, sino de muchos otros (Lightner y Redman, 1998; Nunan y col., 1998; Penga y col., 1998; Kasornchandra y col., 1998, Durand y col., 2000).

### **1.10 Detección Molecular por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

A través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la Biotecnología ofrece una alternativa de diagnóstico para la detección de las enfermedades infecciosas. Desde su descripción en 1985 se ha convertido en una herramienta clave dentro del campo del diagnóstico molecular. La PCR es un proceso enzimático "*in vitro*" que permite la amplificación selectiva de secuencias de ADN. La reacción se lleva a cabo utilizando una mezcla de reactivos, dos iniciadores u oligonucleótidos que son complementarios a un segmento de ADN que será amplificado (secuencia blanco) y una enzima ADN polimerasa termoestable la cual cataliza el copiado de la muestra de ADN del organismo de interés. El procedimiento se lleva a cabo en una serie de tres ciclos que implican la desnaturalización

del ADN, el apareamiento y la elongación de los iniciadores, dando como resultado la amplificación exponencial del fragmento flanqueado por los iniciadores. La alta especificidad, sensibilidad y reproductibilidad para analizar el producto amplificado a través de electroforesis en geles de agarosa, son algunas de las características que han permitido la inclusión de esta metodología dentro del diagnóstico microbiológico, sobre todo en el caso de patógenos de difícil detección. Una ventaja adicional resultado de la automatización del procedimiento, es la rapidez con la cual pueden obtenerse los resultados (Perales, 2001).

Actualmente, existe una gran cantidad de estrategias que han hecho de la PCR una técnica muy versátil, de tal manera que se puede lograr no solo la detección, sino también la diferenciación de especies y subespecies dentro de un género. Esto se puede llevar a cabo a través de la

amplificación de una región conservada (consenso) en todas las especies del género y la posterior identificación de polimorfismos o variaciones en este segmento amplificado utilizando enzimas de restricción (PCR-RFLPs) o bien, utilizando reacciones de PCR en las cuales se incluye más de un par de iniciadores, los cuales se aparean en secuencias que son específicas para cada especie ó subespecie (PCR–multiplex). Asimismo, el acoplamiento de técnicas de hibridación para el análisis de los productos amplificados ha permitido incrementar la sensibilidad y especificidad de la PCR (Perales, 2001).

A pesar de esta gran variedad de métodos de análisis de PCR, solamente se encuentran 3 diferentes técnicas en uso. Existe evidencia de variaciones del virus de la Mancha Blanca (WSSV) en México, lo cual podría afectar la especificidad de las pruebas de PCR; no obstante, a la fecha no se ha confirmado (APEC/FAO/NACA/SEMARNAP; 2000). También existen preocupaciones de que la prueba de PCR no pueda ser totalmente confiable, a causa de la falta de personal entrenado adecuadamente. Por lo tanto, se está realizando una estandarización de los análisis de PCR en toda la República Mexicana a través de la Red de Diagnóstico Nacional, a partir de las investigaciones realizadas a diferentes epizootias provocadas por WSSV. Perales (2001) sugiere una optimización de la técnica del PCR basada en el estuche comercial distribuido por la compañía Diagnostics, obteniendo como resultado la implementación de tecnología altamente confiable realizada en poco tiempo, y costos relativamente bajos. Esta se realizó a partir de la estrategia de PCR anidado que consiste de dos PCR sucesivos, cada uno de los cuales requiere un par de iniciadores específicos y donde el producto de la primera reacción es el ADN blanco de la segunda. El PCR es un método poderoso para amplificar secuencias específicas de ADN de largos complejos de mezcla de ADN. Por ejemplo, se pueden diseñar Primers o iniciadores de PCR para amplificar un solo locus de todo un genoma. De una sola molécula blanco se puede producir cerca de 1 billón de copias del producto de PCR en muy poco tiempo. Sin embargo, la capacidad de amplificar 1 billón de veces también amplía la posibilidad de secuenciar 1 billón de veces el ADN erróneo. La especificidad del PCR es determinada por la especificidad de los Primers o iniciadores. Por ejemplo, si los primers se unen a más de 1 locus (ej. dominio común), entonces más de un segmento de ADN será amplificado. Para reducir estas posibilidades, se emplean primers anidados para asegurar la especificidad (Fig. 9); dos pares de Primers para PCR son utilizados para un solo locus: el



La secuenciación de los genomas completos de diferentes patógenos permite el diseño de estrategias basadas en el análisis de PCR más específicas, sin embargo, el PCR anidado respresenta una buena alternativa para lograr tanto sensibilidad como especificidad durante la detección. Aunado a lo anterior, la optimización del proceso (Perales, 2001), tanto en tiempo como en costo tiene la ventaja de establecer a la PCR como la herramienta de detección de agentes patógenos de gran importancia económica como lo es el WSSV.

## 2. Antecedentes.

En la fermentación ácido láctica de desechos de camarón (cabezas y colas), hay una producción de ácido láctico por bacterias ácido lácticas donde el crecimiento de éstas se ve favorecido al agregar azúcares fermentables (Shirai y col, 2001; Cira y col, 2002). Al mismo tiempo, el ácido láctico y las bacteriocinas producidas por las bacterias proporcionan un efecto conservador durante la fermentación, previniendo la rápida descomposición por microorganismos, manteniendo las cuentas microbianas estables y el pH en una región ácida (Shirai y col., 2001; Einarsson y Lauzon, 1995).

Al terminar la fermentación se pueden separar dos fracciones: a) semi-sólida, que contiene principalmente quitina y b) líquida, que contiene proteínas, lípidos y pigmentos. De estas fracciones se pueden separar otros productos de valor comercial como los pigmentos (astaxantinas), proteínas y quitina, (Shirai y col, 1997; Cira y col., 2002).

Existe una gran preocupación por mejorar el rendimiento y bajar los costos de dietas acuícolas con dietas alternativas, tomando en cuenta como punto principal la aceptación que puede tener la especie de cultivo a un alimento específico (Hardy, 2000; Avault, 2001; Hendrickx, 2001). Una probable combinación entre alimentos balanceados de origen industrial y alimentos procesados a partir de desechos naturales diversos, podría traducirse en una disminución significativa de los costos de explotación, derivados de la harina de pescado.

Por tal motivo, varios investigadores han estudiado la posibilidad de sustituir total o parcialmente la harina de pescado por proteínas de origen vegetal y animal en alimentos para organismos de cultivo acuático. Debido a la composición adecuada de las dietas, la presencia de aminoácidos indispensables para estimular el crecimiento y probablemente de atrayentes, ha sido la razón para que las dietas sustituidas con proteínas de origen animal sean mejor asimiladas por los organismos (Plascencia y col., 2002; Galicia, 2001; Ezquerro y col., 1998; Cañipa, 1994; Clark y col., 1993; Fox, 1993).

El uso de ensilados de desechos de camarón en alimentos para animales de cultivo acuático ha sido probado en dietas para tilapia *Oreochromis niloticus*, sustituyendo harina de pescado en diferentes concentraciones. La aceptación de la dieta, asimilación y crecimiento de las tilapias fue totalmente favorable (Plascencia y col., 2002). No obstante, no se ha aplicado el uso de ensilados de desechos de camarón como suplemento de la harina de pescado en dietas para

camarón, debido a que no se ha evaluado la posible presencia de virus infectantes del camarón en el producto final obtenido del ensilado de desechos de camarón. Tampoco se ha tomado en cuenta en México el proceso de ensilaje como un método adecuado para manejar los desechos de camarón, pudiéndose reciclar a industrias para alimentación animal, en especial la acuícola, disminuyendo fuentes de contaminación ambiental y de enfermedades camaronícolas, principalmente virales como el WSSV. De esta manera, no se tendrían que destruir los lotes que dieran positivos en los diagnósticos realizados para el virus WSSV, como lo indica el punto 4.5 de la NOM-EM-001-SEMARNAP-PESC-1999, brindando una opción alterna al uso de cultivo enfermos, estudio que necesita ser confirmado.

Sin embargo se han realizado investigaciones donde se someten a diversos virus tales como Hepatitis B y Mancha Blanca Baculovirus (WSBV), a tratamientos calóricos, radiación ultravioleta, pH, exposición a ozono y desinfectantes químicos para observar el efecto que causa sobre su infectividad. Esto se realizó ya que se tenía la hipótesis que alguno de estos tratamientos podría afectar la incidencia de los virus, permitiendo el uso de alguno de los tratamientos dados como proceso desinfectante. Se obtuvieron principalmente datos donde el pH ácido entre 1-3 a lo largo de 1 hr. o menos, inhibe la infectividad de éstos virus (consulta en línea: Virus Taxonomy, 2002; Tagawa y col., 2000; Chang y col., 1998).

Se conoce que la Reacción en Cadena de la Polimerasa es un análisis confiable y de rápido diagnóstico para la detección de virus en camarón (Lightner y col., 1998; Nunan y col., 1998; Peng y col., 1998; Kasornchandra y col., 1998; Durand, 2000). Sin embargo, debido a la diversidad de técnicas de esta metodología, los resultados pueden ser no confiables por falta de personal entrenado. Por lo tanto, APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2000 y Galaviz y col., 2000, sugieren la estandarización de la técnica mediante cursos de actualización a lo largo de todos los laboratorios del país que la emplean para el diagnóstico y así evitar resultados erróneos.

Con base a los estudios anteriores, el pH ácido se debe a la producción de ácido láctico por las bacterias ácido lácticas adicionadas al ensilado, lo cual permite suponer que el tratamiento de desechos de camarón por la fermentación ácido láctica (ensilado) será un proceso adecuado que afectará el desarrollo de bacterias descomponedoras y virus infectantes del camarón. De esta manera se podría dar nuevos usos a un producto poco aprovechado y barato como lo es el desecho de camarón.

### **3. Justificación.**

La acuicultura ha tomado un lugar muy importante en la economía y sustentabilidad de las pesquerías a nivel mundial.

El efecto de enfermedades virales en esta actividad causa pérdidas catastróficas, principalmente en el cultivo de camarón, éstas pérdidas se estiman en \$3,000 millones de dólares al año (APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2001). En el mundo se encuentran siete diferentes virus que tienen un impacto global en el cultivo comercial del camarón, siendo el más agresivo de ellos: *Virus del Síndrome de la Mancha Blanca* (WSSV).

En México, el cultivo de camarón se ha desarrollado ampliamente en los últimos 30 años, en los cuales eventualmente las enfermedades virales han surgido. Aunque en México se han registrado pérdidas causadas por la presencia de virus, a la fecha no han existido casos en los cuales se hayan tenido pérdidas como las reportadas en otros países. Sin embargo, para el año 2000, las pérdidas por Mancha Blanca y Taura fueron de \$ 28 millones de dólares sobre la cifra total de camarón cultivado (Galaviz y col., 2000). El virus de la Mancha Blanca no ha atacado a los cultivos mexicanos tan severamente como en Asia, debido a la alerta oportuna sobre sus estragos. De este modo, se teme que de no mantenerse las medidas estrictas (ya que no existe tratamiento alguno para controlarlo) y se encuentran más opciones para mitigar esta infección, las pérdidas por epizootias provocadas por WSSV podrían ser extraordinarias. Por lo anterior, es urgente aplicar y crear nuevas medidas preventivas para evitar su presencia de cualquier otra epizootia en el territorio mexicano.

Otro problema que preocupa a los productores e investigadores es la disminución del costo del alimento para camarón y para la acuicultura en general, lo que significa la reducción de proteína, sustituyendo la harina de pescado por algún otro suplemento alimenticio de origen vegetal o animal (Hardy, 2000; Avault, 2001; Hendrickx, 2001). La utopía en la acuicultura es incrementar la producción al igual que el precio del producto y bajar los costos. Estas acciones no pueden ser llevadas a cabo sin un buen manejo de la granja y de las industrias procesadoras pesqueras, ya que entre ellos mismos podrían ser vectores de enfermedades.

El control de enfermedades virales en animales acuáticos es extremadamente difícil de controlar, aún después de haber infectado al camarón se requiere de una exhaustiva desinfección de los estanques y material para disminuir al máximo fuente de infección. Se han reportado

diversos estudios en donde la actividad de la acidez sobre bacterias y virus es bactericida e inhibitoria (Giraffa y col., 1990; Harris y col., 1989). Con base en lo anterior, en esta tesis se sugiere el uso de la acidez producida por las bacterias lácticas (ensilado) para el procesamiento adecuado alterno de los desechos de camarón y animales enfermos o muertos que no tengan vías alternativas de uso. En este sentido se efectuará un reciclaje de desechos de camarón y camarones enfermos para su posterior aprovechamiento en industrias productoras de alimento acuícola, farmacéuticas, cosmetológicas y tratamiento de aguas (Hansen y col, 1994). Con esta propuesta, los desechos de camarón y camarones enfermos no representarían pérdidas monetarias al tener que abaratar el costo o destruir lotes contaminados, al contrario, podrían representar por ej. fuentes de alimentación al ser incluidas en dietas acuícolas.

El fin que se busca en este trabajo es la inclusión de desechos de camarón procesados a través del ensilado en dietas acuícolas, que es un tratamiento barato y poco aprovechado en México.

#### **4. Objetivo General.**

1.- Obtención y caracterización química microbiológica de ensilados de desechos de camarón.

##### **4.1 Objetivos Particulares.**

1.- Reciclaje de desperdicios de camarón mediante el ensilado en dos reactores, dinámico y estático, evaluando la producción de ácido láctico, evolución del pH y la recuperación de proteína.

2.- Determinación de la composición químico proximal del ensilaje de desechos de camarón y análisis microbiológico.

3.- Detección del virus de la Mancha Blanca en ensilados de desechos de camarón, mediante el análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR anidado).

#### **5. Hipótesis.**

La acidez en ensilados de desechos de camarón puede disminuir la presencia de bacterias patógenas-descompositoras y probablemente de virus infectantes de camarón (por ej. WSSV), beneficiando la reducción de contaminantes y enfermedades causadas por el desecho de camarón y su reutilización como suplemento alimenticio en dietas acuícolas.

## 6. Metodología.

### 6.1 Obtención del ensilado de desechos de camarón.

#### 6.1.1 Material.

Los residuos de camarón consistieron en cabezas (cefalotórax) y colas maltratadas (fracción comestible), las cuales se obtuvieron en el mercado de La Nueva Viga de la Ciudad de México en enero-febrero de 1999, alrededor de las 7:00 h, hora de descarga de los últimos productos pesqueros provenientes de toda la República Mexicana. Las cabezas de camarón obtenidas fueron principalmente de *Farfantepenaeus duorarum* (rosado) y *Litopenaeus setiferus* (blanco del Golfo), con una mezcla de cabezas de camarón del Pacífico y colas de *Farfantepenaeus brevisrostris* (cristal). Los desechos fueron molidos en un molino de carne Sanitary cedazo 1/8", inmediatamente después de su compra en Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I).

Asimismo se obtuvieron colas de camarón provenientes de Honduras, positivos para el virus de la Mancha Blanca, vía el análisis de PCR. Los camarones obtenidos fueron *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, siendo donados por el Lab. de Patología Molecular del Centro Nacional de Sanidad Acuícola en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

#### 6.1.2 Microorganismos.

Las bacterias ácido lácticas utilizadas, identificadas como *Lactobacillus plantarum* (APG Eurozym), fueron cepas inoculadas en los reactores estático (RE) y dinámico (RD). Para su propagación, éstas fueron inoculadas en un medio de cultivo líquido APT (Difco, USA) e incubadas a 30 ° C durante 24 horas. El cultivo iniciador tenía una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ml (Cira y col., 2002).

#### 6.1.3 Condiciones de la fermentación.

##### a) Reactor estático (RE).

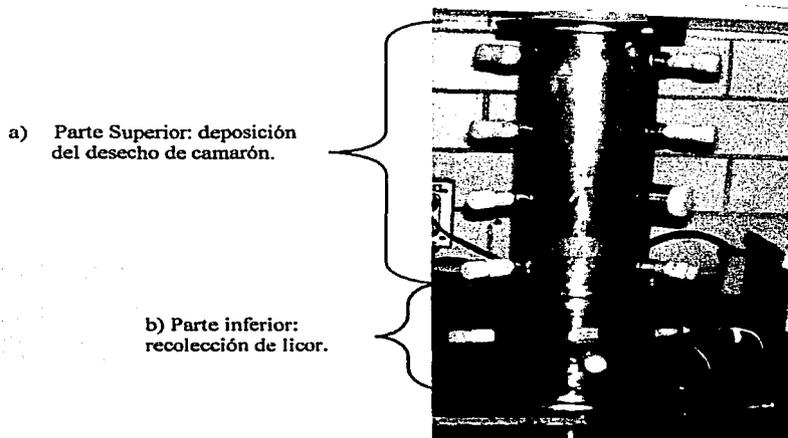
Para realizar las fermentaciones, se utilizaron cabezas (cefalotórax) o colas de camarón por separado como materia prima, colocándose en un fermentador estático (reactor de columna). El cual consiste de dos módulos construidos en acero inoxidable. El módulo superior es utilizado para la deposición del desecho a fermentar (Fig. 10a) y el de la parte inferior se utiliza para la recolección del licor producido (Figura 11b). Asimismo posee entradas para la colocación de

termopares, electrodos y salidas para gas y muestreo. En la Tabla 8 se presentan las características de los dos reactores estáticos utilizados.

**Tabla 8.** Dimensiones del Reactor estático.

Reactor	Dimensiones (cm)		Carga de desecho húmedo de camarón (Kg)
	Longitud	Diámetro	
Pequeño	20	10	2
Grande	424.5	20.4	30

Como se mencionó, las fermentaciones se realizaron por separado con dos materias primas, cabezas o colas molidas de camarón de procedencia mexicana, adicionándose 10 % (peso/peso base húmeda) de azúcar de caña refinada (Azúcar, S.A. México) y un inóculo con 5 % (vol/peso base húmeda) del cultivo iniciador, *Lactobacillus plantarum*. Llevándose a cabo en el reactor durante 6 días, durante los cuales se obtuvieron muestras semi-sólidas y líquidas cada 24 h. Las muestras se almacenaron bajo congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior utilización (Cira, 2000). El congelamiento no afecta la actividad de las enzimas nativas y cualquier cambio en la población de microorganismos no es importante, dada la gran concentración del inóculo de bacterias lácticas (Shirai y col, 2001).



**Fig. 10.** Reactor Estático. Dimensiones 20 cm longitud y 10 cm de diámetro y capacidad de carga de 2 Kg.

### b) Reactor de Cilindro Rotatorio (RD).

La parte móvil del reactor está constituida por una malla de acero inoxidable de 11 hilos por 2.5 cm y 3 mm de diámetro intersticial, colocada en forma de un cilindro de 14 cm de diámetro y 540 cm de longitud, con tapas desmontables de nylamid ajustadas al cilindro. Este cilindro está montado en un eje de acero inoxidable de 1.27 cm in con baleros de 1.27 cm, el cual es concéntrico al cuerpo del reactor y que se conecta al motor electrónico marca Bosch 12 volts 1/8 H.P.

Existe un sistema fijo, el cual está constituido por una coraza de acrílico de 20 cm de diámetro y longitud de 44 cm. En su interior se encuentra el sistema móvil y posee 2 tapas de acrílico desmontables con oril; estas se fijan con tornillos junto con bridas de acero inoxidable. El reactor completo (Fig. 11) es colocado en un soporte de acrílico; la longitud total del equipo es de 72 cm, con 29 cm de ancho y 30 cm de alto; la velocidad de agitación fue de 50 rpm intermitentemente durante 6 días. El tiempo de agitación fue regulado mediante un termorizador cada 6 horas.

El modo de operación del reactor fue el siguiente: las cabezas de camarón de procedencia mexicana o colas de camarón de procedencia Hondureña cada materia prima por separado, fue mezclada con la fuente de carbono y el cultivo iniciador antes de ser empacadas en el cilindro rotatorio y en su debido tiempo. La agitación fue intermitente durante 6 días de fermentación; cada 24 h se obtuvieron muestras semi-sólida y líquida, las cuales se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización (Shirai y col.,2000)

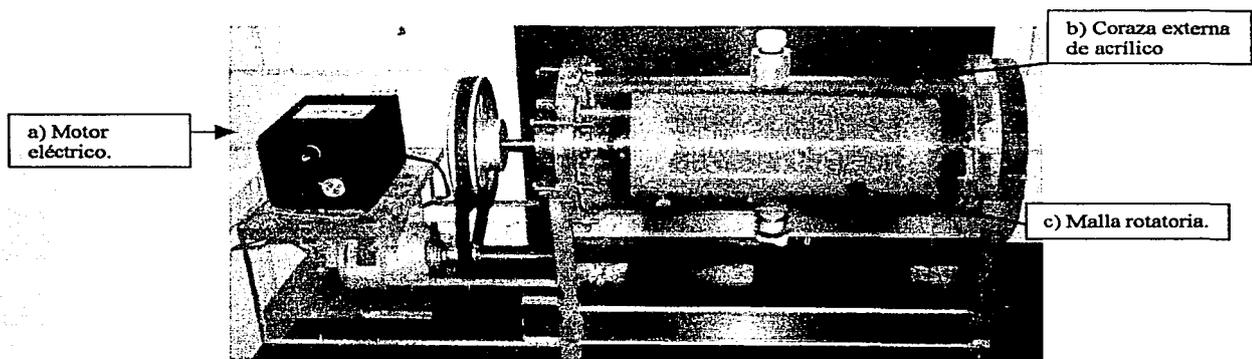


Fig. 11. Reactor Rotatorio o Dinámico.

## **6.2 Caracterización físico-química y biológica de ensilados de desechos de camarón.**

### **6.2.1 pH**

El pH fue determinado por duplicado en muestras líquidas y sólidas obtenidas de los reactores estático y dinámico. El pH del ensilado fue medido diluyendo la muestra 1:10 en agua destilada, usando un potenciómetro (Hannah, Italia) a una temperatura de 20 ° C (Cira, y col., 2002)

### **6.2.2 Acidez Total Titulable.**

La Acidez Total Titulable (ATT (mmol/g)) fue determinada en las muestras de licor y semi-sólidas diluidas (1:10) con agua destilada por duplicado, mediante titulación con NaOH 0.1 N hasta un pH de 8. Las determinaciones de la ATT se hicieron por duplicado y su valor se expresó como mmol/g de ácido láctico en la muestra (Cira, y col., 2002; Cira, 2000).

### **6.2.3 Liofilización (Secado en Frío).**

Las muestras del ensilado de desechos de camarón mexicano (hidrolizado proteico) fueron congeladas utilizando una mezcla de hielo seco y etanol (grado industrial). Posteriormente, la liofilización fue llevada a cabo en un liofilizador LABCONCO modelo 77510-00M (Kansas City, USA) en la UAM-I, Lab. de Biotecnología y en un liofilizador Heto FD3 (Alemania) en el Instituto de Química, UNAM, Lab. 28 y 29.

### **6.2.4 Pasteurización.**

Las muestras del ensilado de desechos de camarón mexicano fueron pasteurizadas durante 3 minutos a 70 ° C en una pasteurizadora Elecrem No. P21L-1072, Type: P9000 11 OV. 50/ 60 Hz-2300 W, (E.U.A.).

### **6.2.5 Análisis Microbiológico.**

El crecimiento de la microflora en el ensilado fermentado de camarón fue determinado mediante el conteo de colonias en placas con tres diferentes medios, por duplicado:

- a) Agar para *Lactobacillus* según Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Merck, Alemania) a una temperatura de incubación de 30 ° C.
- b) Agar Violeta Bilis y Rojo Violeta (Bioxon, México) para detección de microorganismos coliformes específico para coliformes, a una temperatura de 37 ° C.

c) Agar para Métodos Estándar (Bioxon, México) para cuenta de microorganismos en leche y otros materiales de importancia sanitaria (fórmula APHA) a una temperatura de 30 ° C durante 48 h (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1979).

#### **6.2.6 Análisis químico proximal.**

Las muestras líquidas y semi-sólidas del ensilado fermentado de camarón, obtenidas a diferentes tiempos de la fermentación, en estado liofilizado y liofilizado-pasteurizado, fueron sometidas a un análisis para determinar su composición químico proximal y proteína cruda (AOAC,1980). Los resultados fueron reportados por el Laboratorio de Nutrición, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

#### **6.3 Análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en ensilados de desechos de camarón.**

Muestras de los ensilados de desechos de camarón de procedencia mexicana, así como las colas de camarón hondureño, fueron sometidos al análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (PCR anidado).

Se analizaron los PCR de muestras obtenidas cada 24 h durante 6 días de fermentación. Todos los análisis de PCR anidado optimizado fueron llevadas a cabo utilizando una modificación de la metodología indicada por la compañía Diagxotics (Fig. 12) enviadas y reportadas por el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México.

##### **6.3.1 Reactivos.**

Los reactivos para llevar a cabo las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs) fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: la enzima Taq DNA polimerasa, dNTP's y el MgCl<sub>2</sub> de Promega Corporation (Madison, Wi, EUA). El estuche para llevar a cabo la detección del virus de la mancha blanca (iniciadores, testigos positivo y negativo) provienen de la compañía DiagXotics Inc. (Wilton, CT. USA).

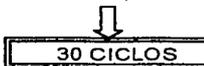
## METODO ESTANDAR

Mezcla de reactivos 1	
DNA	1 $\mu$ l
Buffer 10 mM	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 $\mu$ l
d'NTP'S	0.5 $\mu$ l
Iniciadores 1	1 $\mu$ l
Taq. DNA Polimerasa	0.3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	18.2 $\mu$ l

Volúmen final 25  $\mu$ l



MEZCLA DE REACTIVOS 2 \*  
+ 1  $\mu$ l MEZCLA 1



TIEMPO: 3 horas aprox.

## METODO OPTIMIZADO

Mezcla de reactivos 1	
DNA	0.5 $\mu$ l
Buffer 10 mM	1.25 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.75 $\mu$ l
d'NTP'S	0.25 $\mu$ l
Iniciadores 1	0.5 $\mu$ l
Taq. DNA Polimerasa	0.15 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9.1 $\mu$ l

Volúmen final 12.5  $\mu$ l

Concen. Final  
1X  
1.5mM  
0.2mM  
1.5V/ 25  $\mu$ l



MEZCLA DE REACTIVOS 2 \*  
+ 12.5  $\mu$ l MEZCLA 1



TIEMPO: 1 hora 30 min. aprox.

\* Solo cambia a iniciadores 2

Se muestra en forma de diagrama de flujo una comparación de los dos protocolos, estándar y optimizado donde se observan los cambios en el número de ciclos y en el volumen de reactivos, señalándose además la reducción del tiempo de ejecución.

**Fig. 12.** Comparación de dos protocolos de PCR: estándar y optimizado (Perales, 2001).

## 7. Resultados y Discusión.

### 7.1 Obtención del Ensilado de desechos de Camarón.

#### 7.1.1 Caracterización físico-química y biológica del ensilado de desechos de camarón.

En el presente estudio se fermentaron desechos de camarón de procedencia mexicana y hondureña por el proceso de ensilado, los cuales consistieron de cabezas o cefalotórax comúnmente desechadas y colas que no puedan ser comercializadas por maltrato o enfermedad. Así mismo, los desechos fueron ensilados en dos tipos de reactores Estático (RE) y Dinámico (RD).

El microorganismo, nivel de inóculo, fuente de carbono y tiempos de hidrólisis, se llevaron a cabo con base a los trabajos realizados por Shirai (1999), Plascencia, (2000), Shirai, y col., (2001) y Cira y col., (2002).

En los dos reactores se realizaron ensilados de 6 días, durante los cuales se obtuvieron fracciones líquidas y semi-sólidas (como la de una pasta). Esto se debe a la hidrólisis llevada a cabo en gran parte por las enzimas naturalmente presentes en el desecho de camarón y a la producción de ácido láctico por bacterias ácido lácticas (BAL) inoculadas en el ensilado. El ácido láctico facilita las condiciones para la acción lítica de las enzimas en los tejidos, además de limitar el crecimiento de bacterias descompositoras (Aranson, 1994).

El ensilado procesado a través del uso de *Lactobacilli* es menos costoso de producir que el ensilado preservado con compuestos químicos (ácidos y sales). El ensilado por Lactobacilos permite una preservación natural y económica del producto, sin adicionar enzimas o ácidos que tengan que ser lavados del producto final, permitiendo que su costo de producción sea menor al no tener que utilizar agua para eliminar los compuestos químicos adicionados.

Por tal motivo, el uso de los reactores RE y RD permitió realizar la comparación de sus características en la práctica, tales como la producción y recolección de muestras líquidas y semi-sólidas, producción de acidez total titulable y evolución del pH, las cuales se mencionan a continuación:

#### a) Reactor Estático (RE).

La fracción líquida fue separada por medio de una malla de vinilo y se produjo a consecuencia de las enzimas naturalmente presentes, sobre todo de las digestivas en el cefalotórax (Shirai, 1999), musculares en las colas de camarón y la actividad proteolítica de las enzimas provenientes del inóculo de *Lactobacillus plantarum*. La fracción líquida

obtenida se mantuvo a 4° C y presentó una consistencia prácticamente líquida, poco viscosa, color rosado y café oscuro, con un olor intenso a fermentado y presencia de perlas color blanco de calcio, provenientes de la disolución de la cutícula durante el ensilado.

Ya que el cefalotórax recubre a los órganos principales que concentran la mayor parte del agua del cuerpo de un camarón, en consecuencia la cantidad de agua es más abundante en las cabezas que en cualquier otra parte del cuerpo (Shirai, 1999). Es por ello que la fase líquida se ve aumentada al utilizar solamente cabezas de camarón en el ensilado, sucediendo lo contrario en ensilados con colas. En el cefalotórax se encuentran órganos con enzimas de toda clase, sobre todo digestivas (proteasas: tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasas; carbohidrasas: amilasas, maltasas, sacarosas y algunas veces celulasas; lipasas: lipasas y estererasas (Bringas, 1999) que son el principal factor de la hidrólisis de los desechos, auxiliadas por la acción del ácido láctico (Shirai, 1999). De ahí la consistencia líquida y poco viscosa de la fracción líquida, debido a la digestión de proteínas, carbohidratos y lípidos.

En el ensilado de colas de camarón existe una menor cantidad de enzimas y agua con respecto a la del cefalotórax, por lo que la acción del ácido láctico se vuelve un poco más abundante que las enzimas presentes en la cola del camarón.

Cira y col., (2002) han reportado que la mayor proporción de proteína se encuentra en la fracción líquida y la obtención de la misma se facilita en el Reactor Estático. Esto es debido a su diseño en columna con una malla de vinilo en la parte inferior (Fig. 10 b), que separa la fracción líquida de la semi-sólida. Cabe resaltar que el uso de este reactor, permitió la mayor obtención de la fracción líquida en ensilados con cabezas de camarón. Su empleo es económico, ya que no requiere de energía eléctrica para estar homogenizando la muestra.

El ensilado puede ser llevado a cabo a temperatura ambiente hasta 35° C. No se adiciona agua, sino únicamente la que existe en la materia prima. Estos dos últimos puntos aplican tanto para el RE como el RD.

No obstante, una limitante al fermentar colas de camarón en el RE fue la dificultad para la homogenización de la fracción semi-sólida, debido a falta de movimiento en éste. Es por ello que probablemente la cantidad de proteína a través de 6 días de fermentación pudo verse modificada. Para evitar este efecto, se realizó el vertido total del ensilado cada 24 h

para homogenizarlo, tomar la muestra y devolverlo nuevamente al reactor. Esta acción mostró la desviación de la fermentación hacia una descomposición. Las bacterias ácido lácticas son anaerobias y el hecho de aerearlas limitó su desarrollo, facilitando el crecimiento de bacterias aerobias descompositoras. Por lo anterior es recomendable utilizar un reactor con paletas que mantenga en movimiento la fracción semi-sólida, cuando se ensilen colas de camarón. Por el contrario, se obtuvieron cantidades abundantes de la fracción líquida al utilizar cabezas de camarón.

#### **b) Reactor Dinámico (RD).**

La recolección de fracción líquida en el ensilado de colas de camarón, no se realizó posteriormente a los dos días de fermentación, debido a la incorporación de ésta en la semi-sólida por el constante movimiento rotatorio del reactor. Por tal motivo, solo se realizó un muestreo de la fracción semi-sólida. Esta recolección fue compleja, pues el reactor no está diseñado para la obtención de muestra semi-sólida. La toma tuvo que realizarse desarmando uno de los costados del reactor, permitiendo un restringido acceso hacia la malla rotatoria donde se encontraba la muestra, mientras que la recolección de la fracción líquida en el ensilado con cabezas se facilita por la presencia abundante de agua en el cefalotórax.

Zakaria y col., (1998) reportaron que la agitación de un ensilado por un RD es particularmente importante durante las primeras etapas de la fermentación, cuando el volumen de la fracción líquida es bajo, sirviendo para contactar las dos fracciones del ensilado: líquida y semi-sólida. Aunque no se sabe que tanto afecte el movimiento en la producción de ácido láctico, el movimiento también podría permitir una disolución del calcio y una evolución continua del bióxido de carbono, generando una atmósfera benéfica para las BAL e inhibición de organismos descomponedores.

La consistencia del ensilado en la fase semisólida durante la fermentación fue tornándose de camarón molido a una textura pastosa, viscosa, pegajosa, de color naranja claro, al contacto con el aire su color se torna naranja-rosado y su olor es casi imperceptible. El color rosado se debió a los pigmentos (astaxantinas) que se encuentran en el tejido y en el exoesqueleto, que al oxidarse con el aire se toman de ese color (Charley, 1982). La consistencia de la fase líquida fue muy similar a la descrita en el RE.

Hall y col., (1985) reportaron que en ensilados de pescado siempre existe una parte semi-sólida que queda sin digerir, probablemente porque existe una resistencia en el acomodo de algunas proteínas a la acción proteolítica de las enzimas presentes en el ensilado. Sin embargo, esta acción no es clara y varios factores pueden estar involucrados. Probablemente el tiempo y la concentración proteínica elevada del ensilado de colas de camarón hayan sido la causa de que no se permitiera una mayor hidrólisis de la fase semi-sólida. Otra explicación por es que la proteína muscular (en su mayoría presente en las colas) estabiliza la unión proteínica por puentes disulfuro, asociaciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Por lo que quizás la digestión de la proteína de la fracción semi-sólida de las colas de camarón fue incompleta en el transcurso de la fermentación. Raa y col., (1976) propusieron que la presencia de lípidos y puentes disulfuro son la causa de la incompleta digestión de ensilados de pescado de áreas frías y que deben de ser considerados los lípidos y puentes disulfuro presentes en la musculatura de pescados de áreas cálidas, para un correcto proceso de ensilado. Posiblemente las enzimas presentes en las colas y la acción del ácido láctico producido por las bacterias ácido lácticas sobre éstas proteínas no sea suficiente para desintegrar algunos polipéptidos, por lo que Hall y col., (1985) propusieron la combinación de enzimas exopeptidasas para una mayor digestión del tejido. Sin embargo, en este estudio solamente se está comparando el uso y resultados obtenidos con los dos diferentes reactores.

El uso de este reactor permite la inclusión de la fracción líquida en la sólida, al ensilar colas de camarón, proporcionando probablemente una cantidad considerable de proteína en los análisis químico proximales. Al ensilar cabezas de camarón se facilita la obtención de la fracción líquida, ya que la malla del tambor rotatorio permite la separación de las dos fracciones. El líquido se contiene en el interior de la coraza de acrílico, cerca del orificio de salida para su recolección (Fig. 11 b y c).

Algunas de las limitantes de su uso son que no permite una obtención mínima de fracción líquida cuando se está trabajando con colas de camarón, debido al movimiento rotatorio intermitente que unifica las dos fracciones líquida y semi-sólida.

Se dificulta la obtención de muestra semi-sólida que se encuentra en el tambor rotatorio, debido a que se tiene que desarmar un lado del reactor para obtenerla. Esto posiblemente afecte el resultado de los análisis químico proximales, pues la homogenización por un tambor rotatorio

no combina suficientemente la muestra para homogenizarla totalmente. Quizá también, se requiera de un reactor con paletas para combinar con mayor precisión toda la muestra y diseñar o rediseñar el reactor para poder obtener muestra semi-sólida.

### 7.1.2 Análisis de Acidez Total Titulable.

En la Figura 16 se muestra la producción de ácido láctico expresada como acidez total titulable (mmol/g) de ensilados con desechos de camarón. Cabe resaltar que las muestras obtenidas de ensilados utilizando cabezas de camarón fueron de la fracción líquida y las de cefalotórax fueron de la fracción semi-sólida. En la Tabla 9 se muestra el análisis de estimación no lineal utilizando el modelo de Gompertz en el programa STATISTICA (Statsoft, Inc.). Este modelo ha permitido analizar datos de producción de ácido láctico (Whiting y col, 1994; Cira y col, 2002), por lo que se utilizó para el análisis de la cinética de datos de Acidez Total Titulable (ATT) de los 4 ensilados (RE-Cabezas; RD-Cabezas; RE-Colas; RD-Colas) de desechos de camarón. En este modelo logístico, el producto es representado por P (ácido láctico), el cuál es una función con respecto al tiempo (t), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P = P_{\max} \exp(-b \exp(-k t))$$

Donde  $P_{\max}$  es la concentración máxima de producto (con  $t \Rightarrow \infty$ ),  $b$  es una constante relacionada con las condiciones iniciales (cuando  $t = 0$ , entonces  $P = P_0 = P_{\max} \exp(-b)$ ) y  $k$  el índice de la constante de acidificación.

Las constantes  $P_{\max}$ ,  $b$  y  $k$  fueron evaluadas de los datos de los ensilados realizados, utilizando el modelo ya mencionado. La velocidad máxima de producción del ácido láctico ( $V_{\max}$ ) fue calculado de los parámetros del modelo de Gompertz como  $V_{\max} = 0.368 k P_{\max}$ . Al obtener los datos del análisis se tiene que los valores de correlación (R) fueron mayores a 0.94 (Tabla 9).

no combina suficientemente la muestra para homogenizarla totalmente. Quizá también, se requiera de un reactor con paletas para combinar con mayor precisión toda la muestra y diseñar o rediseñar el reactor para poder obtener muestra semi-sólida.

### 7.1.2 Análisis de Acidez Total Titulable.

En la Figura 16 se muestra la producción de ácido láctico expresada como acidez total titulable (mmol/g) de ensilados con desechos de camarón. Cabe resaltar que las muestras obtenidas de ensilados utilizando cabezas de camarón fueron de la fracción líquida y las de cefalotórax fueron de la fracción semi-sólida. En la Tabla 9 se muestra el análisis de estimación no lineal utilizando el modelo de Gompertz en el programa STATISTICA (Statsoft, Inc.). Este modelo ha permitido analizar datos de producción de ácido láctico (Whiting y col, 1994; Cira y col, 2002), por lo que se utilizó para el análisis de la cinética de datos de Acidez Total Titulable (ATT) de los 4 ensilados (RE-Cabezas; RD-Cabezas; RE-Colas; RD-Colas) de desechos de camarón. En este modelo logístico, el producto es representado por P (ácido láctico), el cuál es una función con respecto al tiempo (t), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P = P_{\max} \exp(-b \exp(-k t))$$

Donde  $P_{\max}$  es la concentración máxima de producto (con  $t \Rightarrow \infty$ ), b es una constante relacionada con las condiciones iniciales (cuando  $t = 0$ , entonces  $P = P_0 = P_{\max} \exp(-b)$ ) y k el índice de la constante de acidificación.

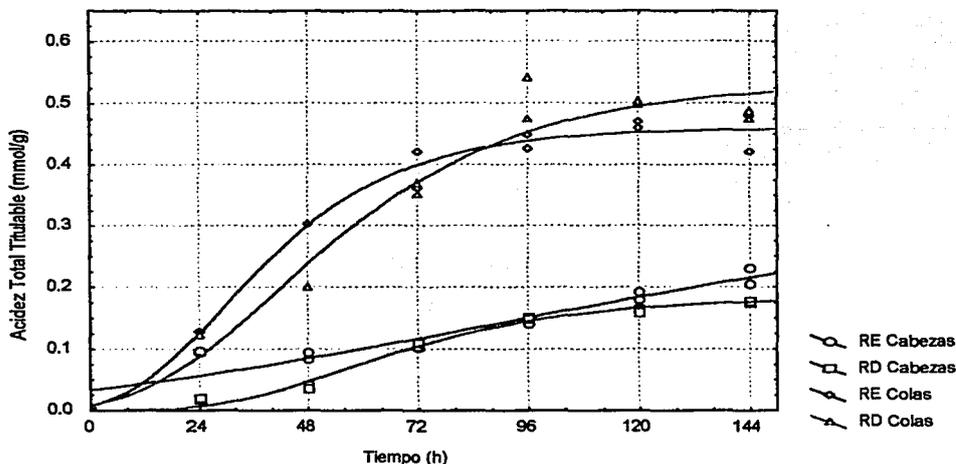
Las constantes  $P_{\max}$ , b y k fueron evaluadas de los datos de los ensilados realizados, utilizando el modelo ya mencionado. La velocidad máxima de producción del ácido láctico ( $V_{\max}$ ) fue calculado de los parámetros del modelo de Gompertz como  $V_{\max} = 0.368 k P_{\max}$ . Al obtener los datos del análisis se tiene que los valores de correlación (R) fueron mayores a 0.94 (Tabla 9).

**Tabla 9. Constantes cinéticas para experimentos de acidificación, de acuerdo con el modelo de Gompertz.**

Condición de Fermentación	$V_{\max}$ (mmol/g/h)	$P_{\max}$ (mmol/g)	$b$	$k$ (h <sup>-1</sup> )	R
1.- RE Cabezas Fracción líquida	0.00141	0.385796	2.435268	0.0099324	0.9471
2.- RD Cabezas Fracción líquida	0.00249	0.183151	7.933371	0.036923	0.9951
3.- RE Colas Fracción semi-sólida	0.00788	0.459825	3.968097	0.046552	0.9943
4.- RD Colas Fracción semi-sólida	0.00658	0.532686	4.028556	0.033563	0.9833

Se observó que la  $V_{\max}$  y la  $P_{\max}$  fueron mayores en los ensilados con colas (RE-Colas y RD-Colas) evaluados en la fracción semi-sólida, con valores de  $V_{\max}$  de 0.00788 y 0.00658 mmol/g/h, y valores de  $P_{\max}$  de 0.0459825 y 0.532686 mmol/g, respectivamente. Contrariamente, aquellos ensilados con cabezas evaluados en la fracción líquida (RE-Cabezas y RD-Cabezas) obtuvieron valores menores de  $V_{\max}$  de 0.00141 y 0.00249 mmol/g/h, y valores de  $P_{\max}$  de 0.3858 y 0.183151 mmol/g. Se encontró que las diferencias fueron considerablemente mayores en los valores de  $V_{\max}$  y  $P_{\max}$  en ensilados de colas que en cabezas, independientemente del reactor (Fig. 13).

Cira y col. (2002) reportaron la evaluación de la  $P_{\max}$  y  $V_{\max}$  en ensilados de desechos de camarón (cabezas) utilizando con diferentes inclusiones de fuentes de carbono en un RE, fluctuaron entre 0.190-0.520 de  $P_{\max}$  y 0.0043-0.0077 de  $V_{\max}$ . Estos valores son cercanos a los reportados en la Tabla 9. Las constantes de acidificación,  $k$ , indican qué tanto tardan los ensilados, bajo ciertas condiciones, el alcanzar los valores de  $P_{\max}$ . Debido a que  $k$  es el inverso proporcional del tiempo, entre más pequeño sea el valor de  $k$ , mayor el tiempo que tarda en obtener su  $P_{\max}$  y viceversa. Esto quiere decir que el valor de una  $k$  pequeña como 0.009932 h<sup>-1</sup> del ensilado de RE-cabezas representa una acidificación lenta, tal vez por la presencia de alguna sustancia en las cabezas que no le esté permitiendo actuar al ácido láctico. Mientras que las demás  $k$  de RD-cabezas, RE-Colas y RD-Colas, muestran valores entre 0.03356-0.04655 h<sup>-1</sup>, siendo valores más altos, por lo tanto llevan a acabo una acidificación más rápida.



**Fig.13** Evolución de la Acidez Total Titulable durante la fermentación ácido láctica de desechos de camarón, en un reactor estático (RE) y dinámico (RD).

Existen dos factores que probablemente puedan explicar este comportamiento de la cinética de ATT: a) Evaluación de las muestras en fracción líquida para ensilado con cabezas y fracción semi-sólida para ensilados con colas y b) El uso de diferente materia prima (cabezas y colas).

a) Las dos fracciones, líquida y semi-sólida, son separadas en los RE y RD con mayor efectividad en el primero que en el segundo, debido a los diseños de los mismos. El hecho de haber evaluado las dos fracciones obtenidas permitió analizar cual de los dos reactores es mucho más eficaz en la producción de ATT. Si bien la materia prima utilizada es un agente importante que afecta la producción del ácido láctico, el diseño del reactor brinda las condiciones ambientales para el desarrollo del ensilado, por lo que es importante notar el efecto de los diseños de los reactores en el ensilado.

Los dos reactores permiten la separación de las dos fracciones, líquida y semi-sólida. Sin embargo, por su diseño en columna el RE (Fig. 10) facilita el escurrimiento de la fracción líquida hacia la parte inferior del reactor, llevando en su paso por la fracción semisólida, proteínas, pigmentos, lípidos, calcio entre otros minerales que están siendo separados de su

conformación natural por la acción de enzimas presentes y del ácido láctico. Todo ello, se disuelve en la fase líquida, sobre todo el calcio. Este efecto también sucede en el RD, solo que en diferente manera, pues la muestra se mantiene en movimiento en el tambor rotatorio (Fig. 11), escurriéndose la fracción líquida en menor proporción, ya que se encontraba homogenizándose continuamente en la fracción semi-sólida por el movimiento rotatorio del reactor.

Según Zakaria y col (1998) realizaron en un ensilado de desechos de *Nephrops norvegicus* (langosta Noruega) en un RD, evaluando el % ATT en la fracción líquida durante 6 días, observando una considerable capacidad amortiguadora en el pH hacia el área básica y una disminución del % ATT durante las primeras horas, lo cual fue provocado por la disolución del calcio hacia la fracción líquida. Esto fue mayormente explicado por la presencia de un 61 % calcio diluido en la fracción líquida, valor aproximado de la diferencia del calcio inicial en el ensilado de los desechos de langosta Noruega.

Cira y col., (2002) en un ensilado de desechos de camarón (cabezas) en RE durante 90 días, encontraron un efecto inversamente proporcional entre el contenido de calcio en la fase semi-sólida y líquida. En los primeros 6 días hay una disminución amplia de calcio en la fracción semi-sólida hacia la líquida, mostrándose un aumento del calcio en ésta.

Estos estudios son evidencia que la ATT se puede ver contrarrestada en la fracción líquida, por la acción amortiguadora del calcio disuelto, independientemente del reactor utilizado.

La elevada cantidad de mmol/g de ATT en ensilados con colas de camarón se podría explicar de la siguiente manera. Se han encontrado indicios en donde después de la muerte de los peces, su músculo se puede ver afectado por lo que se conoce como "rigidez cadavérica", provocada por los esfuerzos que hacen los animales (peces; crustáceos) antes de morir, por la falta de oxígeno y la temperatura elevada. Este estrés de captura y de transporte provoca una disminución del pH del tejido muscular del pescado, transformando el glucógeno muscular (abundante en los crustáceos (Charley, 1982)) en ácido láctico (Frazier y col., 1993). No obstante, durante la rigidez cadavérica, que bien puede ayudar al aumento de ácido láctico en un ensilado con colas de camarón, se encontraron valores que indican que en un ensilado de cabezas de camarón se puede producir casi la misma cantidad de ATT que con colas. Cira y col., (2002) evaluaron la

fracción semi-sólida de ensilado de camarón con cabezas en un RE, encontrando valores de 4-5 mmol/g de ATT en los primeros 10 días de la fermentación, coincidiendo aproximadamente con los valores obtenidos en RE-Colas y RD-Colas evaluadas en la misma fracción a las 144 h de fermentación. Lo anterior muestra que la cantidad de ácido láctico en la fracción semi-sólida se podría detectar con mayor precisión debido a la ausencia de calcio que enmascara la presencia del ácido, como en la fracción líquida en RE-Cabezas y RD-Cabezas (Fig. 13,) independientemente de la materia prima utilizada. Sin embargo, la producción de ácido láctico entre RD- Cabezas y RD-Colas (Fig. 13) muestra una diferencia amplia en la producción de ácido láctico y muy probablemente se deba a la diferente materia prima, anteriormente explicado. Debido a que se utilizaron cabezas y colas de camarón como desechos, indiferentemente de sus especies, esto podría estar dando como resultado una disparidad en la presencia en la producción del ATT en el ensilado. Se tendrían que realizar diversos estudios con diferentes especies de desechos de camarón para conocer certeramente este dato. Sin embargo, en este trabajo se cumplió con el objetivo de monitorear la ATT a lo largo de diferentes fermentaciones en dos reactores RE y RD.

La producción de ATT muy probablemente se vea influenciada por las especies de camarón utilizadas, su estadio, el estrés de captura al que se vean sometidos los organismos, etc., variando así la cantidad de glucógeno en su cuerpo, en caso de que se utilicen colas de camarón enfermas o lastimadas.

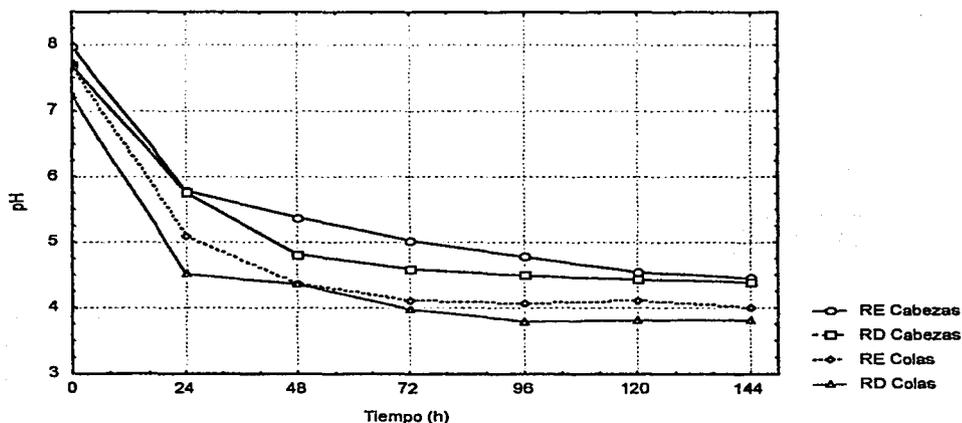
### 7.1.3 pH

En la Figura 14 se muestra la evolución del pH a través de las 4 fermentaciones con desechos de camarón. El descenso del pH es inversamente proporcional a la producción de ATT, conforme se va produciendo ácido láctico; el pH en las 4 muestras desciende en las primeras 24 h entre 4.51-5.79 y a las 48 h entre 4.36-5.38, hasta llegar a valores de 3.81-4.45 a las 144 h. En RE-Cabezas y RD-Cabezas evaluadas en fracción líquida, los valores de pH se encuentran entre 4.39-4.45 a las 144 h, mientras que en el ensilado de RE-Colas y RD-Colas es de 3.81-3.99, respectivamente.

Probablemente las colas de camarón usadas en los ensilados fueron sometidas a un alto estrés de captura, lo cual permitió que el pH en la musculatura de la cola descendiera por el ácido láctico

producido en los momentos de captura y durante el ensilado. Un comportamiento similar se muestra en la evolución del pH de la fermentación del RE con colas, aunque se obtiene un pH ligeramente más elevado.

Cabe recordar que las muestras obtenidas del RE-Cabezas y RD-Cabezas fueron de la fracción líquida y las muestras obtenidas para el RE-Colas y RD-Colas fueron de la fracción semisólida.



**Figura 14.** Evolución de pH durante la fermentación ácido láctica de desechos de camarón en un reactor estático (RE) y dinámico (RD).

Los ensilados de RD-Cabezas y RE-Cabezas se encuentran entre un pH de 4.39-4.45 a las 144 h, lo que podría indicar que existe una acción amortiguadora del pH y de la producción de ATT (Tabla 9). Como se mencionó anteriormente, el calcio disuelto de la cutícula del cefalotórax en la fracción líquida podría ser la causa amortiguadora del descenso del pH. Es importante considerar que en el cefalotórax se encuentra una gran cantidad de cutícula (aprox. 50-55 % de todo el camarón (Cañipa, 1993)) y por ende de calcio, ya que se encuentra conformada por éste.

Por el contrario, el descenso del pH en ensilados de RE-Colas y RD-Colas se ve beneficiado también por una alta cantidad de proteínas que se fueron hidrolizando a aminoácidos durante el ensilado, pudiendo aumentar así la acidez del mismo; tal vez se deba también a una alta cantidad de proteína presentes en éstos.

Cira y col., (2002) indicaron que la evolución del pH llega a ser de 4.2 a las 144 h en un ensilado de RE-Cabezas evaluado en la fracción semi-sólida, obteniéndose aquí, un valor ligeramente superior de 4.58 a las 144 h con un ensilado de RE-Cabezas. Quizás el aumento del pH se deba a la cantidad de calcio que se va diluyendo hacia la fase líquida.

Zakaria y col., (1998) presentaron la evolución del pH de muestras evaluadas en la fracción líquida, a lo largo de un ensilado de desechos de langosta en un RD durante 6 días. Ahí se observó que el pH disminuyó rápidamente a 5 durante las primeras 48 h, pero en las siguientes horas el pH se incrementó hasta 6.6, dando como explicación, la capacidad amortiguadora del calcio diluido en la fracción líquida. Debido a que el exoesqueleto o cutícula de camarón tiene una menor cantidad de calcio (14.6- 15.9 % en Cira y col., 2002) que la langosta (20.80 % en Zakaria y col., 1998), la disolución del calcio en la fracción líquida en los ensilados de cabezas de camarón no muestra un aumento abrupto del pH hacia el área básica como lo menciona Zakaria y col., (1998).

#### **7.1.4 Liofilización (Secado en Frío).**

En el inciso 6.22 se describió el proceso de liofilización, llevado a cabo en el licor almacenado de desechos de camarón mexicano, para transportar las muestras fácilmente y poder incluirlas en un alimento pelletizado.

Su olor es muy penetrante, su consistencia es la de un polvo fino, color naranja-rosado y al contacto con la humedad el polvo se vuelve pegajoso e higroscópico. No hay cambio aparente en las proteínas, ya que se está extrayendo el agua de la muestra por medio de sublimación.

Se obtuvieron alrededor de 250 g de ensilado liofilizado por litro de ensilado líquido. La desventaja de la liofilización es que es un proceso muy lento y caro, por lo que se recomendaría otro proceso de secado y evaluar los cambios de la consistencia del ensilado después de éste; un ejemplo de secado barato podría ser el sol.

### 7.1.5 Pasteurización.

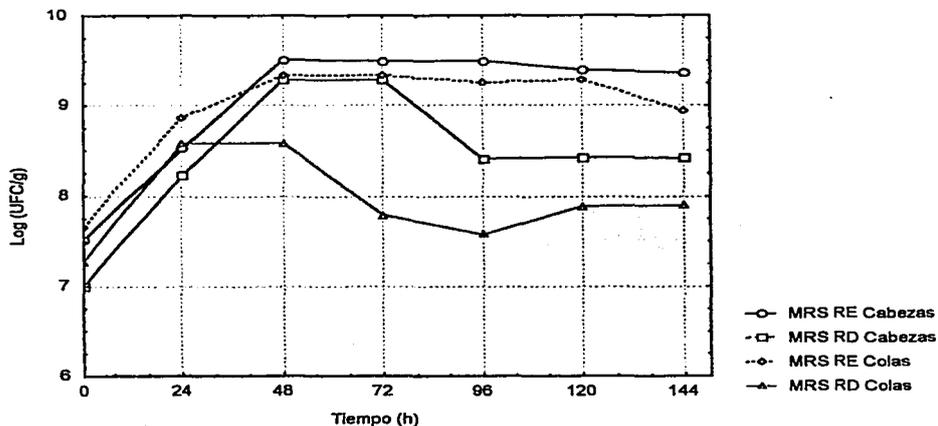
En el inciso 6.2.3 se describe el proceso de pasteurización en el licor almacenado de desechos de camarón mexicano. Su consistencia se vuelve más soluble, el color del licor se torna a café claro, el olor es poco intenso a fermentado. Se realizó este tratamiento calórico para conocer el efecto sobre los microorganismos, ya que es un proceso bien conocido para la eliminación de éstos y de agentes virales. Se sabe que a una temperatura de más de 60° C durante 1 o 3 minutos, se desnaturalizan las proteínas (Macrae y col., 1993).

### 7.1.6 Análisis Microbiológico.

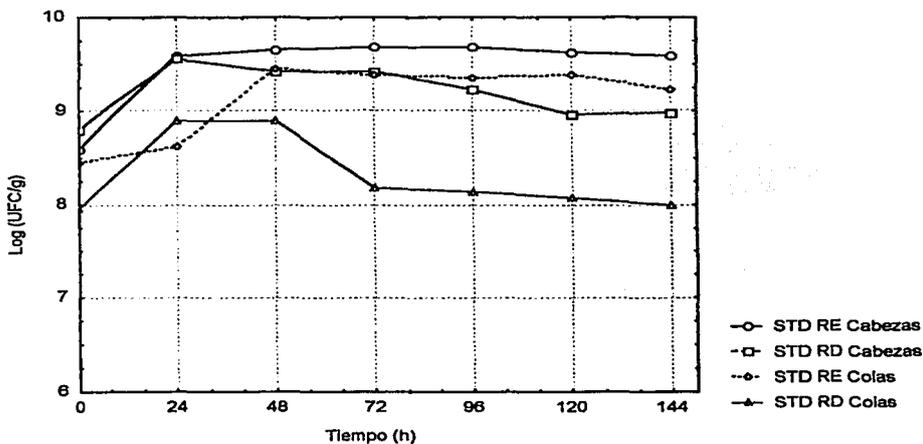
*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Micrococcus* se han identificado como la microflora de putrefacción del camarón proveniente del Golfo de México. De estos microorganismos, *Pseudomonas* es particularmente importante por su actividad proteolítica, acelerando la putrefacción (Shirai, col., 2001). Se conoce que el crecimiento de microorganismos puede ser controlado con factores ambientales tales como el pH, la actividad del agua (AW), temperatura y disponibilidad de oxígeno (Owen y col., (1997); En: Shirai y col, (2001)). La caracterización microbiológica se acota en este trabajo a las cuentas microbiológicas de los 4 ensilados realizados con respecto al crecimiento de: a) Bacterias ácido lácticas (BAL) en medio MRS (según Man, Rugose y Sharpe) y b) Aerobios totales en medio estándar (Fig. 15a y b).

No se presentaron crecimientos de coliformes debido a las características químicas de los ensilados, los cuales no permitieron su desarrollo, brindando un producto eficaz en la eliminación de estas bacterias. Presser y col., (1997) reportaron un modelo de crecimiento de *Escherichia coli* como una función de pH y concentración de ácido láctico y Harris y col., (1989) reportaron la actividad antimicorbiana de bacterias ácido lácticas en contra de *Listeria monocytogenes*, encontrándose en ambos estudios una disminución de *E. coli* y *L. monocytogenes* debida a la actividad de ácido láctico en las células sensibles y a la disminución del pH, que permiten un mejor desarrollo de las BAL en un pH entre 4 y 5 (Cira, 2000). Por tal razón, se puede obtener una mayor producción de ácido láctico y un descenso en el pH, que limite el crecimiento de bacterias descomponedoras y la acción de agentes virales. También se realizó un estudio por Moon y col., (1982), evaluando la acción de las BAL para extender la

vida de anaquel del camarón, encontrándose que existe una acción inhibitoria del crecimiento de *Pseudomonas* y de *Vibrio parahaemolyticus*; se corroboró que el uso de ácido láctico o BAL que lo produzcan en una muestra de materia orgánica, limita o mantiene el crecimiento de microorganismos descomponedores.



a) Evolución del crecimiento de bacterias ácido lácticas en ensilados de desechos de camarón en medio MRS (Man, Rogose Sharpe).



b) Evolución del crecimiento de aerobios totales en ensilados de desechos de camarón en medio Estándar.

**Figura 15.** Evolución del crecimiento de microorganismos en ensilados de desechos de camarón, a través de 6 días de fermentación.

Además de los factores ambientales como bajo pH, Aw y producción del ácido láctico, se conoce que las BAL producen bacteriocinas, que son compuestos proteínicos antimicrobianos que poseen una actividad inhibitoria o bactericida en contra de un limitado rango de microorganismos que usualmente están cercanamente relacionados a la bacteria productora de estas sustancias (Giraffa y col., 1989; y Barnby-Smith, 1992).

*Lactobacillus plantarum* SIK-83 produce una bacteriocina designada como plantaricin SIK-83, la cual se adhiere a células sensibles provocando lesiones en la membrana celular, resultando en la lisis de la célula. No se adhiere a BAL no sensibles y bacterias Gram-negativas (Andersson y col., 1988). Aunque existe la actividad de bacteriocinas en el ensilado que controla el crecimiento de microorganismos descomponedores, su actividad se puede ver aminorada por enzimas proteolíticas (Harris y col., 1989). Shirai y col., (2001), en un ensilado de desechos de camarón (cabezas), muestra resultados opuestos a los presentados en este trabajo; cuentas de coliformes que se vieron fuertemente afectadas por la acción del ácido láctico. Sin embargo, después de 72 h las cuentas incrementaron debido al uso total de la glucosa, previniendo la producción de ácido láctico y reduciendo la inhibición.

En la Figura 15a se muestra la evolución de las cuentas de BAL (*L. plantarum*) en medio MRS, a través de 6 días en los 4 ensilados realizados. El inóculo inicial se encuentra entre  $1 \times 10^7$ - $4.7 \times 10^7$  UFC/g de BAL, mientras que en b) se muestra la evolución de los aerobios totales en medio estándar, con un valor similar y mayor de entre  $9.1 \times 10^7$ - $6.4 \times 10^8$  UFC/g. Este aumento es debido a que en las en las cuentas de aerobios totales se cuantifican también a las BAL que también tienen la capacidad de crecer en este medio. Es notable que todas las cuentas muestran un crecimiento normal logarítmico en las cuentas de a) y b) en la Fig. 15; en RE-Cabezas y RD-Cabezas y RE-Colas se mantienen las cuentas entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC/g, en tanto que las cuentas de RD-Colas se encuentra entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/g. Este crecimiento tan amplio de las BAL permite suponer que la producción de ácido láctico es sumamente alta, sin embargo, el crecimiento que se muestra en las BAL en RE-Cabezas, RD-cabezas tienen una acidez total titulable a las 144 h de 0.2185 y 0.1767 mmol/g, respectivamente (Fig. 16), valores menores a los obtenidos con un crecimiento de BAL en RE-Colas y RD-Colas, existiendo una diferencia poco mayor del doble con valores de 0.4508 y 0.4821 mmol/g a las 144 h.

Lo anterior indica que independientemente del crecimiento de BAL, la producción del ácido láctico puede verse afectado por la presencia de Calcio y la actividad proteolítica de enzimas endógenas y producidas por los mismos microorganismos (Shirai y col, 2001). La actividad inhibitoria del ácido láctico es mucho mayor en valores bajos de pH, ya que su difusión a través de la membrana en una forma no ionizada y la disociación subsecuente dentro de la célula provoca una disfunción en el proceso metabólico (Shirai y col, 2001).

Los valores de cuentas de BAL y aerobios totales en ensilados de camarón con cabezas; almacenado y pasteurizado, se encuentran muy similares de entre  $3.8$  y  $3.6 \times 10^8$  UFC/g en ensilado almacenado y  $2.42$  y  $2 \times 10^8$  UFC/g en ensilado pasteurizado, presentando valores de ATT de  $0.1555$  y  $0.1442$  mmol/g respectivamente. Esto significa que al ser sometidos a un cambio físico de extracción de agua por sublimación y un tratamiento calórico por pasteurización, las cuentas microbiológicas disminuyen por un ciclo a  $10^8$  UFC/g. La cantidad de ácido láctico es un poco menor que la presente en RE-Cabezas y RD-Cabezas, sin embargo, es suficiente para mantener un ensilado de desechos de camarón sin descomponerse y sin presencia de bacterias coliformes.

Los valores de a) y b) en la Fig. 15 son bastante similares, sin embargo, los de b) son ligeramente mayores y se encuentra limitado su desarrollo por los factores ambientales del pH, ATT, bacteriocinas, pero también por la actividad de agua (Aw). Todos los organismos vivos requieren de cierto valor mínimo para llevar a cabo su actividad biológica y las actividades que requieren *Pseudomonas* y *Acinetobacter* son de  $0.97$  y  $0.96$ , respectivamente (Jay, 1996; En: Cira, 2000). En general, los hongos requieren de bajas actividades de agua, seguidos por las levaduras y por último las bacterias, las cuales son las más exigentes (Cira, 2000).

Las BAL también se pueden ver afectadas por la Aw, por lo que reducción de agua puede contribuir a la selección de una microflora láctica. Los mínimos valores de Aw para el crecimiento varían considerablemente entre grupos, siendo más bajas para especies de *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sake* se adaptan a nichos ecológicos especiales con

$Aw \leq 0.93$  (Lücke, 1995; En: Cira, 2000). Shirai y col., (2001) presentaron diversos valores de Aw en ensilados de desechos de camarón a las 48 h de fermentación, adicionando glucosa al 10 % y 5 % de inóculo de diferentes *Lactobacillus*, mostrando valores entre  $0.965$ - $0.972$  de Aw e indicando que el desarrollo de la actividad de agua en un ensilado permite el desarrollo de

*Pseudomonas* y *Acinetobacter*; sin embargo, esta actividad de agua disminuye a lo largo del ensilado (Cira, 2000) debido a la utilización y descenso de la fuente de carbono, inhibiendo algunos microorganismos descompositores.

Aunque en este trabajo no se determinaron los valores de  $A_w$ , ésta mide los cambios iónicos en el agua. Por tal razón, es importante mencionar que el hecho de utilizar sacarosa en el ensilado como fuente de carbono, modifica las condiciones osmóticas e iónicas en las células de los microorganismos presentes. Esto significa que se limita su desarrollo, siendo quizá un factor más que permite que no se lleve a cabo la descomposición de los desechos de camarón, sino que sean fermentados.

#### **7.1.7 Análisis Químico Proximal.**

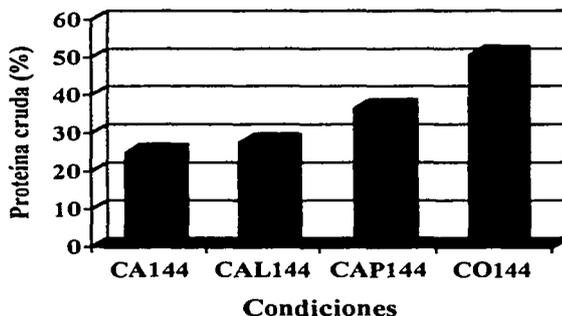
Una vez realizado el ensilado se determinó la composición químico proximal de desechos de camarón con especial énfasis en el porcentaje de Proteína Cruda (PC), en dos ensilados diferentes en RE y RD: RE-Cabezas (fracción líquida) y RD-Cola (fracción semi-sólida). Este análisis se realizó con el motivo de conocer si el producto final del ensilado puede ser una nueva fuente alterna de proteína para sustituir la harina de pescado en dietas acuícolas, pues se ha vuelto un producto escaso y de alto costo. Cira y col., (2002) indicaron que en un ensilado de desechos de camarón la fracción líquida es la que contiene una mayor cantidad de proteína, a consecuencia de la acción lítica de las enzimas y del ácido láctico presentes en el ensilado, sobre la fracción semi-sólida, principalmente de enzimas digestivas como proteasas (Bringas, 1999; Shirai, 1999). Por el contrario, la fracción semi-sólida muestra un decremento en la cantidad de proteína, ya que ésta se diluye hacia la fracción líquida.

El uso de dos reactores estático (RE) y dinámico (RD) ha permitido definir cuál de los dos es mejor para obtener la fracción líquida (RE) y el mejor para mantener las dos fracciones homogéneas (RD).

Los efectos de almacenaje en ensilados de pescado y camarón sobre su calidad nutricional son poco conocidos. Sin embargo, se ha demostrado que un ensilado de pescado se puede almacenar hasta 1.5-2 años, aunque es necesario adicionar antioxidantes para prevenir la oxidación

(Aranson, 1994). En este trabajo también se analizaron ensilados de desechos de camarón con diferentes presentaciones como: almacenaje por 7 meses a 4 ° C, liofilización y pasteurización. En la Figura 16 se observa la gráfica del análisis químico proximal del ensilado de RE-Cabezas, en su fracción líquida, con muestras de 144 h (T6) en cuatro diferentes presentaciones. Ensilado de cabezas de camarón almacenado (CA); ensilado de cabezas de camarón almacenado liofilizado (CAL); ensilado de cabezas de camarón almacenado pasteurizado y liofilizado (CAPL) y ensilado de colas de camarón (CO). Los resultados proporcionados son en base de 90 % de materia seca y 10 % de humedad. Debido a la escasez de muestra, solamente se realizaron análisis del T6  $\Rightarrow$  144 h.

El porcentaje de proteína en las muestras CA fue de 24.94 % y CAL de 27.60 %; ambos resultaron muy similares, teniendo solamente una diferencia de 2.66 %. EL aumento en CAL probablemente se deba a la previa concentración de la proteína en la muestra, al extraer el agua por medio de la liofilización.



**Figura 16.** Análisis de Proteína Cruda en cabezas y colas de camarón a las 144 h de fermentación, en ensilados de desechos de camarón.

Los valores obtenidos de proteína en la fracción líquida son mayores con respecto a los datos descritos por Zakaria y col. (1998) y Cira y col., (2002) en ensilados de desechos langosta y de camarón evaluados en la fracción semi-sólida de 17.63 % y 16.5 % de PC, respectivamente.

Este incremento de PC es más notable cuando se observa el valor de CAPL de 36.50 %; este aumento de 8.9 % es respecto a los valores de CAL. Quizá se deba al desdoblamiento,

separación y dilución de proteínas en la fracción líquida por la acción calórica y de enfriamiento de la pasteurización, siendo similar este dato con lo reportado por Plascencia (2000), en un ensilado en RE-Cabezas de camarón con duración de 56 días, donde el contenido de PC es de 35.96 %. Al comparar estos dos datos, se podría sugerir que tanto la acción del tiempo como el proceso de pasteurización, permiten que exista una cantidad similar de PC entre 35 - 36 %.

Se conoce que a través de una fermentación se tiene una pérdida de PC con respecto a la PC inicial en la materia prima, en este caso, cabezas o colas de camarón. Esto se debe a la licuefacción de proteína en la fracción semi-sólida, recolectándose en la fracción líquida. Por lo anterior se compara la fracción semi-sólida de un RD con la líquida de un RE representada en la última columna del lado izquierdo en la Fig. 16, siendo colas de camarón fermentadas (CO). Es evidente que existe una mayor cantidad de proteína en el ensilado de CO de camarón fermentadas a las 144 h con 50.72 % de PC, a comparación con 24.94 % de PC en CA. Sin embargo, lo esperado era encontrar un valor de PC similar al obtenido en CA, ya que la proteína a través del tiempo se diluye hacia la fracción líquida, siendo su presencia cada vez menor en la fracción semi-sólida. No obstante, se debe de tomar en cuenta que la materia prima utilizada fue de colas de camarón, donde la proteína es mucho mayor que en las cabezas. Es por ello es que el porcentaje de PC en las CO se ve elevado por poco más del doble.

Los resultados del análisis químico proximal del ensilado de colas de camarón en un RD, evaluadas en la fracción semi-sólida, se muestran en la Tabla 10. El evento de reducción de proteína de la fracción semi-sólida a través del tiempo es menor en un RD que en un RE, ya que parte de la fracción líquida se mantiene incluyéndose en la fracción semi-sólida por el movimiento rotatorio del reactor.

En la Tabla 10 se observan 4 muestras de ensilado de colas de camarón, en diferentes tiempos: colas molidas de camarón (CO); colas ensiladas de camarón a las 24 h (CO-24 h); colas ensiladas de camarón a las 48 h (CO-48 h) y colas ensiladas de camarón a las 144 h (CO-144 h). El porcentaje de PC en las colas molidas sin ensilar es alto, siendo de 71.70 % disminuyendo a 34.95 % en CO-24 h, hasta 26.40 % en CO-48 h. En el tiempo de 144 h se obtiene un porcentaje de 50.72 % de PC, lo cuál es poco lógico, después de considerar que hay una reducción de proteína en la fracción evaluada, hacia la fracción líquida.

Existió el factor de la dificultad que hubo para obtener la muestra semi-sólida del RD, ya que cada 24 h se tuvo que desarmar, una parte lateral del reactor para poder acceder al tambor rotatorio, donde la fracción semi-sólida estaba contenida. Este hecho limitó en gran parte la homogenización adecuada al momento de la toma de la muestra. Por lo tanto, muy probablemente la última toma de muestra se haya visto influenciada por el desarmamiento total del reactor, lo cual facilitó la homogenización total de la fracción semi-sólida. El resultado de una homogenización incompleta, con una completa al tomar la muestra, fue una mayor cantidad de PC a las 144 h que en las 48 h. Esto indica que se requiere de una modificación del diseño del reactor dinámico (RD) para poder obtener con facilidad muestra semi-sólida del tambor rotatorio incorporado dentro del reactor.

**Tabla 10.** Análisis químico proximal del ensilado de colas de camarón en un reactor dinámico, en la fracción semi-sólida.

	Base 90 %			
	CO	CO-24 h	CO-48 h	CO-144 h
Materia Seca %	90 %	90 %		90 %
Humedad %	10 %	10 %		10 %
Proteína Cruda (Nitrógeno 6.25)	71.70 %	34.95 %	26.40 %	50.72 %
Extracto Etéreo	---	---	---	3.60 %
Cenizas	---	---	---	5.94 %
Fibra Cruda	---	---	---	2.60 %
Extracto Libre de Nitrógeno	---	---	---	27.17 %
pH	7.5	5.09	4.37	3.99
% ATT	----	1.15	2.73	4.06

Nota: CO= Colas de camarón molido; CO-24 h = Ensilado de colas de camarón de 24 h.; CO-48 h = Ensilado de colas de camarón de 48 h; CO-144hrs. = Ensilado de Camarón de 144 h. Base seca.

Cabe mencionar que las colas de camarón no tienen las mismas características en sus componentes químicos como las cabezas, debido a que las colas tienen más tejido muscular conformado por proteínas fibrosas complejas. Las colas de camarón aquí utilizadas presentaron 74.72 % de PC, valor mucho mayor con respecto a lo reportado por Charley, H., (1982), de 18.1 % PC. Sin embargo, este dato puede variar dependiendo de la especie de camarón usada, estadio, conservación de la cola de camarón, etc.

Plascencia (2000) reportó un valor de 49.65 % de PC en las cabezas de camarón, indicando que las colas de camarón contienen una mayor cantidad de proteína que las cabezas.

Dados los resultados, faltaría por conocer los análisis proximales de cabezas de camarón en RD y de colas de camarón en RE, con ello se conocería con más precisión con cuál de los

dos reactores es más eficiente la obtención de fracciones altas en proteína al procesar colas enfermas y cabezas de camarón. No obstante, es contundente observar que cualquiera de los dos reactores con las dos muestras utilizadas (cabezas y colas) permiten obtener fracciones con un porcentaje considerable de PC, en fase semi-sólida y líquida dentro de los rangos requeridos para alimento de camarón de 20-45 % de proteína (El Pedregal, Silver Cup, 2001), sugiriendo el uso del producto como suplemento alimenticio en dietas acuícolas, en particular de camarón.

Hardy, (2000) menciona que "sí tan solo se procesaran los desperdicios de la industria pesquera en alimento para peces, la cantidad sería equivalente a la producción anual de alimento para peces y potencialmente proveería significativamente proteínas y aceites de peces para alimento acuícola. Sin embargo, el alto contenido de cenizas y problemas logísticos sobre la colecta y procesamiento limitaría el total aprovechamiento del recurso".

Plascencia y col, (2002) utilizaron la fracción líquida del ensilado de cabezas de camarón en RE como suplemento alimenticio para tilapia *Oreochromis niloticus*, obteniendo resultados de crecimiento muy alentadores para su incorporación en dietas acuícolas.

### 7.1.8 Análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en ensilados de desechos de camarón.

Desde 1992, el virus de la Mancha Blanca (WSSV) ha causado estragos en cultivos de camarón Asiáticos debido a las grandes pérdidas ocasionadas. En 1995 se registró por primera vez la presenciadle virus en Texas y Carolina del Sur, E.U.A., para 1999 el virus ya se había expandido hacia cultivos de Nicaragua, Honduras, Guatemala, México, Panamá, Colombia, Perú y Ecuador (Durand y col., 2000).

Esta transmisión tan rápida del virus se debe a varias razones: el transporte por humanos y animales (aves principalmente que van de estanque a estanque o del área silvestre a los estanques), transporte terrestre, marino, aéreo o a través de cargamentos congelados de productos alimenticios infectados, en este caso camarón (Nunan y col., 1998).

Los sistemas de cultivo más utilizados hoy en día son el semi-intensivo (densidad de post-larva por m<sup>2</sup> de 5-20) y el intensivo (densidad de post-larva por m<sup>2</sup> de 20-50); las altas densidades de cultivo y el uso de un monocultivo fomenta la transmisión de muchas enfermedades entre las poblaciones cultivadas e inclusive poblaciones silvestres (Lightner, 1993; Moore y Band, 1993). También los efluentes de industrias pesqueras y sus desechos sólidos que son liberados sin un tratamiento adecuado a zonas alledañas como cuerpos de agua locales y terrenos alledaños a la costa (Nunan y col., 1998). Todo ello ha llevado a una rápida transmisión no solamente en cultivo de camarón, sino en otros peces y crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii*, camarón de agua dulce que se consideraba menos susceptible a las enfermedades de camarón marino (Peng y col., 1998).

Se ha tratado de conocer con más detalle las características del virus de la Mancha Blanca (WSSV), su desarrollo, método de infección, propagación, etc., para encontrar métodos profilácticos y /o eliminación. Aunque se conoce poco acerca del método de infección, se han realizado estudios muy diversos de transmisión del WSSV: por ejemplo, Soto y col., (2001) realizaron un bioensayo con camarón para conocer las posibles vías de transmisión y su eficacia cuál era la más eficaz, encontrando que la cohabitación resultó ser menos dañina que la ingestión de cadáveres de camarón enfermo (canibalismo).

Por tal razón se ha optado utilizar el ensilado de desechos de camarón (cabezas desechadas y colas que no puedan ser comercializadas por enfermedad o maltrato) como un tratamiento para procesar adecuadamente los desechos y puedan ser reciclados.

Desde 1993 dentro de los diagnósticos biotecnológicos se han creado pruebas basadas en el ADN; como las utilizadas en humanos y en medicina veterinaria. Se han desarrollado también para algunas enfermedades virales de camarones pencidos (Durand, 1996). Una de esas pruebas implementadas y desarrolladas es el análisis por PCR, el cual es altamente sensible y específico para detectar la presencia del ADN en cuestión, permitiendo además un rápido diagnóstico (Durand y col., 2000; Chou y col, 1998).

Con el fin de determinar la presencia del WSSV en el ensilado de cabezas y colas de camarón mexicano y colas de camarón infectadas con virus WSSV procedentes de Honduras, se realizaron análisis de PCR anidado, llevándose a cabo en la Unidad de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

En los diferentes laboratorios de México donde se lleva a cabo la detección del WSSV, el diagnóstico molecular se utilizan por lo menos 3 diferentes técnicas de PCR, lo cual trae como consecuencia una falta de certeza en los resultados obtenidos, sobre todo por la evidencia de cepas variantes que no han sido totalmente caracterizadas. Sin embargo, el método mediante el cual se llevaron a cabo los análisis moleculares en este trabajo, esta ampliamente avalado por la compañía DiaXotics.

Una de la hipótesis del trabajo es que la actividad del ácido láctico y los bajos valores de pH llevados a cabo en la fermentación ácido láctica (ensilaje), afectarán la morfología del virus WSSV modificando las proteínas de su envoltura y cápside, inhibiendo o se destruyendo los desechos de camarón.

Las cabezas y colas mexicanas en el análisis de PCR mostrado en la Fig. 18 no amplificaron durante la PCR por lo tanto se puede asumir que no que no están infectadas con el WSSV. Sin embargo, las colas de camarón de Honduras positivas para WSSV, ensiladas en un RE durante 6 días después de practicar la PCR mostraron los siguientes resultados (Fig. 17): en los primeros

carriles se encuentra el marcador de peso molecular 1 kb (Promega), en el carril 1 se encuentra el testigo positivo para WSSV y en el carril 2 el testigo negativo para WSSV. Del carril 3-9 se encuentra las muestras previamente notificadas como positivas para WSSV por el Lab. de Patología Molecular, del Centro Nacional de Sanidad Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, en sus diferentes tiempos a través de la fermentación, incluyendo la muestra inicial de colas de camarón hondureñas. En el caso de la prueba de PCR, solamente en el carril 5  $\Rightarrow$  T2 se observa el producto de 941 pb, proveniente de la amplificación del ADN del WSSV, lo cual sugiere que las muestras en los carriles 3 y 4 deberían de presentar la amplificación del virus, pues son muestras de los tiempos previos y fuente del material utilizado en el T2. Sin embargo, puesto que durante este ensayo la cantidad de muestra de ensilado para llevar a cabo la extracción del ADN fue tomada al azar, se realizó un segundo experimento controlando la cantidad de muestra durante la extracción del ADN (Fig. 18).



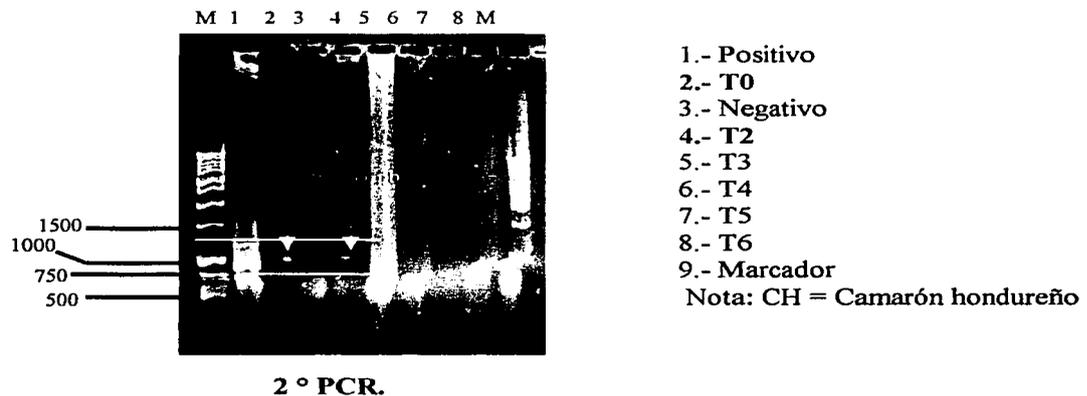
1 ° PCR.

- 1.- Positivo
  - 2.- Negativo
  - 3.- Cola de Camarón de Honduras
  - 4.- T0
  - 5.- T2
  - 6.- T3
  - 7.- T4
  - 8.- T5
  - 9.- T6
  - 10.- T0 Reactor Dinámico (Cabezas CM)
  - 11.- T0 Reactor Estático (Colas CM)
- Nota: CM = Camarón mexicano

**Fig. 17.** 1° análisis de PCR anidado para detectar el virus WSSV. En la figura se muestra el resultado del análisis del PCR anidado a las siguientes muestras de los Reactores Dinámico (RD) y Estático (RE), con muestras de cabezas de camarón mexicano y colas de camarón hondureño positivo para WSSV y colas de camarón mexicano libres de WSSV; carril 3 = cola de camarón hondureño infectado con WSSV (RD); carril 4= T0 (WSSV-RD); carril 5=T2=positivo para WSSV RD; carril 6= T3 (WSSV-RD); carril 7=T4; carril 8=T5; carril 9=T6; carril 10=T0 cabezas de camarón mexicano del Reactor Dinámico; 11=T= colas de camarón mexicano del Reactor Estático. Los carriles 1 (+) y 2 (-) corresponden al testigo positivo y negativo, respectivamente. M= marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). La cantidad de muestra para este análisis fue tomado al azar.

En la Figura 18 se muestran los resultados de la segunda amplificación. Las muestras de colas de camarón hondureño presuntamente infectadas con WSSV, a excepción de la muestra inicial

de colas de camarón. En el carril 2  $\Rightarrow$  T0 y carril 4  $\Rightarrow$  T2 la presencia del virus del WSSV está presente con la banda de amplificación de ADN de 941 pb. La cantidad de muestra utilizada para el PCR fue la misma, significando que ésta puede ser una variable que modifica los resultados del PCR, pues no se sabe si se está extrayendo de la muestra, solamente ADN viral o ADN viral diluido. Esto puede traer consigo, que el ADN extraído de las muestras del camarón infectado, aunque hayan estado infectadas, la cantidad de ADN utilizado no sea la suficiente para la detección del virus y probablemente no todos los camarones se encontraban infectados, como lo indicó el resultado en el carril 3 de la Fig. 17, donde no apareció una banda de ADN viral en la cola de camarón de Honduras.



**Fig. 18. 2 ° Análisis de PCR anidado para detectar el virus de WSSV.**

En la figura se muestra el resultado del PCR anidado para las muestras de colas de camarón hondureño infectado con WSSV: carril 1= Testigo positivo (+); carril 2= T0; carril 3=Testigo negativo (-); carril 4=T2; carril 5=T3; carril 6=T4; carril 7=T5; carril 8=T6. M= marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

Con los resultados obtenidos durante este trabajo se hace necesario llevar a cabo una serie de experimentos adicionales en los cuales se comparen los diferentes métodos de PCR para la detección del virus a fin de comprobar y/o validar los resultados. Ya que se puede observar como a través del tiempo, después de la segunda aparición del ADN viral en el T2  $\Rightarrow$  48 h, a partir del T3  $\Rightarrow$  72 h hasta T6  $\Rightarrow$  144 h, nuevamente no está presente el ADN viral, indicando probablemente que:

- a) La acidez presentada a través de 6 días de fermentación, manteniendo el pH entre 4 y 3 ha afectado: 1) la parte de ADN viral que es amplificada por los primers específicos para este virus; 2) el virus completo.
- b) Debido a que existe una pre-digestión de las proteínas, lípidos y carbohidratos por la acción del ácido láctico producido por las BAL, probablemente se pudieron haber modificado una o varias veces las proteínas y lípidos presentes en la cápside y la envoltura viral (Nadala y col., 1998).

Hulten y col., (2001) describen que existe en la envoltura del virus una proteína llamada V28 involucrada en el sistema de infección del virus. Si esta proteína V28 puede ser modificada por la acción de la acidez se inhibiría la adherencia del virus a la superficie celular o a la entrada a la célula.

Chang y col., (1998), describen el efecto que tienen varios tratamientos físicos y químicos sobre la infección del WSBV (virus perteneciente al grupo del virus WSSV). Estudiaron diferentes efectos sobre el virus: la radiación ultra violeta, el aumento de la temperatura, el aumento y la baja del pH, el efecto del ozono disuelto en el agua y químicos desinfectantes usualmente utilizados en los cultivos de camarón. El efecto del pH en áreas ácidas de 1, inactivó a los virus tratados por en 10 min y en un pH de 3 tomó 1 h. Con un pH en el área básica con valor de 12, tomó 10 min de tratamiento para su inhibición.

También Tagawa y col., (2000), realizaron un estudio de la inhibición del Hepadnavirus, virus similar al de Hepatitis B que ataca al humano. Realizándose un bioensayo en patos por medio de agua acidulada eléctricamente que contiene un pH bajo aproximadamente de 2, un alto potencial de óxido-reducción y efecto bactericida. Demostrando directamente que inactiva al virus y se recomienda su aplicación clínicamente.

Aunque este último trabajo **no** se refiera a un virus que ataque al camarón, permite comprender que uno de los tratamientos desinfectantes es el uso de un bajo pH o una alta acidez.

Ya que el virus de WSSV continua causando pérdidas sustanciales en la industria acuícola en varios países, cualquier intención pragmática por erradicar o inactivarlo en el medio de cultivo sería de un enorme beneficio práctico (Chang y col., 1998).

## 8. Conclusiones.

- En los dos reactores utilizados, estático y dinámico se produce, una considerable cantidad de ácido láctico que mantiene el pH en valores entre 4-3.
- La cantidad de ácido láctico puede ser modificada por la materia prima utilizada como desechos (cefalotórax o colas) y los minerales presentes en las fracciones obtenidas para el estudio: líquida o semi-sólida.
- La recuperación de proteína en fracción líquida es mayor en el reactor estático que en el dinámico, debido a la ausencia de movimiento y su diseño en columna.
- Las cuentas microbiológicas de bacterias ácido lácticas y de aerobios totales, indican que su crecimiento es amplio en ambos reactores y en ambas materias primas.
- El almacenaje y la pasteurización de ensilado de desechos de camarón en fracción líquida, permitieron que las cuentas de BAL y aerobios totales se mantuvieran un ciclo más bajas. No obstante su abundancia, los desechos se conservan sin descomponerse.
- El análisis químico proximal muestra que el producto final, en el porcentaje de proteína cruda, se encuentra dentro de lo requerido para la alimentación de camarón. Lo que muestra que podría ser factible su inclusión en dietas para camarón
- Estandarizar los análisis de PCR para encontrar el más efectivo para la detección de virus en camarón.

## 9. Recomendaciones para trabajos posteriores.

- Rediseñar el reactor dinámico para una mejor obtención de muestra de la fracción semi-sólida de un ensilado.
- Realizar ensilados de desechos de camarón analizando las dos fracciones: líquida y semisólida, con diferentes especies, estadios uniformes y el uso de una materia prima de camarón a la vez. Con el fin de observar los cambios en acidez total titulable, pH, análisis microbiológico y químico proximal.
- Realizar la caracterización taxonómica de bacterias aerobias totales presentes en ensilados de camarón.
- Realizar análisis químico proximal a la fracción líquida de ensilados de desechos de camarón en los dos reactores: estático y dinámico.
- Realizar ensilados de desechos de camarón, utilizando cabezas de camarón libres y contaminadas del virus de la Mancha Blanca. Corroborar por medio del análisis de PCR que todas y cada una de las cabezas utilizadas se encuentran libres e infectadas de WSSV antes de ensilarlas, para después utilizar la fracción líquida del ensilado como sustituto de la harina de pescado en alimentos para camarón.
- Realizar bioensayos con camarón, alimentándolos con ensilado libre y contaminado de WSSV, incluido en sus dietas, para observar la inocuidad del producto final del ensilado.
- Pasar el producto final del ensilado de desechos de camarón por diversos procesos calóricos para disminuir la cantidad de aerobios totales y disminuir la probabilidad de que un virus se presente.
- Incluir ensilado de desechos de camarón en dietas para animales.

## 10. Bibliografía.

- Alday, V. (2000). An overview of shrimp viral diseases. *En: APEC/FAO/NACA/SEMARNAP*. April 2001. Transboundary Aquatic Animal Pathogen Transfer and the Development of Harmonized Standards on Aquaculture Health Management (FWG/03/2000). APEC/FAO/NACA/Semarnap, Workshop, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 23-24 July, p. 60.
- Aranson, S. (1994). Production of fish silage. *En: Fisheries Processing: Biotechnological applications*. Martin, A. M (ed.) Chapman & Hall, London, p. 244-272.
- Avault Jr. J.W. (2001). Commercial aquaculture during difficult times. *Aquaculture magazine*, March/April 2001, p. 63-65.
- Andersson, R.E., Daeschel, M.A. & Hassan, H.M. (1988). Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie* 70: 381-390.
- A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, D.C. p.54-71
- APEC/FAO/NACA/SEMARNAP. (2001). Transboundary Aquatic Animal Pathogen Transfer and the Development of Harmonized Standards on Aquaculture Health Management (FWG/03/2000). APEC/FAO/NACA/Semarnap, Workshop, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 23-24 July: 15-66, 69-85, 115-119, 132-180 y 184-185.
- Barg, U.C. (1992). Guideline for the promotion of environmental management of coastal aquaculture development (based on a review of selected experiences and concepts. *FAO, Fisheries Technical Paper No. 328, Rome, FAO, 122 p.*
- Barnby-Smith, F.M. (1992). Bacteriocins applications in food preservation. *Trends in Food Science & Technology*, June , Vol. 3: 133-137.
- Bringas, L., Ezquerro, J.M y López, J.A. (1999). Nutrición. *En: Martínez, R. (ed.) Cultivo de camarones Peneidos: principios y prácticas*. AGT Editor, México, pp. 146-148.
- Burton, D.R. , Williamson, R.A. y Parren, P.W.H.I. (2000). Antibody and virus: Binding and neutralization. *Virology* 270: 1-3.
- Cañipa Morales, A. J. (1994). Estudio sobre el aprovechamiento integral del cefalotórax de camarón. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias de Alimentos), Facultad de Química, UNAM, 97 pp.
- Charley, H. (1982). *Food Science*. Macmillan Publishing Company, N.Y., E.U.A., p. 434-435, 440.

- Cira, L.A., Guerrero, I., Huerta, S., Hall, G.M., Shirai, K. (2001). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, Vol. 37 No. 12: 1359-1366.
- Cira Chávez, L.A. (2000). Tesis de Maestría: Escalamiento de un proceso para la recuperación de Quitina a partir de desecho de camarón. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Julio, pp.
- Clark, D.J., Lawrence, A.L. y Swakon, H.D. (1993). Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture* 109:15-17.
- Contreras, L. y Montero, A.B. (2000). México. En: APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, April 2001. Transboundary Aquatic Animal Pathogen Transfer and the Development of Harmonized Standards on Aquaculture Health Management (FWG/03/2000). APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, Workshop, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 23-24 July, p.69-85.
- Contreras López, L.E., González, J. y Rodríguez, G.M. (2000). Reseña y Avances del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico de Enfermedades en Organismos Acuáticos Nivel nacional. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico*, Año 3, Vol. 3, Número 11, p. 9-11.
- Chang, P.S., Chen, L.J. y Wang, Y.C. (1998). The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166: 1-17.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Lo, C.F. y Kou, G.H. (1998). Studies on transmittion of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. *Aquaculture* 16: 263-267.
- Dore, I. y Claus F. (1987). An illustrate guide to shrimp of the world. Van Nostrand Reinhold Publ., New York E.U.A., pp. 18,19, 132-137, 142.143, 166, 167, 170-175.
- Durand, S.V., Tang, K.F. y Lightner, D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12: 128-135.
- Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R.M. y Bonami, J.R. (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Disease of Aquatic Organisms*, 29: 205-211.
- Durand, S. Lightner, S.V., Nunan, L.M., Redman, R.M. Mari, J. y Bonami, J.R. (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Auatic Organismos*, Vol. 27: 59-66.

- Einarsson, H. y Lauzon, H. (1995). Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, February: 669-676.
- Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L. & Carrillo, O. (1998). In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 163: 123-136.
- FAO/ SEMARNAP. (1998). Guía Metodológica para el Diagnóstico Ambiental de Campo de Granjas Camaronícolas: Hacia una acuicultura sustentable. Proyecto TCP/MEX/4555 "Camaronicultura para el Sector Social en los estados de Nayarit y Sinaloa". FAO/ Semarnap, 44p.
- FAO. (2000). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2000. FAO, Roma, 2000, pp.3-38, 47-66, 113-116.
- Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993). Microbiología de los alimentos. 4ª ed., Acribia, España, pp. 325-340.
- Fox, C.J. (1993). The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon*. (Fab.). Aquaculture, 109: 39-49.
- Galaviz, L., De la Cerda, G., Molina, Z. J. (2000). Técnicas de Diagnóstico Molecular Basadas en el DNA: Necesidades de Investigación para Estandarización y Validación de la Detección de Patógenos en Organismos Acuáticos. Apuntes del Curso Básico Primera Parte: La Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de Patógenos Virales de Camarón Cultivado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Centro Nacional de Sanidad Acuícola, Monterrey, Nuevo León. Del 4-7 de diciembre.
- Galicia, A. (2001). Determinación del valor nutricional de un hidrolizado de Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para juveniles de camarón del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Fac. de Estudios Superiores, Campus Iztacala, UNAM, 78 p.
- Garduño Argueta, H. (1999). Los cambios en la nomenclatura y las principales características de las especies de camarón. Apuntes del taller de Cultivo de Camarón, Nivel II, Facultad de Ciencias, UNAM, 4 p.
- Giraffa, G., Neviani, E. y Veneroni, A. (1990). Use of Conductance to Detect Bacteriocin Activity. Journal of Food Protection, September 1990, Vol. 53, No. 9: 772-776.
- Gracia Gasca, A. (1992). Explotación y manejo del recurso camarón. Ciencia y Desarrollo, Vol. XVIII, Núm. 106, p. 82-95.
- Hall, G.M., Keeble, D., Ledward, D.A. & Lawrie, R.A. (1985). Silage from tropical fish 1. Proteolysis. Journal of Food Technology 20: 561-572.

- Hall, G.M., Ledward, D.A. Lawrie, R.A. (1985). Silage from tropical fish 2. Undigested fraction. *Journal of Food Technology* 20: 573-580.
- Hall, G.M. y De Silva, S. (1992). Lactic acid fermentation of scampi (*Penaeus monodon*) waste for chitin recovery. *En: De brine, C.J., Sandford, P.A. & Zikakis (Eds.). Advances in chitin and chitosan. Elsevier Applied Sciences. London, p.663-668.*
- Hansen, M.E. y Illanes, A.(1994) Application of crustacean wastes in biotechnology. *En: Martín, A.M.(ed.). 1994. Fisheries Processing: Biotechnological applications. Chapman & Hal, London, pp.174-25.*
- Hardy, R. W. (2000). New developments in aquatic feed ingredients and potential of enzyme supplements. *En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salzar, M., Olvera-Novoa, M.A. & Civera-Cerecedo, R., (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 200. Mérida, Yucatán, México, pp. 216-226.*
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. y Klaenhammer, T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, June, 1989, Vol. 52, No. 6: 3784-387.
- Hassan, T.E. y Heath, J.L. (1987). Chemical and nutritive characteristics of Fish Silage produced by Biological fermentation. *Biological Wastes* 20:187-201.
- Hassan, T.E. y Health, J.L. (1986). Biological Fermentation of Fish waste for potential use in animal and Poultry Feeds. *Agricultural Wastes* 15:1-15.
- Hendrickx, M.E. y Estrada Navarrete, F.D. (1996). Los Camarones Pelágicos (Crustacea: Denrobranchiata y Caridea) del Pacífico Mexicano. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, México, pp.157.
- Hendrickx, Michel. E. (2001). Taxonomía, Biología y Zoogeografía de los Peneidos de Importancia Comercial del Pacífico Mexicano. *En: Páez Osuna, F. (Ed.), 2001. Camaronicultura y Medio Ambiente. Instituto de CIENCIAS DEL Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa, México, p. 25-39.*
- Infofish Technical Handbook 4.(1991). Shrimp waste utilisation. Schoemaker, R Richards, N. & Rajadurai (Eds.). Infofish Technical Handbook series, 20 pp.
- Kasornchandra, J. Boonyaratpalin, S. e Itami, T. (1998). Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture: 243-251.*

- Kou, G.H., Peng, S.E. Chiu, Y.L. y Lo, C.F.(1998) Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *En: Flegel , T.W. (ed) . Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 267-271*
- Lightner, D.V. (1993). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *En: McVey, J.P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture (2nd ed.). Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, Fl, E.U.A., pp. 393-486.*
- Lightner, D.V. y Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture 164: 201-220.*
- Lightner, Donald V., (ed.). (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, E.U.A., pp. Sección 3, IHHNV, WSBV y TSV.
- Macrae, R., Robinson, R.K. y Sadler, M.J. (eds.) (1993). Encyclopedia of Food Technology and Nutrition. Vol. 5. Academic Press. London, U.K., p. 3437-3440.
- Masami, T., Yamaguchi, T. Yokosuka, O. Shoichi, M., Maeda, T. y Saisho, H. (2000). Inactivation of a hepadnavirus by electrolysed acid water. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46: 363-368.*
- Meyers , S. P. (1986). Utilisation of shrimp processing wastes. *Infosh Marketing Digest, No. 4/86: 18-19.*
- Moon, N.J., Beuchat, L.R. Kinkaid, D.T. & Hays, E.R. (1982). Evaluation of lactic acid bacteria for extending the shelf life of shrimp. *Journal of Food Science, Vol. 47: 897-900.*
- Moore, D.W. y Brand, C.W. (1993). The culture of marine shrimp in controlled environment superintensive systems. *En: McVey, J.P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture (2nd edn.). Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, Fl, E.U.A., pp. 393-486.*
- Nadala Jr. E.C.B., Tapay, L.M. y Loh, P.C. (1998). Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms, 1998, Vol. 33: 221-229.*
- Nicol, S. (1991). Life after death for empty shells. *New Scientist 9 February, p. 46-48.*
- Nunan, L.M., Poulos, B.T. y Lightner, D.V. (1998). The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture 160 (1998): 19-30.*
- Raa, J, Gildberg, A. y Strom, T. (1982). Fish Silage. A review. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition., 16(4): 383-419.*

- Raa, J y Gildberg, A. (1976). Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *Journal of Food Technology*, 11: 619-628.
- Richards, N., (ed.) (1991). *Infotish Technical Handbook 4: Shrimp waste utilization*. Infotish Technical Handbook. 20 p.
- Páez Osuna, F. (ed.).(2001). *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Instituto de CIENCIAS DEL Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa, México, pp. 15-21, 273-295, 413-436.
- Peng, S.E., Lo, C.F., Ho, C.H., Chang, C.F. y Kou, G.H. (1998). Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrhombrachium rosenbergii*, using Polymerase Chain Reaction. *Aquaculture* 164 (1998) 253-262.
- Perales Flores, L.E. (2001). Optimización de un método de PCR para la Detección del Virus de la Mancha Blanca (WSV) en camarón. Tesina de especialización en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas, 37 p.
- Pérez-Farfante, I. y Kensley, B. (1997). Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Memoires du Museum National d' Histoire Naturelle*, Paris, Vol. 175, pp.233.
- Plascencia, M., Olvera-Novoa, M, Arredondo-Figueroa, Hall, G. y Shirai, K. 2002. Feasibility of Fish meal replacement by shrimp-head silage protein hydrolysate in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (L) diets. *Journal of Science of Food and Agriculture*. Vol. 82: 753-759.
- Plascencia, Maribel.2000. Tesis de Maestría: Recuperación de Proteínas a partir de Desechos de Camarón y su Aplicación en Dietas para la Acuicultura. UAM-Iztapalapa. México, pp.106.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. & Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, June, p. 2355-2360.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia, Subsecretaría de Salubridad.(1979). Dirección General de Laboratorios de Salud Pública Técnicas Generales para Análisis Microbiológicos de Alimentos, México, pp. 17-21, 38-41.
- SEMARNAP. (2000<sup>a</sup>). Anuario Estadístico de Pesca 1999. México, D.F., pp. 43, 48, 56, 61, 84, 162, 163, 209, 210, 214, 215 y 217.
- SEMARNAP. (2000<sup>b</sup>). Estado de Salud de la Acuicultura. Subdirección de Acuicultura, Instituto Nacional de Pesca, México, D.F. pp. 32.

- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González Obdulia R. y Hall, G. M. (2001). Effect of Initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 446-452.
- Shirai y Hall. (1996). Utilisation of prawn waste for recovery of chitin by lactic acid bacteria. Technical report. March 7-21. Loughborough University of Technology.
- Shirai, K., Guerrero, I., Rodríguez, G., Suacedo, G., Huerta, S. y Hall, G.M. (1997). Aspects of protein breakdown during the lactic acid fermentation of prawn waste.. En: Domard, A.; Roberts, G.A.F. & Varum, K.M. Jaques Andre Publisher. *Advances in Chitin Science*, 7<sup>th</sup> ICCS-ISBN:2-907922-57-2, Volume II:56-63
- Shirai, K. (1996). Utilisation of Prawn Waste Recovery of Chitin by Lactic Acid Bacteria, Thecnical Report. Loughborough University of technology. March 7-21, 1996, 4pp.
- Shirai, Matsumoto, K. (1999). Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, p 32-40.
- Soto, M.A. y Lotz, J.M. (2001). Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 9-15 .
- Tagawa, M., Yamagichi, T, Yokosuka, O., Matsutani,S., Maeda, T y Saisho, H. (2000). Inactivation of a hepadnavirus by electrolysed acid water. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46:363-368.
- Van Hulten, M.C., Witteveldt, J., Snippe, M. & Vlak, J.M. (2001). White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 is Involved in the Systemic Infection of Shrimp. *Virology* 285: 228-233.
- Wang, C.H., Yang, H.N., Tang, C.Y., Lu, C.H., Kou, G.H. y Lo, C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Diseases of Aquatic Organisms* 41: 91-104.
- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. (1994).Microbial modeling: Scientific Status Summary. *Food Technology*, Vol 48, No. 6: 113-119.
- Williamson, D.I. (1988). Evolutionary trends in larval form. *En: Fincham, A.A. & Rainbow, P.S. (ed.). Aspects of Decapod Crustacean Biology: the Proceedings of a Symposium Held at the Zoological Society of London on 8 th and 9 th april, 1987, No. 59. The Zoological Society of London, Clarendon Press, pp. 1-9.*
- Wyatt, L. (1995). To investigate the possibility that chitin has as a feed attractant for juvenile rainbow trout (*Onchorhycus nykiss*).

- Zakaria, Z., Hall, G.M. y Shama, G.(1998) Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. Process Biochemistry Vol. 33, No. 1, pp. 1-6.

**Consulta en línea de:**

- Virus Taxnomy online, Copyright Academic Press 2000:  
<http://www.virustaxonomyonline.com/wirtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-.htm>
- SEMARNAT: [www.semanrant.gob.mx/legislación](http://www.semanrant.gob.mx/legislación)
- <http://www2.hawaii.edu/~pilip/wsv2.htm>
- <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/NestedPCR.html>