

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA CEPA BACTERIANA
EN LA CALIDAD BROMATOLÓGICA DEL ENSILADO BIOLÓGICO
OBTENIDO CON RESIDUOS DE CARAJITO (*Diplectrum
conceptione*) Y VOLADOR (*Chelidonichthys
obscurus*)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

AUTOR:

Br. YICSON JAVIER AREVALO AGUIRRE

ASESORES:

**Dr. JAVIER QUEREVALÚ ORTIZ
Mblgo. RUBÉN HERNÁN ALFARO AGUILERA**

TUMBES, PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS



TESIS

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA CEPA BACTERIANA
EN LA CALIDAD BROMATOLÓGICA DEL ENSILADO BIOLÓGICO
OBTENIDO CON RESIDUOS DE CARAJITO (*Diplectrum
conceptione*) Y VOLADOR (*Chelidonichthys
obscurus*)”**

**LOS SUSCRITOS DECLARAMOS QUE EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS
ES ORIGINAL EN SU CONTENIDO Y FORMA**

Br. Yicson Javier Arevalo Aguirre
Ejecutor.

Dr. Ing. Javier Querevalú Ortiz
Asesor.

Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera
Co-Asesor.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS



TESIS

**“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA CEPA BACTERIANA
EN LA CALIDAD BROMATOLÓGICA DEL ENSILADO BIOLÓGICO
OBTENIDO CON RESIDUOS DE CARAJITO (*Diplectrum
conceptione*) Y VOLADOR (*Chelidonichthys
obscurus*)”**

APROBADA EN CONTENIDO Y ESTILO POR:

Dr. Ing. Héctor Alfredo Sánchez Suárez
PRESIDENTE

Mg. Ing. José Luis Cabrera Reyes
SECRETARIO

Ing. Dorian Y. Aguirre Campos
VOCAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser orientador de mi vida, por darme el entusiasmo, el empuje y perseverancia necesarios para cumplir los objetivos trazados en la ejecución de esta investigación; y especialmente a mis padres, por todo el amor, sabiduría, dedicación en mi formación académica y personal, por el apoyo siempre brindado en cada meta y objetivo trazado, por ser mi fortaleza y ejemplos de mi vida.

También quiero agradecer a los docentes Dr. Ing. Javier Querevalú Ortiz y al Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera por darme motivación, e integrarme a su grupo de tesis, por su acertada dirección, encaminándome así satisfactoriamente en el desarrollo y culminación de mi tesis. Por su valiosa amistad, sabios consejos y apoyo.

Al mismo tiempo quiero agradecer a los nuevos lazos de amistad que formé en el laboratorio de análisis ambiental, a mis amistades de la universidad, al Mg. Ing. Dorian Y. Aguirre Campos, al Mg. Ing. José Luis Cabrera Reyes, Dr. Ing. Héctor. A. Sánchez Suárez, al Ing. John H. Rimaycuna Ramírez y a la Mg. Blga. Lilita Solís por haberme ayudado y compartido conocimientos valiosos durante la ejecución y redacción de mi tesis.

DEDICATORIA

A mi madre, a mi padre y a mi hermano, Flora, Javier y Anller por el apoyo incondicional, el esfuerzo, consejos y amor que me han brindado para concluir mis estudios satisfactoriamente, permitiéndome así formarme profesionalmente. Esto es para ustedes, porque sin ustedes no lo hubiera logrado.

A Dios por darme la vida, brindarme sabiduría, salud y hacer posible la ejecución de esta investigación. Por haberme dado una familia hermosa y encontrar buenos amigos que me han ayudado y dado buenos consejos.

A mis maestros, que se convirtieron en amigos, personas de respeto y futuros colegas, por inculcarme que el estudio es primordial para cumplir todas las metas trazadas; por sus enseñanzas transmitidas y consejos que hicieron posible el buen desempeño en este trabajo de investigación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO-CIENTÍFICO	15
2.1. ANTECEDENTES	16
2.2. BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS	18
2.2.1. Carajito (<i>Diplectrum conceptione</i>)	18
2.2.2. Volador (<i>Chelidonichthys obscurus</i>)	19
2.2.3. Residuos de pescado.	20
2.2.4. Bacterias ácido lácticas.	20
2.2.5. Melaza.	20
2.2.6. Ensilado de pescado.	21
2.2.7. Ensilado químico.	21
2.2.8. Ensilado biológico.	22
2.2.1.1 Ventajas del ensilado biológico de pescado	24
2.2.9. Proceso del ensilaje.	25
2.2.10. Implicaciones sanitarias del uso del ensilaje	25
2.2.11. Forma de utilizar el ensilado de pescado	26
2.2.12. Uso del ensilado de pescado en la alimentación de animales	
2.2.13. Procesos de acidificación y de hidrólisis	27
2.2.14. Proceso de elaboración	29
2.2.15. Usos del ensilado	29
2.2.16. Análisis proximal del alimento	29
2.2.17. Uso de bacterias del yogurt	31
2.3 Definición de términos básicos.	31
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Tipo de estudio	33
3.1.1. De acuerdo al fin que se persigue	33

3.1.2. De acuerdo al enfoque de investigación.....	33
3.2. Poblacion y muestra.....	33
3.2.1. Población.....	33
3.2.2. Muestra.....	33
3.3. Materiales y equipos.....	34
3.3.1. Materiales de laboratorio.....	34
3.3.1.1. Materiales.....	34
3.3.1.2. Materiales para elaborar el yogurt.....	34
3.3.2. Reactivos y medios de cultivo.....	34
3.3.2.1. Reactivos.....	34
3.3.2.2. Medios de cultivo.....	34
3.3.3. Equipos.....	35
3.4. Método de Investigación.....	35
3.4.1. Aislamiento de bacterias acido lácticas.....	36
3.4.2. Analisis bioquímicos preliminares.....	36
3.4.3. Análisis Molecular.....	36
3.4.3.1. Extracción de ADN.....	37
3.4.3.2. PCR (Reacción en cadena polimerasa).....	37
3.4.3.3. Electroforesis.....	37
3.4.3.4. Secuenciación de los productos de la PCR.....	37
3.4.4. Obtención de ensilado biológico.....	37
3.4.5. Preparación de inóculo bacteriano.....	38
3.4.6. Conservación de la materia prima.....	39
3.4.7. Cocción y enfriado de la materia prima.....	39
3.4.8. Molienda y mezclado.....	39
3.4.9. Envasado y almacenamiento.....	40
3.4.10. Evaluación de parámetros bromatológicos del ensilado biológico de pescado.....	40
3.4.10.1. Análisis fisicoquímico.....	41
3.2.10.2. Análisis de valor nutricional (composición proximal).....	41
3.2.10.3. Análisis microbiológico.....	44
3.2.10.4. Análisis organoléptico.....	46
3.4.11. Análisis estadístico	46
3.4.12. Diseño experimental.....	46

CAPÍTULO IV. RESULTADOS	47
4.1. Aislamiento e identificación molecular de cepas bacterianas	47
4.2. Temperatura	47
4.2.1. Ensilado incubado a 40°C, TA y 30°C	50
4.3. Comparación entre pH y temperatura.....	51
4.4. Comparación entre acidez y temperatura.....	52
4.5. Análisis microbiológicos	53
4.6. Análisis organolépticos	54
4.7. Análisis nutricional.....	55
CAPÍTULO V. DISCUSIONES.....	56
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	59
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....	60
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Diplectrum conceptione</i> (Carajito).....	18
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Chelidonichthys obscurus</i> (volador).....	19
Tabla 3: Frecuencia de colecta de muestras.	
Tabla 4: Diseño experimental del carajito y volador.....	46
Tabla 5: Evaluación microbiológica del ensilado durante su almacenamiento de 15 días.....	53
Tabla 6: Evaluación microbiológica del ensilado durante su almacenamiento de 30 días.....	53
Tabla 7: Atributos organolépticos del ensilado biológico.....	54
Tabla 8: Composición proximal del EBP seco, inicial y final durante el tiempo de almacenamiento de la especie carajito.....	55
Tabla 9: Composición proximal del EBP seco, inicial y final durante el tiempo de almacenamiento de la especie volador.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de ensilado obtenido químicamente.....	21
Figura 2. Diagrama de ensilado obtenido biológicamente.....	22
Figura 3. Puntos de ubicación de colecta de muestras para aislamiento bacteriano y residuos de pesca.....	33
Figura 4. Dilución de muestra para recuento en placas.....	44
Figura 5 y 6. Comportamiento de las temperaturas durante el proceso de ensilaje de carajito y volador.....	48
Figura 7,8 y 9. Valores de pH y acidez del ensilado de carajito incubado a 40°C, TA y 30°C.....	49
Figura 10,11 y 12. Valores de pH y acidez del ensilado de pez volador incubado a 40°C, TA y 30°C.....	50
Figura 13. Comparación de especies entre pH y temperatura.....	51
Figura 14. Comparación de especies entre acidez y temperatura.....	52

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar las características bromatológicas del ensilado biológico preparado con residuos de pescado, y con inóculos bacterianos fermentadores aislados a partir del recto del cerdo; durante el proceso de conservación a temperatura ambiente y a temperaturas de incubación de 30°C y 40°C.

El flujo de procesamiento para la elaboración de ensilado de residuos de carajito y volador fue: obtención de las bacterias fermentadoras, evaluación bioquímica de las bacterias, (pruebas de valoración como BAL), (pH, sales biliares, producción de gases, pruebas oxidasa y catalasa negativas), preparación de la solución como inóculo; recepción, cocinado, molido, mezclado de insumos, envasado y almacenamiento, la mezcla empleada fue: residuos de pescado 70%, melaza 25% e inóculo bacteriano 5%.

En esta tesis se empleó un diseño experimental con muestras al azar y sus 3 réplicas, las cuales fueron: **T1** (incubados a temperatura ambiente), **T2** (incubado a 30°C), **T3** (incubado a 40°C), las cuales fueron evaluadas por un periodo de 30 días, para determinar su valor nutricional y estabilidad durante el tiempo de conservación.

Los ensilados biológicos mostraron un contenido de proteínas de 32,43% y 36,70% en el T1, en el T2 30,20% y 33,80% y 34,63% y 36,00% en el T3, de la especie carajito, mientras la especie volador en el T1 24,66% y 33,00%, en el T2 27,25% y 32,60% y en el T3 30,60% y 33,16%. En las muestras tratadas T1, T2 y T3, los microorganismos aerobios mesófilos, levaduras y hongos estuvieron dentro del límite aceptable en alimento balanceados para cerdos de acuerdo con la Norma Técnica Colombiana NTC1839 por la autoridad sanitaria ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). Por otro lado, la bacteria patógena *Salmonella* spp, no estuvo presente en el proceso del ensilaje. Se observó que en el proceso fermentativo de conservación se logró una buena fermentación con resultados de parámetros aceptables del ensilado, con disminución de pH e incremento de ácido láctico; considerándose como tiempo óptimo del proceso desde el día 7.

Basándose a los resultados obtenidos se acomoda a los requerimientos nutricionales que se necesitan para inducirlos como fuente de proteína en la alimentación porcina.

Palabras claves: Ensilado, bacterias ácido lácticas, fermentación, melaza.

ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the bromatological characteristics of biological silage prepared with fish residues, and with fermenting bacterial inocula obtained from the pig's rectum; during the storage process at room temperature and at incubation temperatures of 30 ° C and 40 ° C.

The processing flow for the elaboration of silage of carajito and flying waste was: obtaining of the fermenting bacteria (samples) biochemical evaluation of the bacteria, (valuation tests like BAL), (pH, bile salts, gas production, oxidase tests and catalase negative), preparation of the solution as inoculum; reception, cooking, grinding, mixing of inputs, packaging and storage, the mixture used was: fish waste 70%, molasses 25% and bacterial inoculum 5%.

In this thesis an experimental design with random samples and its 3 replicas was used, which were: T1 (incubated at room temperature), T2 (incubated at 30 ° C), T3 (incubated at 40 ° C), which were evaluated for a period of 30 days, to determine their nutritional value and stability during the conservation period.

The biological silage showed a protein content of 32.43% and 36.70% in the T1, in T2 30.20% and 33.80% and 34.63% and 36.00% in the T3, of the species carajito, while the flying species in T1 24.66% and 33.00%, in T2 27.25% and 32.60% and in T3 30.60% and 33.16%. In the treated samples T1, T2 and T3, the mesophilic aerobic microorganisms, yeasts and fungi were within the acceptable limit in balanced feed for pigs according to the Colombian Technical Norm NTC1839 by the health authority ICA (Colombian Agricultural Institute). On the other hand, the pathogenic bacterium *Salmonella* spp, was not present in the silage process. It was observed that in the fermentation process of conservation a good fermentation was achieved with results of acceptable silage parameters, with a decrease in pH and an increase in lactic acid; Considering itself as the optimal time of the process from day 7.

Based on the results obtained, it accommodates the nutritional requirements needed to induce them as a source of protein in swine feeding.

Keywords: Ensilage, lactic acid bacteria, fermentation, molasses.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los residuos de productos hidrobiológicos se pueden utilizar como alimentos para animales, pues contienen proteína de óptima calidad y elevado valor biológico. Así mismo, los peces y sus residuos que no tienen mercado son una formidable opción referentemente fácil de obtener en los puertos pesqueros, dado que no cuentan con la tecnología para procesarlas y, por ende, los arrojan, generando contaminación al medio ambiente. Por lo tanto, estos residuos pueden ser conservados en forma de ensilaje, lo cual disminuye los costos de producción animal; por lo tanto, es necesario conocer las condiciones óptimas del proceso (temperatura y tipo de cepa bacteriana) para su preparación y mejorar su tiempo de vida útil en anaquel.

Actualmente, la necesidad de adquirir alimentos para el consumo humano impone una búsqueda y la investigación de alimentos no convencionales para la alimentación animal que puedan reemplazar total o parcialmente las fuentes de cereales con prioridad de ventajas económicas (Vidotti, 2001).

Ocasionalmente es complicado asegurar una nutrición con cereales y fuentes proteicas tradicionales, principalmente en los países donde existen con mayor connotación la competencia animal – hombre (Sánchez et al. 2001).

Debido a una conciencia ambiental que aumenta diariamente y las leyes ambientales se hacen más restrictivas, durante la producción industrial en sus procesos generan grandes volúmenes de desechos orgánicos de difícil manejo, pueden tornarse inestables. En la mayor parte de las empresas pesqueras dedicadas a la producción de especies marinas para consumo humano, los residuos orgánicos representan un 60% de todo el material procesado (Ponce y Gernat, 2002). Así mismo, las especies marinas representan una importante fuente de proteína de elevado valor biológico, pero su fácil putrefacción con el inevitable impacto ambiental determina que se realice un estudio sobre la forma más adecuada de su conservación en forma de ensilaje químico aplicando ácido sulfúrico, producto

prohibido por la legislación peruana (Miranda, 1999).

Uno de los problemas principales del centro poblado de Puerto Pizarro, es la contaminación generada por los residuos orgánicos producto de la pesca, los cuales no son valorados adecuadamente. Cabe resaltar que este centro poblado produce anualmente alrededor de 45 000 kg de producción de pesca de carajito y de otras especies alrededor de 40 000 kg que incluye el pez volador (Desembarcadero de Puerto Pizarro 2016). Según el Organismo de Sanidad Pesquera (SANIPES), estas especies al ser fileteadas para la extracción de la pulpa, se elimina un 64% de residuos que incluyen vísceras, esqueleto, cabeza y piel.

Bajo este contexto, el presente trabajo de tesis pretende resolver esta deficiencia haciendo uso de métodos amigables con el medio ambiente, siendo uno de ellos la elaboración y optimización de ensilado biológico a partir de residuos de pescado o pescado entero, que además es un proceso económico y estable en el tiempo. Asimismo, presenta una alternativa viable para reducir el impacto ambiental negativo que generan constantemente estos residuos al ser segregados indiscriminadamente en los canales de marea aledaños al centro poblado de Puerto Pizarro, trayendo consigo la proliferación de insectos y roedores, que pueden transmitir enfermedades a los pobladores de la zona.

El propósito de esta investigación fue producir ensilados biológicos a partir de residuos de pescado como materia prima, evaluando características físico-químicas, organolépticas, microbiológicas y su valoración nutricional, utilizando inóculos fermentadores obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas recto del cerdo, para utilizarlo en el alimento para cerdos. El otro propósito es poder acabar con el impacto ambiental negativo que se genera a partir de residuos pesqueros arrojados a la orilla de la playa de Puerto Pizarro, por lo cual este proceso de elaboración de ensilados es una de las alternativas para poder acabar con este problema que tiene este centro poblado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO-CIENTÍFICO

2.1. ANTECEDENTES

El ensilado es un proceso de conservación de forrajes o de residuos de alimentos dado que, contiene un porcentaje de humedad muy elevado (65–70%), en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), de la humedad exterior y de la iluminación, mediante acidificación que impide la continuidad de la vida vegetal y de la actividad microbiana indeseable, entre ellos Clostridia, Listeria, coliformes, hongos y levaduras (Rodríguez y Díaz, 2005; De la Roza, 2005; León-Álamo, 2003).

Otro autor define al ensilado como el producto final de la fabricación de ácidos orgánicos, primordialmente ácido láctico y cantidades menores de otros ácidos como propiónico y acético. El objeto primordial de fabricar ensilados es mantener o conservar la composición nutricional del forraje original (León Álamo, 2003; Díaz, 2005).

La fabricación de los ensilados es considerada como una mejor alternativa de conservar los residuos agrícolas y pesqueros. La transformación de los residuos de pescado a ensilaje, tiene la ventaja de ser un suplemento económico para la ración animal, mientras se disminuye los residuos y el impacto al medio ambiente (Zynudheen et al. 2008).

El ensilado biológico de pescado, es un método de preservación basado en dos fenómenos, que se complementan; una le compete a la acidificación misma que implica a la otra denominada hidrólisis o licuefacción. Las investigaciones de estabilidad del EBP demuestran que es viable almacenar este producto por lapsos prolongados de tiempo a temperatura ambiente (mayores a 6 meses sin requerir de refrigeración) sin que se disminuya su valor nutricional ni la calidad higiénica del producto (Kjos, 2001; Bello, 1994).

El EBP se determina por la obtención de ácido láctico por degradación microbiana de glúcidos. Los microorganismos pueden ser añadidos por inoculación de cepas clasificadas de bacterias ácido lácticas (BAL) (Bello *et al.* 1992). El método descrito en Ottati *et al.* (1990), para producir ensilado biológico de pescado se distingue por usar menudos insumos a añadir al pescado dado que, ha sido empleado y evaluado en distintos estudios realizados como Ottati y Bello (1990), Cordova *et al.* (1990), Guevara *et al.* (1991), Martínez *et al.* (1991), Meire *et al.* (2002) y González y Marín (2005), con resultados favorables.

Otra investigación estableció los cambios en la composición química y microbiológica de desperdicios del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis sp.*), fermentados con un inóculo comercial de *Lactobacillus casei* cepa Shirota, como se demuestra en estudios realizados por Spanopoulos & Hernández (2010). Se aprovecharon procedimientos campestres e insumos de fácil acceso para emplearse como suplemento en la acuicultura. Se evaluó el porcentaje de miel de caña óptima para la fermentación, el conteo de microorganismos y la composición proximal de los ensilados. Las levaduras, mohos, *Salmonella* sp y coliformes totales, estuvieron ausentes porque son inhibidos por el proceso de ensilaje debido a que tienen atributos adecuados para su utilización como suplemento en alimentos para organismos acuáticos.

Olaya (2005), investigó el aprovechamiento de los residuos de la trucha arco iris, como ensilado biológico, usando para ello bacterias *Lactobacillus vulgaris* y *Streptococcus termophilus*, lográndose resultados importantes en lo referente a procesamiento, así como en los análisis físicos y bromatológicos, del mismo.

Por otro lado, Martínez (2003), empleó residuos de los intestinos de pescado de las especies más característicos del río Arauca: *Phractocephalus himliopteros* (Cajaro), *Prochilodus mariae* (Coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Bagre rayado), las cuales fueron probadas con distintas BAL a diferentes tratamientos (29°C y 40°C), usando como fuente de carbono la miel de caña y sacarosa en la fabricación de un ensilado biológico. Todas las cepas con las que se experimentaron como inóculo

todas fueron eficientes en el proceso de fermentación, presentando mejores resultados cuando estuvieron incubadas a una temperatura de 29°C, reduciendo considerablemente el nivel del pH al día 5 hasta alcanzar valores de 4,07. Además, a los 60 días, presentó buena estabilidad.

De acuerdo con la investigación de Carrasco y Mendoza (2007), determinaron la mejor concentración de inocular yogurt, utilizando melaza (miel de caña) y cabezas de langostino para obtener el menor nivel de bases volátiles nitrogenadas totales en el ensilado biológico. Las concentraciones de inóculo de yogurt de 12,5% y 15%, bajo una proporción melaza y cabezas de langostino de 1 a 8, presentaron niveles de bases volátiles nitrogenada totales (BVNT) por debajo de 80 mg de N/100 g, con características sensoriales aceptable; indicando estabilidad hasta el día 7, y una relativa estabilidad hasta el día 30. En todos los tratamientos, los valores de pH estuvieron por encima de 4,5 elevándose posteriormente hasta por encima de 5,0; indicando de esta manera, la formación de bases nitrogenadas.

Fernández et al. (2011), determinaron los cambios en la composición química y la calidad nutricional que ocurren durante el ensilado de residuos de carpa (*Cyprinus carpio*). La investigación se diseñó para determinar dos factores: EBI (miel: 10% y yogurt 10%) y EBII (miel: 15% y yogurt 10%). Aunque las dos formulaciones consiguieron un pH estable de 5,0 a los 5 días, logrando un pH a 4,5 a los 30 días. Los valores microbiológicos que se registraron en ambos ensilados ponen de evidencia que los microorganismos patogénicos y putrefactivos son impedidos, primordialmente por la acidez del medio, generada por las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus bulgaris* y *Streptococcus termophilus*). La composición química de los 30 días (con base seca) fue la siguiente: EBI: Proteína 57,39 %, extracto etéreo 6,93% y cenizas 10,59%; y EBII en proteína 50,13%, extracto etéreo 4,48% y cenizas 10,41%.

Debido al comportamiento parecido de los dos ensilados, estima suficiente emplear como aporte de glúcidos un 10% de melaza para un inóculo y 10% de yogurt comercial, como una alternativa a la harina de pescado, principal fuente proteica, en los alimentos para acuicultura.

Bertullo (1984), manifiesta que el ensilado antiguamente surge como una alternativa al aprovechamiento de residuos orgánicos ya sean de origen vegetal o animal. Además, durante el proceso de elaboración del ensilado biológico la reducción de pH hasta 4,5 permite una reducción de los fenómenos de putrefacción y otros sucesos indeseables.

2.2. BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS

2.2.1 Carajito (*Diplectrum conceptione*).

La familia serranidae se compone de peces voraces que se encuentran en zonas de la costa de todos los mares templados y tropicales, en torno a arrecifes de coral y de rocas. Tienen el cubierto con escamas peinadas; los opérculos presentan espinas (Ramos 2004).

El género *Diplectrum* es endémico de América, en donde se encuentran nueve especies en el Pacífico Oriental y otras tres en el Atlántico Occidental, todas son hermafroditas sincrónicos (Bortone 1977 a, López et al. 2002). En el Perú se han registrado los nueve especies reportadas para el pacífico oriental: *D. conceptione*, *D. eumelum*, *D. euryplectrum*, *D. labarum*, *D. macropoma*, *D. maximun*, *D. pacificum*, *D. rostrum*, *D. sciuris*, aunque esta última por confirmar (Chirichigno y Cornejo 2001).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Diplectrum conceptione* (Carajito).

Carajito (<i>Diplectrum conceptione</i>) Valenciennes, 1828	
Orden	Perciformes
Familia	Serranidae
Nombre científico	<i>Diplectrum conceptione</i>
Nombre común	Carajito, camotillo, camote, pollito.
Nombre en ingles	Sand – perch
Nombre FAO	[En] Camotillo seabass

3.4.3 Volador (*Chelidonichthys obscurus*).

Se caracteriza por su cuerpo alargado, casi cilíndrico, cabeza cubierta de placas óseas, crestas y espinas. Perfil cefálico poco cóncavo. Rostro con "visera" corta. Espina del opérculo corta. Dos aletas dorsales separadas, la

primera con el segundo radio espinoso muy largo, como una antena. Línea lateral con escamas redondeadas y pequeñas. Parte anterior del vientre y pecho sin escamas. Coloración anaranjado-grisácea, más oscura por el dorso; vientre blanco; aletas pectorales azuladas. Hasta 30 cm de longitud.

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Chelidonichthys obscurus* (pez volador).

<i>Chelidonichthys obscurus</i> (Bloch y Schneider, 1801)	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Scorpaeniformes
Familia	Triglidae
Género	Chelidonichthys
Nombre común	Volador
Sinonimias	<i>Aspitrigla obscura</i>

3.4.4 Residuos de pescado.

Entre los años 1996 y 2010, la pesca artesanal en la región Tumbes estuvo comprendida esencialmente por 20 especies hidrobiológicas siendo las más representativa el bereche *Larimus pacificus* (12,4%), el machete de hebra *Opisthonema* spp (9,2%), la merluza *Merluccius gayi peruanus* (6,9 %) y el carajito *Dipletrum conceptione* (7,4%), chiri *Peprilus medius* (6,1%), cachema *Cynoscionanalis* sp. (4,4%), espejo *Selene peruviana* (4,1%) que en conjunto representaron el 50,5% del desembarque total (Gonzales, 2010).

Aunque La mayor estimación del ensilado consiste en su empleo para la formulación de raciones de bajo costo y alto valor nutricional. Puede ser usado en la piscicultura, donde se disminuye los costos de fabricación. Para obtener del ensilado biológico se utilizan desechos de pescado obtenidos a partir del proceso de fileteado, así como aquellos peces que no tienen mercado exterior ni interior.

El ensilado biológico de desechos de pescado posee un alto valor nutritivo, siendo similar su composición nutricional con la materia prima utilizada en este proceso (Padilla, 1996).

3.4.5 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un conjunto de microorganismos representados por muchos géneros con características fisiológicas, morfológicas, y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no móviles, no esporulados, anaerobios microaerófilos o aerotolerantes. Producen ácido láctico y la mayoría crece a pH entre 4 y 4,5 permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramírez, 2011).

3.4.6 Melaza.

Es el producto final de la producción de la sacarosa proveniente de la caña de azúcar, es un fluido espeso y viscoso de color oscuro, el cual se emplea en aquellos alimentos procesados para los animales y como suplemento alimenticio y nutricional para el ser humano.

La Norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza (no cristizable) al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final lo que no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (Barrera, 2011).

La melaza de caña tiene hasta un °Brix normal de 79,5 y pesa 1,39 kg/L (Chachapoya, 2014).

3.4.7 Ensilado de pescado.

Es un producto semilíquido, obtenido a partir de desechos de pescado o pescado entero. Presenta una característica de producto estable a temperatura ambiente por largo tiempo. Las investigaciones de estabilidad del ensilado nos recomiendan que deben ser almacenados por períodos superiores a 6 meses en el cual no es necesario su refrigeración para su duración.

Algunas de las ventajas del uso del ensilado de pescado son:

- A temperatura ambiente se alarga la vida útil del producto.
- Producto final microbiológicamente estable y controlado.
- No genera el “vómito negro en aves”.
- Mejora el desarrollo y crecimiento en porcinos, aves y bovino.
- Se puede emplear como un sustituyente de la harina de pescado.
- La presencia de bacterias de yogurt facilita la digestión y actúan como probióticos, mejorando la población microbiana intestinal de animales.

3.4.8 Ensilado químico.

Es producido por añadir ácidos minerales y/o orgánicos al pescado. Es utilizado solo el ácido sulfúrico, clorhídrico, propiónico, fórmico o combinado, como mezclas de acético, fórmico y fosfórico; fórmico y sulfúrico o propiónico y sulfúrico. La materia prima pasa por un proceso de molienda, se le añade los ácidos y son mezclados, para que las enzimas presentes en el mismo puedan asimilarlo en las condiciones favorables que el medio ácido provee.

Las enzimas eliminan las proteínas del pez, y el ácido contribuye a acelerar la velocidad de su actividad, mientras retrasa el desarrollo bacteriano (Díaz, 2004; León, 2003; Tatterson y Windsor, 1974; Botello, 2005). Estas enzimas presentan su mayor actividad cuando el pH se disminuye a valores cercanos a 4 (Bello, 1994).

El ensilado se mantiene estabilizado a temperatura ambiente por largo tiempo y se usa frecuentemente en alimentación de aves y cerdos (Bello, 1993).

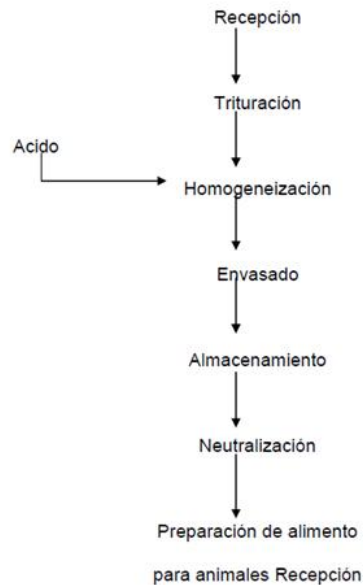


Figura 1. Diagrama de obtención del ensilado químico.

3.4.9 Ensilado biológico.

Se le añade al pescado la melaza y un microorganismo, capaz de utilizar el substrato y producir ácido láctico. Se han investigado distintas fuentes de carbono tales como harina de avena, harinas de maíz, malteada, azúcar, yuca, miel, etc. y diferentes organismos capaces de producir ácido láctico, entre otros, *Lactobacillus plantarum*, *Hansenula montevideo*, bacterias lácticas del yogur y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como la papaya, repollo, piña, camote, banana y yuca (Bello et al., 1992; Areche et al., 1992; Lessi et al. 1992).

Durante los últimos años se ha generado un gran interés en la elaboración de ensilados biológicos empleando desechos orgánicos, para producir fuentes de proteína de alta calidad a un costo respectivamente accesible. (Díaz, 2004; Berenz, 1994).

Por medio de un proceso de fermentación anaeróbica controlada, es posible elaborar un producto fermentado, firme y con elevado valor nutritivo (Díaz, 2004).

Tatterson y Windsor (1974), manifiesta que el proceso de preparación del ensilado necesita que las enzimas presentes en los intestinos sean derramadas a través de la masa del pescado triturado o mezclado. Por ende, se utiliza una fuente de glúcidos fermentables para la producción de ácidos tales como harinas de maíz, yuca, arroz y avena; almidón de maíz y melaza.

La microflora dominante durante las etapas iniciales de la fermentación son los del género *Enterobacteriaceae* (coliformes), que luego ante condiciones ideales es sustituida por *Leuconostoc* y *Streptococcus* y posteriormente por BAL (*Lactobacillus* y *Pediococcus*). Uno de los microorganismos más indeseables y cuya población se busca reducir mediante la fermentación ácido láctico es Clostridio (Díaz, 2004).

La licuefacción observada durante el almacenamiento del ensilado es debida primordialmente, a las enzimas proteolíticas de los intestinos del pescado. La cual se puede establecer por medio de su firmeza, que se disminuya a medida que se incremente la hidrólisis y el contenido de nitrógeno soluble. También, hay antecedentes que demuestran la utilización de jugo de frutas para acelerar la fermentación (Córdova et al. 1990).

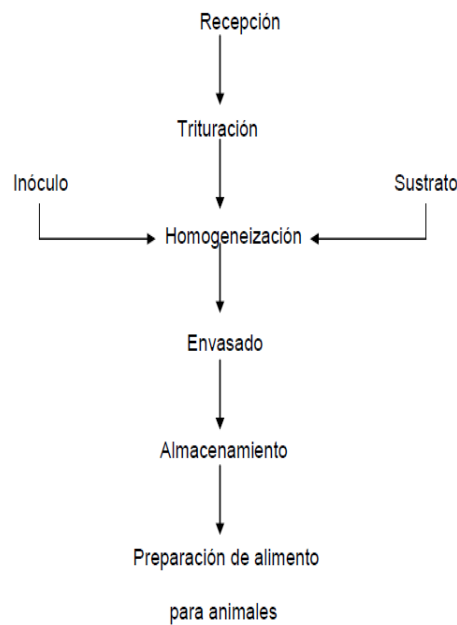


Figura 2. Diagrama de obtención de ensilado biológico.

En diferentes estudios. La eficiencia, el progreso y la estabilidad del proceso se han evaluado mediante una amplia diversidad de pruebas físico-químicas, microbiológicos y bromatológicos (Bello 1992).

3.4.9.1 Ventajas del ensilado biológico de pescado.

- a) Fácil manipulación, sin los peligros y riesgos que presentaba el ensilado químico;
- b) Costos menores, debido a, que no es necesario de importar el ácido orgánico.
- c) La posibilidad de agregar múltiples cepas de bacterias ácido-lácticas.
- d) La miel de caña se puede conseguir a precio accesible.
- e) Tiempo de proceso reducido.
- f) Es un producto estable, con excelentes características organolépticas.

2.2.8.2. Ventajas frente a la harina de pescado

Ockerman y Hensenn (1994), señalan las siguientes ventajas del ensilado frente a la harina de pescado:

- a) El ensilado no se deteriora durante su almacenamiento y tiene menos probabilidad de contaminación en su preparación;
- b) El ensilado es estéril y se eliminan las salmonelas;
- c) La economía de producción del ensilado no se ve afectado si varía sus volúmenes de producción.
- d) El ensilado mezclado con glúcidos se puede secar al sol sin que se planteen problemas con las moscas.

3.4.10 Proceso del ensilaje.

Es un método para la conservación de forraje que se obtiene por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones sin oxígeno cuando este almacenado, compactado y cubierto para eliminar el aire, el proceso del ensilaje se puede separar en cuatro etapas fundamentales las cuales son: fase aeróbica, fase de fermentación, fase estable y fase de deterioro aeróbico (Weinberg y Muck, 1996; Merry et al., 1997).

3.4.11 Implicaciones sanitarias del uso del ensilaje.

La situación de hoy en día en nutrición de animales con productos que contengan agentes patogénicos y putrefactibles es muy aceptable, puesto que muchas de las fuentes usadas como sustratos para el ensilaje pueden estar alteradas por la contaminación. Por lo tanto, la calidad e inocuidad del ensilado necesita del tipo de materia prima, proceso de fermentación y condiciones de almacenamiento (Berenz, 1995).

Se ha evaluado que el proceso de fermentación de ensilado si está elaborado correctamente, debido que es un medio efectivo para disminuir o eliminar agentes patogénicos y organismos indicadores en residuos de bacterias de incubación, residuos de matadero avícola, y residuos pesqueros, microorganismos como coliformes, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus faecalis*, no estaba contaminado

en el ensilado que mostraban un bajo valor de recuento bacteriano o estaban libres de bacterias (Machín, D. 2001).

Además, esta conclusión se refuerza por lo indicado por Frazier y Westhoff (1978), estos demostraron las infecciones causadas por microorganismos que causan infecciones alimentarias. Son inhibidas en ambientes de $\text{pH} < 4$, y que en el caso del *Clostridium botulinum*, la posibilidad de intoxicación es prevenida con un $\text{pH} < 4,5$.

La fermentación de estos residuos no aptos para consumo directo, también disminuye el número de patógenos Gram negativos (Talkington et al., 1981) y de virus (Wooley et al., 1981).

Muchos residuos de animales y de pescados tienen enzimas autolíticas, las cuales a un pH reducido son capaces de degradar moléculas orgánicas, por lo cual exponen a cualquier microorganismo presente en el desecho a una acción antimicrobiana (Backhoff, 1976).

3.4.12 Procedimiento para utilizar el ensilado de pescado.

Es utilizado en forma líquida o seca, con atributos y calidad nutricional superior o similar a la harina de pescado, empleándolo como un insumo dentro de las formulaciones de alimentos concentrados o como un aditivo diario artesanal en la manutención animal, siendo una alternativa como fuente proteica (Gonzales et al. 2007; Fagbenro et al. 1993).

3.4.13 Uso del ensilado de pescado en la alimentación de animales.

Entre los componentes más primordiales en la producción animal se destaca una nutrición de calidad, que representa entre el 50 y 80% de los costos variables de producción (Berenz, 1994). El alto costo se debe en gran medida a que la mayoría de las fuentes proteicas son costosas (Díaz, 2004).

El ensilaje de desechos pesqueros ha sido empleado satisfactoriamente como suplemento proteico en dietas para rumiantes y no rumiantes donde hay poca disponibilidad de fuentes proteicas (Gonzales y

Marín, 2005; Córdova et al., 1990; Hassan y Heath, 1986; León, 2003). Winter y Feltman (1983), han realizado estudios sobre el uso de ensilaje de pescado como solución a la provisión de proteínas en las dietas de rumiantes. Estos autores han demostrado que tanto los bovinos de carne y lechero, así como los ovinos, pueden degradar bien la proteína presente en el pescado ensilado. (Díaz, 2004; Winter y Feltman, 1983).

Samuels et al. (1991), se determinaron favorablemente diferentes subproductos de pescadería “residuos de pescado y cangrejos” ensilados y usados como suplementos proteicos en corderos alimentados con heno de gramíneas, lo que nos muestra su alto potencial en la industria animal. León (2003), estudió el efecto de la suplementación con subproductos fermentados de pescadería “residuos del procesado de filete de tilapia y lodos de la industria atunera” sobre el consumo y la digestibilidad de nutrientes en corderos alimentados con gramíneas tropicales, observándose resultados favorables.

El uso de estos desechos pesqueros fermentados como suplemento proteico para diversas clases de animales resulto productivo tanto para la industria pesquera como para la agropecuaria, así redujeron los problemas de contaminación ambiental y disposición de residuos sólidos (Díaz, 2004).

3.4.14 Procesos de acidificación y de hidrólisis.

Acorde a los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas, pareciera que dicho proceso se puede dividir en dos fenómenos distintos, pero que se complementan: una corresponde a la hidrólisis o licuefacción, la cual está administrada por las enzimas proteolíticas, y la otra corresponde a la acidificación y reducción del pH, la cual está administrada por la acción de los microorganismos ácido-lácticos. Es posible acelerar uno de los dos fenómenos, sin alterar drásticamente el otro (Bello 1997).

El pH es uno de los indicadores de mayor relevancia que debe ser monitoreada durante todo el proceso, Además el pH es posible de medir sin complicaciones.

Por esto es importante que la cantidad de fuente de carbono agregada sea la necesaria como para sostener un pequeño reservorio que les conceda a las bacterias lácticas producir suficiente ácido en un tiempo determinado. Esta fase se puede observar en los contajes de microorganismos mesófilos, los cuales incrementan en el momento en que el pH aumenta y luego se merman cuando la cantidad de ácido producida es capaz para bajar nuevamente el pH a su valor cercano a 4 y auto inhibir el desarrollo microbiano. El comportamiento de estos microorganismos fue observado por Van Wik y Heyderich (1985).

Mientras la otra fase de hidrólisis o licuefacción del ensilado, puede ser medida o evaluada a través del nitrógeno no-proteico, el líquido exudado o la consistencia. Esto especifica señalando un incremento de la hidrólisis proteica progresiva y rápidamente al inicio del proceso, haciéndose más lenta después hasta un periodo de 60 días (FAO, 1997).

Aun cuando las dos fases parecieran estar separados, presentan una relación estrecha. A medida que la hidrólisis proteica progresa, se generan compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminas, amonio y otros compuestos de bajo peso molecular, los cuales perturban la capacidad amortiguadora del producto, elevandose los valores de pH, lo cual conduce a que las bacterias ácido-lácticas comiencen a producir ácido y disminuir nuevamente el pH a su valor inicial (Lindgren y Pleaje, 1983).

El pescado fresco, juega un rol muy importante en la rapidez de disminución del pH inicial. Esto se debe a una fijación de un mecanismo de competencia entre los microorganismos descomponedores y las bacterias lácticas. A mayor número de microorganismos iniciales de que participan en el deterioro del pescado fresco, mayor será el número de bacterias lácticas que se deben inocular para asegurar un adecuado proceso. Igualmente, cuando se utilizan los intestinos del pescado en la elaboración del ensilado, se está favoreciendo el fenómeno de hidrólisis, por la

presencia de mayor cantidad de enzimas contenidas en los intestinos, pero paralelamente se está agregando una fuerte carga de microorganismos que es necesario inhibir rápidamente.

Por lo tanto, se recomienda usar pescados frescos y con intestinos para aumentar la velocidad del desarrollo del ensilado.

3.4.15 Proceso de elaboración.

Según Kjos (2001), la preparación de un ensilado biológico puede elaborarse a nivel artesanal, como también a escala industrial. Las instalaciones que se utilizan para la preparación de ensilado dependen de la cantidad de producción. Los equipos utilizados en el proceso de trituración son: adaptación de equipos disponibles localmente como molino picador de coco, picadora de carnes convencional a tornillo con placas perforadas, molino de martillo desintegrador, bomba trituradora (Mutrator).

Este último equipo se utiliza como mezclador y es usado en el proceso de pescados pequeños o sólo vísceras. La molienda del pescado debe realizarse eficientemente tanto para el proceso biológico como para el químico. Para lograr este requerimiento, el equipo a utilizar para la trituración podrá ser de características muy distintas, según se trate de desmenuzar pequeños pelágicos o cabezas de gran tamaño y fuerte estructura ósea.

3.4.16 Utilización del ensilado.

En la fabricación de ensilados como subproductos de la industria pesquera e hidrobiológica son importantes insumos en la nutrición animal. Son utilizados en la dieta nutritiva de toda clase de animales. Lo cual convierte en un producto pesquero primordial para la alimentación animal es por su elevado y valioso contenido proteico y grasa (aceite).

La composición química del ensilado húmedo indica elevados tenores de agua (60-80%) y variables porcentajes de proteína bruta (12-19%) de elevado valor nutricional en ensilados biológicos. Se considera que en los biológicos la grasa es un poco más estable a la oxidación que en los

ensilados químicos (Martínez Prada, 2003).

3.4.17 Análisis proximal del alimento.

El uso indiscriminado de ciertos alimentos, sin conocer su composición química, impide su beneficio total y en circunstancias incluso puede tener consecuencias detrimentales para los animales o el consumidor de los productos de esos animales, de tal manera que se podría decir que el estudio de los alimentos es primordial porque permite beneficiarlos en forma favorable al conocer qué componentes contienen y en qué cantidad (Berruecos et al. 1976).

Un análisis "próximo" se distingue de un "último" en que no determina un elemento o compuesto particular, sino que es una estimación de un cierto tipo de componentes, "materia volátil", "humedad", "grasa", "cenizas", "materia nitrogenada", etc.

Los constituyentes de un análisis proximal según Berruecos et al. 1976, son:

- **Humedad:** El agua es un nutriente fundamental de gran importancia, que los animales necesitan en volúmenes altos. Sin embargo, el agua no contribuye al valor nutritivo de los alimentos excepto bajo condiciones especiales de aridez. Por lo contrario, diluye el contenido de nutrientes sólidos y lo hace más susceptible a fenómenos de descomposición por enzimas tisulares, bacterianas o de hongos (Berruecos, Merino y Tejada de Hernández, 1976).
- **Proteína cruda:** Un elemento característico de las proteínas es el nitrógeno, los métodos de cuantificación de proteína se basan esencialmente en la determinación del contenido de nitrógeno de la muestra, suponiendo que todo el nitrógeno está en forma de proteína. (Berruecos, Merino y Tejada de Hernández, 1976).
- **Extracto etéreo o grasa cruda:** Las grasas y aceites presentes en la muestra seca se sustraen para cuantificarse con un disolvente

orgánico, generalmente dietiléter o bencina.

- Fibra cruda: Es una mezcla heterogénea de glúcidos (celulosa, hemicelulosa) y otros materiales (ligninas) esencialmente indigeribles por los animales monogástricos (Berruecos, Merino y Tejada, 1976).
- Cenizas o material mineral: Son restos de la incineración de la muestra o sea la exclusión del agua y la materia orgánica. Nutricionalmente esta fracción es demasiado cruda y en realidad es poco importante. Sin embargo, es un buen punto de partida para el análisis individual de nutrientes minerales presentes como el calcio, fósforo, hierro. (Berruecos, Merino y Tejada, 1976).

3.4.18 Uso de bacterias del yogurt.

Últimamente se está empleando bacterias ácido-lácticas del yogurt, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para el desarrollado de nuevos ensilados biológicos de pescado (Aguilera, 1993). La ventaja de estas investigaciones es que han logrado agregar microorganismos de más fácil obtención, utilización y manejo. Además, se ha decidido establecer la temperatura del proceso más conveniente para que garantice un rápido proceso hidrolítico con una eficiente acidificación.

Se han investigado como son afectados los distintos componentes de la flora microbiana existente en el pescado y los insumos durante la etapa de este proceso, al igual de cómo se reflejan en los parámetros físicos y químicos (Ockerman et al. 1994).

2.3 Definición de términos básicos.

Ensilado: Es nombrado ensilado al producto fermentado que resulta del almacenamiento del alimento en condiciones anaerobias durante un periodo de tiempo, con el propósito de preservar el valor nutricional del alimento original (Valencia 2011).

Residuos orgánicos: Definido como los componentes que se generan en el proceso de elaboración y consumo que no alcanzan ningún valor económico en el contexto en que se producen, son uno de los problemas ambientales con mayor relevancia, dado que, falta tecnología sofisticada o adecuada para su aprovechamiento y a la inexistencia de un mercado para los productos recuperados (Holguín 2009).

Hidrólisis: Significa descomposición, alteración o destrucción de una sustancia química por el agua. En los estudios realizados sobre soluciones acuosas de electrólitos, el término hidrólisis se utiliza principalmente a las reacciones de los cationes (iones positivos) con el agua para producir una base débil, o bien, a las de los aniones (iones negativos) para producir un ácido débil.

Acidificación: método basado en disminuir el pH de los alimentos que inhibe el crecimiento de los microorganismos. Se lleva a cabo agregando a los alimentos esencias acidas como el vinagre; Este método de conservación previene la contaminación de bacterias y contribuye a mantener la calidad deseada del producto.

Secado: método de conservación de los alimentos consistentes en extraer el agua de estos, lo que impide la proliferación de microorganismos y dificulta la putrefacción.

Aerobio: Organismos que sobreviven o se desarrollan en presencia de oxígeno di-atómico, mientras que si lo necesitan se denominan aerobios estrictos. El adjetivo aeróbico se aplica no sólo a organismos sino también a los procesos implicados (metabolismo aerobio) y a los ambientes donde se llevan a cabo.

Anaerobio: Son los procesos que no utilizan oxígeno (O₂) en su metabolismo, más exactamente que el aceptor final de electrones es otra sustancia diferente del oxígeno.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

3.1.1. De acuerdo al fin que se persigue

Tipo de estudio aplicada.

3.1.2. De acuerdo al enfoque de investigación

Tipo de investigación experimental.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

La población estuvo correspondida por los residuos de pescado obtenidas del centro poblado de Puerto Pizarro en la región de Tumbes.

3.2.2. Muestra

Las muestras de residuos de pescado (resultantes del fileteado de Carajito (*Diplectrum conceptione*) y volador (*Chelidonichthys obscurus*)) fueron recolectadas en el centro poblado de Puerto Pizarro - Tumbes con un total de 12 kg aproximadamente por especie; ambas muestras fueron adquiridas en estado fresco.

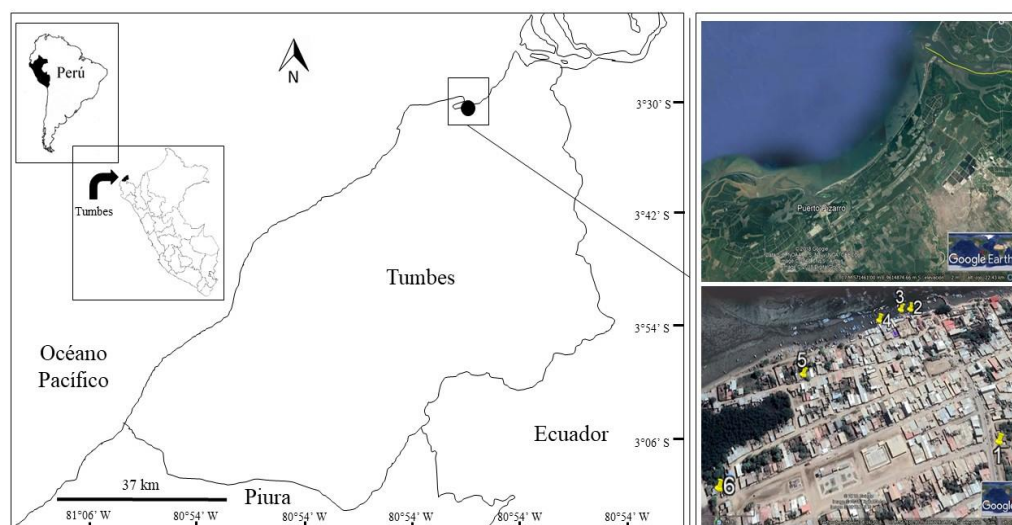


Figura 3. Puntos de ubicación de colecta de muestras para aislamiento bacteriano y residuos de pesca. (1) Granja de pollos, (2, 3, 4 y

5) Establecimientos de fileteado de pescado y (6) Granja de cerdos.

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Materiales de laboratorio

Frascos de dilución de 250 ml con tapa rosca, matraces de 150, 250 y 1000 ml, micropipetas 100 a 1000 ml, pipetas de 5 ml y 10 ml, placas Petri, propipetas, puntas para micropipetas 100 – 1000 µl, termómetro, tubos de ensayo de 160 x 10 mm, vaso de precipitación, fiola, probeta de 100 ml, probeta de 500 ml.

3.3.1.1. Materiales

Botas de jebe, cocina, balón de gas, mandil, melaza, moledora de carne ollas grandes, residuos de pescado, fundas herméticas (96 fundas), termómetros de alcohol.

3.3.1.2. Materiales para elaborar el yogurt

Balón con gas, cocina de dos hornillas, coladores, cuchara de palo, leche de vaca, microorganismos (Lactobacilos del tracto digestivo del cerdo), recipientes de plástico de 1 litro, recipiente para 3 L, recipientes de tecnopor.

3.3.2. Reactivos y medios de cultivo

3.3.2.1. Reactivos

Agua destilada, Azul de anilina al 0,03%, Fenolftaleína, Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N, Hexano, Glicerol.

3.3.2.2. Medios de cultivo

Agar MRS, Agua peptonada, Agar Salmonella/Shiguella, Plate Count Agar (PCA), Agar inclinado (TSA), Agar Sabouraud.

3.3.3. Equipos

Autoclave, balanza digital, baño maría, cámara de flujo laminar, vortex contador de colonias, equipo Soxhlet, espectrofotómetro, estufa, homogeneizador, incubadora, mufla, potenciómetro, refrigerador.

3.4. Método de Investigación

3.4.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se realizó el aislamiento y conservación de las bacterias ácido lácticas a partir del recto del cerdo, los cuales se procedió a identificar mediante un examen microscópico los lactobacilos desarrollados en la superficie del agar.

3.4.2. Análisis bioquímicos preliminares

Medida de pH: Se indicó la concentración de iones hidrógeno presentes en determinadas disoluciones de cultivo de las BAL.

Prueba de oxidasa: Se determinó la presencia de enzimas oxidasas en las BAL.

Prueba de Catalasa: Se determinó la capacidad que tienen las BAL para desdoblar el agua oxigenada en agua y oxígeno.

Generación de Gas: Se determinó la presencia de gas según el proceso fermentativo en caldo nutritivo.

Prueba de Sales Biliares: Se determinó la resistencia a sales biliares, para lo cual se preparó tubos de ensayo con 5 ml de caldo MRS enriquecidos con 1%, 5%, 10% de bilis y se inoculó con 1 ml del cultivo bacteriano BAL; posteriormente se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Tolerancia a pH bajos: Se evaluó el crecimiento en medios hostiles a 2,5; 3,5 y 4,5 pH en 5 ml de caldo MRS con HCl, inoculando el medio de las BAL y a las 24 horas de incubación a 37 °C

3.4.3. Análisis Molecular

3.4.3.1. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich et al. 1991, adaptado para células bacterianas según Dulanto 2013).

Luego, se procedió a pesar las muestras de las BAL en un microtubo 1,5 ml en la balanza analítica hasta obtener una cantidad entre de 25 a 30 mg.

Además, se agregó 600 μL de la solución de extracción (DTAB) se agito en el vortex por 20 segundos y se procedió a incubar a 100°C por 10 min. Después se llevaron a un choque térmico por 5 min; con la finalidad de romper la lisis celular.

Luego se agitaron en vortex por 20 segundos, y se adicionaron 700 μL de la solución de precipitación ADN, se agitaron nuevamente en vortex por 20 segundos. A continuación, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos.

Se transfirió el sobrenadante 250 μL a otro microtubo 1,5 ml contendrá previamente 100 μL de solución CTAB y 900 μL de agua destilada estéril. Se agitó en vortex y se incubó a 75°C durante 5 minutos. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min.

Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet (ADN) con 150 μL de solución disolvente, incubándose a 75°C durante 5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente.

A continuación, se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y después se transfirió el sobrenadante de 150 μl a un nuevo microtubo con 300 μl de etanol absoluto. Agitándose en el vortex por 20 segundos y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, se lavó el pellet con 200 μl de solución de lavado (etanol al 75%), se volteó el tubo varias veces secándolo el pellet por 15 minutos sin perderlo y re-suspenderlo con 200 μL de tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) y almacenado a -20°C .

3.4.3.2. PCR (Reacción en cadena polimerasa)

Para amplificar la región 16S RNAr, se utilizaron los cebadores universales 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3') descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud, y otros, 2003).

El volumen final de cada reacción será 20 µL, constituida por 2 µL de buffer Taq 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 mol de cada cebador y 2 µL de ADN extraído. La PCR se realizará en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) y constará de un ciclo de 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

3.4.3.3. Electroforesis

De cada producto de amplificación de la reacción en cadena polimerasa (PCR) 10 µL serán migrados en gel de agarosa al 1 % con tampón de migración TAE 1X. La migración se realizó a 120 V durante 20 minutos; conjuntamente se hará migrar un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (pb). Los geles serán visualizados utilizando un transiluminador UV, y fotografiados con cámara digital.

3.4.3.4. Secuenciación de los productos de la PCR.

Se utilizaron 10 µL de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, y serán colocados en micro tubos de 0,2 mL. Además, se preparó en microtubos de 0,2 mL porciones de 5 uL de cada cebador universales para el gen 16S ARNr. Estas serán empacadas y enviadas a la empresa Macrogen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

3.4.4. Obtención de ensilado biológico

Como materia prima se utilizó resultantes del fileteado de carajito y resultantes del fileteado de volador, transportados con destino al Laboratorio de Cárnicos de la Escuela de Agroindustrias de la Universidad

Nacional de Tumbes. Se cocinó durante un tiempo de 20 minutos a la temperatura de ebullición del agua (100°C) con el objetivo de disminuir la carga microbiana que estas poseen, luego se trituró en un molino eléctrico del taller de cárnicos de la Universidad Nacional de Tumbes, cuya masa resultante se mezcló por 3 minutos con los siguientes insumos.

Composición para 2 kg:

- Residuo cocinado (pescado): 70 %
- Sustrato (Melaza): 25 %
- Inóculo bacteriano: 5 %

La mezcla se colocó en fundas herméticas transparentes de capacidad para 200 gr. y se cerró el envase, dejando un % de espacio libre entre el producto y la parte inferior de la bolsa. Se realizó el diseño completamente aleatorizado (DCA), tres repeticiones por cada tratamiento para los respectivos análisis y fueron los siguientes.

T1 (TA°) = Ensilado de residuos de pescado con melaza y yogurt

T2 (30°) = Ensilado de residuos de pescado con melaza y yogurt

T3 (40°) = Ensilado de residuos de pescado con melaza y yogurt

3.4.5. Preparación de inóculo bacteriano

Para preparar inóculo bacteriano e incorporar al ensilado, se utilizó leche UHT de 1L, se utilizó bacterias ácido lácticas (BAL) nativas, aisladas del recto del cerdo, y conservadas en el Laboratorio Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud (F.C.S.) ubicada en la ciudad universitaria.

- **Activar cepas de BAL extraídas del tracto digestivo del cerdo:**
Se sembraron en placas Petri con agar MRS y azul de anilina para ayudar al reconocimiento de las BAL, incubándose por 48 horas a 32°C (Jurado, 2009). De las placas de MRS, se transfirió 2 a 3 colonias en tubos cónicos con 10 ml de caldo MRS, incubando por 48 horas a 35°C - 40°C (anexo 11).

- **Concentración de BAL por espectrofotometría:** La absorbancia o densidad óptica (D.O.) fue 1 y longitud de onda 630 nm.
- **Inóculo bacteriano:** Primera fase: En una olla se puso a pasteurizar 1 L de leche fresca a 85°C por 10 min y se dejó enfriar hasta 40°C. Posteriormente, en depósitos de 250 ml se agregó la leche y luego agregando un 1 ml de caldo ya en concentraciones iguales realizados por espectrofotometría, incubando el cultivo a temperatura de 40°C por 18 horas. Segunda fase: En una olla se pasteurizó 1 L de leche hasta 85°C por 10 min luego se enfrió hasta 40 °C. Del cultivo anterior se sacó 50 ml c/u de los cuatro inóculos para ser agregados en 1 L de leche ya pasteurizado. Se dejó incubar a 40°C por 5 horas, luego se colocó en el refrigerador para evitar que se deteriore.

3.4.6. Conservación de la materia prima.

Se utilizó baldes grandes para transportar los residuos de pescado de las dos especies a evaluar, la cual será transportada en cadena de frío con destino al Laboratorio de Cárnicos de la Escuela de Agroindustrias de la Universidad Nacional de Tumbes.

3.4.7. Cocción y enfriado de la materia prima.

Se cocinó durante un tiempo de 20 minutos a la temperatura de ebullición del agua con el objeto de disminuir la carga microbiana patógena que éstas poseen (Martínez, 2003).

Los residuos se retirarán de la olla de cocción con una coladera para escurrir y enfriar colocándose en bandejas largas para luego ser molido.

3.4.8. Molienda y mezclado.

Los residuos fueron sometidos a molienda empleándose un molino artesanal y una moledora de carne, con el fin de tener una masa uniforme y ampliar la superficie del contacto con el inóculo de yogurt y la melaza.

En un recipiente se colocará los residuos de pescado, mezclándose por 3 min con la ayuda de una cuchara de madera; luego la melaza y fermento láctico.

3.4.9. Envasado y almacenamiento.

Se realizó tres tratamientos con diferentes temperaturas y por triplicado. Para esto, se envasaron en fundas herméticas transparentes de capacidad para 200 g. al cual se incorporó un termómetro de alcohol para el registro periódico de la temperatura. Mezclado todos los componentes se sella herméticamente el envase, dejando un 25 % de espacio libre entre el producto y la parte superior del envase evitando la contaminación. Luego se inició el proceso de ensilaje aplicando temperaturas de 40°C, 30°C (incubadora) y temperatura ambiente para el proceso de ensilaje.

3.4.10. Evaluación de parámetros bromatológicos del ensilado biológico de pescado.

Se desarrollaron análisis fisicoquímico, valor nutricional, microbiológico y organoléptico, que comprende esto un análisis bromatológico como producto terminado por parte del ensilado biológico como alimento para cerdos.

Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos se realizaron en el laboratorio de Biología molecular y los análisis de valor nutricional en el laboratorio de Forestal y Medio Ambiente. Se siguió la frecuencia de colecta de muestra con respecto a los tiempos de almacenamiento del ensilado, ver tabla N° 03.

Tabla 3: Frecuencia de colecta de muestras

TIEMPO (DÍAS)	FISICOQUIMICOS	MICROBIOLOGICOS	VALOR NUTRICIONAL	ORGANOLEPTICO
3	X		X	X
5	X			X
10	X			X
15	X	X		X
30	X	X	X	X

X= Toma de muestra

3.4.10.1. Análisis fisicoquímico

- Se evaluó la temperatura mediante el uso de un termómetro.
- La evaluación de pH se realizó mediante un equipo potenciómetro.
- En la acidez, se recurrió al método por titulación al 0,1 N de NaOH (Martínez Prada 2003).

3.4.10.2. Análisis de valor nutricional (composición proximal).

Para el análisis químico se tomó de un manual de laboratorio referido al análisis de alimentos (UNAM, 2008).

a) Determinación de la humedad

Método por secado en estufa: Este método se refiere a la reducción de peso de la muestra por la volatilización del agua. Utilizando un equipo de la marca Marconi, modelo MA 033. Se pesó 2 gr de muestra por triplicado a temperatura de 70°C por 20 h y se dejó enfriar en la campana desecadora por 10 min.

Fórmula:

$$\%H = \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} * 100$$

Dónde:

A = peso de cápsula seca limpia.

B = peso cápsula + muestra húmeda.

C = peso cápsula + muestra seca.

b) Análisis de lípidos

Método de Soxhelt (James, 1999): Es una extracción semi-continua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (Nielsen, 2003).

Fórmula:

$$\%Grasas = \frac{W_b - W_f}{W_m} * 100$$

Dónde:

W_b = peso del balón.

W_m = peso de la muestra

W_f = peso final del balón

c) Determinación de Proteínas

Método de Kjeldahl: El procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas.

El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios, consta de dos pasos consecutivos:

a) La alteración de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.

b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra

FORMULA:

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{p_2}{p_0} * 100 * F$$

- Para pasar ha contenido de proteínas corregir por el factor adecuado según la naturaleza de la muestra. (6.25 por defecto)
- Periódicamente realizar un ensayo en blanco y restarlo del resultado.

Dónde:

P_2 = Nitrógeno (mg).

P_0 = Peso de la muestra (mg).

F = Factor proteínico. (6.25 por defecto)

d) Determinación de minerales.

Método cenizas totales (calcinación) (Kirk et al., 1996): Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. Se secó el crisol en una estufa a 110 °C por 10 min y se pesó el crisol a peso constante en una balanza analítica, se pesó 2 g de muestra en base seca, y luego se colocaron los crisoles en la mufla con la marca Thermoconcept Lac, modelo KL 05/12 a temperatura de 600°C por 4 h. hasta la obtención de cenizas blancas o grisáceas. Al término de este tiempo se dejó enfriar en la mufla y de inmediato se colocaron los crisoles en el desecador para enfriar durante una hora.

Formula:

$$\%Cenizas = \frac{wc + cenizas - wc}{wm} * 100$$

Dónde:

Wc+cenizas = peso del crisol junto con las cenizas.

Wm = peso de la muestra.

Wc = peso del crisol.

e) Medición del pH

La medición del pH se realizó a través del método potenciométrico, por medida directa, introduciendo el electrodo en cada muestra homogenizada. La lectura del pH se considerará válida cuando el valor se mantuvo constante por un tiempo aproximado de 10 segundos. Previo a la medición, el potenciómetro será calibrado utilizando las soluciones buffer de pH 4 y pH 7.

f) Medición del porcentaje de acidez titulable.

Paralelamente al análisis de pH se llevó a cabo la determinación del porcentaje de acidez titulable expresado como ácido láctico, siguiendo la metodología de la AOAC (1998) citada por Peralta (2010) en la que se mide en forma indirecta el ácido láctico presente en la muestra. El método consiste en la titulación del ácido con hidróxido de sodio 0,1 N teniendo como punto final al cambio de pH del indicador fenolftaleína a un viraje de pH 8.1 +/- 0.2.

Para este fin se pesaron 10 gramos de la muestra y se diluyeron en 50 ml de agua destilada agregándosele además 0.3 ml de fenolftaleína, luego se procedió a la titulación con NaOH manteniendo el electrodo dentro para registrar el cambio de pH. Una vez alcanzado el valor de pH deseado (es decir pH 8.1 +/- 0.2) se medirá el gasto de NaOH utilizado el cual se usó en la siguiente fórmula para conocer el porcentaje de ácido láctico:

Fórmula:

$$\% \text{ de ácido láctico titulable} = \frac{G * N * 0.090 * 100}{m}$$

Dónde:

G = gasto de NaOH (ml)

N = normalidad del NaOH

m = masa de la muestra (g)

0.090 = factor de conversión

Esta fórmula expresa los gramos de ácido láctico por 100 gramos de producto.

3.4.10.3. Análisis microbiológico

Se colectó 150 g de muestra en los ensilados. La preparación de muestras para el análisis microbiológico exige condiciones de manipulación aséptica muy estrictas, así como la utilización de material y diluyentes estériles (DIGESA, 2001). Se analizó la muestra en el laboratorio de biología molecular de la facultad de ciencias de la salud ubicada en la ciudad universitaria, en una cámara de flujo laminar de la marca Labotecgroup.com, modelo BBS – DDC.

Se agregó 25 g de muestra al medio diluyente (agua peptonada) de 225 ml, se efectuó diluciones 1 ml a los tubos falco que contenga medio diluyente, se mezcló por 20 s. en un agitador. Se agregó 100 µl de las diluciones respectivas en placa Petri debidamente rotuladas por duplicado y con la técnica por extensión en superficie se sembró fig. (3).

Para el recuento de microorganismos en el ensilado como producto son las siguientes (Martínez, 2003).

- Recuento Total de mesófilos aerobios, en el medio Plate Count que se incuba a temperatura ambiente por 48 horas en placa invertida.
- Recuento de BAL, en el medio MRS, se incubó a temperatura ambiente por 48 horas en placa invertida.
- Recuento de salmonela, en el medio enriquecido para salmonela SS Agar, que se incubó a 37 °C por 48 horas.
- Recuento de mohos y levaduras en el Agar SABOURAUD, que se incubó a temperatura ambiente por 48 horas en placa invertida y se realiza la lectura.

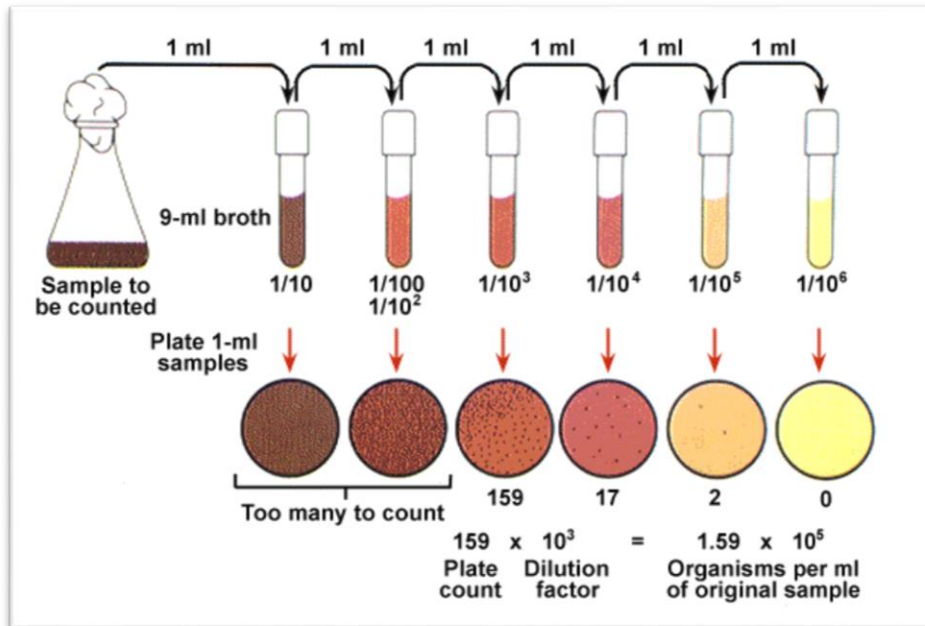


Figura 4. Dilución de muestra para recuento en placas.

3.4.10.4. Análisis organoléptico

Las características organolépticas, conocidos también como atributos sensoriales, constituyen el estímulo que se evaluó en el ensilado biológico con el objetivo de determinar las características del producto como su color, olor y consistencia.

3.4.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de temperatura, pH y acidez titulable fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% y la determinación de medias distintas con la prueba Duncan.

3.4.12. Diseño experimental

Tabla 4. Diseño experimental carajito y volador.

ESPECIE CARAJITO Y VOLADOR						
TIEMPO TRATAMIENTO	0	3	5	10	15	30
TA		R1	R1	R1	R1	R1
	R1	R2	R2	R2	R2	R2
		R3	R3	R3	R3	R3
T30°C		R1	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2	R2	R2
		R3	R3	R3	R3	R3
T40°C		R1	R1	R1	R1	R1
	R3	R2	R2	R2	R2	R2
		R3	R3	R3	R3	R3

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación molecular de cepas bacterianas.

A partir de hisopados rectales sembraron en agar MRS con azul de anilina, se aislaron un total de tres cepas bacterianas, que, según sus características microscópicas y bioquímicas básicas, corresponden al grupo de las bacterias ácido lácticas (Bacilos Gram positivos, oxidasa negativa, catalasa positiva, no formadoras de esporas). (Accesión CP017982.1, 99,39% de identidad).

4.2. Temperatura

Los valores promedio obtenidos de temperatura Ta, T30°C y T40°C, ha tenido una estabilidad adecuada; por lo cual la temperatura de ambas especies tanto carajito como el pez volador están dentro de la temperatura asignada. Cuyos resultados se muestran en la figura 5 y 6, se muestra el comportamiento de la temperatura promedio de los tratamientos donde TA 28.04 ± 3.06 , T30 30.61 ± 6.84 y T40 38.56 ± 40.30 , para la especie carajito y TA 27.64 ± 1.96 , T30 30.75 ± 7.28 y T40 38.63 ± 39.91 , para la especie volador. Siendo la mayor temperatura promedio durante todo el proceso de almacenamiento el T40 en ambas especies, donde se observa también mayor variación y diferencia estadística de la TA frente a los tratamientos de T30 Y T40, estas dos últimas estadísticamente son semejantes según la prueba de Duncan.

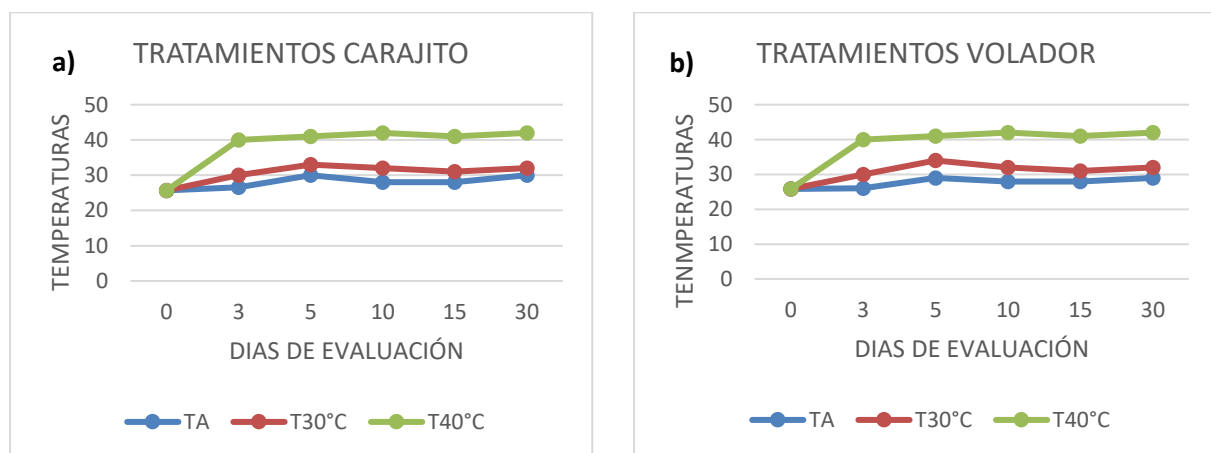


Figura 5. Comportamiento de temperaturas durante el proceso de ensilaje de carajito a) y volador b).

4.3. Determinación del pH y acidez del ENSILADO INCUBADO a 40°C, TA y 30°C.

Este ensilado se incubó durante los treinta días. Dado que a este tiempo se efectuaron análisis de pH, acidez, puesto que son éstos los primordiales indicadores a observar durante el proceso.

Que según tabla de la figura N°7, 8 y 9, se muestra la relación entre el pH y la acidez de los tratamientos así como su comportamiento en función a los días de evaluación de la especie carajito donde el promedio del tratamiento a temperatura ambiente presento pH de 4.54 ± 0.29 , T 30°C 4.50 ± 0.32 y T 40°C 4.59 ± 0.26 , así como también se muestra el promedio de Acidez para esta especie donde TA 1.86 ± 0.52 , T30°C 1.89 ± 0.53 y T40°C 1.60 ± 0.25 , se observa que no hay diferencia estadística entre los tratamientos tanto en pH como en % de acidez, según la prueba de Duncan.

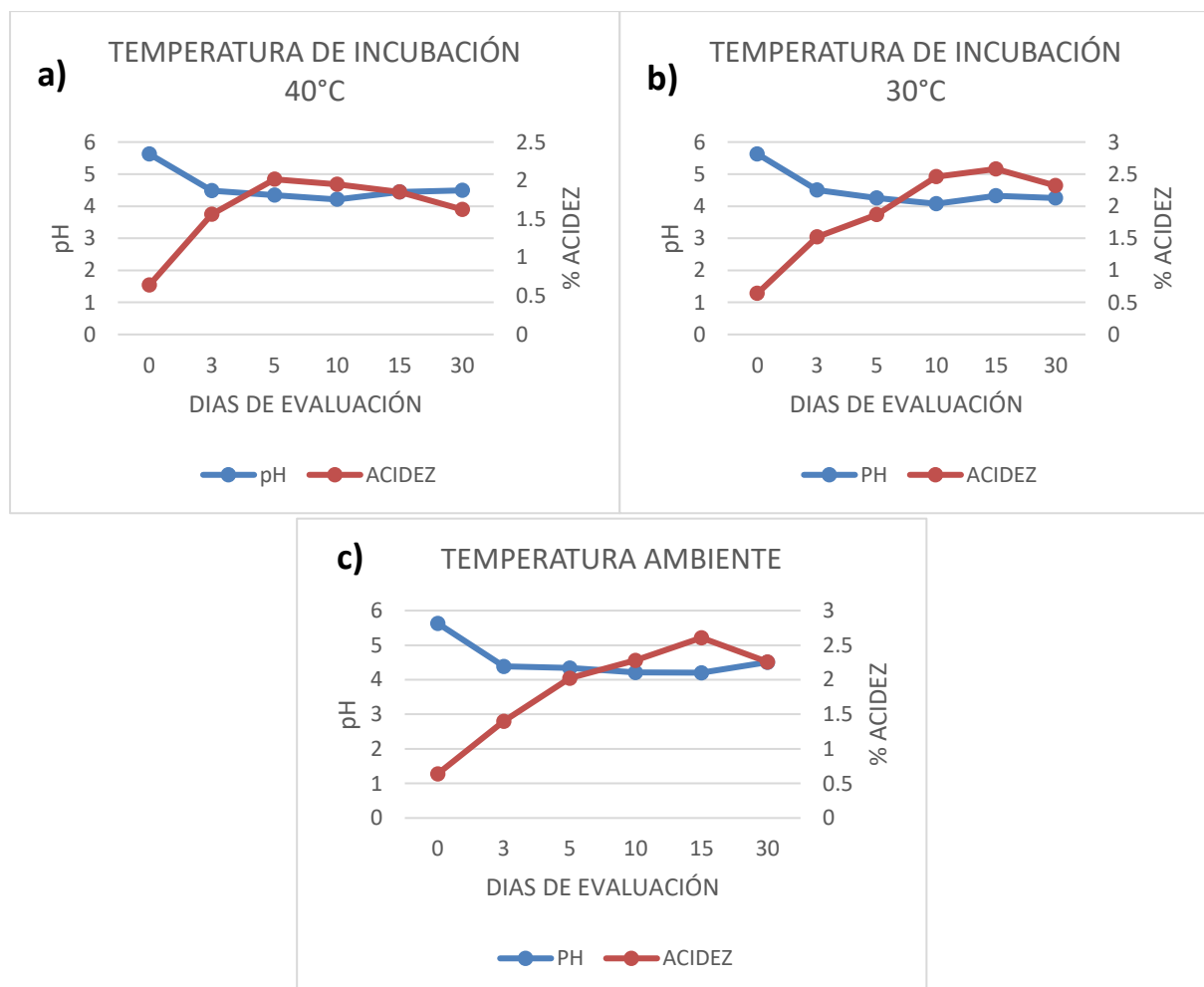


Figura 7. Valores de pH y acidez del ensilado de carajito incubado a) 40°C, b) 30°C y c) TA.

Que según tabla de la figura N°10, 11 y 12, muestra la relación entre el pH y la acidez de los tratamientos, así como su comportamiento en función a los días de evaluación, de la especie volador donde el promedio del tratamiento a temperatura ambiente presento pH de 4.54 ± 0.13 , T 30°C 4.48 ± 0.14 y T 40°C 4.49 ± 0.14 . así como también se muestra el promedio de Acidez para TA 1.57 ± 0.23 , T30°C 1.44 ± 0.14 y T40°C 1.21 ± 0.05 , Donde se observa que no hay diferencia estadística entre los tratamientos para el pH, pero si lo hay para el % de acidez, según la prueba Duncan.

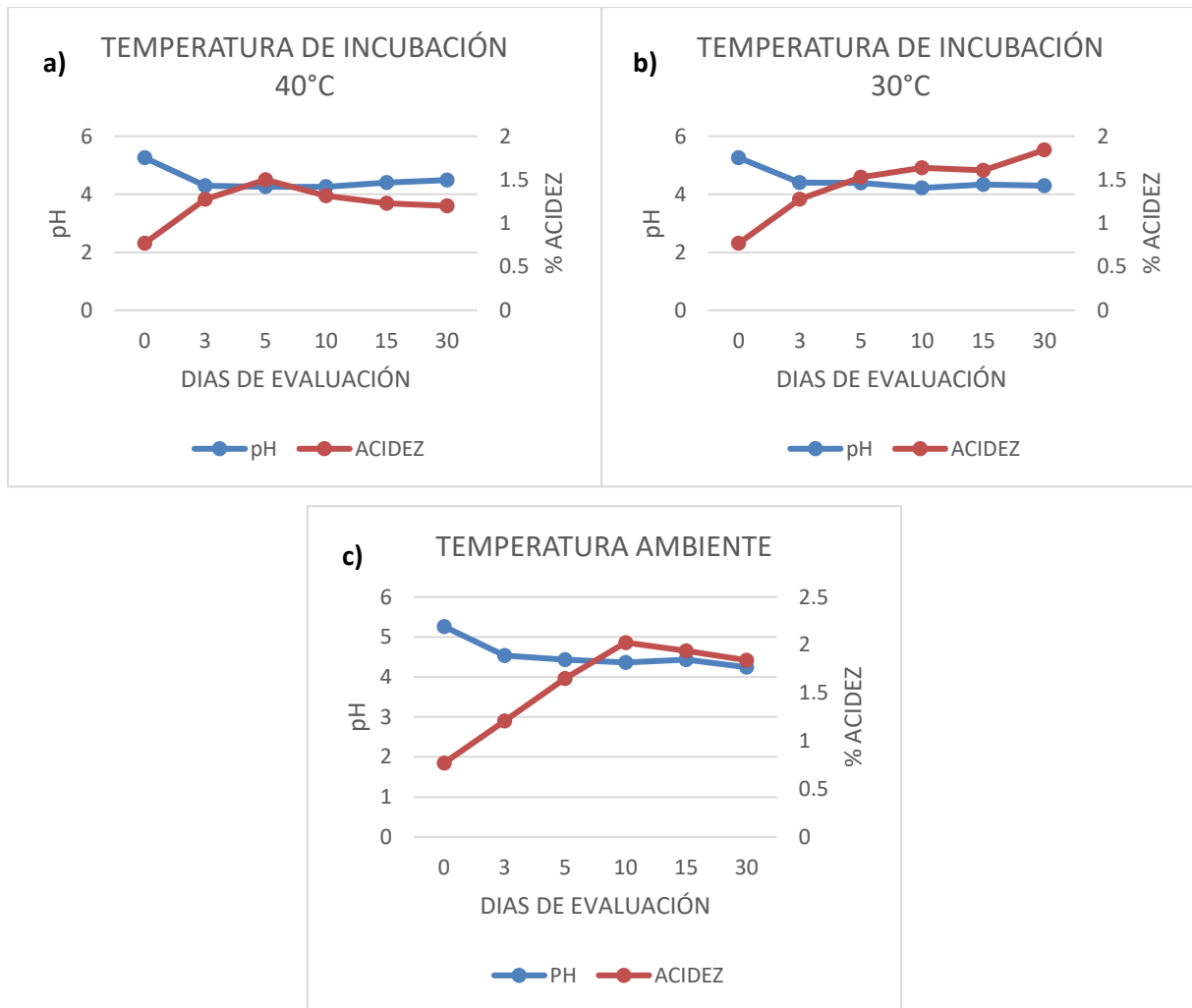


Fig. 10 Valores de pH y acidez del ensilado de volador incubado a) 40°C, b) 30°C y c) TA.

4.3. Comparaciones entre pH y temperatura

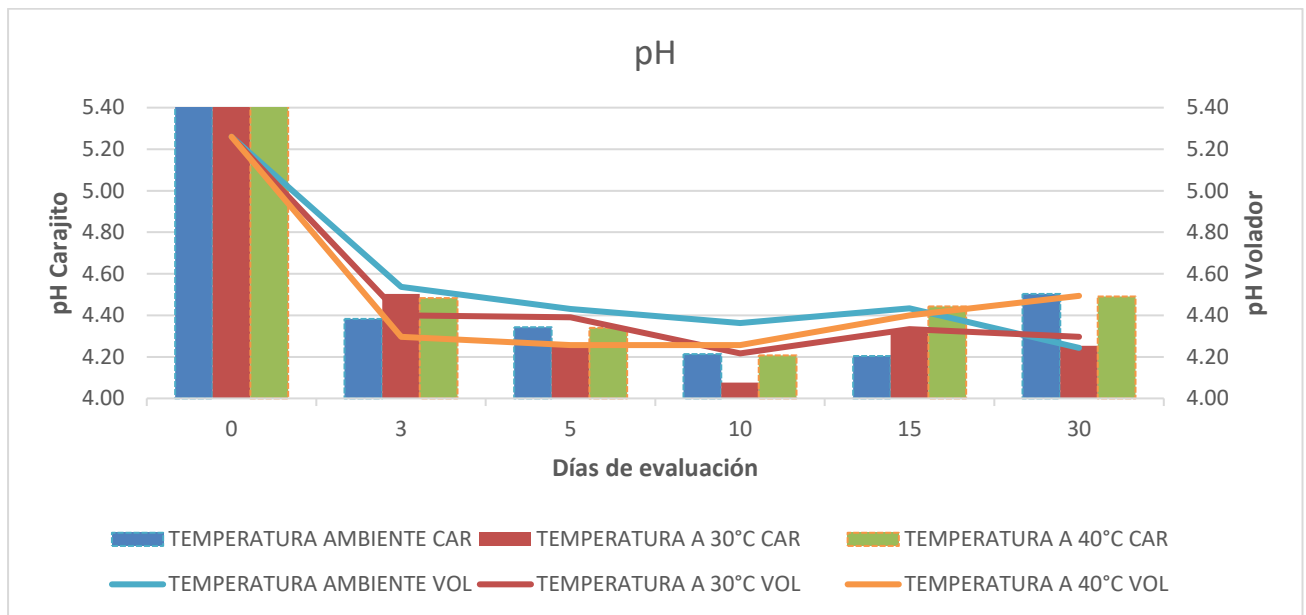


Figura 13. Comparación del pH en función a los días de evaluación de las dos especies en estudio.

Que según tabla de la figura 13 se muestra la comparación de, pH en función a los días de evaluación de los tratamientos donde el promedio del tratamiento a temperatura ambiente presento pH de 4.54 ± 0.29 , T 30°C 4.50 ± 0.32 y T 40°C 4.59 ± 0.26 , en la especie carajito. Asi como también se muestra el promedio del tratamiento a temperatura ambiente 4.54 ± 0.13 , T 30°C 4.48 ± 0.14 y T 40°C 4.49 ± 0.14 . en la especie volador. Para ambos casos no hay diferencia estadística entre especies, asi como también no existe diferencia entre los pH promedios entre los tratamientos., según la prueba Duncan. se observa que el pH va disminuyendo al partir del tercer día estabilizándose al día 15 donde el T30 y T40 bajaron el pH mas rápido que el TA.

4.4. Comparaciones entre acidez con temperatura

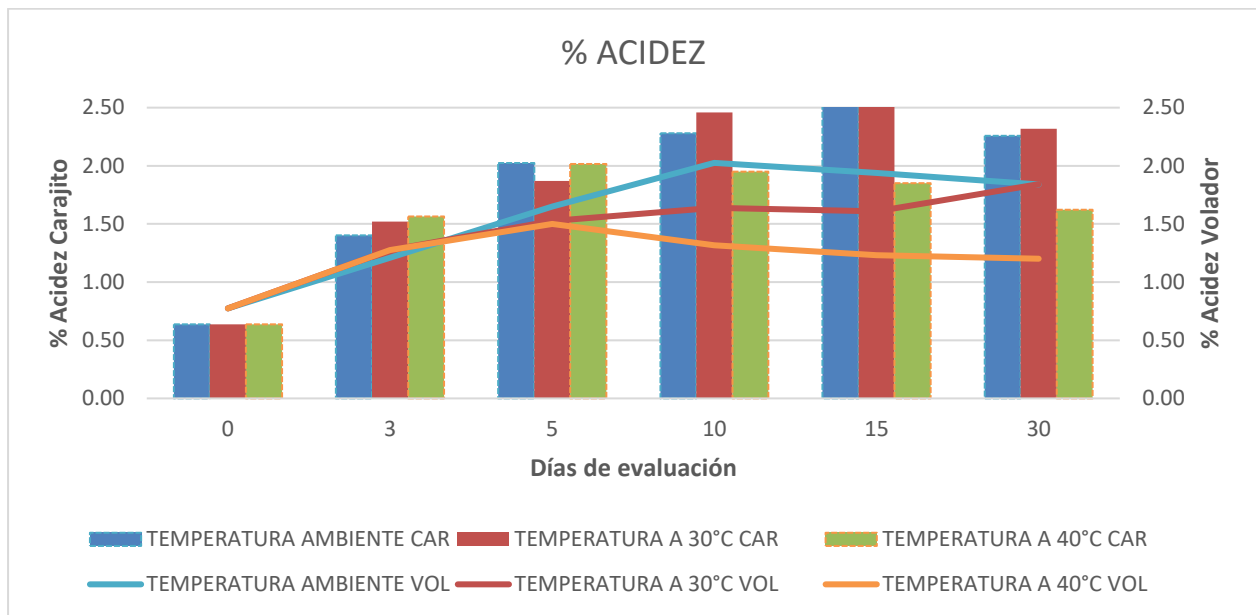


Figura 14. Comparación de especies entre acidez y temperatura.

Que según tabla de la figura 14, se muestra la comparación de especies entre acidez y temperatura así como su comportamiento en función a los días de evaluación donde el promedio del tratamiento a temperatura ambiente presento porcentaje de acidez de 1.86 ± 0.52 , T30°C 1.89 ± 0.53 y T40°C 1.60 ± 0.25 , en la especie carajito, se observa que no hay diferencia estadística significativa en los tratamientos estudiados. Así como también se muestra el promedio del tratamiento a temperatura ambiente 1.57 ± 0.23 , T30°C 1.44 ± 0.14 y T40°C 1.21 ± 0.05 , en la especie volador, por lo cual podemos observar que si hay diferencia estadística significativa entre TA y a T 40°C en esta especie estudiada. Donde se observa que el porcentaje de acidez aumenta en función a los días de evaluación, se obtiene los mayores porcentajes en la especie carajito.

4.5. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

Se colectaron 150 g de muestras de los EB a los 15 y 30 días, de las siguientes temperaturas: Ta, T30°C y T40°C, para ver los crecimientos de estos microorganismos.

Tabla 5. Evaluación microbiológica del ensilado durante su almacenamiento de 15 días.

RECUESTO	Carajito T.A	Carajito T 30°C	Carajito T 40°C	Volador T.A	Volador T 30°C	Volador T 40°C
BAL(UFC/ml)	10.7x10 ⁴ UFC/mL	3.5x10 ⁴ UFC/mL	25.7x10 ³ UFC/mL	5.2x10 ⁷ UFC/mL	6.6x10 ⁷ UFC/MI	8.5x10 ⁵ UFC/mL
Mesofilos aerobios(UFC/ml)	9.6x10 ⁴ UFC/mL	22.5x10 ³ UFC/mL	5.1x10 ³ UFC/mL	6.2x10 ⁷ UFC/mL	7.4x10 ⁷ UFC/MI	6.3x10 ⁵ UFC/mL
Levaduras y hongos(UFC/ml)	19.3x10 ⁴ UFC/mL	6.9x10 ⁴ UFC/mL	9.3x10 ³ UFC/mL	26.6x10 ⁴ UFC/mL	6.6x10 ⁵ UFC/MI	4.7x10 ⁵ UFC/mL
Salmonella spp.	Ausencia/25g	Ausencia/25gr	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25

Tabla 6. Evaluación microbiológica del ensilado durante su almacenamiento por 30 días.

Parámetro microbiológico	Carajito T.A	Carajito T 30°C	Carajito T 40°C	Volador T.A	Volador T 30°C	Volador T 40°C
BAL	13.9x10 ⁶ UFC/mL	11.5x10 ⁴ UFC/mL	10.2x10 ⁴ UFC/mL	19.8x10 ⁵ UFC/mL	12.8x10 ⁵ UFC/mL	8.1x10 ⁵ UFC/MI
Mesofilos aerobios	6.9x10 ⁵ UFC/mL	9.7x10 ⁴ UFC/mL	20.3x10 ⁷ UFC/mL	14.4x10 ⁸ UFC/mL	6.9x10 ⁵ UFC/mL	5.0x10 ⁵ UFC/mL
Levaduras y hongos	12.6x10 ⁵ UFC/mL	12.3x10 ⁴ UFC/mL	6.2x10 ⁴ UFC/mL	18.1x10 ⁷ UFC/mL	7.4x10 ⁵ UFC/mL	4.8x10 ⁵ UFC/mL
Salmonella sp.	Ausencia/25gr	Ausencia/25gr	Ausencia/25gr	Ausencia/25gr	Ausencia/25gr	Ausencia/25gr

4.6. ANALISIS ORGANOLEPTICOS

Tabla 7. Atributos organolépticos del ensilado biológico.

ESPECIES	ATRIBUTOS	TRATAMIENTO	TIEMPO (DÍAS)				
			3	5	10	15	30
CARAJITO	COLOR	TA	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón	Marrón
		T30°C	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón	Marrón
		T40°C	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón oscuro	Marrón oscuro
	OLOR	TA	Dulce y olor a pescado	Dulce ácido con suave olor a pescado	Ácido con ligero alcohol	Ácido con ligero alcohol	Ligerment e ácido y alcohol
		T30°C	Dulce y olor a pescado	Ácido suave	Ligeramente alcohol	ligeramente alcohol	Ligeramente ácido y alcohol
		T40°C	Dulce y olor a pescado	Ligeramente ácido	Ácido fuerte	Ácido fuerte	Ácido fuerte
	CONSISTENCIA	TA	Pastoso con poco líquido en la base	Pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso
		T30°C	Pastoso con poco líquido en la base	Pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso
		T40°C	Pastoso con poco líquido en la base	Pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso
VOLADOR	COLOR	TA	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón	Marrón
		T30°C	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón	Marrón
		T40°C	Beige	Beige	Beige oscuro	Marrón oscuro	Marrón oscuro
	OLOR	TA	Dulce y olor a pescado	Dulce ácido con suave olor a pescado	Ácido con ligero alcohol	Ácido con ligero alcohol	Ácido con ligero alcohol
		T30°C	Dulce y olor a pescado	Ácido suave	Ácido con ligero alcohol	Ácido con ligero alcohol	Ácido con ligero alcohol
		T40°C	Dulce y olor a pescado	Ligeramente ácido	Ácido fuerte	Ácido fuerte	Ácido fuerte
	CONSISTENCIA	TA	Pastoso	Pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso
		T30°C	Pastoso	Pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso
		T40°C	Pastoso	pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso	Semisólido-pastoso

4.7. Análisis nutricional

Se enviaron muestras secas al laboratorio de control de calidad de la universidad Nacional de Piura, para la determinación de proteína. Los resultados obtenidos mediante el análisis de composición proximal de los ensilados biológicos en estado seco se presentan en la tabla 7. Los tratamientos TA, T30°C y T40°C con respecto al tiempo existe poca variabilidad. En proteína de TA un 32,43 – 36,70%; T30°C un 30,20 – 33,80% y T40°C un 34,63 – 36,00 de la especie carajito. En grasa de TA un 10,75- 9,50%; T30°C un 11,54 – 14,00% y T40°C un 10,07 – 9,76 por último en cenizas de TA un 24,23 – 25,50%; T30°C un 25,48 - 26,12% y T40°C un 25,50 – 25,50%. También se obtuvieron buenos los resultados con la especie volador los cuales se verán reflejados en una tabla.

Tabla 8. Composición proximal del EBP seco, inicial y final durante el tiempo de almacenamiento de la especie carajito.

Especie	Tratamiento	Materia seca (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Fibra (%)
Carajito	Inicial Ta	90.46	10.75	32.43	24.23	1.60
Carajito	Final Ta	93.69	9.50	36.70	25.50	1.30
Carajito	Inicial 30°C	95.75	11.54	30.20	25.48	1.40
Carajito	Final 30°C	95.78	14.00	33.80	26.12	1.70
Carajito	Inicial 40°C	94.14	10.07	34.63	25.50	1.47
Carajito	Final 40°C	90.37	9.76	36.00	25.50	1.50

Tabla 9. Composición proximal del EBP seco, inicial y final durante el tiempo de almacenamiento de la especie volador.

Especie	Tratamiento	Materia seca (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Fibra (%)
Volador	Inicial	94.14	14.14	24.66	18.76	1.35
Volador	Final	90.48	11.24	33.00	26.12	1.50
Volador	inicial 30°C	92.80	13.61	27.25	25.93	1.65
Volador	final 30°C	89.66	10.07	32.60	25.50	1.23
Volador	inicial 40°C	93.30	11.19	30.60	29.35	1.54
Volador	final 40°C	92.90	11.19	33.16	29.35	1.39

CAPITULO V. DISCUSIONES

Según Martínez (2003), manifiesta que se obtuvieron mejores resultados a 29°C en comparación a la temperatura de 40°C utilizando como sustrato la melaza. Por lo cual se afirma que en los tratamientos que se ha realizado en este proyecto se lograron mejores resultados a 30°C y 40°C (temperatura de incubación) a diferencia con la temperatura ambiente. Debido a que a estas temperaturas los pH decrecieron en los primeros días del proceso y siguieron decreciendo hasta lograr valores de 4.08 y 4.22 de las especies carajito y volador a 30°C; mientras a 40°C los valores alcanzados fueron de 4.21 y 4.26 a los 10 días de haber sido inoculados. Lograr ciertos valores de acidez nos posibilita tener más confianza dado a que en 10 días de almacenamiento podemos obtener un ensilado de calidad.

Por ende, en las comparaciones de pH y temperatura realizados en esta investigación podemos decir que a temperatura de 30°C (temperatura de incubación) se observó mejores resultados que al de 40°C (temperatura de incubación) y al de temperatura ambiente. Ya que se ha hecho comparaciones de las especies estudiadas se puede determinar que se obtuvo mejor resultado en la especie carajito, debido a que se lograron valores de pH cercanos a 4, el cual es 4.08, pero en la especie del pez volador determina que se obtiene mejor resultado a temperatura de 40°C en comparación con los valores obtenidos a esa misma temperatura con la especie carajito. Estos resultados revelan que 30°C es una temperatura preferible para la incubación del ensilado, dado que es importante desde el punto de vista económico a la hora de elaborar ensilado, debido a que se reducirán los costos de calefacción o acondicionamiento de lugares a temperatura necesariamente elevadas.

Pese a que la velocidad de fermentación en el proceso está estrechamente relacionada con la temperatura y de acuerdo a antecedentes 40°C sea una temperatura ideal para el desarrollo de las bacterias lácticas y la reducción de las probabilidades para que bacterias perjudiciales incrementen; en casos como este puede apreciarse que a 30°C fueron mejores los resultados. En investigaciones realizadas se usó el cultivo de yogurt como inóculo, se manifestó que a 40°C temperatura de incubación se llevaba a cabo la fermentación en un tiempo de 2 días.

Según Fernández et al. (2011), Los estudios microbiológicos permitieron determinar la aplicación de una buena práctica de elaboración y la inocuidad de los EB obtenidos. Siendo establecido por la norma técnica de Colombia en alimento balanceado para cerdos; los mesófilos aerobios de los tratamientos T1, T2 y T3 de valores 9.6×10^4 UFC/mL, 22.5×10^3 UFC/mL, 5.1×10^3 UFC/mL, de la especie carajito y 6.2×10^7 UFC/mL, 7.4×10^7 UFC/mL, 6.3×10^5 UFC/mL, de la especie volador, al final de su almacenamiento, se comprende que cumplen con los parámetros microbiológicos, siendo el límite permisible 10×10^7 UFC/g. De igual forma, el recuento de levaduras y hongos de los tratamientos T2 y T3 con valores 6.9×10^4 UFC/mL, 9.3×10^3 UFC/mL, se encuentra dentro del límite permisible de 10×10^4 UFC/g (ICA, 1999). Por otro lado, la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp. pone de manifiesto que han sido inhibidos por la condición de acidez del ensilado generada por las BAL (Fernández, 2011).

Según Bello (1997), el pH es uno de los indicadores de mayor relevancia, debido a que se debe controlar durante todo el proceso de fermentación y almacenamiento del ensilado, tal como se registró en los tratamientos T1, T2 y T3 valores de pH aceptables. Según Veloz Vargas (2005), los ensilajes de deficiente calidad, tienen un pH de 5,2 o más y contenido de ácido láctico, tan solo del 0,1 al 0,2%. El cual no ocurrió en los tratamientos trabajados. Sin embargo, los tratamientos T1, T2 y T3, disminuyeron con valores finales de almacenamiento un 4,50; 4,25 y 4,36 de pH, de la especie carajito, mientras tanto los valores finales de almacenamiento de la especie volador obtuvieron los siguientes resultados de pH 4,24; 4,30 y 4,49 valores similares de Triana et al. (2014) con 4,30 como también Gonzales y Marín (2005) con 4,5.

Además, que, para el éxito de este método de conservación, es fundamental contar con pescado fresco, dado que es primordial la velocidad de reducción del pH inicial; debido a que se establece un mecanismo de competencia entre los microorganismos descomponedores y las BAL (Llanes, 2007), según Martínez (2003) alcanzar bajos valores de pH permite tener más seguridad en que los atributos del ensilado no se van a ver modificados por la presencia de microorganismos indeseables.

Según Balsinde et al. (2003) y Ngoan (2000), comentan que en la práctica la composición del ensilado biológico va a depender de la especie, alimentación, época de captura, tipo y proporción de los residuos.

Por otro lado, Valencia (2011), afirma que en el proceso de ensilado no afecta el contenido de proteínas comparando entre residuos de pescado y ensilado biológico, lo cual indica la preservación del valor nutricional de ambas muestras.

Estudios realizados por Ngoan et al. (2000) en ensilado de cabeza de langostino obtuvieron resultados en base seca un 26,3% de proteína y 2,9% de grasa, difieren mucho con los resultados obtenidos con 36.70%, 33.80% y 36.00% de proteína con sus diferentes temperaturas TA, T30°C y T40°C respectivamente y 9.50%, 14.00%, 9.76% de grasa de la especie carajito, obteniendo porcentajes similares con la otra especie evaluada el pez volador 33.00%, 32.60% y 33.16% respectivamente con sus tratamientos y porcentajes de grasa 11.24%, 10.07% y 11.19% del producto final. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación son mejores a los de otros investigadores ya que contiene mayor porcentaje de proteína, cenizas, fibra, etc. Además, Gonzales y Marín (2005), señalan que la composición de los ensilados deshidratados como producto, se ajusta a los requerimientos nutricionales y energéticos necesarios en la alimentación animal, pudiendo ser utilizado, como insumos proteicos de origen animal. El contenido de cenizas es variable dependiendo de los residuos aprovechados (enteros, vísceras, espinas y esqueletos), que tienen un alto porcentaje de cenizas con rangos de 9 a 17% (Valenzuela, 2016), en este caso se entiende con los resultados obtenidos de cenizas un 16,93% de ensilado biológico de cabeza de langostino y 24.23%; 25.50%; TA., 25.48%; 26.12%; T30°C y 25.50%; 25.50%; T40°C de ensilado biológico de residuos del fileteado de carajito y 18.76%, 26.12% TA; 25.93%, 25.50%; T30°C y 29.35%, 29.35% de residuos del fileteado del volador.

Por otro parte en las características organolépticas, se observó cambios en color, olor y consistencia, en los ensilados biológicos que contenían melaza (T1, T2 y T3) Los tratamientos T1, T2 y T3 resultaron con olores agradables a ácido suave, con ligero alcohol, consistencia pastosa, semisólida-pastoso y color marrón y marrón oscuro. Según Bertullo (1989), un ensilado biológico con melaza de buena calidad se le atribuye un color amarronado grisáceo claro, consistencia líquida y olor ácido suave. En un estudio de Mendoza y Carrasco (2007), describen el olor ligeramente a frutas fermentadas. Además, su prolongado tiempo de almacenamiento, el ensilado se hace más liviano en consistencia y desarrolla un agradable olor a malta (Parín y Zugarramurdi, 1997).

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

La temperatura de incubación de 40°C es la temperatura óptima o adecuada para el crecimiento de los microorganismos.

La temperatura ambiental resulta favorable para el crecimiento microbiano en los residuos de pescado (vísceras, esqueletos, piel, cabeza) que son arrojados a la orilla del mar en la localidad de villa Puerto Pizarro impactando negativamente en los cuerpos de agua receptores.

Las bacterias ácido lácticas utilizadas en el ensilado (extraídas del recto del lechón) son factibles y funcionan como fermentadoras.

La tecnología para producir ensilado de pescado es simple y podría asegurar que estos recursos se utilicen y no se desperdicien.

El ensilado de pescado es un hidrolizado que puede usarse como ingrediente de ración o eventualmente como fertilizante.

La producción de ensilado no necesita equipos sofisticados y costosos, ya que pueden elaborarlo pequeños procesadores de pescado y granjeros.

En el estudio realizado sobre la producción de ensilado se obtuvo resultados factibles en el tema económico, ya que usan ingredientes de muy bajo precio, puesto que se cuenta con desechos pesqueros que puede ser obtenidos sin ningún costo.

Se concluye que en el estudio microbiológico realizado en los tratamientos a TA, T30°C y T40°C, los microorganismos aerobios mesófilos, levaduras y hongos estuvieron dentro del límite aceptable en alimento balanceados para cerdos de acuerdo con la Norma Técnica Colombiana NTC1839.

La ausencia de bacterias patógenas y putrefactivas como *Salmonella* sp. pone en declaración que han sido inhibidos por la acidez del ensilado biológico generada por las BAL de acuerdo con la Norma Técnica colombiana NTC1839.

Se concluye que los análisis bromatológicos tienen un porcentaje aceptable para consumo animal, ya que contiene excelente porcentaje de proteínas, etc. Ya que necesita asimilarlo para que se convierta en músculo.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Si no hay mucha diferencia de temperaturas entre la temperatura ambiente y el de 30°C la incubación, debería escoger el más económico; por lo que se debería producir ensilado a la temperatura ambiental.

Tomar la temperatura del ambiente donde elaboren o almacenen los productos de ensilado biológico.

Se recomienda usar inóculo bacteriano a base de bacterias ácido lácticas aisladas del tracto gastrointestinal y del recto del cerdo como acidificante o agente fermentador para elaborar ensilado.

Llevar a cabo estudios respecto al tema de ensilado biológico de pescado y residuos, para determinar el periodo de almacenamiento de este producto a temperatura ambiente.

Aprovechar los residuos de pescado o pescado entero de la localidad de villa Puerto Pizarro que no tengan mercado o valor comercial para producir subproductos tales como harina, fertilizantes, ensilados, entre otros.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Areche N., Berenz V. y León O. 1992. Desarrollo de ensilado de residuo de pescado utilizando bacterias lácticas del yogur. FAO Informe de Pesca, #441, p.51-63, Supl. Roma, FAO.
- Backhoff, H.P. 1976. Algunos cambios químicos en el ensilaje de pescado. J. Fd. Techn., 11: 353-363.
- Balsinde, M., Fraga, L., y Galindo, J. 2003. Inclusión de ensilado de pescado como alternativa en la elaboración de alimento extruido para el camarón de cultivo (*Litopenaeus schmitti*). CIVA, 303-309.
- Barrera Vaca, Rosa Verónica. «Producción de ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza.» *Repositorio.uta*. 2011. <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3108/1/PAL245.pdf> (último acceso: 18 de 9 de 2016).
- Bello R.A; Gutiérrez M., Ottati M. y Martínez A. 1992 «Estudio sobre la elaboración de ensilado de pescado por vía microbiana en Venezuela». FAO informe de pesca, #441, p.1-17, Supl. Roma, (FAO 1992).
- Berenz, Z. 1994. Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos. En: Taller Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería. FAO. La Habana, Cuba, del 5 al 8 de septiembre. En línea: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/aph134/cap2.htm>.
- Berenz, Ziska. 1995. Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos: Capítulo 2. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao. Accedido mayo 26 de 2017 <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap2.htm>.

- Bello, R. 1994. Experiencia con ensilado de pescado en Venezuela. En: Taller "Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería". FAO. La Habana, Cuba, del 5 al 8 de septiembre 1994. En línea: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap1.htm>.
- Bello, Rafael A. 1997 «Experiencias con ensilado de pescado en Venezuela.» Cap. 1 de *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal*, de FAO, editado por Vilda Figueroga y Manuel Sánchez, 1-12. Caracas.
- BERTULLO, E. 1984. Empleo de las producciones animales acuáticas en la elaboración de ensilado. Rev. Tec. Alim. Pesq. N° 1 Lima. Pág. 24 - 45.
- Berruecos, J., H. Merino, y I. Tejada de Hernández. 1976 «Análisis Bromatológico de alimentos empleados como ingredientes en nutrición animal.» *Revista Mexicana de Ciencias pecuarias*, pag. 31 - 33.
- Bortone SA.1997a. Revisión of the Sea basses of genus *Diplectrum* (Pisces: Serranidae). En: Obando E, León JR. Reproducción del bolo, *Diplectrum formosum* (Linnaeus, 1766) (Pisces: Serranidae) en punta mosquito, isla de margarita, venezuela. *Scient. Mar.* 53 (4): 771 – 777.
- Botello, A. L. 2005. Utilización de diferentes ensilados químicos de pescado en la alimentación de alevines del pez gato africano (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822). Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Biología Marina con mención en Acuicultura. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana. <http://www.monografias.com/trabajos39/alimentacion-peces/alimentacionpeces.shtml>

- Carrasco Casariego, Jorge Humberto, y Magno Ego Mendoza Dioses. 2007 «Efecto del inoculó de yogurt sobre el nivel de bases volátiles nitrogenadas totales en el ensilado biológico de cabeza de langostino.» Proyecto de Investigación de Docentes, Departamento Académico de Tecnología y Apoyo a la formación Pesquera, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes.
- Córdova, E., Mármol, C., Miranda, L., Navarrete, J.A., Reyes, G. (1990). Ensilado biológico de pescado. Curso regional sobre tecnología de productos pesqueros FAO/programa de cooperación gubernamental Caracas, Venezuela.
- Chachapoya Rivas, Diego Leonardo. «Producción de alimentos balanceados en una planta procesadora en el Cantón Zevallos. «» 2014. (último acceso: 20 de 8 de 2016).
- Chirichigno. N, Cornejo. M. 2001. Catálogo comentado de los peces marinos del Perú. Publicación Especial Inst. Mar Perú. Callao – Perú. p:73.
- De la Roza, B. 2005 «El ensilado de zonas húmedas y sus indicadores de calidad». IV Jornadas de alimentación animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra). 7 de octubre 2005. http://www.mouriscade.com/doc_ponencias/oct2005/ensilado_zonas_humedas_e_indicadores_calidad.pdf
- Díaz, H. L.2004. «Efecto de la suplementación con ensilaje de residuos de una planta procesadora de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre el consumo voluntario y la digestibilidad de nutriente de heno de gramíneas y leguminosas tropicales». Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de maestro en ciencias, Universidad de Puerto Rico, Recinto universitario de Mayagüez. <http://grad.uprm.edu/tesis/diazrios.pdf>

- Dulanto, G.R. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostinoblanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).
- Fagbenro, O., Jauncey, K. (1993). Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silages. *Food Chemistry* 48, 331-335.
- FAO. «Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal.» 1997. <http://www.fao.org/3/a-w4132s.pdf> (último acceso: 2016 de 09 de 2016).
- Frazier, W.C., & Westhoff, D.C, 1978. *Food Microbiology*. 3rd Ed., McGraw-Hill.
- Guevara, J., Bello, R. y Montilla, J. 1991. Evaluación del ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica como suplemento proteico en dietas para pollos de engorde. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 41(2):247-256.
- Gonzales Chávez, I. et al. 2010 «La actividad extractiva de los recursos hidrobiológicos en la región Tumbes, con énfasis en las modalidades de arrastre, cerco y cortina.» *IMARPE*. 2010. http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/noticias/Actividad_extractiva_Tumbes_septiembre_2010.pdf (último acceso: 9 de 10 de 2016).
- Gonzales, D. y Marín, M. 2005 «Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos del procesamiento de sardinas.» *Revista Científica* Vol. XV, Nº 6 (2005): pag. 560-567.
- Gonzales, D., J, Córdoba., F, Indorf y E, Buitrago. 2007. Estudios preliminares en la formulación de dietas para camarón blanco (*litopenaeus schmitti*) utilizando ensilado de pescado. *RC* v.17 n.2. <http://redalyc.Uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95917210&iCveNum=10748>

- Gustincich, S.; Manfiolett, G.; Del Sal, G.; Schneider, C.; Carnici, P. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11(3): 298-302.
- Hassan, T.E. y J.L. Heath. 1986. Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. *Agriculture wastes*. 15:1-15. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract;jsessionid=471FE57E684CE6886906F1DBB3C479C7.tomcat1?fromPage=online&aid=616160>
- Holguín, Caicedo y Veloza, L. «Estabilidad de almacenamiento de ensilados biológicos a partir de residuos de pescado inoculados con Bacterias ácido lácticas.» *Revista Med. Vet. Zoot.* Vol. 56 (2009): 95 - 104.
- Jurado Gómez, Henry. 2009 «Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos.» *Dialnet* 14, nº 2 (2009): 1723 - 1735.
- Kjos, N.P. «The use of fish by-products in animal feeding. Proceedings of Workshop on improved utilization of by-products for animal feeding in Vietnam». NUFU Project 2001. http://www.vcn.vnn.vn/sp_pape/spec_5_4_2001_14.htm.
- León Álamo, F.J. 2003 «Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería». MS Tesis. Universidad de Puerto Rico. RUM. 63pp 2003. <http://grad.uprm.edu/tesis/leonalamo.pdf>
- Lessi E., Ximenes Carneiro A.R y Lupin H. M. 1992. Obtención de ensilado biológico. *FAO Informe de Pesca, #441*, p.64-79, Supl. Roma, FAO.

- Lindgren, S. and Pleaje, M. 1983 Silage fermentation of fish waste products with lactic acid bacteria. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 34:1057.
- López P, Rosas J, Velasquez A, Cabrera T, Maneiro C. 2002. Desarrollo embrionario y larval del bolo *Diplectrum radiale* Quoy y Gaimard, 1824 (Pisces: Serranidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 37 (2): 127 – 137.
- Llanes, J., Toledo, J., Fernández, I. y Lazo, J. 2007. Estudio del ensilado biológico de pescado como inóculo de bacterias lácticas en la conservación de desechos de pescado. *REDVET*, 1695-7504.
- Machín, D. 2001 «El uso potencial del ensilaje para la producción animal en la zona tropical, especialmente como una opción para los pequeños campesinos.» En *Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones para Pequeños Campesinos*, de FAO, editado por Marnette L. 't. Roma.
- Martinez, R., Pascual, M. Y Bello, R. 1991. Elaboración de ensilados biológicos de pescado en Venezuela y España. *Alimentaria*. 28(221):43-49.
- Martinez Prada, Renzon. 2003 «Producción de un Ensilado Biológico a partir de vísceras de pescado de la especies *Prochilodus mariae* (coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (bagre rayado) y *Phractocephalus hemiliopterus* (cajaro).» Tesis de Grado de Ingeniería, Colombia.
- Meire R. V., Carneiro D. J., and Macedo E. M. 2002. Acid and Fermented Silage Characterization and Determination of Apparent Digestibility Coefficient of Crude Protein for Pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 33, No. 1. March, 2002.

Miranda, M., O., L. M. Cisneros, y F. M. Otero. 1999. Conservación in vitro de ensilaje de pescado (*ophistonema oglinum*) con ácido sulfúrico comercial, temperatura, pH y composición química. Instituto de investigaciones Jorge Dimitrov, Universidad de Gramma, Bayamo, Cuba.

[http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:BxxtpA6T1d4J:www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705101.pdf+Conservasi%C3%B3n+in+vitro+de+ensilaje+de+pescado+\(Ophistonema+oglinum\)+con+ácido+sulf%C3%BArico+comercial+temperatura+pH+y+composici%C3%B3n+qu%C3%ADmica.&hl=es&gl=mx](http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:BxxtpA6T1d4J:www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705101.pdf+Conservasi%C3%B3n+in+vitro+de+ensilaje+de+pescado+(Ophistonema+oglinum)+con+ácido+sulf%C3%BArico+comercial+temperatura+pH+y+composici%C3%B3n+qu%C3%ADmica.&hl=es&gl=mx)

Ngoan, L., An, L., Ogle, B. y Lindberg, J. 2000. Técnicas de ensilaje para los subproductos del camarón y su valor nutritivo para los cerdos. 13(9), pág. 1278-1284.

Oude, E. et al. 2001 «Estudio 2.0 - Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. » Cap. 2 de *Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones para Pequeños Campesinos*, de FAO, editado por L. 't Mannelje. Italia.

Ockerman, Herbert y Hansen, Conly. «Industrialización de subproductos de origen animal». Zaragoza (España): Acribia, 1994. 387 P.

Ottati, M. & Bello, R. 1990. Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. I. Valor nutritivo del producto en dietas para cerdos. *Alimentaria*. 27(211):37-44.

Ottati, M., Gutiérrez, M. y Bello, R. 2002 «Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas». *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 42 p.

Padilla Pérez, P. «Técnica del ensilado biológico de residuos de pescado para la ración animal.» *Instituto de investigación de la Amazonia Peruana* vol. 8, nº 2, 1996.

- Parín, M., y Zugarramurdi, A. 1997. Aspectos económicos del procesamiento y uso del ensilado biológico de pescado. En FAO, Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal (págs. 41 - 63). Italia, Roma.
- Ponce, L. E. and A. G. Gernat. 2002. The effect of using different levels of tilapia by-product meal in broiler diets. *Poultry science* 81 (7): 1045-1049.
- Ramírez Ramírez, J. et al. «Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.» nº 7. 2011: 1-16.
- Ramos F. 2004. Repertorio en torno a las especies alimentarias mas utilizadas en España. R. P. I. nº M – 007567/2004 (22 de oct. 2004) on line [6 de agosto del 2009]
<http://www.historiacocina.com/especiales/diccionario/S.pdf>.
- Rodríguez, A. y H, Díaz. 2005 «Fermentación anaeróbica de residuos de pescadería y su utilización en dietas para pequeños rumiantes. Integrando producción animal y medio ambiente». Vol. 1; 4 – 6.
[http://www.uprm.edu/agricultura/inpe/hsi
csrees/integrando_produccion_animal_y_medio_ambiente.pdf](http://www.uprm.edu/agricultura/inpe/hsi/csrees/integrando_produccion_animal_y_medio_ambiente.pdf)
- Samuels, W.A., J.P. Fontenot, V.G Allen y M.D.A. Adazinge. 1991. Seafood processing wastes ensiled with straw: Utilization and intake by sheep. *J. Anim. Sci* 69:4983-4992.
<http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/69/12/4983>
- Spanopoulos Hernández, M. et al. 2010 «Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis* sp), para la alimentación de especies acuícolas.» *Revista Mexicana de Ingeniería Química* (Publicado por Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C) vol.9, nº 2, 2010: 167 - 178.

- Talkington, F.D., Shotts, E.B., jr., Wooley, R.E., Whitehead, W.K., & Dobbins, C.N. 1981. Introduction and re-isolation of selected Gram-negative bacteria from fermented edible wastes. *Am. J. Vet. Sc.*, 42: 1298-1301.
- Tatterson, I. y M, Windsor. 1974. Fish silage. *J. Sci. Food Agric.* 25: 369-379
<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5937e/x5937e00.htm>.
- UNAM. «Fundamentos y Técnicas de Análisis de Alimentos.» Manual de Laboratorio, México, 2008.
- Valencia castillo, Alberto. 2011 «Actividad de la hormona IGF-1 y metabolismo energético-proteico asociado a la inclusión de ensilado biológico de pescado en la dieta de terneros.» Tesis de maestría, México, 2011.
- Van Wik, H. and Heydenrich, M. 1985. The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. *Journal of Science and Agriculture.* 36, 1093-1102.
- Vidotti, R. M. 2001. Producto e utilização de silagens de peixe na nutricio do piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Tesis Dr. Sci. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. pp. 59
- Weinberg, Z.G., & Muck, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.*, 19: 53-68.
- Windsor, Malcolm y Barlow, Stuart. 1984, Introducción a los subproductos de pesquería. Edición en español. Zaragoza: Acribia. 204 p.
- Winter, K. and L. Feltham. 1983. Fish silage: The protein solution. *Agriculture Canada Research Branch Contribution.* Ottawa, Canada. p. 112

Wooley, R.E., Gilbert, T.P., Whitehead, W.K., Shotts, E.B., jr., & Dobbins, C.N.
1981. Survival of viruses in fermented edible waste materials. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 87-90.

Zynudheen A. A; R, Anandan, y K, G. Ramachandran Nair. Effect of dietary supplementation of fermented fish silage on egg production in Japanese quail (*coturnix coromandelica*). *African Journal of agricultural Research* Vol. 3 (5), pp. 379-383, May 2008.

