

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Evaluación de la inhibición in vitro de Vibrio cholerae O1,
biotipo Eltor, serotipo Inaba, en camarón (Penaeus sp)
con jugo de limón (Citrus limonia)



Informe de tesis

Presentado por

DIANA VIRGINIA GARZARO ABULARACH

Para optar al título de
QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, mayo de 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

R
06
T(1630)

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS Padre, fuerza, gozo y guía de mi vida.

A MIS PADRES Lic. Rafael Garzaro Arriola
Nezha Graciela Abularach Handal
a quienes agradezco su ayuda constante
y el amor brindado.

A MIS HERMANOS Rafael, Elizabeth y Ana Lucía
con mucho cariño.

A MIS ABUELOS Antonio Garzaro Izzepi (Q.E.P.D.)
Felipa Arriola Farfán
José Nesim Abularach David (Q.E.P.D.)
Feride Handal de Abularach (Q.E.P.D.)
con cariño.

A MIS TIOS Y PRIMOS.
A Leonel Estuardo Godínez
con especial cariño.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS En especial a:
Ingrid Tabarini de Mora.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

AGRADECIMIENTOS

A mi hermano Rafael Estuardo, por el gran apoyo que siempre me ha brindado.

A Leonel Estuardo Godínez por sus consejos y apoyo.

A la familia Tabarini Barrios, por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis.

A la Lic. Norma Gil de Castillo por su asesoría.

Al Lic. Federico Nave por su colaboración en la elaboración y revisión de la tesis.

Al personal del laboratorio de Microbiología y Bioquímica de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y al Centro de Estudios del Mar y Acuacultura (CEMA), por su apoyo y colaboración.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este trabajo.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 La enfermedad del cólera	5
3.2 El camarón	15
3.3 Aislamiento e identificación de <u>V. cholerae</u> en alimentos	18
3.4 Limón	20
4. JUSTIFICACIONES	22
5. OBJETIVOS	23
6. HIPOTESIS	24
7. MATERIALES Y METODOS	25
7.1 Universo de trabajo	25
7.2 Medios	25
7.3 Procedimiento	26
7.4 Diseño experimental	28
8. RESULTADOS	29
9. DISCUSION DE RESULTADOS	31
10. CONCLUSIONES	33
11. RECOMENDACIONES	34
12. REFERENCIAS	35
13. ANEXOS	39

1. RESUMEN

Guatemala, junto con otros países, ha sido fuertemente afectada por la epidemia del cólera, la cual ha provocado un alto grado de mortalidad y una acentuada disminución en el consumo de productos marinos. Es por ello que se realizó el presente estudio, a fin de determinar la eficacia del jugo de limón para eliminar al V. cholerae O1 presente en el camarón a diferentes tiempos de contacto, con el propósito de mejorar el consumo del mismo y al mismo tiempo, lograr una nueva forma de prevenir la enfermedad.

El estudio se inició sumergiendo los camarones en una solución que contenía 1×10^8 bacterias de V. cholerae O1/ml, posteriormente se pelaron, picaron y sumergieron en jugo de limón por una, dos y tres horas; por último se evaluó si aún existía V. cholerae en los camarones luego de los tres tratamientos efectuados. Este procedimiento se repitió nueve veces.

Los resultados mostraron que de las nueve inoculaciones realizadas solamente una, a las tres horas de contacto del camarón con el jugo de limón, manifestó una total inhibición de V. cholerae O1. Este resultado pudo verse influido por la cantidad de vibrios inoculados que fue bastante grande (1×10^8 bacterias/ml). Los mariscos pueden estar contaminados con distintas cantidades de Vibrio cholerae O1, es posible que al tener menor cantidad del mismo, el jugo de limón sí logre eliminarlo. Esto permite concluir que el pH ácido del jugo de limón no es capaz de eliminar al Vibrio cholerae O1 en su totalidad a una, dos y tres horas de contacto.

Se recomienda realizar estudios posteriores para determinar

la presencia y cantidad de V. cholerae O1 en camarón, antes y después de su distribución en el mercado y evaluar el efecto del jugo de limón en camarón contaminado, relacionando grado de contaminación con tiempo de contacto mínimo para eliminar al V. cholerae.

2. INTRODUCCION

La enfermedad del cólera, ha sido un flagelo para la humanidad desde tiempos antiguos y ha permanecido en forma endémica en la India. Llegó a Europa en el siglo XIX, y posteriormente a América, distribuída como 7 pandemias; actualmente se afronta la séptima pandemia, la cual apareció en Perú, se extendió a varios países de Latinoamérica incluyendo México y llegó a Guatemala causando gran número de muertes. Guatemala, por ser un país de bajo nivel socioeconómico, con alta pobreza, desnutrición y deterioro de la infraestructura sanitaria, hace propicia la extensión de la enfermedad y el desarrollo de la misma en sus formas más severas, con alta deshidratación y por consiguiente la muerte (1-3).

El reaparecimiento del cólera, también ha provocado una acentuada disminución en el consumo de productos marinos, a pesar de que éstos no son los únicos alimentos implicados en la transmisión de la enfermedad, afectando a los productores, pescadores y en general, a la economía total del país (4,5).

El camarón es uno de los productos afectados, por lo cual es de gran importancia el realizar un adecuado procesamiento y control de calidad del mismo, para disminuir el riesgo de contraer el cólera. Especialmente porque el camarón de venta al público, a diferencia de los productos de exportación, no tiene ningún tipo de control de calidad, y sufre de alta manipulación, lo que aumenta el riesgo de ser contaminado (6,7).

En el presente estudio se pretendió determinar la eficacia del jugo de limón, para eliminar al Vibrio cholerae O1 presente en

amarón, a diferentes tiempos de contacto, como una medida que permitiera recuperar el consumo del mismo, principalmente el preparado en seviche y a la vez establecer un método para el tratamiento de productos marinos.

3. ANTECEDENTES

3.1 La enfermedad del cólera

3.1.1 Definición

El cólera es una enfermedad diarreica aguda, causada por la presencia de Vibrio cholerae O1 en el intestino delgado. Se presenta únicamente en el ser humano, y dependiendo de las condiciones nutricionales del individuo, varía en gravedad, desde un estado diarreico leve y poco notable, a un cuadro grave con diarrea profusa y vómitos. Causa deshidratación, la cual puede ser tan severa hasta provocar un choque hipovolémico y así la muerte (1,8-10).

3.1.2 Agente etiológico

Vibrio cholerae O1 es un bacilo Gram negativo, pequeño (2-4 um), aerobio, móvil, con un flagelo polar, que en cultivo primario presenta formas curvas (1,8-10).

3.1.2.1 Características

Pertenece al género Vibrio, el que a su vez forma parte de la familia Vibrionaceae, a la que pertenecen además, el género Aeromonas, Plesiomonas y Photobacterium, estando este último no asociado a infecciones humanas (11,12).

De las 34 especies descritas en la literatura, V. cholerae es la que posee mayor capacidad patogénica (10).

Entre los otros vibrios que pueden causar patogenicidad en el hombre se tienen: V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. hollisae, V. damsela, V. vulnificus y V.

metschnicovii, los cuales pueden causar infección intestinal y extraintestinal (11,13).

El V. cholerae posee un lipopolisacárido somático llamado antígeno O, el cual sirve de base para su clasificación serológica, y el antígeno H o flagelar, que es termolábil (1,8,14).

Existen más de 60 serogrupos O de V. cholerae, pero sólo el O1 causa el cólera epidémico; algunos de los otros son causa esporádica de diarrea aguda, que en ocasiones puede ser de gravedad semejante a la del cólera (9).

El V. cholerae O1 se divide en dos biotipos los cuales se denominan Clásico y Eltor. El biotipo Eltor es el más resistente a los agentes físicos y químicos y puede producir la hemólisis de los glóbulos rojos de carnero. Este biotipo ha sido el responsable de casi todos los brotes recientes de cólera en América, ya que tiene la capacidad de sobrevivir más tiempo en el ambiente (1,8-10,15,16).

3.1.2.2 Fisiología

El V. cholerae crece muy bien en medio alcalino (8.5-9.5), puede sobrevivir hasta pH 10, y es muy lábil a pH ácido siendo el pH 6 letal para el mismo (1,6,8,14-16).

La temperatura óptima para el crecimiento del organismo es entre 32 y 35 °C, pero puede crecer a 40 °C (6,8,14).

Se desarrolla fácilmente, pues no necesita considerables nutrientes para su crecimiento, crece en medios de cultivo comunes, como agar sangre de carnero al 0.5%. El medio Tiosulfato Citrato-Sales Biliares-Sucrosa (TCBS), es utilizado para el

aislamiento del V. cholerae pues, la alcalinidad del medio inhibe a las enterobacterias, la bilis y el colato inhiben a los enterococos y los coliformes que podrían crecer, no fermentan la sucrosa, con excepción de algunas cepas de Proteus y Klebsiella que sí presentan colonias de color amarillo (6,8,12,14).

En presencia de cloruro de sodio (NaCl), el V. cholerae crece óptimamente hasta una concentración de 5 a 15 mM, pero puede crecer en ausencia de la misma (6).

Existe una serie de pruebas útiles para diferenciar a V. cholerae de otros microorganismos semejantes a él, como la prueba de oxidasa, el requerimiento de NaCl para sobrevivir, la fermentación de azúcares y otras más. V. cholerae es oxidasa positivo y fermenta la sacarosa y la manosa, pero no la arabinosa (8,14,15).

3.1.3 Epidemiología

3.1.3.1 Antecedentes históricos

El cólera es una enfermedad que se describe desde el siglo V antes de Cristo, en la época de Hipócrates. Ha sido endémica en India y China, siendo hasta en el siglo XIX cuando se extendió a Europa y América como 7 pandemias. En la segunda pandemia (1829-1850) apareció por primera vez en América procedente de Europa. Llegó a Guatemala en la segunda y tercera pandemias, en 1837 y 1857, respectivamente, provocando más de 10,000 muertos (1-3).

Actualmente se está viviendo la séptima pandemia, que inició en el año de 1961 en Indonesia y luego se extendió a Asia, Africa y Europa Meridional, convirtiéndose en una enfermedad endémica en

dichos países (1-3,15,16).

En enero de 1991 apareció una epidemia de cólera en las costas del Perú, de donde la enfermedad se extendió hacia Ecuador, Colombia, Chile y Brasil. Luego de varios casos de cólera en México, en julio aparecieron en San Marcos los primeros brotes de la enfermedad en nuestro país, los que se diseminaron hacia Retalhuleu, Suchitepéquez, Escuintla y Guatemala. Posteriormente la epidemia se dirigió hacia el Nor-orienté del país generalizándose luego al resto del territorio nacional (1-4).

La pandemia actual se debe al V. cholerae O1, biotipo Eltor, serotipo Inaba (1,9).

3.1.3.2 Formas de transmisión

Las fuentes comunes de infección incluyen la ingestión de agua contaminada con V. cholerae, mariscos provenientes de esas aguas, consumidos crudos o insuficientemente cocidos; verduras que han sido rociadas con agua contaminada y, en general por cualquier alimento contaminado con heces o vómitos de pacientes (1,15,16).

El reservorio natural del cólera es el hombre, aunque actualmente se delibera acerca de la existencia de un reservorio marino, ya que V. cholerae se ha aislado de aguas donde no hay evidencia de contaminación fecal ni de infección en poblaciones aledañas (3).

Los alimentos contaminados por el agua o por manipulación antihigiénica son fuente importante de infección, como ya se mencionó, así como las moscas, cucarachas, ratas, etc. La vía más común de transmisión es la vía feco-oral, cuando la infección se

ha establecido en determinada población (3,6,8,15).

En Guatemala, las fuentes de contagio identificadas han sido ríos y lagos; alimentos expendidos en ventas callejeras como: alimentos trasvasados a bolsas plásticas, masa y tortilla de maíz, y manos de personas que manipulan alimentos (3).

3.1.3.2.1 Vendedores ambulantes y su relación con el cólera

El deterioro de las condiciones de vida de las áreas rurales ha causado una creciente migración de personas a la ciudad quienes por su bajo nivel socioeconómico, consumen todo tipo de alimentos que se ofrecen en la calle. Los vendedores ambulantes, frecuentemente son personas con poco conocimiento de las medidas higiénicas básicas en la preparación de alimentos, además no cuentan con agua potable y servicios sanitarios, lo que contribuye directamente al desarrollo de enfermedades transmitidas en forma feco-oral, incluyendo el cólera (3,6,16).

Un vendedor de alimentos podría ser un portador asintomático del cólera o bien, un portador convaleciente. El portador asintomático excreta entre 100 a 10,000 bacterias/gramo de heces, aunque la existencia de un portador crónico es muy rara. El portador convaleciente excreta microorganismos por períodos de 2 a 3 semanas (3,15).

Los enfermos excretan una concentración de 10^7 a 10^9 bacterias/ml de heces, y si éstas están expuestas en el ambiente, llegan moscas y distribuyen al microorganismo en los alimentos que encuentran a su paso (3,6,15).

El V. cholerae sobrevive a temperatura ambiente en las frutas

de 2 a 5 días; en hortalizas frescas de 1 a 7 días y en alimentos cocidos de 2 a 5 días. Si el producto se encuentra en refrigeración el tiempo de sobrevivencia aumenta de 7 a 14 días, 7 a 10 días y 3 a 5 días, respectivamente (3,6,15).

En fomites como aluminio, monedas, cemento y metales, la bacteria sobrevive de 7 a 13 días (6).

La supervivencia de V. cholerae en el medio ambiente dependerá del grado de contaminación, temperatura, pH, presión osmótica, nivel de humedad, concentración de sales e hidratos de carbono, presencia de materia orgánica y de bacterias competidoras (3,15).

3.1.3.2.2 Alimentos de mar asociados con el cólera

Las especies de Vibrio se encuentran generalmente en ambientes marinos y en esteros. Diversas investigaciones demuestran que V. cholerae está distribuido a lo largo del Atlántico y costas de los Estados Unidos, además se aisló de aguas estuarinas de Florida, de algunos ríos en Australia y Bangladesh, y en 1992 se aisló del río Nahualate en Guatemala (17-21).

La presencia de V. cholerae en ambientes marinos afecta la calidad sanitaria de productos de este origen, por lo que en diversas regiones, la transmisión del cólera se ha relacionado con el consumo de numerosos tipos de productos de pesca, como los crustáceos (camarones, cangrejos y langostas), los moluscos (ostras, almejas y mejillones) y la pesca mayor. Entre estas regiones se encuentra la bahía de Chesapeake, las costas de los Estados Unidos (Miami y Louisiana), Filipinas y Portugal (6,22,23).

Los crustáceos pueden acumular en la superficie de la concha, branquias y estómago, bacterias potencialmente patógenas. Se han detectado sustancias crioprotectivas para el V. cholerae en la caparazón del camarón (6,24).

Según algunos estudios, los vibrios que se introducen en el tracto gastrointestinal de los mariscos, sobreviven 45 días a una temperatura de 0 a 5 °C y pueden vivir de 15 a 20 días a 22 °C, aunque algunos autores han indicado que V. cholerae biotipo Eltor puede sobrevivir de 2 a 5 días en mariscos a temperatura ambiente (30 a 31 °C) y tiene la posibilidad de aumentar su tiempo de supervivencia de 7 a 14 días si se almacena a una temperatura de refrigeración (5-10 °C) (4,6,8,15,23,25).

Guthrie y Cofie determinaron, que las fuentes de queratina de camarones frescos, estimulan la producción de la enterotoxina del V. cholerae (26).

Algunas investigaciones han demostrado que la sobrevivencia de V. cholerae en agua no estéril de algunos puertos es de 47 días y en agua de mar profundo es de 7 días. Al hacer el mismo estudio en agua estéril la sobrevivencia aumentó significativamente, posiblemente, debido a que en el agua no estéril había competencia de nutrientes por parte de otros microorganismos (23).

Para un buen desarrollo en el agua, el V. cholerae requiere de bajas temperaturas, alto contenido orgánico, salinidad intermedia, pH alcalino, obscuridad y baja competencia por parte de otros microorganismos (23).

3.1.4 Patogenia

El período de incubación del cólera es de uno a dos días, pero puede variar de 12 horas a 6 días.

Las bacterias de Vibrio cholerae sobreviven através del estómago, colonizan y se multiplican en el intestino delgado, liberando su enterotoxina. La colonización se fomenta por la adherencia de los vibriones a la mucosa del intestino delgado (9).

La enterotoxina es una proteína (peso molecular = 84,000) compuesta de subunidades A y B. La subunidad B se une en forma irreversible a su receptor, un gangliósido llamado GM1, de naturaleza lipídica que se encuentra en la membrana de las células epiteliales del intestino delgado. Esto facilita la penetración de la subunidad A a dichas células, que provoca, un aumento en la actividad de la adenilciclase, enzima que aumenta el contenido intracelular del AMP cíclico (3',4' monofosfato de adenosina cíclico), el cual altera el transporte activo de iones a nivel de la membrana celular, originando la salida de agua, cloruros y carbonatos por los segmentos del intestino delgado, a la vez que inhibe la absorción de sodio en las vellosidades intestinales. La permeabilidad de las proteínas séricas y la absorción de glucosa no son alteradas (1,2,9,10).

3.1.5 Manifestaciones clínicas

Cuando el V. cholerae O1 ingresa al organismo humano, el sujeto puede permanecer asintomático o presentar molestias leves, moderadas o graves. Cuando se trata del biotipo Eltor, el 75% de las personas son asintomáticas, 23% tienen síntomas moderados o

leves y el 2% de los pacientes tienen un cuadro grave (2).

El cólera comienza con la aparición de heces acuosas que rápidamente dejan de contener materia fecal. La presencia de moco le da a las heces el aspecto característico de "agua de arroz" (9).

En los casos graves las deposiciones pueden presentarse cada hora y ser hasta de un litro cada una. A continuación pueden aparecer vómitos no precedidos de náuseas. Al progresar la disminución de líquidos y electrolitos se presentan calambres, principalmente en las pantorrillas (1,9).

En los casos graves y no tratados, los hallazgos físicos incluyen colapso (cuando las pérdidas no sustituidas de líquido son del 10% del peso corporal), mala turgencia de la piel, pulsos periféricos débiles o ausentes, hipotensión, taquicardia y cianosis. Los ojos están hundidos y la voz es débil y aguda, los ruidos cardíacos son débiles y los ruidos intestinales hipoactivos (9).

En los niños menores de 7 años puede aparecer fiebre y en ocasiones convulsiones y coma (9).

Las causas de muerte son choque hipovolémico, acidosis metabólica y uremia (1).

3.1.6 Prevención

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda en una primera fase reforzar la vigilancia epidemiológica, el saneamiento ambiental, la educación para la salud, la capacitación del personal de salud y los servicios de laboratorio. Esto se aplica

a regiones que aún no sufren la enfermedad, pero que se encuentran cerca de lugares que sí la padecen (9,15).

En una segunda fase, se recomienda la instalación de un comité nacional de control de la epidemia y el establecimiento de grupos de control móviles, dirigiéndose estos últimos a los grupos apartados para reforzar las medidas de prevención, principalmente el saneamiento ambiental, la educación para la salud y la capacitación del personal de salud, como ya se mencionó anteriormente (9,15).

La prevención y control del cólera se basan en la educación de la población. Las medidas dirigidas a la población se refieren al abastecimiento de agua potable, a la disposición sanitaria del excremento y a la preparación de alimentos y bebidas.

Se recomienda agregar cloro a las redes de abastecimiento de agua y hervir el agua que no sea potable. En época de epidemia la dosis de cloro residual aumenta de 0.5 a 2.0 mg/l; si no puede clorarse el agua, ésta debe hervirse durante dos o tres minutos (9,15).

Se debe evitar el consumo de alimentos en puestos callejeros. El alimento deberá calentarse a más de 80 °C, no se deberán consumir vegetales crudos que hayan sido regados con aguas no tratadas y se deberá prohibir la importación de mariscos y pescados frescos refrigerados provenientes de países con cólera, que no tengan un buen control de calidad (2).

Se debe interceptar las aguas de desecho (aguas negras) y tratarlas de tal forma que los patógenos sean exterminados o removidos antes que el efluente llegue al estuario o aguas

costeras. Se requieren plantas de clarificación y purificación de aguas de desecho para poder reciclar la misma (15).

Se debe monitorear el agua donde se capturan peces y mariscos para determinar el grado de contaminación. Se debe prohibir la captura de los mismos de aguas contaminadas, a menos que éstos sean adecuadamente tratados (15).

Antes de recomendar el no consumir los seviches (tratados con limón) debe investigarse la viabilidad de V. cholerae en este tipo de productos, ya que V. cholerae no puede vivir en medios ácidos (15).

3.2 El camarón

3.2.1 Clasificación

Las especies de camarón cultivadas en Guatemala, están clasificadas de la siguiente forma:

Phylum: Artrópoda
 Clase: Crustacea
 Subclase: Malacostraca
 Serie: Eumalacostraca
 Superorden: Eucarida
 Orden: Decápoda
 Suborden: Dendrobranchiata
 Familia: Penaeidae
 Género: Penaeus
 Especies: P. vannamei (camarón blanco), P. stylirostris (camarón azul) y P. aztecus (camarón café) (27,28).

El número de especies de camarones y langostinos descritos en todo el mundo es muy grande, pero las especies más importantes desde el punto de vista comercial probablemente no excedan de unas veinte (29).

3.2.2 Características generales del camarón

El cuerpo del camarón está lateralmente comprimido igual que la cabeza, los crustáceos tienen dos pares de antenas sensitivas, un par de mandíbulas, dos pares de maxilares sobre su cabeza y diez pares de patas. La caparazón se forma de quitina, impregnada de sales de calcio. La cola en forma de abanico, la utiliza el animal para nadar hacia atrás. La respiración se efectúa por branquias. Poseen sistema circulatorio que incluye un corazón y arterias que terminan en el hemoceloma, grandes espacios llenos de sangre que se ramifican por casi todas las partes del cuerpo (7,30,31).

El ciclo vital del camarón comprende tres estadios larvales que son: nauplia, zoea y mysis. Las larvas nauplios viven de sus reservas de vitelo y del fitoplancton. La etapa de mysis se alimenta de diatomeas planctónicas y zooplancton (32).

Luego de los estadios larvales alcanza el estadio de postlarva, juvenil y huevo (29,30).

La postlarva ya tiene las características morfológicas de un adulto y las corrientes le han aproximado a la costa, ingresando finalmente a las aguas estuarinas en donde hay más disponibilidad de alimento, menor salinidad y mayor temperatura (32,33).

Después de cuatro meses inician una migración hacia aguas marinas, donde alcanzan la madurez sexual (30,31).

Los adultos gustan estar a diferentes profundidades y frecuentemente caminan cerca del sustrato marino (33)(Anexo No.1).

Los camarones requieren, para poder desarrollarse de un rango de pH entre 7.2 y 9.0 (32).

Con respecto a la alimentación, los camarones se han descrito como omnívoros, es decir, que se nutren con toda clase de alimentos, incluyendo bacterias (32-37).

3.2.3 Comercialización del camarón en Guatemala

Se ha demostrado que el camarón contiene proteínas de buena calidad nutricional, un alto contenido de vitaminas liposolubles y bajo contenido en grasa; por lo que es un alimento de gran importancia para la buena nutrición del guatemalteco (7,38,39).

En su mayor parte la producción de camarón proviene de la pesca marítima y en menor proporción de la acuicultura (35).

3.2.3.1 Proceso del camarón de exportación

El camarón se pesca en barcos de pluma o tangón, en donde se congela en las bodegas respectivas. Se descarga en el puerto congelado en toneles. Al llegar a la planta empacadora se selecciona por color y tamaño: café (P. aztecus), azul (P. stylirostris) y blanco (P. vannamei). Posteriormente se empaca y para ello se pesa y se selecciona de nuevo según su tamaño y se coloca en cajas. Finalmente se pone agua clorada y se congela.

Para el almacenaje se coloca el lote en la bodega hasta su transporte (7).

3.2.3.2 Proceso del camarón de consumo local

El camarón se pesca en embarcaciones pequeñas y al llegar a la playa se coloca en hieleras. Se transporta de ésta manera hasta llegar a los lugares de venta en Guatemala. En los puestos de venta se les coloca en bandejas de aluminio o latón. El producto que no se vende se guarda en cajas grandes de aluminio

con hielo en trozos y al día siguiente se coloca en las bandejas nuevamente.

Los camarones se pescan, en general, entre los 80 y 200 pies de profundidad, dependiendo de la especie (7).

El cultivo de camarones constituye la mayor y más importante actividad de acuicultura que se desarrolla actualmente en nuestro país, existiendo a la fecha alrededor de 15 fincas camaroneras privadas que se encuentran ubicadas en la Costa Sur. Estas camaroneras capturan postlarvas del medio natural, para su posterior siembra y crecimiento en estanques rústicos (35).

3.3 Aislamiento e identificación de V. cholerae en alimentos

Se debe dar una inspección a conciencia de los alimentos, para asegurar la inocuidad de los mismos (4).

El aislamiento de V. cholerae de alimentos utiliza más o menos el mismo procedimiento que el usado para el aislamiento del organismo de muestras clínicas, aunque con ciertas modificaciones, ya que por lo regular el organismo se encuentra en muy bajo número (8).

Las muestras de alimentos sospechosas de estar contaminadas deben recolectarse lo más pronto posible, refrigerarse entre 4 y 10 °C y procesarse rápidamente (8).

El procedimiento para el análisis de alimentos, en forma general es el siguiente:

En forma aséptica, se pesa una muestra del alimento y se coloca en un Masson estéril que contenga agua peptonada alcalina; se licúa durante 2 minutos a la velocidad máxima y a partir de

éste, se hacen las diluciones respectivas (6).

Las diluciones se incuban de 6 a 8 horas a 36 °C. Después de la incubación, se transfiere inóculo de la película de crecimiento formada en la superficie, a una placa de agar TCBS, que se incuba de 18 a 24 horas a 36°C (6,8).

Se examina el medio de TCBS a fin de determinar si presenta las colonias con las características propias del V. cholerae.

Se seleccionan cuidadosamente, por lo menos tres colonias sospechosas y se subcultivan a un medio nutritivo, éste se incuba a 36 °C de 18 a 24 horas (6,8,14).

A partir del medio de TCBS se inoculan también un tubo de TSI, uno de LIA y uno de MIO. Después de incubar 18 horas a 36 °C se verifican las reacciones bioquímicas que produce V. cholerae, y además se realizan, a partir del medio de enriquecimiento, la prueba de oxidasa y la prueba de string, ambas positivas para V. cholerae. Por último se realiza la prueba de aglutinación con el antisuero polivalente anti V. cholerae O1. Si no aglutina y todas las pruebas han coincidido con V. cholerae, se reporta V. cholerae no O1 (6,8,14,40) (Anexo No. 2).

El biotipo Eltor es Voges-Proskauer positivo, aglutina glóbulos rojos de pollo y es resistente a polimixina B (50 unidades). El biotipo clásico da las reacciones opuestas. Para diferenciar los serotipos debe aglutinarse con antisueros Ogawa e Inaba (6,8,40).

3.4 Limón

3.4.1 Clasificación

Reino: Vegetal

Subreino: Embryobiontha

División: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Especies principales: Citrus aurantifolia (lima ácida o limonero sutil), Citrus limonia (limón real) y Citrus limeta (lima limón) (41,42).

3.4.2 Principales clases de limón producidos en Guatemala

En Guatemala se producen dos tipos de limón principalmente: el limón persa que es un limón grande, muy ácido, con pulpa casi blanca y gruesa y el limón criollo que es de forma oval, mediano, con mucho jugo, regular cantidad de semillas, el cual al madurar toma un color amarillo pálido, el cual es vendido por el 69.8% de la población (43,44) (Anexo No. 3).

3.4.3 Usos del limón

El limón posee una serie de propiedades terapéuticas, higiénicas y alimenticias. Además es la fruta que contiene más vitaminas (A,B,C y K), estimula las funciones del hígado, es diurético y astringente (44).

Por el ácido cítrico, el limón estimula las funciones digestivas y de las glándulas endocrinas y exocrinas. Puede eliminar sustancias extrañas y microorganismos patógenos. Se considera que a un pH bajo el interior de algunas bacterias se acidifica, lo cual impide el transporte de nutrientes provocando su muerte (43,44).

En 1992 se realizó un estudio en Panamá, en el cual mezclaron

bacterias de V. cholerae 01 a una concentración de 15×10^8 vibriones/ml con jugo de limón puro y diluido hasta 1:32 en un tiempo de 5 a 15 minutos (pH = 2.36-3.01) lo que provocó una total inhibición del V. cholerae 01 (45).

3.4.4 Evaluación del pH del jugo del limón

El pH del jugo del limón gradualmente baja de 5.40, cuando la fruta es muy joven (1-2 cm de diámetro), a 2.25 cuando ya está listo para comercializarse. En Florida un estudio demostró rango de pH entre 2.1 a 2.5 (46).

El pH del jugo de limón se ve influido por diversos factores, entre ellos la sucrosa, pues se ha demostrado que la ausencia de sucrosa correlaciona con el pH bajo. Los azúcares reductores y el ion hidrógeno que se encuentran en mayor cantidad que la sucrosa la invierten. Otro factor que influye en el mismo es la humedad, pues al aumentar ésta se aumentan los iones hidrógeno, disminuyendo de esta manera el pH, de esta forma el limón que aún está verde tiene poca humedad por lo que el pH es mayor y al contrario en el limón maduro. Por último está el ácido propio que el limón contiene, el jugo de limón contiene de 5 a 7 % de ácido cítrico y éste incluye el 95 % del contenido total de ácidos. El ácido cítrico también contribuye a bajar el pH del limón, pero en menor grado (46).

4. JUSTIFICACIONES

El camarón es un alimento de buena calidad nutricional, pues contiene altas dosis de proteínas y vitaminas liposolubles y baja cantidad de grasa. Su cultivo constituye la mayor y más importante actividad de acuacultura que se desarrolla actualmente en el país, pero desafortunadamente por la llegada del cólera al país, se ha disminuído el consumo de productos de pesca, entre ellos, el camarón. Se ha demostrado que el inicio de epidemias de cólera en muchos lugares, ha sido por el consumo de pescado y mariscos, lo que también ha afectado la economía de productores, pescadores y en general, de todo el país. Se sabe que el Vibrio cholerae, el agente causal de la enfermedad del cólera, por sus condiciones fisiológicas no puede sobrevivir al pH ácido del jugo del limón, por lo que en el presente estudio se pretendió obtener más información acerca del efecto del jugo de limón sobre camarón contaminado con V. cholerae O1, dando las bases para la realización de estudios posteriores.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la inhibición in vitro de Vibrio cholerae 01, biotipo Eltor, serotipo Inaba en camarón (Penaeus sp) con jugo de limón (Citrus limonia).

5.2 Específicos

5.2.1 Evaluar a diferentes tiempos de contacto, el efecto del jugo de limón sobre camarón contaminado con V. cholerae.

5.2.2 Determinar el tiempo mínimo, en el cual el jugo del limón, elimina totalmente al V. cholerae que se encuentra contaminando el camarón.

6. HIPOTESIS

El jugo del limón (Citrus limonia) elimina al V. cholerae O1, biotipo Eltor, serotipo Inaba, que se encuentra contaminando camarón (Penaeus sp) en un tiempo de contacto mínimo de 1 hora.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo:

- camarón (Penaeus sp)
- cepa de Vibrio cholerae O1, biotipo Eltor, serotipo Inaba, donada por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) proveniente del CDC.

7.2 Medios:

7.2.1 Recursos humanos:

Investigadora:

Br. Diana Garzaro Abularach

Asesora:

Lic. Norma Gil de Castillo

7.2.2 Recursos materiales:

7.2.2.1 Institucionales:

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos y el Centro de Estudios del Mar y Acuacultura (CEMA)

7.2.2.2 Cristalería:

- Massons con capacidad de 500 ml
- Beackers de 500 ml
- Cajas de petri estériles
- Tubos de vidrio con tapaderas de rosca
- Pipetas serológicas de 1 ml estériles

7.2.2.3 Reactivos:

- Agua peptonada alcalina
- Agar TCBS
- Agar Müller-Hinton

- Agar TSI (Triple azúcar y hierro)
- Agar LIA (lisina y hierro)
- Agar MIO (movilidad, indol, ornitina)
- Reactivo de oxidasa (dihidrocloruro de tetrametil p-fenilendiamina al 0.5%)
- Solución salina estéril al 0.85%
- Antisuero polivalente anti V. cholerae O1
- Solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5%

6.2.2.4 Equipo:

- Asa bacteriológica en anillo
- Asa bacteriológica en punta
- Licuadora Osterizer
- Potenciómetro Corning modelo UL24CB-6
- Mechero Bunsen
- Refrigeradora Tyler modelo AS47FAG
- Incubadora Lab-line serie 1031
- Balanza Ohaus serie 4606
- Autoclave Swendeman serie C-79
- Espectrofotómetro Bausch-Lomb (Spectronic 20)

7.3 Procedimiento:

7.3.1 Levantamiento del inóculo

7.3.1.1 Se resembró la cepa de V. cholerae en dos cajas del medio de cultivo Müller Hinton y se incubó a 36 °C de 18 a 24 horas.

7.3.1.2 Se colocaron aproximadamente 2 ml de solución salina estéril en las dos cajas de Müller Hinton sembradas el día anterior y se agitó suavemente. Se vertieron los 2 ml en un beacker que contenía 600 ml de solución salina, se repitió esto

hasta que se obtuvo una concentración de 1×10^9 vibriones/ml, lo cual se correlacionó con una transmitancia de 80 % a una longitud de onda de 650 nm (45).

7.3.2 Procesamiento del camarón

7.3.2.1 Se lavó aproximadamente 200 gramos de camarón con agua y luego se tomó aproximadamente 150 gramos de ellos y se colocaron en un beacker. Se añadió al mismo la suspensión de V. cholerae preparada con anterioridad. Se dejó reposar por 15 minutos.

7.3.2.2 El grupo control estuvo formado por un grupo de camarones que se pelaron y partieron, 25 gramos de este grupo se colocaron en un recipiente Masson que contenía 225 ml de agua peptonada alcalina y se licuó a velocidad máxima por 60 segundos.

7.3.2.3 Se obtuvo entonces una dilución 1:10 y a partir de ella se hicieron diluciones 1:100 y 1:1000. Estas se incubaron por 6 horas a 36 °C (6,29).

7.3.2.4 Transcurridos los 15 minutos de contaminación de los 150 gramos de camarón, éstos se escurrieron, pelaron, partieron, pesaron y dividieron en cuatro grupos de 25 gramos cada uno. A tres se les agregó jugo de limón hasta cubrir completamente los camarones (determinando con anterioridad el pH del jugo de limón). El grupo restante se trabajó como se procesó el control y fue considerado como el estándar (6).

7.3.2.5 Al transcurrir una, dos y tres horas de contacto del camarón contaminado con el jugo de limón, se tomó cada grupo de 25 gramos por aparte y se colocó en un recipiente Masson que contenía 225 ml de agua peptonada y se realizó lo mismo que se hizo con los camarones no contaminados (6).

7.3.3 Aislamiento e identificación

7.3.3.1 Se tomó una muestra de la superficie de cada tubo utilizando el asa en anillo y se sembró en el medio de TCBS. Se incubó aeróbicamente de 18 a 24 horas a 36 °C (8,11,40).

7.3.3.2 Se buscó en el medio de TCBS las colonias típicas de V. cholerae, colonias medianas de 2 a 3 mm de diámetro, amarillas, con centro opaco, bordes translúcidos, delgados y ligeramente achatadas (8,11,40).

7.3.3.3 Se aislaron las colonias sospechosas en un medio de Müller Hinton. Se incubaron a 36 °C de 18 a 24 horas. Además con las colonias sospechosas se inoculó un tubo de agar TSI, LIA y MIO, se incubaron a 36 °C de 18 a 24 horas (8,11,12,40).

7.3.3.4 Las reacciones obtenidas fueron comparadas con las reacciones propias de V. cholerae O1. Si todo coincidía, a partir del agar Müller Hinton se realizó la prueba de indofenol oxidasa, las pruebas de String y de aglutinación, las cuales debieron ser positivas (8,11,12,40).

7.4 Diseño experimental

Se llevó a cabo un diseño de bloques al azar, con tres tratamientos y nueve inoculaciones por cada tratamiento para formar nueve bloques. El primer tratamiento fue a una hora de contacto del camarón con el jugo de limón; el segundo tratamiento a dos horas de contacto y el tercero a tres.

Para comparar los tratamientos se utilizó la prueba de Cochran, tomando como éxito la ausencia de V. cholerae en las muestras tratadas con limón y como fracaso la presencia de V. cholerae en las mismas, con un nivel de significancia de 0.01.

8. RESULTADOS

De las nueve inoculaciones realizadas solamente una, a las tres horas de contacto del camarón con el jugo de limón, manifestó una total inhibición del V. cholerae O1 presente en la misma, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla No. 1 Efecto del jugo de limón sobre camarón contaminado con V. cholerae O1 a diferentes tiempos de contacto

Inoculación	Tratamientos (horas)		
	1	2	3
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+

+: crecimiento de V. cholerae O1
 -: no crecimiento de V. cholerae O1

Para determinar la presencia de V. cholerae O1 en los camarones luego de los distintos tratamientos, se realizaron tres diluciones de cada muestra (1:10, 1:100 y 1:1000). De la dilución 1:10 no se obtuvo crecimiento de V. cholerae O1 en ninguna de las

nueve inoculaciones realizadas, en cambio, de las otras dos diluciones sí se obtuvo crecimiento a excepción de la muestra dos, a las tres horas de tratamiento. El pH de la dilución 1:10 fue de 6, a diferencia del pH de las diluciones 1:100 y 1:1000 que se mantuvo en 8.5. El jugo de limón utilizado tenía un pH que varió entre 2.2 y 2.4.

Todas las muestras de camarón utilizadas se compraron en el mercado "El Guarda" en distintas ocasiones, de este camarón no se aisló V. cholerae O1, pero sí algunas otras bacterias que no fueron identificadas.

La prueba de Cochran indicó que no hubo diferencia significativa entre los tres tiempos ensayados ($p > 0.01$) y que el jugo de limón no fue efectivo para eliminar al V. cholerae.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El jugo de limón no logró, en la mayoría de las muestras, la eliminación total de V. cholerae O1, a pesar de que el pH del mismo osciló entre 2.2 y 2.4. Este resultado pudo verse influido por la cantidad de V. cholerae inoculada que fue bastante grande (1×10^9 bacterias/ml), esta cantidad es la necesaria que debe ingerir una persona para padecer la enfermedad (1). Los mariscos pueden estar contaminados con distintas cantidades de V. cholerae O1, es posible que al tener menor cantidad del mismo, el jugo de limón sí logre eliminarlo.

El tiempo que se deja el camarón con el jugo de limón en la preparación de seviche generalmente es de una hora. Al hacer el análisis del grado de inhibición de V. cholerae O1 al transcurrir una hora de contacto del camarón con el jugo de limón, la disminución en la cantidad de V. cholerae fue muy poca comparándola con el estándar (camarón contaminado pero sin tratamiento). Esto pudo deberse a que previo al aislamiento de Vibrio cholerae O1 de las muestras de camarón ya tratadas se realizó un enriquecimiento en agua peptonada alcalina, medio ideal para el desarrollo del vibrio, lo que pudo provocar la reproducción de las pocas bacterias que quedaban después del tratamiento. A las tres horas de contacto del camarón con el jugo de limón hubo una total inhibición del vibrio en una de las nueve inoculaciones realizadas y se observó una inhibición notable en las otras ocho, sin embargo no se realizó el recuento de colonias.

Esto demuestra que el jugo de limón si es desfavorable para el desarrollo de V. cholerae O1, pero no se comprobó

estadísticamente que los tratamientos fueran efectivos para eliminar al Vibrio cholerae en esas condiciones.

Al efectuar el procedimiento para determinar la presencia de V. cholerae O1 luego de los tratamientos se hicieron tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000), de la dilución 1:10 no se aisló V. cholerae, entonces se procedió a tomar el pH y se encontró que el pH era de 6 y no de 8.5 como tendría que ser para el adecuado desarrollo del vibrio y su posterior aislamiento, lo que puede indicar que el pH 6 ya inhibe totalmente al V. cholerae O1 que contamina camarón, al estar en contacto con el mismo por 6 horas.

El camarón utilizado se compró en el mercado "El Guarda", del mismo no se aislaron bacterias de V. cholerae pero si algunas otras bacterias, lo que demuestra la poca higiene que se tiene en productos como éste, que fácilmente pueden convertirse en un medio de transmisión de enfermedades si no se le da un adecuado control.

10. CONCLUSIONES

10.1 El pH ácido del jugo de limón es desfavorable para el adecuado desarrollo de V. cholerae O1 que pudiera estar contaminando camarón, pero no es capaz de eliminarlo en su totalidad a una, dos y tres horas de contacto.

10.2 El camarón que se vende en el mercado "El Guarda" presenta alto grado de contaminación bacteriana.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Se recomienda realizar estudios posteriores para determinar la presencia y cantidad de V. cholerae O1 en camarón, antes y después de distribuirse en el mercado. Posterior a ello, determinar el efecto del jugo de limón sobre este camarón a tiempos de contacto de una hora en adelante, relacionando concentración de V. cholerae con tiempo de contacto necesario para eliminarlo.

11.2 Se recomienda en estudios posteriores, cuantificar la cantidad de bacterias que quedan luego de los diferentes tiempos de contacto con el jugo de limón y determinar si esta cantidad es menor o mayor que la dosis infectiva (1×10^6 bacterias).

11.3 Se recomienda a las personas que consuman seviche de camarón, que tomen las precauciones adecuadas, pues el jugo de limón en estas condiciones, ejerce un efecto inhibitorio bajo sobre V. cholerae O1 que pudiera estar contaminando el camarón y este efecto se ve influido por la cantidad de V. cholerae que pudiera tener.

12. REFERENCIAS

1. Barrios LC, et al. El cólera en Guatemala. Guatemala: Centro de Investigación de las ciencias de la salud; Facultad de Ciencias Médicas; Universidad de San Carlos de Guatemala. 1991. 28p.
2. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Organización y Desarrollo, Instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Baez". Manual sobre cólera para personal de salud. México, DF. Doc. Tec. No. 11. 1991. 26p.
3. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección General de Servicios de Salud. Manual de normas y procedimientos para la vigilancia y control del cólera; Versión actualizada. Guatemala, 1992. 49p.
4. Organización Panamericana de la Salud. La situación del cólera en las Américas. Bol. Epid. 1991; 12(1):1-24.
5. Organización Panamericana de la Salud. Impacto del cólera en el comercio nacional e internacional de alimentos. Perú, 1992. 15p.
6. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos. Washington, D.C., 1991. 66p.
7. Massanet I. Estudio microbiológico comparativo entre camarones de exportación y camarones de consumo local. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 55p.
8. Torres MF, et al. Etiología y Diagnóstico de laboratorio del cólera. Guatemala: Laboratorios de Microbiología "Leonardo Mata", INCAP. 1991. 21p.
9. Smith LH, Wyngharden JB. Tratado de Medicina Interna de Cecil. 16 ed. México: Editorial Interamericana. Vols. 2, vol. 1, 1985. 2600p.
10. Davis BR, et al. Tratado de Microbiología. 2 ed. España: Ginsberg Wood Salvat, 1980. 1559p.
11. Lennette EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. 4 ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991. 1364p.
12. Zinsser H. Microbiology. 16 ed. New York: Appleton Century Crofts. 1976. 1454p.

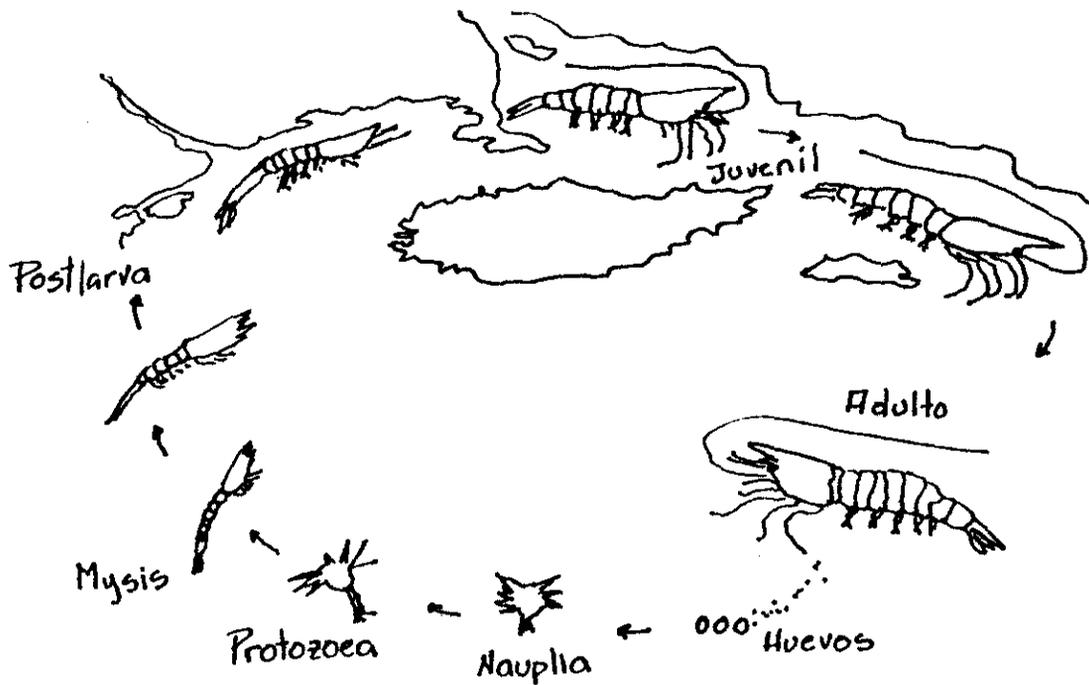
13. Díaz C. Aislamiento de bacterias del género Vibrio causantes de diarrea aguda en pacientes de Puerto Barrios, Izabal. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 50p.
14. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Manual de Microbiología Médica. 11 ed. México, DF: El Manual Moderno, S.A. 1985. 588p.
15. Oficina Panamericana de la Salud, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Información técnica sobre el cólera; revisión bibliográfica. Guatemala, 1991. 23p.
16. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la salud. Pautas para el control del cólera; Programa regional de control de enfermedades diarreicas. Doc. WHO/CDD/SER/80.4 Rev.2, 1991.
17. Kaysner C, Abeyta C. Incidence of Vibrio cholerae from Estuaries of the United States West Coast. Appl. Environ. Microbiol. 1987;53(6):1344-1347.
18. Motes JR. Isolation of Vibrio cholerae Serotype Ogawa from a Florida Estuary. Appl. Environ. Microbiol. 1983;45(1):321-322.
19. Bourke A, et al. Investigation of how cholera disease was acquired in Australia. J. Austral. 1986;229-234.
20. Brayton PR, Tamplin ML, Colwell RR. Enumeration of V. cholerae O1 in Bangladesh waters by Fluorescent Antibody Direct Viable Count. App. Env. Microb. 1987;53:2862-65.
21. Garzaro DV. Informe final de ejercicio profesional supervisado (EPS) realizado en el hospital nacional de Mazatenango. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992. 34p.
22. Blake PA, et al. Cholera; a possible endemic focus in the United States. N. Engl. J. Med. 1980;6:302:309.
23. DePaola A. Vibrio cholerae in Marine Foods and Environmental Water; A Literature Review. J. Food. Sci. 1981;46:66-69.
24. Shimodory S, et al. Extraction from prawn shells el substances cryoprotective for Vibrio cholerae. Appl. and Env. Microb. 1989;55:2726-2728.
25. Felsenfeld O. Notes on food, beverages and fomites contaminated with Vibrio cholerae. Bull. WHO. 1965;33:725.
26. Guthrie R, Cofie D. Culture of Vibrio cholerae in presence of shrimp and crab chitin. Int. Biodeterior. 1991;27:39-48.

27. Rodríguez F, Reprieto J. El cultivo del camarón azul, Penaeus stylirostris. México: Centro de investigaciones científicas y tecnológicas, Universidad de Sonora, 1986. 126p.
28. Barnes RD. Zoología de los invertebrados. 3 ed. México: Editorial Interamericana, 1977. 493p.
29. GATT. Los principales mercados de langostinos y camarones en Europa Occidental. Ginebra: Centro de comercio internacional, 1967. 159p.
30. Villee CA. Biología. 7ed. Espinoza R, trad. México: McGraw-Hill Interamericana, 1988. XV+875p.
31. Ubico SR. Contaminación microbiana de algunos mariscos destinados al consumo humano en la ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, (tesis de graduación) 1980. 40p.
32. Centro de Estudios del Mar y Acuicultura. Shrimp and Prawn Farming. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1989. 263p.
33. Pretto R. Manual de cría de camarones peneidos en estanques de aguas salobres. Panamá: Dirección Nacional de Acuicultura, 1984. 50p.
34. Bardach J, Ryther J, Mclarney W. Acuicultura; crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. Westrup L, trad. México: A.G.T. Editor, 1986. 741p.
35. Villagran ER. Efecto de la tasa de alimentación sobre el crecimiento del camarón (Penaeus spp). Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989. 70p.
36. Kuttyamma V. Observations on the food and feeding of some Penaeid Prawns of Cochin Area. Department of Marine Sciences, Cochin. J. Mar. Biol. Ass. India 1973; 15:184-189.
37. Bertullo V. Tecnología de los productos y subproductos de pescado, moluscos y crustáceos. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur, 1975. 538 p.
38. Toma RB, James W. Nutritional evaluation of protein form shrimp cannery effluent (shrimp waste protein). J. Agric. Food. Chem. 1975;23(6):1168-1171.
39. Tressler DK. Marine products of commerce. 2ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1951. 782p. (p. 594-595).
40. Bailey WR, Scott EG. Diagnostic Microbiology. 8ed. Los Angeles, California: The C.V. Mosby Company, 1990. 860p.

41. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. New York:Columbia University Press, 1981. 1262p.
42. Martínez F. Cultivo del naranjo, limonero y otros agrios. 2ed. Barcelona:Sintes, 1969. 284p.
43. Instituto de fomento de la producción. El Limón. Guatemala, 1968. 56p.
44. Guillén P. Algunas perspectivas del limón criollo en la diversificación agrícola. Rev. Cafet. 1975;149:29-34.
45. Aparicio JM, Rodríguez C. Tolerancia del V. cholerae 01 aislado en Panamá al ácido cítrico del limón. Bol. Lab. Cent. Sal. 1992;2:2-3.
46. Bartholomew ET, Sinclair WB. The lemon fruit. California: Universidad de California, 1951. 163p.
47. INCAP-ICNND. Tablas de composición de alimentos para uso en América Latina. 1980. 140p. (p. 51).

13. ANEXOS

Anexo No. 1

Ciclo Vital del camarón (Penaeus sp)

Los peneidos descargan sus huevos directamente en el agua, y aparecen las larvas nauplios, que van madurando hasta llegar al estadio de postlarva. Las corrientes aproximan las postlarvas a la costa, ingresando éstas a las aguas estuarinas.

Después de 3 meses inician una migración hacia aguas marinas nuevamente, donde alcanzan la madurez sexual (7,28,30-33).

Anexo No. 3

Composición química del jugo de limón (Citrus limonia)

Valor energético: 22 calorías
Humedad: 91.6%
Proteína: 0.3 g
Grasa: 0.2 g
Hidratos de carbono totales: 7.7 g
Ceniza: 0.2 g
Calcio: 10 mg
Fósforo: 10 mg
Hierro: 0.4 mg
Vitamina A: 5 mcg
Tiamina: 0.03 mg
Riboflabina: 0.01 mg
Niacina: 0.2 mg
Acido ascórbico: 51 mg

Tomado de:

INCAP-ICNND. Tablas de composición de alimentos para uso en América Latina. 1980. 140p. (p. 51).