

PAQ-10

DETECCIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA POR PCR EN DESECHOS DE CAMARÓN ENSILADOS PARA OBTENCIÓN DE QUITINA Y PROTEÍNA. (DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS BY PCR IN SHRIMP WASTE SILAGE FOR CHITIN AND PROTEIN RECOVERY)

Diana Corona¹, Ana María Sifuentes² y Keiko Shirai¹.

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Lab. Biopolímeros. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina Iztapalapa. D.F.

Tel. 58044921/Fax 5804 47 12. ² Centro de Biotecnología Genómica-IPN, A.P. 152, Reynosa 88710,

Tamaulipas e-mail: smk@xanum.uam.mx

ABSTRACT. Crustacean silage has been studied as an alternative to chemical process for chitin, protein hydrolysates and pigments recovery [1,2,3]. The protein hydrolysates have been successfully applied in fish diets [4]; nevertheless the reuse of shrimp wastes also involves a risk for virus contamination. The effect of viral diseases in Aquaculture causes economical losses, affecting directly shrimp farms, there are seven viruses: a) White spot syndrome virus (WSSV), b) Yellow-head virus (YHV), c) Taura syndrome virus (TSV), d) Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), e) Hepatopancreatic parvovirus (HPV), f) Monodon baculovirus (MBV) and g) Baculovirus peanei (BP). Since WSSV is the deadliest and most difficult virus to control in shrimp culture. The ensilation of crustacean was suggested to inactivating the virus because the acidic condition might degrade it [5]. The ensilation were carried out in two reactor design, column and rotating. Acidification was determined through the process, besides chemical, microbiological analysis. Several samples from silage as well as cephalothoraxes and tails free and infected of WSSV were used for virus detection by polymerase chain reaction (PCR).

INTRODUCCIÓN. La producción de mariscos, apoyada fuertemente por el crecimiento de la acuicultura, es cada vez mayor en países en desarrollo. Sin embargo, en la actualidad no se aplica un manejo efectivo de los desechos sólidos que genera esta industria, calculados en alrededor del 50% de la producción. La descarga de estos desechos al medio ambiente representa un serio problema por su potencial contaminante. Una medida para reducir problemas generados por estos desechos es la búsqueda de usos alternativos que permitan obtener productos con valor agregado, tales como: quitina, quitosano, pigmentos y proteínas. Se ha propuesta al ensilado, como un método de obtención de quitina alterno al químico, en donde los ácidos orgánicos producidos desmineralizan, mientras que las enzimas hidrolizan las proteínas asociadas a la quitina, lográndose porcentajes de remoción mayores del 80%. El ensilado se mantiene estable a temperatura ambiente lo cual facilita el transporte y procesos de purificación de los otros subproductos [1,2,3].

Un importante mercado para proteína obtenida a partir de desechos de mariscos es la producción animal intensiva. La obtención de proteína a partir desechos de crustáceos y su aplicación en la alimentación de peces ha sido reportada como una alternativa a harina de pescado [4]. A pesar de su potencial la proteína recuperada a partir de desechos de mariscos puede verse limitada en su aplicación a alimentación animal (crustáceos) debida a enfermedades, principalmente virales, como *Síndrome de la Mancha Blanca* (WSSV) que pueden ser transmitidas a través de la dieta.

Se ha reportado que los tratamientos con ácido, pH entre 1 a 3, afectan significativamente el poder infectivo de algunos virus como el de Hepatitis B y Mancha Blanca en ensayos de bioinfectividad [5,6]. Durante el ensilaje el valor del pH es ácido, lo cual afecta la composición químico proximal de los desechos, disminuyendo la presencia de bacterias patógenas-descompositoras y posiblemente de los virus. En este estudio se fermentaron desechos de camarón sanos e infectados con WSSV, utilizando dos diferentes diseños de reactores, estático y dinámico, en los que se determinó las constantes de acidificación, rendimientos de proteína recuperable, y su efecto en WSSV detectado mediante PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIONES. Los diseños de los reactores, rotatorio y en columna respectivamente, proporcionaron distintas características para el desarrollo del ensilado. Al terminar la fermentación se pudieron separar dos fracciones: a) líquida que contiene proteínas, lípidos y pigmentos y b) semi-sólida que contiene principalmente quitina. De las dos fracciones obtenidas de los ensilados en los dos reactores, se compararon en cuanto los siguientes variables de respuesta: 1) producción de ácido láctico, 2) evolución de pH, 3) análisis microbiológico, 4) análisis químico proximal y 5) análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), este último para detectar la presencia del virus WSSV en el producto final del ensilado.

Los resultados obtenidos muestran que en los dos reactores se produce una considerable cantidad de ácido láctico que mantiene el pH en valores entre 4-3, con valores máximos de acidez total titulable de 0.5 mmol/g (figura 1). Sin embargo, la acidez puede ser fuertemente afectada por el tipo de desecho empleado (cabezas o colas), siendo mayor en colas, esto esta relacionado directamente con la capacidad amortiguadora de cabezas o colas debido al contenido de minerales presentes, 14% y 5.7 %, respectivamente.

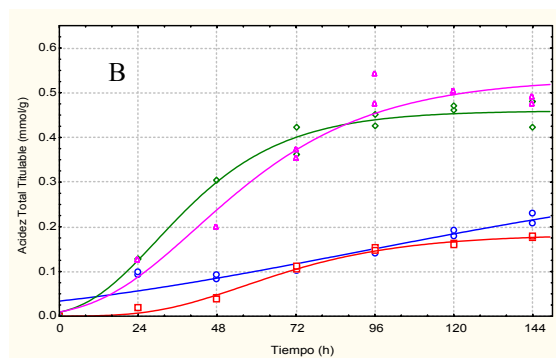
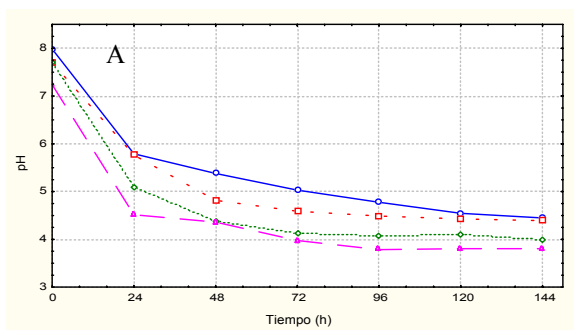


Figura 1. Fermentación ácido láctica de desechos de camarón, en un reactor estático (RE) y dinámico (RD):

A) pH y B) acidez total titulable. Símbolos: ○ RE cabezas, □ RD cabezas, ◇ RE colas y △ RD colas.

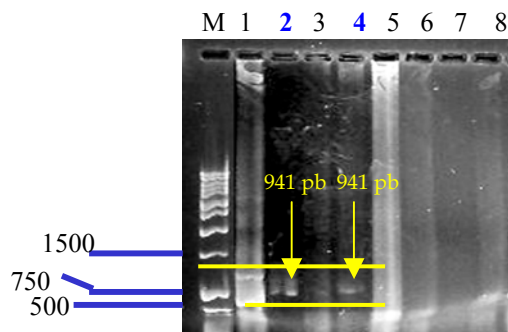


Figura 2. Análisis de PCR anidado para detectar el virus de WSSV, en desechos infectados con diferentes días de fermentación, carriles: 1 testigo positivo; 2 0 días; 3 Testigo negativo; 4 2 días; 5 3 días; 6 4 días; 7 5 días; 8 6 días. M marcador de peso molecular de 1 kb.

un porcentaje de proteína cruda (35 a 50%) dentro de lo requerido para la alimentación. Las cuentas microbiológicas de bacterias ácido lácticas y de aerobios totales fueron altas mientras que no se encontraron coliformes en ninguno de los ensilados.

Por otra parte el análisis de las muestras a diferentes tiempos de fermentación (figura 2) mostraron que a partir del tercer día no se observó la banda correspondiente al virus en las muestras de ensilado provenientes del reactor dinámico, esto parece indicar que las condiciones de alta acidez en el ensilado conducen a una posible degradación del virus. Sin embargo, con los resultados obtenidos durante este trabajo es necesario llevar a cabo una serie de experimentos adicionales en los cuales se comparen diferentes técnicas de PCR para la detección del virus a fin de comprobar y/o validar estos resultados.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen a CONACyT por el apoyo financiero otorgado.

REFERENCIAS

1. Cira, L.A., Huerta, S. y Shirai, K. 2000. Scaling up of lactic acid fermentation of prawn wastes in packed-bed column reactor for chitin recovery. *Advances Chitin Science* Vol. 4:21-27. Editada por M.G. Peter, A. Domard, y R.A.A. Muzzarelli. University of Potsdam, Alemania ISBN 3-9806494-5-8.
2. Shirai, K., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González Obdulia R. y Hall, G. M. (2001). Effect of Initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 446-452.
3. Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. y Shirai, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37:1359-1366.
4. Plascencia, M., Olvera-Novoa, M., Arredondo-Figueroa, Hall, G. y Shirai, K. 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp-head silage protein hydrolysate in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (L) diets. *Journal of Science of Food and Agriculture*. Vol. 82: 753-759.
5. Tagawa, M., Yamagichi, T., Yokosuka, O., Matsutani, S., Maeda, T y Saisho, H. (2000). Inactivation of a hepadnavirus by electrolysed acid water. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46:363-368.
6. Chang, P.S., Chen, L.J. y Wang, Y.C. (1998). The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture* 166: 1-17.