

2aj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE CAMARONES PENEIDOS
(*Litopenaeus vannamei*), MEDIANTE LA INGESTA DE *Vibrio*
parahaemolyticus, BIOENCAPSULADO EN *Artemia franciscana*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
ANTONIO MAZARI SÁMANO



ASESORES DE TESIS:
DRA. ANA MARGARIDA TRIGO DE SOUSA ROQUE
DR. PEDRO PRADAL ROA
DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS

MÉXICO, D.F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

270649

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A DIOS

A MIS PADRES

Y SÓLO TU, SABES COMO LA DEDICO A UDS,
QUE LO SON TODO PARA MI...

AGRADECIMIENTOS

A MI MAMÁ

DRA. ANA MARGARIDA TRIGO DE SOUSA ROQUE

**A MIS ASESORES
DE LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS**

**DR. PEDRO PRADAL ROA
DR. FERNANDO CONSTANTINO CASAS**

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
Título.....	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Lista de contenido.....	IV
Lista de cuadros.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Resumen.....	1
Summary.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Características del género <i>Vibrio</i>	7
1.3 Vibriosis.....	7
1.4 Características de las artemias.....	10
1.5 Bioencapsulación.....	13
1.6 Características de los camarones peneidos (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	13
1.7 Objetivo.....	14
1.8 Hipótesis.....	14
2. MATERIAL Y MÉTODOS	16
2.1 Origen del <i>Vibrio parahaemoliticus</i>	16
2.2 Origen de la <i>Artemia</i> spp.	16
2.3 Origen de los camarones.....	16
2.4 Estandarización de métodos.....	17
2.4.1 Descapsulación de quistes de <i>Artemia franciscana</i>	17
2.4.2 Eclosión de <i>Artemia</i> spp. con antibiótico.....	18
2.4.3 Medición de la concentración inicial de bacterias en artemias eclosionadas con antibiótico.....	19
2.4.4 Incubación de la cepa de prueba.....	19
2.4.5 Medición de la concentración de bacterias de la cepa HL58 que se ofreció a las instar II de las artemias.....	20
2.4.6 Bioencapsulación en <i>A. Franciscana</i>	20
2.4.7 Cuantificación de la concentración de la cepa HL58 en <i>A. franciscana</i> bioencapsulada.....	21
2.5 Desarrollo experimental.....	21

	<u>Página</u>
3. RESULTADOS	24
3.1 Descapsulación de los quistes de <i>A. Franciscana</i>	24
3.2 Concentración de HL58 en <i>A. Franciscana</i>	24
3.3 Calidad de agua.	29
3.4 Niveles de mortalidad de poslarvas en los experimentos.	30
3.5 Resultados histopatológicos.	33
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	34
5. ANEXO ANÁLISIS DE CORRELACIÓN PARA BIOLÓG TM	39
6. LITERATURA CITADA.	41

LISTA DE CUADROS

	<u>Página</u>
CUADRO 1	
Producción acuícola de las principales especies cultivadas en México de 1989-95.	4
CUADRO 2	
Solución descapsuladora para quistes de <i>Artemia</i> spp.	18
CUADRO 3	
Solución desclorinada para quistes de <i>Artemia</i> spp.	18
CUADRO 4	
Seguimiento de la concentración de la CEPAHL58 alcanzada en las artemias.	25
CUADRO 5	
Concentración de la CEPA HL58 expresada en UFC ml ⁻¹ ofrecida en suspensión a las artemias.	26
CUADRO 6	
Concentración de UFC ml ⁻¹ de la CEPA HL58 por <i>Artemia</i> spp.	26
CUADRO 7	
Concentración de la CEPA HL58 expresada en UFC ml ⁻¹ ofrecida en suspensión a las artemias.	28
CUADRO 8	
Concentración de UFC ml ⁻¹ de la CEPA HL58 por <i>Artemia</i> spp.	28
CUADRO 9	
Porcentaje de mortalidad acumulada al término del primer experimento.	30
CUADRO 10	
Porcentaje de mortalidad acumulada al término del segundo experimento. ...	31

LISTA DE FIGURAS

	<u>Página</u>
FIGURA 1 Estructura de las membranas del quiste de <i>Artemia</i> spp.	11
FIGURA 2 Quiste de <i>Artemia</i>	12
FIGURA 3 Concentración de la CEPA HL58, por <i>Artemia</i> bioencapsulada.	25
FIGURA 4 Primer experimento. Concentración de la CEPA HL58, ofrecidas a las artemias y concentración consumida por las artemias.	27
FIGURA 5 Segundo experimento. Concentraciones de la CEPA HL58, ofrecida a las artemias y concentración consumida por las artemias.	29
FIGURA 6 Segundo experimento. Mortalidad diaria acumulada.	31

Mazari Sámano, Antonio. Infección experimental de camarones peneidos (*Litopenaeus vannamei*), mediante la ingesta de *Vibrio parahaemolyticus*, bioencapsulado en *Artemia franciscana*. (Bajo la dirección de Dra. Ana Margarida Trigo de Sousa Roque, Dr. Pedro Pradaí Roa y Dr. Fernando Constantino Casas).

RESUMEN:

El incremento en la demanda mundial de camarón ha presionado positivamente el desarrollo del cultivo de los camarones peneidos. Para dar respuesta a esta demanda la actividad camaronícola se ha intensificado, imponiendo un estrés cada vez mayor sobre los camarones. Este estrés ha tenido como consecuencia la aparición de brotes de enfermedades que son identificados debido a las mortalidades presentes en los sistemas de cultivo. Los organismos patógenos que afectan a los peneidos, pueden ser de etiología viral, bacterial, micótica, y protozoaria. Las bacterias más frecuentemente asociadas con brotes de enfermedades han sido los vibrios. Sin embargo poco se sabe sobre la enfermedad a la cual se ha dado el nombre de vibriosis. Esto se debe esencialmente a que es difícil estudiarla sin poder reproducirla en condiciones controladas de laboratorio, por no existir a la fecha una técnica de infección experimental confiable y reproducible. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica de infección experimental con *Vibrio* sp. Mediante el uso de la técnica de bioencapsulación, se logró una considerable ingesta de vibrios (*V. Parahaemolyticus*) por parte de las artemias (*Artemia* spp.), una vez realizado el proceso de bioencapsulación, estas artemias fueron ofrecidas a postlarvas (PI's) de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de 30 días de edad. Para el monitoreo de las PI's se utilizó un sistema estático de 12 acuarios de vidrio, con 2.5 L de agua de mar, filtrada y esterilizada en autoclave. Los acuarios fueron aireados de forma individual, mediante una línea de aire conectada a un aereador gigante. Las PI's fueron alimentadas diariamente con *Artemia* sp. bioencapsulada con *Vibrio* sp. (6 acuarios) y como control *Artemia* sp. sin *Vibrio* (6 acuarios). Se monitoreo el número de sobrevivientes durante 7 días. Al final de los 7 días se observó una diferencia entre el grupo testigo y el grupo experimental, denotando por una parte la gran cantidad de vibrios que pueden llegar a las PI's a través de las artemias y por otra un decremento en los niveles de sobrevivencia del grupo experimental con relación a los testigos, los cuales no presentaron cambio alguno.

Palabras claves: Camarón, *Artemia*, *Vibrio*, bioencapsulación, Infección experimental.

Mazari Sámano, Antonio. Experimental infection of penaeid shrimp (*Litopenaeus vannamei*), through the ingesta of *Vibrio parahaemolyticus*, bioencapsulated in *Artemia franciscana*. (Under the direction of Dr. Ana Margarida Trigo de Sousa Roque, Dr. Pedro Pradal Roa and Dr. Fernando Constantino Casas).

SUMMARY:

The increasing world demand for shrimp has pressured the development of shrimp culture. To fulfil the gap between demand and fisheries availability the shrimp culture has intensified its techniques, imposing an increasing level of stress on the shrimp. This increasing stress has had as a consequence disease outbreaks which are normally identified due to the high levels of mortalities. The potential pathogens are of several aetiologies such as viral, bacterial, mycotic, and protozoan. The bacteria more frequently associated with disease outbreaks in shrimp are the vibrios. However, little is known about the disease known as vibriosis. This is due to the difficulty of studying vibriosis because there is not technique for reproducing vibriosis in controlled laboratory conditions. The objective of this study was to develop a technique capable of reproducing vibriosis in shrimp. Through the technique of bioencapsulation, it was possible to fill *Artemia franciscana* with *Vibrio parahaemolyticus*. Once the *Artemia* were full with *Vibrio*, they were offered to 30 days old postlarvae (PI's) of white shrimp (*L. vannamei*). To monitor the PIs, a static system of 12 glass tanks with 2.5 litres of sea water filtered and sterilised in autoclave was used. The tanks were individually aerated, through an airline connected to a high volume air blower. The PIs were fed daily with *Artemia* bioencapsulated with *Vibrio* (6 tanks); or as a control fed with *Artemia* without *Vibrio* (6 tanks). The number of survivors was monitored daily. After 7 days, a difference was observed between the control group and the experimental group, showing on one hand that a high quantity of vibrios can reach the PIs through the *Artemia* and on the other hand a decrease in the levels of survival of the experimental group, in relation to the control group, which did not show any mortalities.

Keywords: Shrimp, *Artemia*, *Vibrio*, bioencapsulation, experimental infection.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura actualmente se practica en muchos países del mundo. Se considera una actividad en desarrollo como complemento a la captura de organismos marinos y de agua dulce. Dentro de esta actividad, se destaca la selección de las distintas especies que mejor se adaptan a las condiciones de cultivo, basándose en características tales como el crecimiento o desarrollo, índice de conversión alimenticia, cantidad de biomasa obtenida por período de producción, la resistencia al manejo y enfermedades. También es importante considerar el papel que desempeña el producto final en la oferta y demanda dentro de un mercado nacional e internacional, así como las fluctuaciones que se dan en su precio/kg estimado.

La producción acuícola de especies cultivadas en México está basada principalmente en Carpa, Charal, Lobina, Tilapia, Ostión, Bagre, Trucha y Camarón, esta última ha presentado un incremento considerable en los últimos años (Cuadro 1), debido a que la captura de camarones de altamar no cubre la demanda del producto, la industria camarónica se está desarrollando para intentar alcanzar el punto de equilibrio de producción; por lo que se puede suponer la apertura de un amplio mercado y entrada de divisas en el ámbito nacional.

CUADRO 1

PRODUCCIÓN ACUÍCOLA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES CULTIVADAS EN MÉXICO DE 1986-1995 (ton).										
	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
CARPA	20.921	26.170	27.056	22.504	27.818	28.353	28.393	25.173	18,848	22.870
CHARAL	7.728	7.800	7.522	7.898	8.955	7.816	7.498	7.516	2,665	NR
LOBINA	1.224	1.290	1.466	1.414	1.819	1.615	1.311	1.407	1,470	NR
TILAPIA	65.568	75.093	74,843	73.766	83.788	75.093	76.964	80.638	75.541	77,384
OSTIÓN	42.375	50.715	56,118	56,599	52,582	38.721	32,151	25,847	33,479	30,361
BAGRE	2.786	2.366	2,754	2,947	3,820	3,452	4,219	4,665	2,607	3,155
TRUCHA	425	387	929	840	2,010	1,865	1,854	3,353	1,966	2,305
CAMARÓN	43	286	551	2,846	4,371	5,111	8,326	11,846	13,138	15,828
OTRAS	10.054	10,278	13,100	12,639	5,506	9,382	8,053	9,121	21,675	5,317
TOTAL	151.124	174,385	184,339	181,453	190,669	171,408	168,769	169,566	171,389	157,220

FUENTE: Anuario Estadístico de Pesca (1986-1995)
NR. = No registrado hasta Dic. 95.

En 1995, la producción del cultivo de camarón representó el 27.3% de la producción total mundial, correspondiendo a 712,000 toneladas de camarón (2). En México, el principal estado productor de camarón es Sinaloa, con una producción anual de 10,256 toneladas de camarón (2). Esta actividad se ha desarrollado desde los años 70's, teniendo principal recurso la explotación del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), seguido del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*).

Una manera práctica de incrementar la producción de camarón, es la implantación de métodos intensivos de cultivo, sin embargo, esta estrategia de producción contribuye en el deterioro de la calidad del agua incrementando el estrés en los animales, predisponiéndolos a sufrir enfermedades (5,14,16).

Se considera que las granjas camaronícolas mantienen una actividad económica de alto riesgo, debido a la elevada tasa de mortalidad que presentan los camarones en estos sistemas. Esta mortalidad es atribuida, en gran parte, a las distintas enfermedades que afectan al camarón, tanto en las granjas como en los laboratorios de producción de postlarvas. Estas enfermedades pueden ser de etiología bacteriana, micótica, protozoaria y viral.

Se conoce que la causa de una enfermedad se da por un desequilibrio en el balance que existe normalmente entre hospedero, patógeno y ambiente, definiéndose la enfermedad como una interrupción, terminación, o alteración en las funciones corporales, sistemas u órganos (9).

Los estudios sobre patogenicidad, hasta ahora, se limitan a utilizar inyecciones con bacterias (25,37) o realizan, sin mucho éxito, baños infecciosos (11,32). Aunque se logra inducir mortalidades específicas con el uso de inyecciones, esto no refleja el proceso natural de infección. Para entenderlo, se debe desarrollar una técnica de infección experimental que reproduzca por lo menos algunas condiciones de infección natural. Se considera la vía de inoculación oral como la principal causa de vibriosis en las primeras etapas del desarrollo de los camarones peneidos (18). La vibriosis en camarón ocasiona cuadros clínicos con diferentes características como lo son, nado errático, colonización de cutícula con la subsecuente aparición de reblandecimiento cuticular, edema subcuticular y zonas de melanización cuticular.

Varias especies de *Vibrios* spp. se consideran como bacterias que pueden ocasionar zoonosis, presentando en humanos cuadros entéricos.

Una vez que la técnica de infección experimental esté desarrollada, podrá ser utilizada para examinar la virulencia de diferentes géneros y/o especies de bacterias patógenas; la realización de pruebas de ingesta de bacterias no patógenas como posibles probióticos; monitoreo del seguimiento de una enfermedad específicamente inducida con una bacteria en particular, su tratamiento y medidas para controlar el brote o la erradicación de la enfermedad en un lote de postlarvas; evaluación de medicamentos; indicar cuáles son los factores ambientales que tienen mayor influencia en el inicio y desarrollo de la enfermedad; un sinnúmero de utilidades prácticas para mejorar la calidad de producción de los camarones.

1.1 ANTECEDENTES

Las bacterias Gram-negativas son predominantes en los ambientes marinos (7) y generalmente constituyen la mayoría de las bacterias presentes en la microflora normal del camarón peneido, cultivado o silvestre (24). El género *Vibrio*, se destaca como la principal bacteria asociada a enfermedades en camarones peneidos (23).

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Vibrio*.

Los *Vibrio* spp. son bacterias Gram -, de forma curva o recta, con flagelo polar (dependiendo la especie puede presentar más de un flagelo), aeróbicos facultativos, siendo su temperatura óptima de crecimiento de los 18°C a los 37°C. Dentro de sus características enzimáticas algunos géneros producen quitinasas (quitinasa +) como es el caso de *V. parahaemoliticus*, por lo que fácilmente colonizan la cutícula de crustáceos como el camarón y las artemias (22).

Las características de crecimiento del *Vibrio parahaemoliticus*, en TCBS (Difco) son: sucrosa (-) por lo que presenta una coloración verde azulosa, Gram -, tamaño a las 24 hrs de 3-4mm considerada como grande, elevación umbilicada, crecimiento circular, apariencia de la superficie cremosa, borde entero, densidad ligeramente brillante y su consistencia es de textura suave (17).

1.3 VIBRIOSIS

El término vibriosis se utiliza comúnmente para referir cualquier infección causada por bacterias del género *Vibrio* spp. (13).

Las pérdidas económicas, debidas a vibriosis, pueden ser devastadoras, llegando a ocasionar mortalidades del 100% en cultivos de peneidos. Los *Vibrio* spp. se encuentran de forma natural en el ambiente (8,19,28) y aún existiendo pruebas de que estos organismos presentan un comportamiento oportunista, pueden llegar a causar infecciones letales como resultado de otras condiciones primarias, como es el caso de otras enfermedades infecciosas (1,7,29), enfermedades nutricionales (21), estrés ambiental extremo y heridas (3,23,25). Los intentos realizados para producir infecciones experimentales, que cumplan con los postulados de Koch⁽¹⁾ con *Vibrio* spp. aislados de camarones enfermos, no han tenido éxito y sólo logran obtener resultados consistentes con inóculos muy grandes, con lo que se sustenta el argumento de que estas infecciones son causadas por organismos patógenos oportunistas (23). Existen pocas evidencias sobre si la bacteria, por sí sola, es capaz de desarrollar cuadros de vibriosis en camarones peneideos, o cuál es el número de bacterias necesario para causar esta enfermedad (22).

Las principales especies de vibrios que se han sido aisladas de camarones enfermos son: *V. alginolyticus*, *V. parahaemoliticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, y *V. damsela*, (4,22). Mortalidades asociadas a vibriosis, (*V. parahaemoliticus*, *V. harveyi* y *V. damsela*) (22) han sido reportados en proporciones epizooticas, en producciones de camarones peneidos,

(1) Postulados de Koch. 1.- El organismo debe estar presente en todos los casos de enfermedad. 2.- El organismo debe ser aislado en un cultivo puro. 3.- Cuando se inoculan animales susceptibles con el organismo aislado, se debe reproducir una enfermedad con características similares. 4.- Este mismo organismo, nuevamente debe

afectando a *Penaeus monodon* y *P. maerguiensis* en Tailandia (36). En epizootias registradas en Ecuador, las principales especies aisladas en orden de frecuencia son: *V. parahaemoliticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, y *V. damsela* (26).

Las infecciones bacterianas en camarones pueden presentarse de tres formas: (1) puntos localizados en la cutícula, los que constituyen la condición bacteriana llamada enfermedad de la cutícula (exoesqueleto), (2) infecciones localizadas en las branquias, en el hepatopáncreas o pérdida de apéndices. (3) septicemias. Todas las etapas de desarrollo del camarón son afectadas (22).

Los camarones con vibriosis, al examen histológico, presentan necrosis extensivas e invasión bacterial de órgano linfoide, con múltiples nódulos hemocíticos melanizados, estos nódulos son, mayormente, compuestos de colonias de bacterias rodeados de una zona melanizada y múltiples hemocitos encapsulando las colonias. Estos hemocitos se localizan principalmente en hepatopáncreas, branquias, corazón, gónadas y músculo. La necrosis e inflamación solamente se observa en órganos linfoides y no en otros tejidos (10).

ser aislado en los animales enfermos. Estos postulados se deben llevar a cabo cuando establecemos una relación causal entre un cierto organismo y una cierta enfermedad.

1.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS ARTEMIAS

La clasificación taxonómica de la *Artemia* spp. es: Clase Crustácea, Orden Anostraca, Familia Artemiidae, Género *Artemia* y la Especie que se utilizó para este trabajo fue *A. franciscana* Kellog, 1906.

El uso de nauplios de *Artemia* spp. como alimento, en los primeros estadios de desarrollo de los camarones, es una práctica común de empresas productoras de camarón (33).

La *Artemia* spp. tiene la capacidad de vivir en ambientes hipersalinos hasta de 250ppm de NaCl, pero su rango óptimo oscila entre los 5 y 35ppm de NaCl, esto varía considerablemente, dependiendo de la especie de *Artemia*. Esta capacidad de osmorregulación se interpreta como un mecanismo de defensa, ya que sus predadores naturales no se pueden osmorregular tan eficientemente. Por otro lado las condiciones ambientales afectan su reproducción; a bajas salinidades desarrolla una reproducción ovovivípara produciendo nauplios, pero a partir de concentraciones por encima de los 150 ppm de NaCl, la reproducción cambia a ovípara produciendo quistes (6) (FIGURA 1 Y 2).

La cubierta del quiste está dividido en varias partes (FIGURA 1).

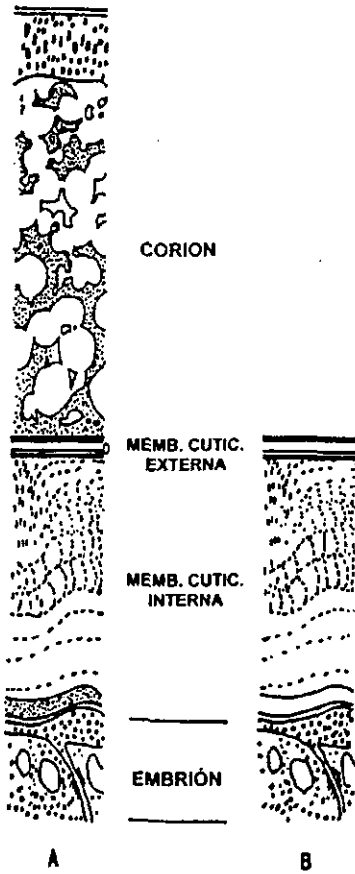


FIGURA 1
A) ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS DEL QUISTE DE ARTEMIA

Córon. (capa cuticular y capa alveolar). Una estructura externa rígida, formada por quitina y hematina, al quiste le proporciona resistencia contra abrasiones mecánicas y radiaciones ultravioleta. Esta capa se encuentra altamente alveolada y actúa como flotador. La hematina le da su característico color café.

Membrana cuticular externa. Protege al embrión contra la penetración de moléculas de tamaños mayores que la de CO_2 .

Membrana cuticular interna. (cutícula embrionaria). Una capa transparente y elástica. A ésta la separa del embrión una membrana cuticular interna, misma que durante la incubación se convierte en la membrana que envuelve al nauplio previo a la eclosión.

Embrión. Dentro del quiste, el desarrollo de éste permanece en la fase de gástrula, en un estado de vida latente, hasta la hidratación.



FIGURA 2
QUISTE DE ARTEMIA

Una práctica recomendada es la descapsulación de los quistes, para eliminar impurezas y residuos de la cáscara o quistes no eclosionados, que pudieran llegar a afectar al organismo consumidor bloqueando su tracto digestivo, ya que estos residuos son indigeribles (34). Otra razón ampliamente aceptada es el hecho de que los quistes descapsulados, prácticamente quedan estériles, debido a la utilización del

hipoclorito de sodio, que actúa además como desinfectante (33,34). Se piensa también que esta práctica mejora el proceso de eclosión (34).

El primer estadio larvario (Instar I) presenta dos cualidades importantes, la primera es su máximo valor energético y la segunda es que durante este estadio, instar I no se alimenta, debido a que su tracto digestivo aún no es funcional y sólo se nutre de sus propias reservas del vitelo y al tener un tracto digestivo limpio presenta una menor carga bacteriana, al ser ofrecido como alimento.

El segundo estadio larvario (Instar II) se presenta 12hrs o más (dependiendo la cepa de procedencia de la *Artemia* spp.), después de la eclosión. En este estadio se presenta la apertura del orificio anal y del bucal, iniciando su alimentación con pequeñas partículas como algas unicelulares, bacterias,

etcétera, que va en rango de tamaño de 1 a 40µm, manifestando hábitos de alimentación como filtradores no selectivos (33).

1.5 BIOENCAPSULACIÓN

La idea de la utilización de artemias como vehiculos de nutrientes, pigmentos, hormonas, medicamentos e inmunoestimulantes ha sido sugerida en distintas ocasiones. La *Artemia* spp. fue utilizada, como vehículo de medicamentos, para tratar larvas de peces y camarones(27,30). Recientemente en un estudio realizado por Gomez-Gil et al., se utilizó la *Artemia franciscana* para bioencapsular bacterias potencialmente probióticas, con la intención de alimentar camarones, con el objeto de incrementarles sus defensas al hacer competir dos especies distintas de *Vibrio* spp.(¹¹)

1.6 CARACTERÍSTICAS DE CAMARONES PENEIDOS (*Litopenaeus vannamei*)

La clasificación taxonómica es: Filum artrópoda, clase crustácea, familia peneidae y género *Litopenaeus*.

Los estadios de crecimiento son: Nauplio (N-1 a N-5), Zoea (Z-1 a Z-3), Mysis (M-1 a M-2), Postlarva (PL-1 a PL-30), después de éstos se presenta un estadio juvenil y posteriormente maduro, donde sólo presenta cambios en tamaño.

(¹¹) Gómez-Gil B., Herrera M. Comunicación personal 1997.

Cabe destacar la importancia de hábitos alimenticios durante estos estadios. En el estadio de Nauplio se alimenta de sus propias reservas de vitelio, en Zoea se alimenta de micro algas de 3 a 10µm. En el estadio de Mysis empieza a consumir alimento "vivo" además de microalgas, manteniendo estos hábitos en los estadios subsecuentes.

Los estadios de Mysis y Postlarva se consideran de suma importancia en procesos de infecciones causadas por *Vibrio* spp., donde un alimento vivo como lo es la *Artemia* spp. puede ser usado como medio de transporte para estas bacterias.

1.7 OBJETIVO

Desarrollar una técnica de infección experimental para inducir vibriosis sistémica en postlarvas (PL's) de camarones *Litopenaeus vannamei*, mediante la ingestión de *Vibrio parahaemolyticus* (CEPA HL58), bioencapsulado en *Artemia franciscana*.

1.8 HIPÓTESIS

El diseño experimental está encaminado a evaluar las siguientes hipótesis:

Primera:

Ha. La *Artemia franciscana* es un medio biótico de transporte de *Vibrio parahaemolyticus*.

Ho. La *Artemia franciscana* no presenta características de ser un medio biótico de transporte de *Vibrio parahaemolyticus*

Segunda:

Ha. La ingesta de *Vibrio parahaemolyticus* bioencapsulado en *Artemia franciscana* induce la vibriosis sistémica en camarones peneidos (*Litopenaeus vannamei*).

Ho. La ingesta de *Vibrio parahaemolyticus* bioencapsulado en *Artemia franciscana* no induce la vibriosis sistémica en camarones peneidos (*Litopenaeus vannamei*).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 PROCEDENCIA DEL *Vibrio parahaemoliticus*.

La CEPA HL58 se obtuvo de hemolinfa de un camarón (*Litopenaeus vannamei*) enfermo, procedente de una granja ubicada en el estado de Sinaloa. Esta cepa fue previamente identificada como *Vibrio parahaemoliticus*, mediante el sistema de identificación BIOLOG GN Microlog 2.0™ (Biolog, Hayward California) y pertenece al cepario del Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. en Acuicultura y Manejo Ambiental, Unidad Mazatlán.

2.2 PROCEDENCIA DE LA *Artemia* spp.

La *Artemia franciscana* que se utilizó durante esta prueba, procede de la CEPA Great Salt Lake, (Utah, U.S.A.).

2.3 PROCEDENCIA DE LOS CAMARONES

Los camarones (*Litopenaeus vannamei*) fueron obtenidos de un laboratorio de producción de postlarvas (PL's) localizado al sur del estado de Sinaloa. El estadio de arribo de estos camarones fue PL6 y PL7. Las PL's se mantuvieron en un acuario de vidrio de 50x30x25cm, con un volumen de agua de mar de 30 l, hasta el inicio de los experimentos, cuando eran PL30. La temperatura se mantuvo en 27.0 °C. ±1.0 y la salinidad a 35ppm. El acuario recibía aireación constante mediante tres líneas de aire, conectadas a un aireador gigante. Los recambios diarios de agua se realizaron aproximadamente a un 30% del volumen total contenido en la pecera.

2.4 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS

2.4.1 DESCAPSULACIÓN DE QUISTES DE *Artemia franciscana*.

La técnica de descapsulación se realizó con apego a la metodología propuesta por Sorgeloos *et al.* (1977).

Se lavó 1.0 g de quistes de *A. franciscana* (Cepa comercial Great Salt Lake, Utah, E.U.A.), en una solución de 0.4ppm de Cloro activo 6% (Cloralex, México) diluido en 1l de agua de mar filtrada a 45 μ m y esterilizada por autoclave 122°C a 124°C, 16Lbs/pulg² por 15 minutos. Los quistes se dejaron a temperatura ambiente con abundante aireación, por un periodo de 20 min. Posteriormente se recuperaron mediante un tamiz de 150 μ m, y se enjuagaron con agua dulce corriente, hasta perder el olor del cloro. Después de lavados, los quistes se dejaron reposar por una hora en agua de mar filtrada y esterilizada. Se descartaron y retiraron los quistes no hidratados (aquellos que permanecen en la superficie).

Los quistes hidratados se colocaron en una solución descapsuladora (CUADRO 2), agitándose por un tiempo aproximado de 2 min; hasta observar cambios en la coloración de la superficie del quiste (cambia de un color café oscuro a uno naranja brillante). Se lavaron inmediatamente con agua dulce corriente por 1 min. y con agua de mar filtrada y esterilizada, hasta perder el olor a cloro. Posteriormente, los quistes son depositados en una solución desclorinadora (CUADRO 3), agitándose por 30 seg. para

después ser lavados con agua dulce corriente por 1 min. y finalmente se terminaron de lavar con agua de mar filtrada y esterilizada.

CUADRO 2

Solución descapsuladora	
Cloralex (Cloro activo 6%) (Lab. Alen del norte S.A. de C.V., México)	51.0 ml.
NaOH (40%) en agua destilada. Baker Analyzed ^{MR.}	2.4 ml.
Agua de mar (Filtrada 45 µm estéril por U.V.)	46.6 ml.
	100.0 ml.

CUADRO 2: Solución descapsuladora para quistes de *Artemia* spp. de acuerdo con *Sorgeloos et. al.* (1977).

CUADRO 3

Solución desclorinadora (Acido Acético 1 N)	
Ac. Acético q. p. Prod. Quim. Monterrey, S.A.	0.6 ml
Agua destilada	c.v.p. 100 ml

CUADRO 3: Solución desclorinadora para quistes de *Artemia* spp. de acuerdo con *Sorgeloos et. al.* (1977).

2.4.2 ECLOSIÓN DE *Artemia* sp. CON ANTIBIÓTICO, (Gómez- Gil-RS. *et al.*, 1994).

Se recuperaron los quistes descapsulados, pasándolos por un tamiz de 150µm, se colocaron en un matraz de 250ml, (Pyrex Erlenmayer) con 100ml de agua de mar previamente filtrada y esterilizada al que se adicionó antibiótico, 4mg de Sulfametoxazol-Trimetoprim (Bactrim F, Lab. Roche, México) y 3mg de Cloranfenicol Levógiro (Cloranfenil 250mg, Lab. Pisa,

México). Se dejaron eclosionar los quistes, por un periodo de 48 hrs en Baño María a 30°C con agitación constante (Baño María de Agitación Recíproca, Precision Scientific, Mod. 25, USA). A las 24 hrs de eclosionadas las instar II de *A. franciscana* fueron cosechadas.

2.4.3 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE BACTERIAS EN ARTEMIAS ECLOSIONADAS CON ANTIBIÓTICO.

Se recuperaron las instar II de *A. franciscana*, mediante un tamiz de 150µm, se enjuagaron con solución salina estéril (2.5% de NaCl); tomándose una muestra con 50 artemias, para macerarlas (Macerador de Tejidos, Wheaton, 5ml, USA) en 1.0ml de solución salina estéril 2.5% de NaCl, de donde se sembraron 4 alícuotas de 20µl por placa, tanto en Agar de Soya Trypticaseína (TSA, Lab. Difco, Michigan USA) + 2.0% de NaCl, como en Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (TCBS, Lab. Difco, Michigan USA). Estas placas fueron incubadas (Incubadora VW Scientific, VWR Co. Mod. 1565, USA) por 24 hrs a 30°C para después contar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) (17), y calcular la carga bacteriana por instar II de *A. franciscana*.

2.4.4 INCUBACIÓN DE LA CEPA DE PRUEBA.

La CEPA HL58, mantenida en criopreservación a -70°C (Ultra Congelador, Revco Scientific, Mod. 29498h13, USA), fue sembrada en 50ml de Caldo de Soya Trypticasa (TSB, Lab. Difco, Michigan USA) + 2.0% de NaCl; y se incubó aeróbicamente por 24hrs a 30°C.

2.4.5 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS DE LA CEPA HL58 QUE SE OFRECIÓ A LAS INSTAR II DE LAS ARTEMIAS.

Se centrifugó (Centrífuga Beckman, MOD. GS-15R, Beckman Instruments, Germany) el cultivo de la CEPA HL58 de 24hrs a una velocidad de 4110 gravedades por 8 min a 2.0°C, desechando el sobrenadante; se le adicionó solución salina estéril 2.5% de NaCl y se agitó mediante Vortex (Scientific Industries Inc. Mod. G-560, USA). Se repitió dos veces el proceso de centrifugado y lavado con solución salina estéril 2.5% de NaCl, limpiando así la muestra de residuos, impurezas y posibles exotoxinas en el medio de cultivo. Se diluyó la muestra hasta ajustar la densidad de células a 1.00 de absorbancia a 610nm en espectrofotómetro (Portable Datalogging Spectrophotometer, Hach, Mod. DR/2010, USA). Esta absorbancia corresponde a una densidad de 0.5 McFarland, lo que equivale a una concentración de 1.5×10^8 bacterias ml^{-1} (Isenberg, 1992)(17). Se tomó una alícuota para sembrarla, en diluciones seriadas, en medio TCBS (Difco), por replicados de 4. Los cultivos se incubaron por un periodo de 24 hrs a 30°C.

2.4.6 BIOENCAPSULACIÓN EN *A. franciscana*.

Las instar II de *A. franciscana*, se recolectaron mediante un tamiz de 150 μm , se enjuagaron con solución salina estéril 2.5% NaCl y se colocaron en un vaso de precipitado con 40ml de agua de mar filtrada y esterilizada. *Aquí se les ofreció ad libitum, por un periodo de 2 hrs, la suspensión de 15 ml de la CEPA HL58 en solución salina estéril 2.5% de NaCl, a una concentración estimada en una absorbancia de 1.00 a 610 nm en el espectrofotómetro.*

2.4.7 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA CEPA HL58 EN *A. franciscana* BIOENCAPSULADA.

Se tomó una muestra de 50 instar II de *A. franciscana* alimentada con la CEPA HL58, se enjuagó con solución salina estéril 2.5% de NaCl, para ser posteriormente macerada en 1ml de solución salina estéril 2.5% NaCl y sembrada, en diluciones seriadas de 4 gotas de 20 μ l cada una, en TCBS (Difco); obteniendo la concentración de UFC de la CEPA HL58 por *Artemia*.

2.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este experimento fue realizado en dos ocasiones, con la única diferencia entre el número de PL's por acuario.

Objetivo

Obtener un registro de mortalidades en PL's alimentadas con la CEPA HL58 bioencapsulada en las instar II de *A. franciscana*.

Metodología

Se utilizó un sistema estático de 12 acuarios de vidrio (18x20x18cm c/u), con control de temperatura externa, mediante la utilización conjunta de aire acondicionado y calefacción manteniendo la temperatura en 28.0 °C \pm 1.0. Los acuarios fueron aireados de forma individual, mediante una línea de aire (burbujeo continuo), a la misma intensidad en todos los acuarios.

Seis acuarios fueron para los testigos y seis para los experimentales, se usó agua de mar filtrada y esterilizada, con un volumen por acuario de 2.5 l con recambios de agua de 50 % cada 24 hrs. Al sistema se le realizó una distribución de tratamientos al azar.

Se realizaron dos experimentos, en ambos casos se manejó la misma forma de alimentación que fue con base en 2 dietas distintas, una con la CEPA HL58 bioencapsulada en *A. franciscana* y la otra con *A. franciscana* libre de *Vibrio* spp. Se suministraron 150 artemias por PL cada 24hrs.

Para el primer experimento se utilizaron 30 PL's, para el segundo replicado 12 PL's ambas de *P. vannamei*, en desarrollo de PL-30, en cada acuario, a ambos se les realizó un conteo de PL's a los 8 días, registrándose la mortalidad observada.

Para el segundo experimento se realizó un monitoreo diario, registrando las mortalidades observadas y finalizando a partir de la fecha en que por 3^{er} día consecutivo no existieron cambios en la mortalidad. Para ambos replicados se realizó un análisis estadístico (Análisis de Normalidad, que nos indicó que la distribución no era normal por lo que se realizó el Análisis de Mann-Whitney, los cuales fueron indicados por el programa Statistic's) a los resultados obtenidos, para saber si existe o no una tasa de mortalidad en el grupo "Experimental", significativamente diferente a la del "Testigo".

Al finalizar el experimento, se tomaron 3 PL's de cada uno de los acuarios para macerarlas en 1 ml de solución salina estéril 2.5% NaCl y sembrarlas en 3 réplicas de una gota de 20µl en medio de TCBS (Difco), para intentar

recuperar la misma cepa, en cada uno del grupo "Experimental", e identificarla mediante el Kit BIOLOG™. Se realizó un análisis de correlación (EXCEL 5.0, Microsoft) con respecto a los resultados obtenidos con el Kit BIOLOG™.

Las PL's restantes se fijaron en Davidson (25), para confirmar a través de histología, un diagnóstico de vibriosis, el cual se realiza al detectar, mediante la tinción de Brown and Brenn (25), la presencia de nódulos hemocíticos sépticos, como respuesta a una infección séptica de origen bacteriano.

3. RESULTADOS

3.1 DESCAPSULACIÓN DE LOS QUISTES DE *A. franciscana*

PRIMER EXPERIMENTO:

Las muestras sembradas en TSA presentaron crecimiento bacteriano de 1UFC ml⁻¹ por *Artemia*, los días 2,3 y 5, sólo en una de las 4 réplicas sembradas. Los restantes días no presentaron crecimiento.

SEGUNDO EXPERIMENTO:

Las muestras no presentaron crecimiento bacteriano en TSA.

En ambos replicados, el conteo de la carga bacteriana de las Instar II que se sometieron al tratamiento de descapsulado y eclosión con antibiótico, no presentaron crecimiento bacteriano en TCBS (selectivo para *Vibrio* spp.). El proceso del conteo se realizó con cada muestra durante los días que duró el experimento sin mostrar cambios.

3.2 CONCENTRACIÓN DE HL58 EN *A. franciscana*

La carga bacteriana alcanzada en las artemias después de haber sido ofrecida la CEPA HL58 (CUADRO 4), indica que no existe diferencia de las 2hrs a las 4 hrs de haber sido expuestas a la suspensión bacteriana. Como se puede observar en la figura 1, el seguimiento del acúmulo de bacterias en una exposición de 4 hrs muestra un incremento hasta las 2 hrs, seguido de una estabilización.

MUESTRAS	A	B	C	D	DESV. EST.	PROM.
1 hr	2.0×10^3	3.0×10^3	2.0×10^3	3.0×10^3	5.7×10^2	2.5×10^3
2 hrs	3.0×10^3	6.0×10^3	5.0×10^3	3.0×10^3	9.5×10^2	4.2×10^3
3 hrs	3.0×10^3	5.0×10^3	3.0×10^3	4.0×10^3	9.5×10^2	3.7×10^3
4 hrs	4.0×10^3	3.0×10^3	4.0×10^3	5.0×10^3	8.1×10^2	4.0×10^3

CUADRO 4. Seguimiento de la concentración de la CEPA HL58 alcanzada en las artemias. Las muestras se obtuvieron de siembras en diluciones seriadas de 20 μ l por 4 réplicas (A,B,C y D) y expresadas en U.F.C ml⁻¹.

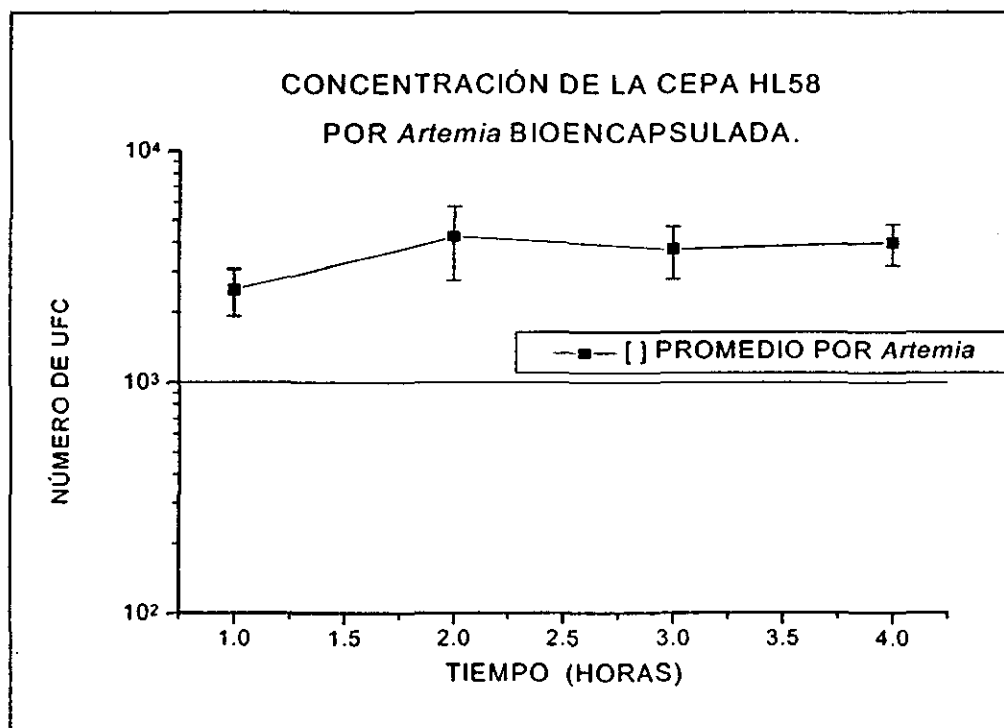


FIGURA 3. Concentración de la CEPA HL58. Las barras indican la Desviación Estándar de 4 réplicas, para cada una de las muestras tomadas.

PRIMER EXPERIMENTO:

La concentración de la CEPA HL58 ofrecida a las artemias se mantuvo en un rango de 4.25×10^8 a 6.75×10^8 UFC ml⁻¹, con un promedio de 5.59×10^8 UFC ml⁻¹ (CUADRO 5).

MUESTRAS	A	B	C	D	DESV. EST.	PROM.
DÍA 1	6.0×10^8	5.5×10^8	7.5×10^8	5.0×10^8	1.08×10^8	6.0×10^8
DÍA 2	4.0×10^8	6.5×10^8	3.5×10^8	7.0×10^8	1.76×10^8	5.25×10^8
DÍA 3	6.0×10^8	5.5×10^8	6.5×10^8	6.0×10^8	4.08×10^7	6.0×10^8
DÍA 4	3.5×10^8	4.5×10^8	6.0×10^8	5.5×10^8	1.11×10^8	4.88×10^8
DÍA 5	8.0×10^8	5.5×10^8	6.0×10^8	4.5×10^8	1.47×10^8	6.0×10^8
DÍA 6	7.5×10^8	7.0×10^8	6.0×10^8	6.5×10^8	6.45×10^7	6.75×10^8
DÍA 7	5.5×10^8	3.5×10^8	4.5×10^8	3.5×10^8	9.57×10^7	4.25×10^8

CUADRO 5. Concentración de la CEPA HL58 expresada en UFC ml⁻¹ ofrecida en suspensión a las artemias.

La concentración de la CEPA HL58 alcanzada a las 2 hrs por *A. franciscana* se mantuvo entre 5.12×10^3 y 6.5×10^3 UFC ml⁻¹, con un promedio de 5.81×10^3 UFC ml⁻¹, durante los 7 días que se ofreció a las PL's (CUADRO 6). La carga total de HL58 alcanzada se estima sobre 150 artemias por PL.

MUESTRAS	A	B	C	D	DESV. EST.	PROM.
DÍA 1	6.0×10^3	6.0×10^3	7.0×10^3	6.5×10^3	4.78×10^2	6.37×10^3
DÍA 2	6.0×10^3	5.5×10^3	7.0×10^3	7.5×10^3	9.12×10^2	6.50×10^3
DÍA 3	4.5×10^3	5.5×10^3	5.0×10^3	5.5×10^3	4.78×10^2	5.12×10^3
DÍA 4	5.0×10^3	6.0×10^3	5.5×10^3	6.0×10^3	4.78×10^2	5.62×10^3
DÍA 5	6.0×10^3	5.5×10^3	7.0×10^3	6.0×10^3	6.29×10^2	6.12×10^3
DÍA 6	4.5×10^3	5.5×10^3	5.5×10^3	6.0×10^3	6.29×10^2	5.37×10^3
DÍA 7	6.5×10^3	6.5×10^3	5.5×10^3	7.0×10^3	6.29×10^2	6.37×10^3

CUADRO 6. Concentración de UFC ml⁻¹ de la CEPA HL58 por *Artemia* spp. bioencapsulada, y ofrecida a las PL's. Conteos realizados por replicados de 4.

La concentración que se presenta de la suspensión de la CEPA HL58 ofrecida a las artemias y la consumida alcanzada a las 2 hrs, se muestra en concentraciones de UFC Artemia⁻¹, (FIGURA 4).

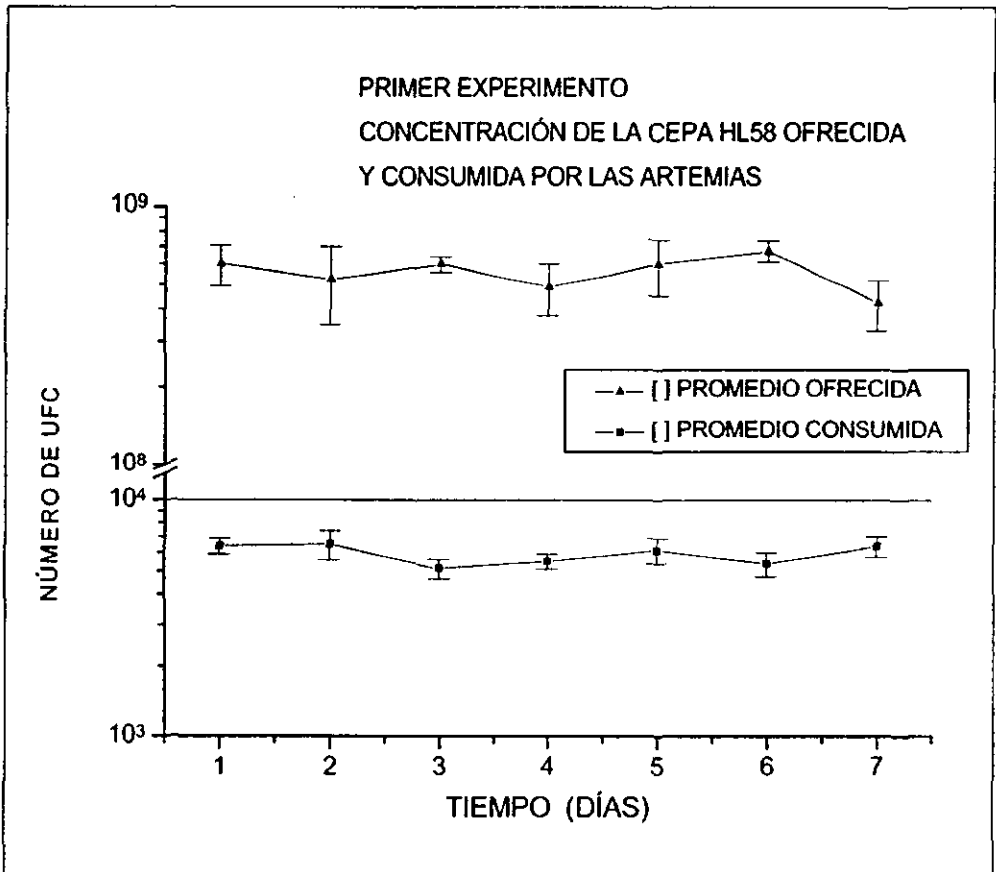


FIGURA 4. Relación entre la concentración de UFC de la CEPA HL58, ofrecidas y consumidas por las artemias. Las barras indican la Desviación Estándar de 4 replicas para cada una de las muestras tomadas.

SEGUNDO EXPERIMENTO:

La concentración de la CEPA HL58 ofrecida a las artemias se mantuvo en un rango de 4.6×10^8 a 6.5×10^8 UFC ml⁻¹, con un promedio de 5.41×10^8 UFC ml⁻¹. (CUADRO 7).

MUESTRAS	A	B	C	D	DESV. EST.	PROM.
DÍA 1	6.0×10^8	6.0×10^8	3.5×10^8	3.0×10^8	1.6×10^7	4.6×10^8
DÍA 2	3.5×10^8	8.0×10^8	7.5×10^8	7.0×10^8	1.6×10^7	6.5×10^8
DÍA 3	3.5×10^8	7.0×10^8	8.0×10^8	5.0×10^8	1.6×10^7	5.8×10^8
DÍA 4	8.5×10^8	5.0×10^8	5.0×10^8	6.0×10^8	1.6×10^7	6.1×10^8
DÍA 5	5.0×10^8	6.0×10^8	7.0×10^8	3.0×10^8	1.7×10^7	5.2×10^8
DÍA 6	3.5×10^8	5.0×10^8	5.5×10^8	4.5×10^8	8.5×10^7	4.6×10^8
DÍA 7	5.0×10^8	5.5×10^8	5.5×10^8	4.5×10^8	4.7×10^7	5.1×10^8

CUADRO 7. Concentración de la CEPA HL58 expresada en UFC ml⁻¹ ofrecida en suspensión a las artemias.

La concentración de la CEPA HL58 alcanzada a las 2 hrs por *A. franciscana* se mantuvo entre 5.1×10^3 y 8.0×10^3 UFC ml⁻¹ durante los 7 días que se ofreció a las PL's (CUADRO 8). La carga total de HL58 alcanzada se estima sobre 150 artemias por PL.

MUESTRAS	A	B	C	D	DESV. EST.	PROM.
DÍA 1	6.0×10^3	8.0×10^3	6.5×10^3	7.5×10^3	9.1×10^2	7.0×10^3
DÍA 2	8.5×10^3	7.5×10^3	8.0×10^3	8.0×10^3	4.0×10^2	8.0×10^3
DÍA 3	5.5×10^3	5.0×10^3	6.5×10^3	5.5×10^3	6.2×10^2	5.6×10^3
DÍA 4	4.5×10^3	5.5×10^3	5.0×10^3	5.5×10^3	4.7×10^2	5.1×10^3
DÍA 5	5.5×10^3	5.5×10^3	6.0×10^3	6.5×10^3	4.7×10^2	5.8×10^3
DÍA 6	5.0×10^3	5.5×10^3	6.0×10^3	6.0×10^3	4.7×10^2	5.6×10^3
DÍA 7	6.0×10^3	6.0×10^3	5.5×10^3	6.5×10^3	4.0×10^2	6.0×10^3

CUADRO 8. Concentración de UFC ml⁻¹ de la CEPA HL58 por *Artemia* spp. bioencapsulada, y ofrecida a las PL's. Conteos realizados por replicados de 4.

La concentración que se presenta de la suspensión de la CEPA HL58 ofrecida a las artemias y la consumida alcanzada a las 2 hrs se muestra en concentraciones de UFC Artemia⁻¹ (FIGURA 5).

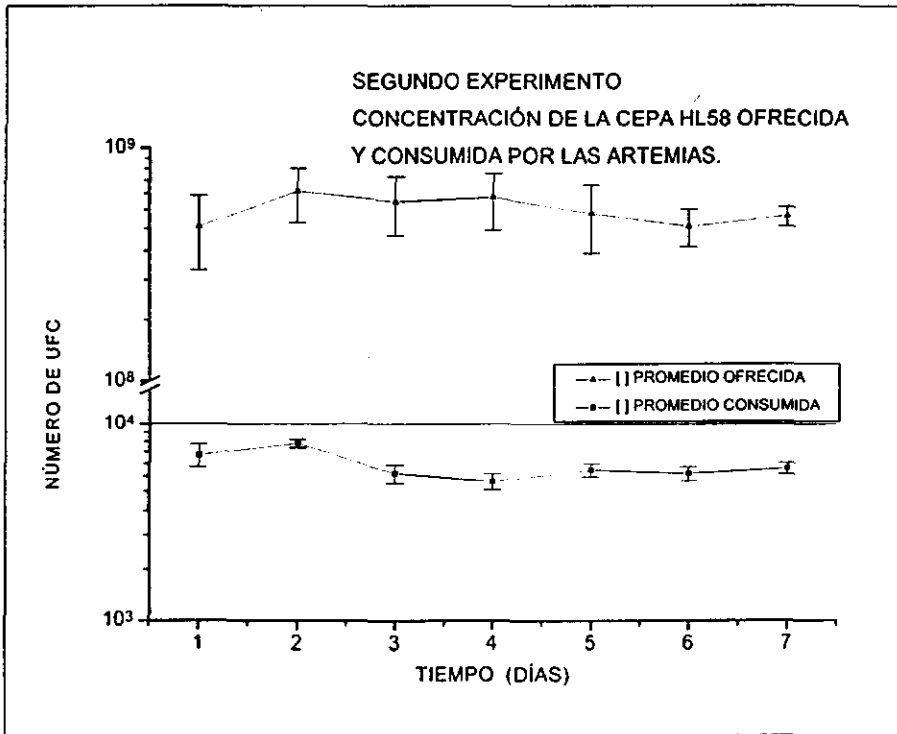


FIGURA 5. Relación entre las concentraciones de UFC, de la CEPA HL58, ofrecida y consumidas por las artemias. Las barras indican la Desviación Estándar de 4 réplicas, para cada una de las muestras tomadas.

3.3 CALIDAD DE AGUA

En ambos experimentos, los parámetros de calidad de agua, se mantuvieron dentro de los aceptables para el crecimiento de PL's de P.

Vannamei. Salinidad 35 ppm, pH 8.39 ± 0.03 , Temperatura 28.19 ± 0.23 °C, Amonio < 0.5 ppm.

3.4 NIVELES DE MORTALIDAD DE POSTLARVAS EN LOS EXPERIMENTOS

PRIMER EXPERIMENTO:

Los registros de mortalidades de postlarvas observados al final del experimento fueron, para el caso de los controles una Media y Desv. Est. de $1.65\% \pm 1.8\%$, en el caso de los experimentales una Media y Desv. Est. de $9.4 \pm 3.29\%$ al final de 7 días.

	CEPA HL58 BIOENCAPSULADA	CONTROL
Estanque 1	10	3.3
Estanque 2	6.6	3.3
Estanque 3	6.6	0
Estanque 4	6.6	3.3
Estanque 5	13.3	0
Estanque 6	13.3	0
Media \pm Desv. Est.	9.4 ± 3.29	1.65 ± 1.8

CUADRO 9. Porcentaje de mortalidad acumulada al término del primer experimento, de un total de 30 PL's por estanque.

SEGUNDO EXPERIMENTO:

Los registros de mortalidad se observaron diariamente por 8 días. Para el caso de los controles la tasa de mortalidad fue del 0%, pero en los estanques donde se alimentó con *A. Franciscana* bioencapsulada con la CEPA HL58, la mortalidad se presentó a partir del tercer día del tratamiento incrementando hasta el sexto, donde se estabilizó, alcanzado una tasa de mortalidad del $15.27 \pm 6.27\%$, observándose dos estanques con mortalidades del 8.3%, tres estanques con mortalidades del 16.66% y un estanque con mortalidad del 25%.

	CEPA HL58 BIOENCAPSULADA	CONTROL
Estanque 1	16.66	0
Estanque 2	8.33	0
Estanque 3	16.66	0
Estanque 4	8.33	0
Estanque 5	16.66	0
Estanque 6	25	0
Media \pm Desv. Est.	15.27 \pm 6.27	0 \pm 0

CUADRO 10. Porcentaje de mortalidad de postlarvas acumulada al término del segundo experimento, de un total de 12 PL's por estanque.

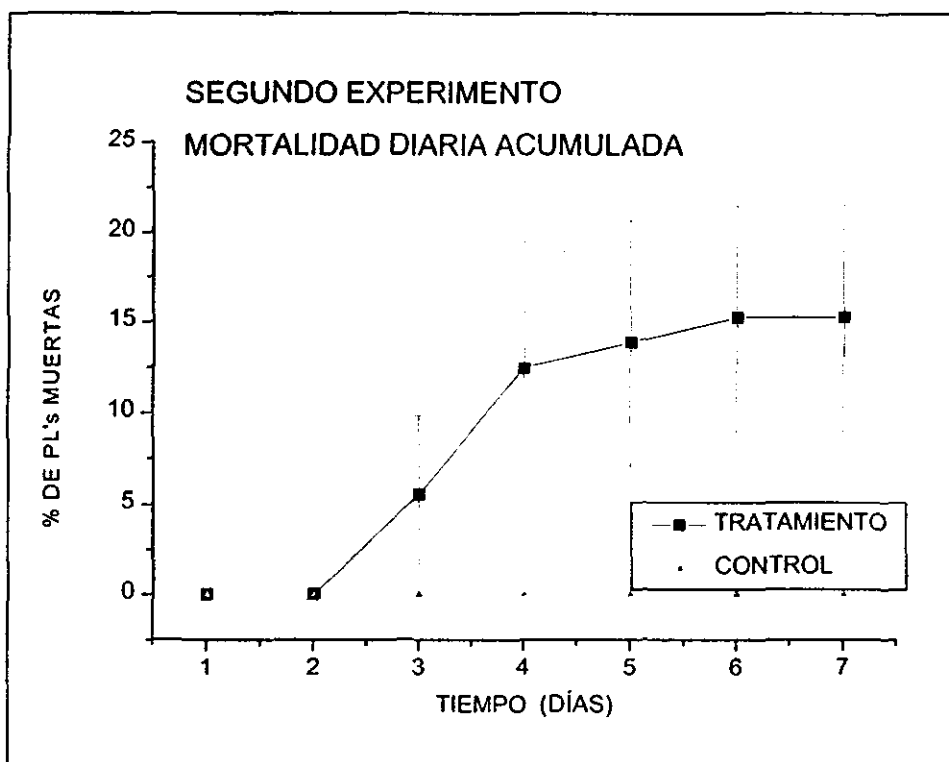


FIGURA 6. El inicio de mortalidades se presentó a partir del tercer día, incrementándose hasta el sexto día, a partir del cual se estabiliza. Las barras indican la Desviación Estándar de 6 replicados.

ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR EN EL REPORTE FINAL

Para establecer si los niveles de mortalidades logrados con los 2 tratamientos fueron significativamente diferentes uno del otro, se hizo una prueba de normalidad que no pasó para ambos experimentos. A partir de esto se tomó la decisión de usar una prueba no paramétrica, Mann and Whitney U-test. Para ambos experimentos la prueba de Mann and Whitney indicó que había una diferencia significativa entre los niveles de mortalidades del tratamiento "bioencapsulación con HL58" y del control ($U=57.0; p<0.005; n=6$ para los 2 experimentos).

Para el caso de las PL's alimentadas con artemia enriquecida con HL58, las cajas de TCBS para la recuperación de la CEPA HL58 mostraron crecimiento de colonias verdes (sucrosa -), pero para el caso de los controles, aunque las cajas de TCBS presentaron crecimiento de colonias, éstas fueron amarillas (sucrosa +), lo que las excluye con cualquier relación a la CEPA HL58.

Los resultados de identificación obtenidos para estas colonias verdes (sucrosa -), mediante el sistema de identificación BIOLOG™ (ANEXO 1), indican índices de similitud mayores a 0.700 con respecto *V. parahaemolyticus* al que pertenece la CEPA HL58. Al realizar un coeficiente de correlación entre las muestras de colonias obtenidas con *V. parahaemolyticus*, todas presentaron un coeficiente mayor a 0.93, como se muestra a continuación:

Lista de Coeficiente de Correlación, entre una colonia verde (sucrosa -) aislada de camarón de cada uno de los replicados del tratamiento "bioencapsulado con HL58" del experimento 2 y la cepa de referencia HL58 del cepario del CIAD. El penúltimo valor presentado se refiere a una colonia amarilla (sucrosa +) aislada

de un camarón del control. Todas las colonias aisladas del grupo control fueron amarillas. El último valor presentado se refiere a una colonia aislada de las instar II bioencapsuladas con HL58. Las muestras de instar II no bioencapsuladas con HL58 (control) no presentaron crecimiento bacteriano.

Replicado 1	0.94682007
Replicado 2	0.93526421
Replicado 3	0.94156958
Replicado 4	0.94590567
Replicado 5	0.94039616
Replicado 6	0.93895864
Control	0.75862015
Artemia	0.94109622

Las colonias amarillas cuyo índice de correlación fue medido con relación a la cepa HL 58 de referencia, fueron identificadas como *Vibrio agallinarum*.

3.5 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

En los cortes histológicos de las poslarvas, pertenecientes al grupo experimental, se observa invasión de colonias bacterianas en las células epiteliales del hepatopáncreas. Asimismo se observa una ligera infiltración de hemocitos, asociados a las bacterias y también se aprecian focos de necrosis en el epitelio del hepatopáncreas.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El proceso de eclosionar quistes de *Artemia* spp. sin cuidar medidas higiénicas, presenta serios problemas. El agua de mar presenta contaminación de materia orgánica, presencia de organismos coliformes y de *Vibrio* spp. Esto es un medio adecuado que facilita la multiplicación de los vibrios y si a esto se le agrega que el córion de los quistes presenta una estructura alveolar expuesta (FIGURAS 1y2); superficie que fácilmente puede ser colonizada por bacterias, del inicio al final del proceso de eclosión de las artemias, propiciando un notable aumento en la concentración de bacterias por mililitro.

Se ha encontrado que los nauplios pueden ser transporte de bacterias heterótrofas, e incluso se ha detectado la presencia de éstas en quistes enlatados al vacío(33). El sistema de alimentación no selectivo que presentan las artemias las convierte en un medio de transporte, para aquellas sustancias o productos biológicos que puedan ser ingeridos por las mismas.

El proceso de eclosión de las artemias es variable en tiempo dependiendo de la cepa con la que se trabaje (33), en general se toma un promedio de 18 hrs para obtener 90% de eclosión de quistes (instar I). Mantener el medio, en que se encuentran las artemias, en un estado libre de bacterias favorece de forma notoria, la disminución de bacterias en el mismo, si a esto se le agrega el poder limpiar la capa externa de los quistes, mediante un lavado que a la vez presente características desinfectantes, los resultados que se obtienen son artemias con concentraciones muy bajas de bacterias. Con el tratamiento de descapsulación y

eclosión con antibiótico se logra obtener artemias libres de bacterias, como se puede observar en los resultados de este estudio. Para evitar la contaminación del medio donde se eclosionan las artemias, se debe mantener un área de trabajo estéril, ya que éste es un medio propicio para el crecimiento y desarrollo de bacterias. La gran cantidad de artemias eclosionadas a las que se ofreció la suspensión de la CEPA HL58, aproximadamente 10,000 instar II en 40 ml de agua de mar filtrada y esterilizada más la suspensión de 15ml de la CEPA HL58, presentó demanda de oxígeno, que fue proporcionada mediante una agitación constante y un flujo de aire por burbujeo, durante el tiempo que duró el proceso de bioencapsulación.

La relación entre la concentración ofrecida de bacterias de la CEPA HL58, con la consumida a las 2 hrs, no se presenta de forma directamente proporcional, por lo que se supone se ofreció la CEPA HL58 en una mayor proporción de la que pudo ser consumida por la *A. franciscana*.

Dentro de los principales estudios que se han realizado con base en la patogenicidad de las bacterias del género *Vibrio* spp., se menciona frecuentemente el uso de inyecciones como una vía con la que se puede demostrar el grado de virulencia y/o patogenicidad de ésta, de lo que se manejan $DL_{50} \text{ g}^{-1}$ de camarón en rangos que oscilan desde 4.0×10^2 a $3.3 \times 10^4 \text{ UFC ml}^{-1}$, este método presenta la gran ventaja de que se puede manejar un inoculación directa (al individuo) con un volumen y una concentración de UFC ml^{-1} conocida, pero si se maneja un volumen de 0.02 ml en camarones de 3 g, esto equivaldría

inyectar 400.0 ml a un individuo de 60.0 kg lo que está induciendo estrés en el mismo.

Con respecto a los baños con concentrados niveles de UFC ml⁻¹, éstos por sí solos, no logran inducir una respuesta medible, lográndola cuando se maneja una vía de continuidad, entendiéndose herida en el exoesqueleto, para permitir un acceso a la carga bacteriana, donde la herida juega un segundo papel al predisponer al camarón a un estado de estrés (31).

Aún cuando estos procedimientos muestran niveles de patogenicidad bacteriana, no denota un proceso infeccioso apegado a una vía o evolución natural. Una inyección permite un acceso directo, exagerado, altamente traumatizante y por ende desencadenante de un estado de estrés en el camarón, disponiéndolo a un estado patológico, los baños por sí solos no desencadenan respuesta alguna, (11). Para el caso de heridas, aún cuando éstas tratan de imitar las lesiones que se producen en el dorso por movimientos de nado, agresividad por territorio y búsqueda de alimento, en sistemas de producción intensiva principalmente, es mínimo el número de individuos afectados, recuperándose de las heridas después del proceso de muda.

Los organismos susceptibles inoculados presentaron: disminución en el consumo alimenticio, aletargamiento, disminución de la respuesta de huida, tasa de mortalidad y presencia de nódulos hemocíticos en los cortes histológicos. Estas señales, aunque comunes en diferentes enfermedades de camarón pueden ser indicativos de vibriosis (23).

El número de células bacterianas administradas a los camarones, tenía una concentración de 10^3 UFC ml⁻¹ que es similar al número de bacterias a que los camarones están generalmente expuestos en larviculturas comerciales*.

Flegel *et al.* (1992) sugirieron que los camarones son continuamente invadidos por bacterias a una velocidad y cantidad constantes. Si esto es cierto, altas concentraciones bacterianas en el agua, fácilmente usarían todos los hemocitos de camarón y aunque sólo una pequeña fracción de estos vibrios fuera patógena, *el efecto de éstos podría ser extremadamente relevante. Debido a esta teoría, se decidió que la técnica de infección experimental sería diaria, en un intento de invadir los camarones a una tasa constante.*

El mismo experimento se repitió para verificar la repetibilidad de los resultados y en ambos casos el análisis estadístico indica una diferencia significativa entre los niveles de mortalidades de ambos tratamientos, esta técnica podría entonces ser usada para probar el efecto de nuevos productos en el tratamiento o prevención de vibriosis. La vibriosis está frecuentemente relacionada con la calidad de agua y por eso este método podría también ser usado, para estudiar cuáles son las condiciones del agua más favorables en la prevención de esta enfermedad.

Mediante la utilización de esta técnica de infección experimental, se logró *introducir elevadas concentraciones de bacterias en las PL's, sin llegar a cuantificar el número de bacterias que logran establecerse en el organismo así como aquellas que se eliminan del mismo.*

* Gómez Gil, CIAD-Mazatlán, comunicación personal.

Aún cuando los cortes histológicos presentan *nódulos sépticos*, no se puede concluir que estos sean originados por la cepa HL58, ya que pudieron ser originados por otra bacteria o quizá se encontraban presentes antes del inóculo. Sin embargo, con base en los estudios experimentales realizados, se toma como indicativo de que las lesiones estén asociadas a la vibriosis.

CONCLUSIÓN

De este estudio se puede concluir:

La *Artemia franciscana* es un medio biótico para la bioencapsulación del *Vibrio parahaemolyticus*.

Como medio de transporte, el *Vibrio parahaemolyticus* bioencapsulado en *Artemia franciscana* induce niveles elevados de *Vibrio* en las PL's.

La técnica de infección experimental para camarones peneidos (*Litopenaeus vannamei*), mediante la ingesta de *Vibrio parahaemolyticus*, bioencapsulado en *Artemia franciscana*, logra ser efectiva en el grado de que se evite su contaminación.

ANEXO ANALISIS DE CORRELACIÓN PARA BILOG™

HL58	ARTEMIA EXP. 01	EXP. 04	EXP. 05	EXP. 07	EXP. 10	EXP. 12	AMARILLA		
A1	0	1	0	0	1	1	0		
A2	1602	1603	1317	1246	1197	1286	1103	1326	117
A3	1628	1685	1383	1407	1482	1474	1320	1298	1121
A4	1325	1492	1281	1308	1318	1262	1133	1139	1221
A5	705	788	319	515	483	478	481	673	457
A6	804	901	676	544	649	674	483	522	168
A7	60	38	24	85	89	33	37	3	98
A8	1768	1765	1215	1564	1557	1523	1564	1285	1350
A9	55	135	54	204	122	190	52	16	85
A10	183	1999	1651	1824	1499	1389	1713	1402	560
A11	92	88	63	180	11	68	48	84	48
A12	738	1041	191	227	173	124	228	215	156
B1	33	41	49	4	52	44	18	126	9
B2	1690	1608	1776	1583	1519	1503	1535	1278	1505
B3	237	285	131	165	487	64	31	34	123
B4	1316	1261	1154	1173	1363	1182	1082	1043	1018
B5	175	47	150	195	202	170	92	6	108
B6	1806	1775	1732	1505	1473	1384	1576	1260	1303
B7	90	4	120	223	345	189	84	10	1280
B8	266	19	199	226	167	170	200	132	1
B9	343	216	202	248	71	319	97	51	16
B10	1622	1789	1573	1497	1438	1459	1427	1299	1325
B11	1680	1712	1438	1388	1197	1386	1384	1263	1472
B12	1779	1954	1608	1645	1298	1290	1417	1189	1230
C1	41	20	71	67	38	54	28	1	27
C2	1965	1620	1562	1479	1482	1485	1482	1058	915
C3	1475	1120	1228	1230	983	1135	1172	893	1084
C4	85	47	125	28	99	51	189	102	75
C5	60	55	116	26	78	118	35	73	50
C6	161	124	252	248	220	228	62	77	341
C7	235	350	377	170	458	651	172	127	1492
C8	1910	1966	1858	1679	1709	1763	1797	1425	1583
C9	971	1123	1278	875	803	1043	977	786	827
C10	52	59	219	68	31	96	13	76	33
C11	136	248	189	6	103	75	22	50	84
C12	1565	1612	1626	1336	1386	1468	1384	951	680
D1	140	96	35	33	25	118	35	3	464
D2	171	0	106	89	47	106	33	59	120
D3	305	34	378	51	225	158	159	7	49
D4	488	91	219	29	157	134	46	71	503
D5	20	2	98	21	10	88	34	103	5
D6	205	23	91	43	133	101	51	70	33
D7	1928	1652	1692	1682	1659	1519	1653	1306	1568
D8	49	60	77	58	45	145	49	76	34
D9	1830	1691	1775	1566	1597	1553	1533	1344	27
D10	213	68	247	129	171	20	22	66	221
D11	14	163	1	18	8	201	95	44	94
D12	99	42	94	46	38	18	56	67	38
E1	29	90	220	14	14	122	4	78	33
E2	43	165	71	53	27	117	85	112	3
E3	128	30	109	85	130	164	60	66	154
E4	1340	1195	1435	1213	1220	1036	1097	1123	153
E5	64	171	97	66	58	128	90	141	67

CONTINUACIÓN DEL ANEXO

E6	1675	1521	1690	1402	1618	1327	1352	1472	1448
E7	309	74	145	21	5	16	13	68	159
E8	152	151	208	94	44	27	40	23	637
E9	65	79	86	4	37	80	48	178	46
E10	157	75	22	41	95	47	32	132	0
E11	29	136	15	44	20	99	56	9	58
E12	1446	1299	1434	1322	1385	1336	1378	992	1335
F1	1148	1190	1382	1162	1277	1248	1231	1097	698
F2	978	1485	1324	1094	911	1251	983	682	822
F3	1134	1353	1149	1030	1034	1039	843	923	270
F4	275	173	407	282	341	220	190	143	425
F5	1052	952	1163	1003	1047	818	798	910	822
F6	1518	1402	1732	1481	1528	1494	1570	1511	1617
F7	1674	1438	1481	1352	1569	1495	1524	1452	1597
F8	1333	1324	1585	1427	1278	1355	1292	1339	1593
F9	1414	1558	1230	1416	1383	1215	1148	1107	1281
F10	1670	1556	1631	1539	1484	1531	1486	1310	1775
F11	1125	932	1352	1282	1321	1240	1043	1043	1206
F12	996	1079	1246	1423	1215	1183	993	1054	1429
G1	530	628	566	797	857	715	944	743	179
G2	1442	1040	1176	684	701	804	882	915	547
G3	349	216	295	410	321	9	106	210	191
G4	232	165	288	181	288	306	113	179	865
G5	114	76	75	211	123	85	69	63	34
G6	1578	1355	1267	1233	1228	1225	979	1240	908
G7	34	30	125	26	137	68	33	180	91
G8	134	30	150	89	112	96	42	212	988
G9	1651	1432	1444	1447	1467	1366	1558	1436	1782
G10	1502	1388	1469	1307	1456	1218	1299	1232	1436
G11	140	99	98	91	217	80	22	60	123
G12	148	102	64	172	141	70	22	69	118
H1	202	170	277	233	168	131	137	182	73
H2	1621	1532	1691	1543	1123	1516	1233	1567	1497
H3	1645	1658	1654	1512	1474	1326	1120	1461	475
H4	1247	1306	1344	1448	1439	1341	1246	1352	907
H5	68	75	84	41	36	79	32	69	13
H6	1168	1136	987	962	998	844	971	885	56
H7	12	15	119	51	46	42	14	18	50
H8	44	73	85	78	74	35	43	46	63
H9	1625	1755	1682	1720	1580	1583	1504	1471	1230
H10	830	681	786	661	786	757	725	706	846
H11	1430	1363	1472	1334	1134	1196	1200	1319	1379
H12	1479	1368	1463	1579	1477	1462	1431	1355	1363

0.94109622 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y ARTEMIA

0.94682007 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP. 01

0.93526421 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP.04

0.94156958 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP. 05

0.94590567 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP. 07

0.94039616 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP. 10

0.93895864 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y EXP. 12

0.75862015 COEF. DE CORRELACIÓN ENTRE HL58 Y VIBRIO AMARILLO DE LOS CONTROLES

LITERATURA CITADA

- 1.- Anderson L.G., Shamsudin M.N., Shariff M, Nash G. Bacterial septicaemia in Juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fisheries Science*, 2: 93-108. (1988).
- 2.- Anónimo. Boletín Técnico de FIRA Banco de México. (1996).
- 3.- Baticados M.C.L. Diseases of *Penaeus monodon*. In: *Biology and culture of Penaeus monodon*, pp. 139-178. (1988).
- 4.- Baticados M.C.L., Lavilla-Pitogo, C.R., Cruz-Lacierda, E.R., de la Pena, L.D. and Sunaz, N.A. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harvei* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases. Aquatic. Organization.*, 9, 133, (1990).
- 5.- Baticados M.C.L., Coloso R.M., Duremdez R.C. Studies on the chronic soft-shell syndrome in the tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, from brackishwater ponds. *Aquaculture*, 56: 271-285. (1986).
- 6.- Berthélemy-Okazaki N.J. and Hedgecock, D. Effect of the environmental factors on cyst formation in the brine shrimp *Artemia*. *Artemia Research and Applications*. Vol. 3 Universal Press, Wetteren, Belgica. pp. 165-182. (1987).
- 7.- Brock J.A., Lightner D.V. Microbial pathogens and diseases of marine crustaceans. In: *Diseases of Marine Animals*, vol. 3 (ed. by O. Kinne), pp. 245-349 Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg (1990).
- 8.- Buck J.D. Potentially pathogenic marine *Vibrio* species in seawater and marine animals in the, Florida area. *Journal of Coastal Research*, 6: 943-948. (1990).
- 9.- Cross G.M., Needham D.J. Disease control and therapeutics. In: *Fish Diseases. Proceedings 106* (ed by D.I. Bryden). (1988).

- 10.- Egusa, S., Takahashi, Y., Itami, T., and Momoyama, K., Histopathology of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, *Fish Pathology.*, 23: 59 (1988).
- 11.- Esteve M., Quijada R. Evaluation of 3 experimental techniques with *Vibrio anguillarum* in *Penaeus brasiliensis*. In: *Discovery to Commercialization*. World Aquaculture'93. EAS special publication, 19. (1993).
- 12.- Flegel T.W., Fregan D.F., Kongsom B. Occurrence, diagnosis and treatment of shell disease in Thailand. *Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the U.S.A.* Ed. W. Fulks, KL Main. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii. pp. 57-112 (1992).
- 13.- Frerich G.N., Roberts R.J. Bacteriology of Teleosts. *Fish Pathology*. 2nd ed pp. 289-319. (1989).
- 14.- Gavine F., Philips M.J. The integration of aquaculture system to produce environmental impacts of coastal shrimp ponds. Biological and physical constraints. Submitted to *Aquaculture*. (1994).
- 15.- Gómez-Gil B., Abreu-Gorbois F.A., Romero J., Herrera M. Chemical Disinfection of *Artemia nauplii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 25 4:(1994).
- 16.- Hanson J.A., Goodwin H.L. Shrimp and Prawn Farming in the Western Hemisphere. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. USA. pp. 439 (1977).
- 17.- Isenberg H.D. Clinical microbiology procedures handbook Vol. 1 Ed American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1992).
- 18.- Jiravanichpaisal P., Miyasaki T., Limsuwan C. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 27-35. (1994).
- 19.- Kaneko T., Colwell R.R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *Journal of Bacteriology*, 113: 24-32. (1973).

- 20.- Lightner D.V., A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. (1996).
- 21.- Lightner D.V. Colvin L.B., Brand C., Danald D.A. Black death, a disease syndrome related to a dietary deficiency of ascorbic acid In: *Proceedings of the World Mariculture Society*, 8. 611 pp. (1977).
- 22.- Lightner D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp, in *Handbook of mariculture*, Vol. 1, *Crustacean Acuaculture*, McVey, J.P., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, USA. 298 (1993).
- 23.- Lightner D.V. Vibrio disease. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. *Aquaculture and Fisheries Science*, 17: 42-47. (1988).
- 24.- Lightner D.V., Bell T.A., Redman R.M., Mohoney L.L. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimp of the Americas and Indopacific. *Diseases in Acuaculture I*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. pp. 58-58. (1992).
- 25.- Lightner D.V., Lewis D.H. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Marine Fisheries Review*, 37: 25-28. (1975).
- 26.- Mohoney L.L., Lightner D.V., and Bell, T.A. An epizootic due to *Vibrio spp.* In pond-reared *Penaeus Vannamei* in Ecudaor, In Abstr. *World Acuaculture Meet.*, San Juan Puerto Rico, June 16 to 20, pp. 45 (1991)
- 27.- Mohoney L.L., Lightner D.V., Williams R.R., Bauerlein M. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of brine shrimp *Artemia* and in the nematode *Panagrellus redivivus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21: 186 -191. (1990).
- 28.- Molitoris E., Joseph S.W., Krichevsky M.I, Sindhuhardja, W., Colwell R.R. Characteristics and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 1388-1394 (1985).

- 29.- Nash G. *Penaeus monodon* growout diseases In: Technical and Economical Aspects of Shrimp Farming Proceedings of AQUATECH Conference, (ed. by M.B. New, H. de Saram, T. Singh), pp. 172-190. Infofish, Kuala Lumpur, Malaysia (1990).
- 30.- Nelis H.J., Leger P., Sorgeloos P., Leenheer A.P. Liquid chromatography determination of efficacy of incorporation of trimethoprim and sulphamethoxazole in the brine shrimp (*Artemia spp.*) used for prophylactic chemotherapy of fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 2486-2489. (1991).
- 31.- Roque A. Turnbull J.F. Escalante-Gomez-Gil B. Alday-sanz M.V. Development of a bath challenge technique for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquaculture*. 1998.
- 32.- Peña L.D. de La., Momoyama K., Nakai T., Muroga K. Detection of the causative bacterium of vibriosis in Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology*, **27**: 223-228. (1993).
- 33.- Sorgeloos P. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Faculty of Agriculture. State University of Ghent, Belgium. pp. 91-100. (1986).
- 34.- Sorgeloos P., Bossuyt E., Laviña E., Baeza-Meza M. and Persoone G. Descapsulation of *Artemia* Cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, **12**:311-315. (1977).
- 35.- Sorgeloos P. and Leger P. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *Journal of the World Aquaculture Society*, **23**(4):251-264. (1992).
- 36.- Tansutapanit D.S.O.A. and Ruangpan, L. *Vibrio harveyi* a causing agent of white shrimp nauplii, *Penaeus marginatus*, *Third National Seminar On Marine Science, NSRC, Bangkok, Thailand* (1987).
- 37.- Vera P., Navas J.I., Quintero M.C. Experimental study of the virulence of 3 species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) Juveniles. *Aquaculture*, **107**. 119-123. (1992).