



Phenotyping of vibrios isolated from marine shrimp hemolymph

Fenotipado de cepas de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de camarones marinos

Renata Albuquerque-Costa^{1*}, Rayza Lima-Araújo¹, Regine Helena Silva dos Fernandes-Vieira^{1,2}

¹ Fisheries Engineering Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

² Sea Sciences Institute, Federal University of Ceará, 60165-081, Fortaleza, Brazil.

* Corresponding author. E-mail: renata.albuq@gmail.com

ABSTRACT. The phenotypic characterization of 100 *Vibrio* strains isolated from the hemolymph of cultured Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, was performed. This process allowed the identification of 10 species: *V. navarrensis* ($n = 53$), *V. brasiliensis* ($n = 15$), *V. parahaemolyticus* ($n = 10$), *V. xuii* ($n = 8$), *V. cholerae* ($n = 5$), *V. coralliilyticus* ($n = 4$), *V. neptunis* ($n = 2$), *V. alginolyticus* ($n = 1$), *V. diazotrophicus* ($n = 1$), and *V. vulnificus* B3 ($n = 1$). These results suggest that penaeid hemolymph may be colonized by vibrios with no imposition or necessity of pathological compromising.

Key words: *Vibrio*, phenotypic characterization, hemolymph.

RESUMEN. Se realizó la caracterización fenotípica de 100 cepas de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados. Este proceso permitió la identificación de 10 especies: *V. navarrensis* ($n = 53$), *V. brasiliensis* ($n = 15$), *V. parahaemolyticus* ($n = 10$), *V. xuii* ($n = 8$), *V. cholerae* ($n = 5$), *V. coralliilyticus* ($n = 4$), *V. neptunis* ($n = 2$), *V. alginolyticus* ($n = 1$), *V. diazotrophicus* ($n = 1$) y *V. vulnificus* B3 ($n = 1$). Los resultados sugieren que la hemolinfa de los peneidos puede ser colonizada por vibrios sin comprometer la salud animal.

Palabras clave: *Vibrio*, caracterización fenotípica, hemolinfa.

INTRODUCTION

Healthy aquatic organisms, including shrimp, are naturally colonized by bacteria. However, there is no consensus on the presence of microorganisms in the fluid of the circulatory system—hemolymph—of these animals. For Fagutao *et al.* (2009), the hemolymph of healthy invertebrates may be colonized by bacterial species. Studies in fluids of the oyster *Crassostrea gigas* and the mussels *Modiolus modiolus* (Olafsen *et al.* 1993) and *Anodonta cygnea* (Antunes *et al.* 2010) have suggested that bacteria belonging to the genus *Vibrio* are part of the autochthonous microbiota of the hemolymph of aquatic organisms.

According to Gomez-Gil *et al.* (1998), although there are reports of *Vibrio* isolation from penaeid hemolymph without pathological impairment, its clinical significance is not yet fully elucidated. On the other hand, the threat these microorganisms pose to shrimp farming is well acknowledged (Mohney *et al.* 1994, Alapide-Tendencia and Dureza 1997, Costa *et al.* 1998, Rengpipat *et al.* 2003, Walling *et al.* 2010).

Considering the importance of researching the indigenous microbiota of shellfish for human consumption, this study aimed to perform phenotyping of vibrios from the hemolymph of cultured *Litopenaeus vannamei* shrimp.

INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos saludables, incluyendo los camarones, son colonizados naturalmente por bacterias; sin embargo, no existe consenso sobre la presencia de microorganismos en el líquido del aparato circulatorio—la hemolinfa—de estos animales. Según Fagutao *et al.* (2009), la hemolinfa de invertebrados saludables puede ser colonizada por especies bacterianas. Estudios de la hemolinfa del ostión *Crassostrea gigas* y los mejillones *Modiolus modiolus* (Olafsen *et al.* 1993) y *Anodonta cygnea* (Antunes *et al.* 2010) han sugerido que las bacterias del género *Vibrio* forman parte de la microbiota autóctona de la hemolinfa de organismos acuáticos.

Según Gómez-Gil *et al.* (1998), aunque existen reportes del aislamiento de cepas de *Vibrio* de la hemolinfa de camarones sin deterioro patológico, aún falta conocer bien su significación clínica. Por otro lado, la amenaza que representan estos microorganismos para el cultivo de camarón es bien conocido (Mohney *et al.* 1994, Alapide-Tendencia y Dureza 1997, Costa *et al.* 1998, Rengpipat *et al.* 2003, Walling *et al.* 2010).

Dada la importancia de estudiar la microbiota autóctona de moluscos y crustáceos para el consumo humano, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización fenotípica de cepas de *Vibrio* de la hemolinfa de camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados.

MATERIALS AND METHODS

Fifty healthy adult shrimp (*L. vannamei*) were collected from a tank at the Center for Coastal Aquaculture Studies (Federal University of Ceará [UFC], Brazil). They were transported alive in a 50 L container to the Laboratory of Environmental and Fish Microbiology (UFC). The time span from collection to the beginning of the bacteriological analysis procedures did not exceed 2 h. All specimens were disinfected with alcohol at 70° GL and subjected to thermal shock by ice-water immersion in a 0.6:1 ratio. Morphometric parameters of the penaeid shrimp were determined using a semi-analytical scale (BG Quimis 2000) and a digital caliper (Digimess). The hemolymph was collected from the ventral region, using a sterile hypodermic syringe of 1 mL containing 0.2 mL of sodium citrate at 10%. Ten hemolymph samples were obtained, each (1 mL) consisting of the liquid removed from five shrimp. The serial decimal dilutions from 10^{-1} to 10^{-4} were obtained by diluting the samples in 1% saline in a 1:9 ratio.

The most probable number (MPN) of *Vibrio* was determined by the multiple tube technique (Elliot *et al.* 2001). For the presumptive and confirmatory tests, alkaline peptone water (pH 8.5) containing 1% NaCl and thiosulfate citrate bile sucrose agar were used, respectively.

Ten colonies of *Vibrio* were randomly selected from each hemolymph sample and isolated in tryptone soy agar medium containing 1% NaCl. The inbred strains were submitted to Gram staining and motility testing for morphological identification. The phenotypic identification was performed based on arginine hydrolysis, ornithine and lysine decarboxylation, oxidase production, indole production, Voges-Proskauer, citrate, gelatinase, carbohydrate fermentation (sucrose, arabinose, mannitol, D-glucosamine and melibiose), growth at 40 °C and 4 °C, o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside evidence (ONPG), ability to grow at a NaCl concentration (0%, 3%, 8%, and 10%), urease production and susceptibility to O/129 (Noguerola and Blanch 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

The MPN mL⁻¹ of *Vibrio* ranged from 30 to 460 (table 1). Considering the morphometric variables analyzed, the variation in bacterial count seems to be related to the weight ($r = 0.7157$) and average size ($r = 0.6609$) of the shrimp. The relation between the weight of the shrimp and its fluid bacterial count was investigated by Soto-Rodríguez *et al.* (2010). However, unlike the present study, the aforementioned authors determined the density of vibrios only in hemolymph samples of diseased shrimp (*L. vannamei*) and found higher rates of *Vibrio* (8.81×10^3 colony forming units [CFU] mL⁻¹) in penaeid with lesser weight (0.26 to 4.0 g, $n = 1753$) (Soto-Rodríguez *et al.* 2010).

Gomez-Gil *et al.* (1998), in a study on the *Vibrio* microbiota associated with the hemolymph of healthy juvenile

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 50 camarones (*L. vannamei*) adultos saludables de un tanque del Centro de Estudios de Acuicultura Costera (Universidad Federal de Ceará [UFC], Brasil), y se transportaron vivos en contenedores de 50 L al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Peces (UFC). El tiempo transcurrido desde la recolección hasta el inicio de los procedimientos para el análisis bacteriológico no excedió las 2 h. Todos los especímenes fueron desinfectados con alcohol (70° GL) y sometidos a choque térmico por inmersión en agua helada a una razón de 0.6:1. Se determinaron los parámetros morfométricos de los camarones peneidos con una balanza semianalítica (BG Quimis 2000) y un vernier digital (Digimess). La hemolinfa fue recolectada de la región ventral con una jeringa esterilizada de 1 mL que contenía 0.2 mL de citrato de sodio al 10%. Se obtuvieron 10 muestras de hemolinfa, cada una (1 mL) compuesta del líquido tomado de cinco camarones. Las diluciones decimales seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} se obtuvieron mediante la dilución de las muestras en solución salina al 1% a una razón de 1:9.

Se determinó el número más probable (NMP) de *Vibrio* mediante la técnica de tubos múltiples (Elliot *et al.* 2001). Para las pruebas presuntivas y confirmatorias se utilizaron agua de peptona alcalina (pH 8.5) con NaCl al 1% y agar tiosulfato citrato bilis sacarosa, respectivamente.

Se seleccionaron aleatoriamente 10 colonias de *Vibrio* de cada muestra de hemolinfa y se aislaron en medio de agar triptona soya con NaCl al 1%. Las cepas endogámicas fueron sometidas a la tinción de Gram y una prueba de movilidad para su identificación morfológica. La identificación fenotípica se realizó con base en la hidrólisis de la arginina, descarboxilación de la ornitina y lisina, producción de oxidasa, producción de indol, Voges-Proskauer, citrato, gelatinasa, fermentación de carbohidratos (sacarosa, arabinosa, manitol, D-glucosamina y melibiosa), crecimiento a 40 °C y 4 °C, evidencia de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), capacidad de crecer en una concentración de NaCl (0%, 3%, 8% y 10%), producción de ureasa y susceptibilidad a O/129 (Noguerola y Blanch 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El NMP mL⁻¹ de *Vibrio* varió de 30 a 460 (tabla 1). Considerando las variables morfométricas analizadas, la variación del conteo de bacterias parece estar relacionada con el peso ($r = 0.7157$) y tamaño promedio ($r = 0.6609$) de los camarones. Soto-Rodríguez *et al.* (2010) analizaron la relación entre el peso de camarones y el número de bacterias en su hemolinfa; sin embargo, a diferencia del presente estudio, estos autores sólo examinaron la densidad de *Vibrio* en muestras de camarones (*L. vannamei*) muertos y encontraron mayores tasas de *Vibrio* (8.81×10^3 unidades formadoras de colonias [UFC] mL⁻¹) en ejemplares de menor peso (0.26 a 4.0 g, $n = 1753$) (Soto-Rodríguez *et al.* 2010).

L. vannamei, observed vibrios in only 14.3% of the hemolymph samples studied, with a CFU mL⁻¹ index ranging from 2×10^2 to 3×10^3 . These data cannot be compared with the present study, since the method of choice to quantify the 10 samples of hemolymph was the MPN index. According to Swanson *et al.* (2001), the MPN index does not provide a direct count of bacteria, but determines the population of viable microorganisms in the sample and is therefore suitable for samples with an expected concentration of less than 10 CFU g⁻¹.

Concerning the presence of vibrios in the penaeid hemolymph, Gopal *et al.* (2005) stated that the fluids of healthy shrimp may be considered sterile. On the other hand, the same authors quantified *Vibrio* in sampling units of diseased shrimp hemolymph and obtained a variation of 1.52×10^3 to 4.36×10^4 CFU mL⁻¹. Similar data were found by Costa *et al.* (1998), who identified bacteria of the family Vibrionaceae only in hemolymph samples of pathologically compromised shrimp.

One hundred *Vibrio* strains were isolated from the ten hemolymph samples analyzed. The phenotypic identification of ten species is summarized in table 1.

The species *V. navarrensis* was detected in every hemolymph sample (table 1) and corresponds to 53% of the overall isolates. This species was first described in 1991, isolated in the Navarra region, Spain, from water samples contaminated by sewage (Urdaci *et al.* 1991). The following characteristics were used to differentiate *V. navarrensis* from the other previously described *Vibrio* species: negative strains for arginine dihydrolase, ornithine and lysine decarboxylase; inability to produce acetoin in the Voges-Proskauer test; failure to use putrescine, gluconate, glucuronate, and histidine; ability to produce acid from sucrose use; and growth at 40 °C. In addition, the group of lineages used to describe the species can be

Gomez-Gil *et al.* (1998), en un estudio de la microbiota de *Vibrio* asociada con la hemolinfa de juveniles saludables de *L. vannamei*, observaron vibrios en sólo 14.3% de las muestras de hemolinfa examinadas y el índice de UFC mL⁻¹ varió de 2×10^2 a 3×10^3 . Estos datos no pueden compararse con los del presente trabajo ya que el método seleccionado para cuantificar las 10 muestras de hemolinfa fue el índice del NMP. Según Swanson *et al.* (2001), el índice del NMP no proporciona un conteo directo de bacterias, sino determina la población de microorganismos viables en la muestra y, por lo tanto, es adecuado para muestras con una concentración esperada de menos de 10 UFC g⁻¹.

Con respecto a la presencia de *Vibrio* en la hemolinfa de camarones peneidos, Gopal *et al.* (2005) documentaron que la hemolinfa de individuos saludables puede considerarse estéril. Por otro lado, estos mismos autores realizaron una cuantificación de *Vibrio* en muestras de la hemolinfa de camarones muertos y obtuvieron una variación de 1.52×10^3 a 4.36×10^4 UFC mL⁻¹. Costa *et al.* (1998) obtuvieron datos similares al identificar bacterias de la familia Vibrionaceae sólo en muestras de la hemolinfa de camarones no saludables.

Se aislaron 100 cepas de *Vibrio* de 10 muestras de hemolinfa analizadas. La identificación fenotípica de 10 especies se resume en la tabla 1.

La especie *V. navarrensis* fue detectada en todas las muestras de hemolinfa (tabla 1) y representa el 53% del total de aislados. Urdaci *et al.* (1991) fueron los primeros en describir esta especie, aislada de muestras de agua contaminada de la región de Navarra en España. Utilizaron las siguientes características para diferenciar *V. navarrensis* de las otras especies de *Vibrio* descritas previamente: cepas negativas para arginina dihidrolasa, ornitina y lisina descarboxilasas; incapacidad para producir acetoina en la prueba de Voges-Proskauer; falta de uso de la putrescina, gluconato,

Table 1. Morphometric variables (size, weight), most probable number (MPN mL⁻¹), and *Vibrio* species isolated from hemolymph samples of 50 Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Tabla 1. Variables morfológicas (talla, peso), número más probable (MPN mL⁻¹) y especies de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de 50 camarones blancos del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

Sample	Average size	Average weight	MNP mL ⁻¹	Species (n*)
1	9.3	7.8	30	<i>V. navarrensis</i> (8), <i>V. alginolyticus</i> (1), <i>V. corallilyticus</i> (1)
2	10.4	11.7	150	<i>V. navarrensis</i> (8), <i>V. parahaemolyticus</i> (1), <i>V. corallilyticus</i> (1)
3	9.1	8.1	86	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. parahaemolyticus</i> (4), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. corallilyticus</i> (1)
4	9.7	8.3	186	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. parahaemolyticus</i> (2), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. diazotrophicus</i> (1)
5	8.7	7.7	86	<i>V. navarrensis</i> (5), <i>V. parahaemolyticus</i> (3), <i>V. xuii</i> (1), <i>V. vulnificus</i> B3 (1)
6	9.2	8.4	86	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. xuii</i> (3), <i>V. corallilyticus</i> (1)
7	8.7	8.6	186	<i>V. navarrensis</i> (6), <i>V. xuii</i> (2), <i>V. cholerae</i> (1), <i>V. brasiliensis</i> (1)
8	10.7	11.4	460	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. brasiliensis</i> (4), <i>V. cholerae</i> (1), <i>V. neptunis</i> (1)
9	9.3	7.8	40	<i>V. navarrensis</i> (4), <i>V. brasiliensis</i> (4), <i>V. cholerae</i> (1), <i>V. neptunis</i> (1)
10	9.5	8.2	86	<i>V. brasiliensis</i> (6), <i>V. cholerae</i> (2), <i>V. navarrensis</i> (2)

* n: isolate number.

differentiated from other vibrios by its fatty acid content (presence of C17 fatty acid) and the DNA G+C ratio (45 to 47 mol%) (Urdaci *et al.* 1991).

Jores *et al.* (2007) first reported the occurrence of *V. navarrensis* in seawater samples (Germany). According to these authors, the strains used in their research shared similar characteristics with *V. vulnificus*, namely the ability to use lactose as sole carbon source and occurrence in ambient water temperature above 20 °C. However, the strains portrayed both phenotype and genotype differentiation enough to classify them as *V. navarrensis* biotype *pommerensis*. Among those differences, the most prominent is the ability to produce hemolysis on sheep blood, recognized as a virulence marker of interest to public health (Takeda 2011) and to the cultivation of aquatic organisms (Austin *et al.* 2005).

In regard to the other isolates found in the present study, the species *V. brasiliensis*, *V. xuii*, and *V. neptunius* were first isolated from culture environments of marine and aquatic organisms and described in 2003. Initially they were phylogenetically related to *V. tubiashii*; however, these vibrios can be differentiated based on phenotypic characteristics, such as fatty acid composition, enzyme activities, and use of different carbon sources (Thompson *et al.* 2003).

The presence of *V. parahaemolyticus* in the shrimp hemolymph observed in this study is consistent with the results obtained by Rojlsakul *et al.* (1998). The detection of five strains of *V. cholerae* may be related to their occurrence in aquatic environments, including the ones used for cultivation purposes. For Worden *et al.* (2006), this species is endemic in aquatic environments; however, its proliferation and dynamics in marine environments have not been well elucidated.

The other species identified in this study have been progressively isolated from marine environments and may eventually become associated with aquaculture (Alday-Sanz *et al.* 2002, Cavallo *et al.* 2002, Kesarcodi-Watson *et al.* 2009).

The detection of *Vibrio* in every analyzed hemolymph sample supports the statement, still scarcely discussed in the scientific literature, that the fluid from cultivated penaeid shrimp can be colonized by bacteria, with no imposition or necessity of pathological compromising.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author received a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Thanks are due to Jorge L Adeodato Júnior for the English translation.

REFERENCES

- Alapide-Tendencia EV, Dureza LA. 1997. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* Fabricius with red disease syndrome. *Aquaculture* 154: 107–114.
- Alday-Sanz V, Roque A, Turnbull JF. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.* 48: 91–99.

glucuronato e histidina; capacidad para producir ácido a partir de la sacarosa; y crecimiento a 40 °C. Además, el grupo de linajes utilizado para describir la especie puede ser diferenciado de otros *Vibrio* por el contenido de ácidos grasos (presencia del ácido graso C17) y la razón G+C del ADN (45 a 47 mol%) (Urdaci *et al.* 1991).

Jores *et al.* (2007) fueron los primeros en registrar la presencia de *V. navarrensis* en muestras de agua de mar (Alemania). Según estos autores, las cepas utilizadas en su trabajo comparten características similares con *V. vulnificus*, es decir, la capacidad de usar la lactosa como única fuente de carbono y de existir en agua a temperatura ambiente superior a 20 °C. Por otro lado, las cepas presentaron suficiente diferenciación fenotípica y genotípica para clasificarlas como *V. navarrensis* biotipo *pommerensis*. Entre estas diferencias, la más prominente es la capacidad para producir hemólisis en sangre de carnero, reconocida como un marcador de virulencia de interés para la salud pública (Takeda 2011) y el cultivo de organismos acuáticos (Austin *et al.* 2005).

En cuanto a los otros vibrios observados en el presente estudio, las especies *V. brasiliensis*, *V. xuii* y *V. neptunius* fueron aisladas por primera vez de sistemas de cultivo de organismos marinos y acuáticos y descritas en 2003. Inicialmente se relacionaron filogenéticamente con *V. tubiashii*; sin embargo, estos *Vibrio* pueden ser diferenciados por medio de sus características fenotípicas, como su composición de ácidos grasos, actividad enzimática y el uso de diferentes fuentes de carbono (Thompson *et al.* 2003).

La presencia de *V. parahaemolyticus* en la hemolinfa de camarones en el presente estudio coincide con los resultados obtenidos por Rojlsakul *et al.* (1998). La detección de cinco cepas de *V. cholerae* puede estar relacionada con su presencia en ambientes acuáticos, incluyendo los usados para propósitos de cultivo. Según Worden *et al.* (2006), esta especie prevalece en ambientes acuáticos; sin embargo, aún no se conoce bien su proliferación y dinámica en ambientes marinos.

Las demás especies identificadas en nuestro trabajo han sido progresivamente aisladas de ambientes marinos y eventualmente podrían asociarse con la acuicultura (Alday-Sanz *et al.* 2002, Cavallo *et al.* 2002, Kesarcodi-Watson *et al.* 2009).

La detección de *Vibrio* en todas las muestras de hemolinfa analizadas apoya la afirmación, aún escasamente discutida en la literatura científica, que la hemolinfa de camarones peneidos cultivados puede ser colonizada por bacterias sin comprometer la salud de los animales.

AGRADECIMIENTOS

La primera autora recibió una beca de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Los autores agradecen a Jorge L Adeodato Júnior la traducción al inglés.

Traducido al español por Christine Harris.

- Antunes F, Hinzmann M, Lopes-Lima M, Machado J, Martins da Costa P. 2010. Association between environmental microbiota and indigenous bacteria found in hemolymph, extrapallial fluid and mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus 1758). *Microb. Ecol.* 60: 304–309.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9649-y>
- Austin B, Austin D, Sutherland R, Thompson FL, Swings J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environ. Microbiol.* 7: 1488–1495.
- Cavallo RA, Stabili L. 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Res.* 36: 3719–3726.
- Costa R, Mermoud I, Koblavi S, Morlet B, Haffner P, Berthe F, Legroumellec M, Grimont P. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164: 297–309.
- Elliot EL, Kaysner CA, Jackson L, Tamplin ML. 2001. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, CFSAN.
- Fagutao FF, Koyama T, Kaizu A, Saito-Taki T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS J.* 276: 5298–5306.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07225.x>
- Gomez-Gil B, Tron-Mayén L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V, Guerra-Flores AL. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163: 1–9.
- Gopal S, Otta SK, Kumar S, Karunasagar I, Nishibuchi M, Karunasagar I. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 151–159.
- Jores J, Appel B, Lewin A. 2007. *Vibrio navarrensis* biotype pommerensis: a new biotype of *V. navarrensis* isolated from the German Baltic Sea. *Syst Appl Microbiol* 30, 27–30.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2009. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *J. Fish Dis.* 32(6): 499–507.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x>
- Mohney LL, Lightner DV, Bell TA. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquacult. Soc.* 25: 116–125.
- Noguerola I, Blanch AR. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *J. Appl. Microbiol.* 105: 175–185.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03730.x>
- Olafsen JA, Mikkelsen HV, Gjaever HH, Høvik HG. 1993. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1848–1854.
- Rengpipat S, Tunyanun A, Fast AW, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a Bacillus probiotic. *Dis. Aquat. Organ.* 55: 169–173.
- Rojlorsakul P, Boonsaeng V, Panbangred W, Suthienkul O, Pasharawipas T, Flegel TW. 1998. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp haemolymph by DNA hybridization and PCR amplification. In: Flegel TW (ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, Roque A. 2010. Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. *J. World Aquacult. Soc.* 41: 76–83.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00335.x>
- Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes FP, Ito K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, pp. 53–62.
- Takeda Y. 2011. *Vibrio parahaemolyticus*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Proc. Jap. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87: 1–12.
- Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Rupp GS, Pereira A, De Bem MM, Sorgeloos P, Swings J. 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 245–252.
- Urdaci MC, Marchand M, Ageron E, Arcos JM, Sesma B, Grimont PAD. 1991. *Vibrio navarrensis* sp. nov., a species from sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 290–294.
- Walling E, Vourey E, Ansquer D, Beliaeff B, Goarant C. 2010. *Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments. *J. Appl. Microbiol.* 108: 2003–2011.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04601.x>
- Worden AZ, Seidel M, Smriga S, Wick A, Malfatti F, Bartlett D, Azam F. 2006. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environ. Microbiol.* 8: 21–29.

Received September 2012,
 received in revised form February 2013,
 accepted February 2013.

