

**INFECCIÓN ORAL EXPERIMENTAL DE POSLARVAS DE
Litopenaeus vannamei A TRAVÉS DE BIOENCAPSULACIÓN DE
Vibrio parahaemolyticus EN *Artemia franciscana***

**ORAL CHALLENGE OF POSTLARVAE OF *Litopenaeus vannamei*
THROUGH BIOENCAPSULATION OF *Vibrio parahaemolyticus* IN
*Artemia franciscana***

A. Roque*
A. Mazari
B. Gómez-Gil

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)
Sábalo Cerritos s/n, Estero del Yugo
Apartado postal 711
Mazatlán, CP 82010, Sinaloa, México
* E-mail: roque@victoria.ciad.mx

Recibido en enero de 1999; aceptado en julio de 1999

RESUMEN

Aunque la vibriosis haya causado pérdidas financieras muy grandes en la camaronicultura, todavía no existe un modelo para estudiar esta enfermedad; por tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar dicho modelo. Dos tratamientos fueron aplicados al camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Los camarones se alimentaron con *Vibrio parahaemolyticus* bioencapsulado en nauplios de *Artemia franciscana* y los controles se alimentaron con nauplios estériles. Después de siete días, los niveles de mortalidad fueron significativamente diferentes entre los dos tratamientos, promediando 9.4% y 15.3% para el tratamiento experimental, y 1.6% y 0% para el tratamiento control, para los ensayos 1 y 2, respectivamente.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, infección experimental, bioencapsulación, *Vibrio* sp.

ABSTRACT

Although vibriosis has caused major financial losses in shrimp farming we still lack a model for studying this disease; therefore, the objective of this study was to develop such a model. Two treatments were applied to the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*; they were fed *Vibrio parahaemolyticus* bioencapsulated in nauplii of *Artemia franciscana* and control shrimp were fed sterile nauplii. After seven days, the mortality levels were significantly different between the two treatments, averaging 9.4% and 15.3% for the experimental treatment and 1.6% and 0% for the control treatment, for trials 1 and 2, respectively.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, oral challenge, bioencapsulation, *Vibrio* sp.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de infección experimental disponibles para vibriosis no reflejan las infecciones naturales en el camarón. Ninguna de las técnicas disponibles ha podido inducir reproduciblemente las señales clínicas, patología y mortalidades asociadas con las infecciones naturales. A la fecha, la vibriosis inducida experimentalmente sólo ha sido detectada histológicamente (Esteve y Quijada, 1993). En este estudio, cuando los camarones fueron infectados experimentalmente, añadiendo simplemente bacterias al agua, no se observaron mortalidades, aunque la vibriosis se detectó histológicamente. Hiriendo los camarones y luego infectándolos experimentalmente por baño, se observaron niveles bajos de mortalidad; desafortunadamente, este trabajo no fue repetido y la técnica no se estandarizó. En otro estudio, infecciones experimentales por inmersión resultaron en algunas mortalidades, pero sus niveles no fueron significativamente diferentes de los controles (Peña *et al.*, 1992). Más recientemente, otro trabajo fue publicado en donde se lograron niveles de mortalidad altamente significativos; sin embargo, la metodología descrita es poco clara y sólo por inferencia es posible saber que se infectó experimentalmente por baño (Prayitno y Latchford, 1995).

Un modelo de infección experimental se requiere por diferentes razones, como investigar la virulencia de cepas y evaluar tratamientos o medidas de prevención. Un modelo de infección experimental también puede ayudar a determinar cuáles son los factores de estrés ambiental que comienzan los brotes de vibriosis en camarón de cultivo y a entender mejor la relación entre el estrés ambiental y las bacterias en la etiología de la enfermedad.

Nauplios de *Artemia* sp. han sido usados como vectores para el suministro de tratamientos químicos (Touraki *et al.*, 1995, 1996;

INTRODUCTION

Available challenges for vibriosis in marine shrimp do not reflect natural infections. None of the challenges have been able to reproducibly induce the clinical signs, pathology and mortality associated with natural infections. To date, experimentally induced vibriosis has only been detectable by histology (Esteve and Quijada, 1993). In this previous study, when the shrimp were challenged by simply adding bacteria to the water, no mortalities were observed, even though vibriosis could be detected histologically. Wounding the shrimp and then doing a water-borne challenge produced low mortalities but, unfortunately, this work was not repeated and the technique was not standardized. In another study, immersion challenges resulted in some mortalities but these were not significantly different from the controls (Peña *et al.*, 1992). More recently, another work was published where significant mortalities were achieved; however, the methodology is unclear and only by inference is it possible to know that a bath challenge was performed (Prayitno and Latchford, 1995).

A challenge model is required for a number of reasons, such as assessing the virulence of isolates and evaluating treatments or methods of prevention. An artificial challenge may help to determine which environmental factors affect the onset of vibriosis in cultured shrimp and lead to a better understanding of the relationship between environmental stress and bacteria in the aetiology of the disease.

Live nauplii of *Artemia* sp. have been used as vectors for delivering chemical treatments (Touraki *et al.*, 1995, 1996; Roque *et al.*, 1998), fatty acids (Sorgeloos *et al.*, 1987), vitamins (Merchie *et al.*, 1995) and bacteria with various characteristics (Chair *et al.*, 1994; Grisez *et al.*, 1996; Gómez-Gil *et al.*, 1998) to larval stages of aquatic animals, a process known as bioen-

Roque *et al.*, 1998), ácidos grasos (Sorgeloos *et al.*, 1987), vitaminas (Merchie *et al.*, 1995) y bacterias con características diversas (Chair *et al.*, 1994; Grisez *et al.*, 1996; Gómez-Gil *et al.*, 1998) a estadios larvarios de animales acuáticos, un proceso conocido como bioencapsulación. La ruta de infección de vibriosis sistémica propuesta para larvas y poslarvas ha sido la oral (Jiravanichpaisal *et al.*, 1993) y se sabe que los vibrios colonizan la boca de los camarones (Alday-Sanz, 1994).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de infección experimental oral, usando la bioencapsulación de *Vibrio* spp. en nauplios de *Artemia franciscana* Kellog, 1906, para poder estudiar la vibriosis en poslarvas (PL) de *Litopenaeus vannamei*, anteriormente *Penaeus vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se crecieron camarones de *L. vannamei* en un acuario de vidrio, desde nauplios 5 a poslarvas 6–8, antes de llevar a cabo el experimento. El acuario tenía una capacidad de 30 L, y la temperatura se mantuvo a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y la salinidad a 35 ppm; se providenció aeración. Recambios de agua parciales (aproximadamente 30% del volumen) fueron hechos cada dos días para mantener la calidad del agua. Durante este periodo, los camarones se alimentaron inicialmente con microalgas (*Chaetocerus* sp.) y después con nauplios de *A. franciscana*.

Sistema experimental

Se usó un sistema estático constituido por seis tanques de vidrio divididos en dos unidades experimentales, con 5 L de capacidad cada

capsulación. The oral route has been suggested to be responsible for systemic vibriosis in larval and postlarval stages (Jiravanichpaisal *et al.*, 1993), and *Vibrio* spp. are able to colonize the mouth parts (Alday-Sanz, 1994).

Thus, the aim of this study was to develop an oral challenge technique, using the bioencapsulation of *Vibrio* spp. in nauplii of *Artemia franciscana* Kellog, 1906, in order to study vibriosis in postlarvae (PL) of *Litopenaeus vannamei*, formally *Penaeus vannamei* (Pérez-Farfante and Kensley, 1997).

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Litopenaeus vannamei shrimp were grown in a glass aquarium, from nauplii 5 to postlarvae 6–8 days old, before carrying out the experiment. The aquarium had a capacity of 30 L, and the temperature was kept at $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and salinity at 35 ppt; aeration was provided. Partial water changes (approximately 30% of the volume) were made every two days to maintain the water quality. During this period, the shrimp were fed initially with microalgae (*Chaetocerus* sp.) and later on with *A. franciscana* nauplii.

Experimental system

The static system employed six glass tanks divided into two experimental units of 5 L capacity each. Each experimental unit was individually aerated, and the water conditions were kept at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, salinity 35 ppt and pH 8.4 ± 0.1 .

Artemia

The *Artemia* cysts were obtained from the Great Salt Lake (Prime Artemia, Utah, USA). The *Artemia* system consisted of 250-mL glass

una. Cada unidad experimental fue aireada individualmente y las condiciones del agua fueron $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 35 ppm de salinidad y pH 8.4 ± 0.1 .

Artemia

Los quistes de *Artemia* se obtuvieron del Gran Lago Salado (Prime Artemia, Utah, EUA). El sistema de *Artemia* consistía en matraces de vidrio de 250 mL con 100 mL de agua estéril, cubiertos con papel de aluminio. Los matraces se colocaron dentro de un baño (Precision Scientific, Reciprocal Shaking Bath, modelo 25), con temperatura controlada (30°C) y agitación constante.

Los quistes de *Artemia* fueron descapsulados en condiciones estériles de acuerdo con la metodología propuesta por Sorgeloos *et al.* (1977) y mejorada por Gómez-Gil *et al.* (1998), y se colocaron en un matraz de 250 mL, conteniendo 100 mL de agua estéril con una mezcla de dos antibióticos: 4 mg de sulfamethoxazol-trimethoprim (800–160 mg/1 g) y 3 mg de cloramfenicol L (250 mg/cápsula). Estos antibióticos fueron escogidos de la lista de antibióticos disponibles en el laboratorio, a los cuales la bacteria seleccionada era sensible. Los quistes de *Artemia* se dejaron en este matraz durante 48 horas a 30°C , con agitación constante para evitar la necesidad de aeración. A este punto se tomaron muestras para confirmar la ausencia de bacterias en los nauplios de *Artemia*. Las muestras de nauplios (50 organismos por muestra) fueron lavadas con agua estéril y maceradas. El macerado se sembró en triplicado en agar de soya tripticaseína (TSA por sus siglas en inglés; Difco, Michigan, EUA) y en agar de tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS, Difco, Michigan, EUA), y el día siguiente se registró el número de colonias formadas.

De 22 a 24 horas de edad los nauplios llegaron al estadio Instar II y abrieron la boca.

flasks with 100 mL of sterile seawater and covered with aluminium foil. The flasks were placed inside a water bath (Precision Scientific, Reciprocal Shaking Bath, model 25), with controlled temperature (30°C) and constant agitation.

The *Artemia* cysts were decapsulated in sterile conditions, according to the technique described by Sorgeloos *et al.* (1977) and improved by Gómez-Gil *et al.* (1998), and placed in a 250-mL flask containing 100 mL of sterile seawater with a mixture of two antibiotics: 4 mg of sulphamethoxazol-trimethoprim (800–160 mg/1 g) and 3 mg of chloramphenicol L (250 mg/capsule). These antibiotics were chosen from the list of antibiotics available in the laboratory, to which the bacterium selected was sensitive. The *Artemia* cysts were left in this flask for 48 hours at 30°C , with constant agitation to avoid the need of aeration. Samples were taken at this step to verify the absence of bacteria from the *Artemia* nauplii. The samples of nauplii (50 organisms per sample) were washed with sterile seawater and then macerated. The macerate was plated out in triplicate in trypton soy agar (TSA, Difco, Michigan, USA) and thiosulphate citrate bile sucrose (TCBS, Difco, Michigan, USA), and the following day the number of colonies formed was recorded.

From 22 to 24 hours of age the nauplii reached the Instar II stage and opened their mouth. The nauplii at 48 hours were still in this stage.

Bacterial isolate

The *Vibrio* sp. used for these trials was isolated from the haemolymph of a moribund juvenile shrimp (*L. vannamei*) from a natural outbreak of vibriosis. It was identified by using the BIOLOG system (BIOLOG, Inc., Hayward, USA) as *Vibrio parahaemolyticus* (BIOLOG scoring number 3725-2507-3123-7050-0501-

Los nauplios de 48 horas seguían en este estadio.

Cepa bacteriana

El *Vibrio* sp. utilizado en estos ensayos fue aislado de la hemolinfa de un juvenil de camarón (*L. vannamei*) moribundo, durante un brote natural de vibriosis. La bacteria fue identificada usando el sistema BIOLOG (BIOLOG, Inc., Hayward, EUA) como *Vibrio parahaemolyticus* (número de BIOLOG: 3725-2507-3123-7050-0501-4377-6114-3517). Esta cepa será referida como HL58. La HL58 se preservó en una ultracongeladora a -70°C , de acuerdo con la técnica propuesta por Gherna (1994), y se resucitaba en 10 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB, por sus siglas en inglés, Difco, Michigan, EUA) + 2% de NaCl a 30°C durante 24 horas al inicio de cada experimento. Este cultivo se centrifugó a 4000 g a 10°C durante ocho minutos. El líquido sobrenadante se desechaba y las células bacterianas se enjuagaban en una solución salina estéril (2.5% NaCl). Estas operaciones se repitieron dos veces para asegurar que las células bacterianas estaban libres de partículas extracelulares y de exotoxinas. La bacteria se resuspendió en una solución salina estéril (2.5% NaCl) y la absorbancia de la suspensión se ajustó en 1.00 a 610 nm. Cada vez que se preparó una suspensión se tomaron muestras para conteos bacterianos en agar TCBS.

Esta cepa bacteriana está disponible en la Colección de Microorganismos con Importancia en Acuicultura del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Unidad Mazatlán.

Bioencapsulación de HL58 en *Artemia franciscana*

De acuerdo con la metodología de Gómez-Gil *et al.* (1998), los nauplios de *Artemia*

4377-6114-3517). This isolate will be referred to as HL58. The HL58 was preserved in an ultrafreezer at -70°C , according to the technique proposed by Gherna (1994) and resuscitated in 10 mL of tripticasein soy broth (TSB, Difco, Michigan, USA) + 2% NaCl at 30°C for 24 hours at the beginning of each experiment. This culture was centrifuged at 4000 g at 10°C for eight minutes. The supernatant fluid was discarded and the bacterial cells were rinsed in sterile saline solution (2.5% NaCl). These operations were repeated twice to ensure that the cells were free of extracellular particles or exotoxins. The bacteria were resuspended in sterile saline water (2.5% NaCl) and the absorbance of the suspension adjusted to 1.00 at 610 nm. Bacterial counts of the suspension were carried out in TCBS agar every time a suspension was prepared.

This isolate is available in the Collection of Important Organisms in Aquaculture of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Mazatlán Campus.

Bioencapsulation of HL58 in *Artemia franciscana*

Following the methodology of Gómez-Gil *et al.* (1998), the hatched *Artemia* nauplii were collected in a 150- μm sieve, rinsed with sterile saline solution (2.5% NaCl) and then placed in a flask with 40 mL of sterile seawater. The seawater was then inoculated with 15 mL of the previously mentioned HL58 suspension. The *Artemia* nauplii were incubated with the bacteria for two hours. After this period, 50 *Artemia* nauplii were collected in 1 mL of the suspension water for total *Vibrio* spp. counts on TCBS. A two-hour period was selected after the preliminary work, where it was observed that the *Artemia* in seawater inoculated with this bacterium would start dying eight hours after the inoculation was performed and 24 hours after incubation the *Artemia* nauplii

eclosionados se recolectaron en un tamiz de 150 μm , se enjuagaron con una solución salina estéril (2.5% NaCl) y se colocaron en un matraz con 40 mL de agua de mar estéril. El agua se inoculó con 15 mL de la suspensión de HL58 previamente mencionada. Los nauplios de *Artemia* fueron incubados con bacterias durante dos horas. Después de este periodo, 50 nauplios de *Artemia* fueron recolectados en 1 mL de solución salina estéril para conteo de vibrios en TCBS. Un periodo de dos horas fue seleccionado después del trabajo preliminar, en que se observó que la *Artemia* en agua de mar inoculada con esta bacteria empezaba a morir ocho horas después de la inoculación del agua y a las 24 horas los nauplios estaban todos muertos. Se determinó también el número de bacterias filtrada por nauplio de *Artemia* y no hubo una diferencia significativa entre dos y cuatro horas de incubación; por lo tanto, se eligió un periodo de dos horas de incubación. La *Artemia* de control se manejó de la misma forma, excepto la inoculación de bacterias. Se tomaron muestras de los nauplios de *Artemia* de control.

Técnica de infección experimental

El sistema experimental se montó con 12 unidades experimentales de 2.5 L cada una. El día siguiente se colocaron 30 PL en cada unidad experimental. En seis de ellas, las PL fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* que habían sido incubados con HL58 y en las otras seis, las PL se alimentaron con nauplios de *Artemia* aparentemente estéril. Se ofreció un promedio de 150 nauplios de *Artemia* por PL, una vez cada 24 horas durante siete días consecutivos. El tipo de dieta ofrecido a cada unidad experimental se asignó al azar.

Diariamente se hicieron recambios de agua de 50% para mantener la calidad del agua. Diariamente se registró la mortalidad y el experimento se terminó al tercer día consecutivo en

were all dead. The number of bacteria filtered by the *Artemia* nauplii was also measured and there was no significant difference between two and four hours incubation; therefore, in order to save time, a two-hour period of incubation was chosen. A control of *Artemia* nauplii was handled in the same manner except for the inoculation with bacteria. Samples were also taken for the control *Artemia* nauplii.

Challenge technique

The experimental system was set up with 2.5 L of sterile seawater in each of the 12 experimental units. On the following day, 30 PL were placed in each experimental unit. In six of them the PL were fed *Artemia* nauplii that had been incubated with HL58 and in the other six, the PL were fed with apparently sterile *Artemia* nauplii. The PL were supplied with an average of 150 *Artemia* nauplii per PL, once every 24 hours for seven consecutive days. The type of diet fed to each of the experimental units was assigned randomly.

Daily 50% water changes were performed in order to maintain the water quality. A daily record of mortalities was kept and the experiment was terminated after the third consecutive day when no mortalities were observed. Daily records of temperature, salinity and pH were also kept. On the last day of the trial, three shrimp were sampled at random from each unit to attempt to reisolate the HL58 and to confirm that this bacteria was colonizing the shrimp and that the controls had not been contaminated. The surviving shrimp and bioencapsulated *Artemia* nauplii were rinsed with sterile saline solution and a pool of the internal organs of each sample was plated out on TCBS; the green colonies were purified on TSA + 2.0% NaCl and used to characterize the bacterium with the BIOLOG system. A correlation coefficient was calculated for each isolate against the

que no se observaron mortalidades. Los valores de temperatura, salinidad y pH también se registraron diariamente. El último día se tomaron tres camarones al azar de cada unidad experimental y se intentó reaislar la HL58 y confirmar si esta bacteria estaba colonizando los camarones y si los controles no habían sido contaminados. Los sobrevivientes y nauplios de *Artemia* bioencapsulados se enjuagaron con una solución salina estéril y una mezcla de órganos internos de cada muestra se sembró en TCBS y las colonias verdes se purificaron en TSA + 2% NaCl y se usaron para caracterizar la bacteria con el sistema BIOLOG. Un coeficiente de correlación fue calculado para cada bacteria purificada contra la bacteria original (HL58 de la colección del CIAD).

El ensayo se hizo dos veces para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Para el segundo ensayo, sólo se usaron 12 PL por unidad experimental.

Para establecer si los niveles de mortalidad en cada tratamiento eran significativamente diferentes unos de otros, se hizo una prueba de normalidad y se decidió usar una prueba no paramétrica: prueba *U* de Mann y Whitney.

RESULTADOS

En el primer ensayo, murió un promedio de 9.5% de los camarones alimentados con HL58, comparado con 1.6% de los camarones control (tabla 1). En el segundo ensayo, murió un promedio de 15% de los camarones tratados con HL58, mientras que ninguno de los camarones control murió (tabla 1). En ambos experimentos, la prueba *U* de Mann y Whitney demostró que había una diferencia significativa entre los dos tratamientos ($U = 57.0$, $P < 0.05$, $n = 6$ para ambos experimentos). El primer camarón que se encontró muerto en los dos experimentos fue encontrado el segundo día (48 horas), después de la primera comida con bacteria, y el último fue encontrado el quinto día.

original inoculated isolate (HL58 from CIAD's collection).

The trial was performed twice in order to confirm the reproducibility of the technique. For the second trial, only 12 PL were used per experimental unit.

In order to establish whether the levels of mortalities in the different treatments were significantly different from each other, a normality test was applied and then a decision was made to use a non-parametric test: Mann and Whitney *U*-test.

RESULTS

During the first trial, an average of 9.5% of the HL58 treated shrimp died, compared with 1.6% of the control shrimp (table 1). In the second trial, an average of 15% of the HL58 treated shrimp died, whereas none of the control shrimp died (table 1). For both trials, the Mann and Whitney *U*-test showed a significant difference between treatments ($U = 57.0$, $P < 0.05$, $n = 6$ for both experiments). The first shrimp to be found dead for both experiments was found on the second day (approximately at 48 hours), after the first feed with bacteria, and the last one was recorded on the fifth day.

The density of HL58 in the treated *Artemia* nauplii ranged from 1.02 to 1.28×10^2 CFU/nauplius for the first trial, and no *Vibrio* spp. were isolated from the disinfected *Artemia* nauplii. In the case of the second trial, the density of HL58 measured in the treated nauplii ranged from 1.02 to 1.6×10^2 CFU/nauplius; again, no *Vibrio* sp. were isolated from the disinfected *Artemia* nauplii. These values were calculated from a sample of 50 *Artemia* nauplii in 1 mL of sterile saline solution, which was plated out in triplicate of 100 μ L samples.

Seven isolates were recovered from the bioencapsulated *Artemia* and from the challenged shrimp. All had high correlation coefficients (> 0.93) with the HL58 strain from

Tabla 1. Mortalidades cumulativas porcentuales logradas en los ensayos para los camarones alimentados con nauplios de *Artemia franciscana* con y sin *Vibrio parahaemolyticus* (HL58). El número total de camarones utilizado en cada replicado fue de 30 en el ensayo 1 y de 12 en el ensayo 2. TCM/TC = total de camarones muertos/total de camarones. DE = desviación estándar. Los números entre paréntesis son los números absolutos de los camarones que murieron durante los experimentos.

Table 1. Percent cumulative mortalities reached in the trials for the shrimp fed *Artemia franciscana* nauplii with and without *Vibrio parahaemolyticus* (HL58). The total number of shrimp used in each replicate was 30 for trial 1 and 12 for trial 2. TCM/TC = total of dead shrimp/total of shrimp. Promedio \pm DE = mean \pm standard deviation. The numbers in parentheses are the absolute number of shrimp that died during the experiments.

	Camarón tratado con HL58		Camarón control	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
Replicado 1	10.0 (3)	16.66 (2)	3.3 (1)	0 (0)
Replicado 2	6.6 (2)	8.33 (1)	3.3 (1)	0 (0)
Replicado 3	6.6 (2)	16.66 (2)	0 (0)	0 (0)
Replicado 4	6.6 (2)	8.33 (1)	3.3 (1)	0 (0)
Replicado 5	13.3 (4)	16.66 (2)	0 (0)	0 (0)
Replicado 6	13.3 (4)	25.00 (3)	0 (0)	0 (0)
TCM/TC	17/180	11/72	3/180	0/72
Promedio \pm DE	9.4 \pm 3.29	15.27 \pm 6.27	1.65 \pm 1.8	0 \pm 0

La densidad de HL58 en los nauplios inoculados varió de 1.02 a 1.28×10^2 UFC/nauplio en el primer ensayo y no se encontraron vibrios en los nauplios desinfectados. En el segundo ensayo, la densidad de HL58 medida en los nauplios inoculados varió de 1.02 a 1.6×10^2 UFC/nauplio; una vez más no se registró la presencia de vibrios aislados de los nauplios desinfectados. Estos valores fueron calculados a partir de una muestra de 50 nauplios de *Artemia* en 1 mL de solución salina estéril que se sembró por triplicado de muestras de 100 μ L.

Se recuperaron siete aislados bacterianos de la *Artemia* bioencapsulada y de los camarones infectados experimentalmente. Todos tuvieron un alto coeficiente de correlación (> 0.93) con la cepa HL58 de la colección del

CIAD's collection, whereas the bacteria isolated from the control shrimp only had a correlation coefficient of 0.759 and formed yellow colonies in TCBS as opposed to green colonies for the other isolates.

DISCUSSION

Although the technique of bioencapsulation is not a natural way of infecting shrimp, it has the advantage of ensuring that the challenge dose of bacterial cells has intimate contact with the shrimp gut and that the mortality is not imminent, allowing the testing of treatments or preventive measures. The number of *V. parahaemolyticus* cells fed to each shrimp was 10^4 CFU/shrimp, which is not an unrealistic number of vibrios for shrimp larvae to be

CIAD, pero la bacteria aislada de los camarones control sólo tenía un coeficiente de correlación de 0.759 y formaba colonias amarillas en TCBS, mientras que los otros aislados formaban colonias verdes.

DISCUSIÓN

La técnica de bioencapsulación, aunque no sea una forma natural de infectar a los camarones, tiene la ventaja de asegurar que la dosis de células bacterianas administradas tiene un contacto íntimo con el tracto digestivo del camarón y que las mortalidades no son eminentes, permitiendo que se prueben tratamientos o medidas preventivas. El número de células de *V. parahaemolyticus* alimentadas a cada camarón fue de 10^4 UFC/camarón, lo que no es un número irreal de vibrios a lo que las poslarvas están expuestas en laboratorios de producción larval comercial en México (González-Gallardo, 1997; Lizárraga-Partida *et al.*, 1997).

El uso de antibióticos y la alta densidad de quistes utilizada no parece haber tenido un efecto detrimental en la eclosión de la *Artemia*. La HL58 se incorporó exitosamente en los nauplios de *Artemia* con un pico de filtración a las dos horas y este pico se mantuvo hasta las cuatro horas (Roque *et al.*, datos no publicados). Esta observación ya había sido hecha en un trabajo previo en que los nauplios de *Artemia* se usaron para bioencapsular otra cepa de *V. parahaemolyticus* (HL57, colección del CIAD), en donde un pico de incorporación fue logrado después de dos horas y se mantuvo similarmente por cuatro horas. Este experimento fue repetido y no hubo diferencias significativas entre los dos ensayos (Gómez-Gil *et al.*, 1998). Al igual que en el trabajo anterior, los nauplios de *Artemia* estaban aparentemente estériles antes de que la HL58 les fuera ofrecida. Estos resultados de bioencapsulación concuerdan con los de Gómez-Gil *et al.* (1998).

exposed to, according to the literature on Mexican hatcheries (González-Gallardo, 1997; Lizárraga-Partida *et al.*, 1997).

The use of antibiotics and the high density of cysts used had no apparent detrimental effect on the hatching of *Artemia*. The HL58 was successfully incorporated into *Artemia* nauplii with a peak of uptake at two hours and the level was maintained for at least four hours (Roque *et al.*, unpublished data). This had already been observed in a previous work where *Artemia* nauplii had been used to bioencapsulate another strain of *V. parahaemolyticus* (HL57, CIAD's collection), in which a peak of incorporation was achieved after two hours and was similarly maintained for four hours. This experiment was repeated and there were no significant differences found between the two trials (Gómez-Gil *et al.*, 1998). As for the previous work, the *Artemia* nauplii were apparently sterile before the HL58 was offered to them. These results on bioencapsulation agree with those reported by Gómez-Gil *et al.* (1998).

The specific cause of death was not verified in these experiments, but inferred by comparison with the controls. Samples of dead shrimp would have been invaded by any bacteria in the water invalidating any bacterial analyses; in addition, autolysis would have rendered them unsuitable for histology. It may have been possible to sample moribund animals for specific diagnoses, but this would have required continuous monitoring of the tanks.

Flegel *et al.* (1992) suggested that shrimp were continuously invaded by whole bacterial cells at a fixed rate. If so, the high numbers of bacterial cells encountered in the water of shrimp tanks or ponds would easily swamp the shrimp haemocytes and even if only a small fraction of the total count consisted of pathogenic *Vibrio* cells, the effect could be extremely harmful. Because of the above

La causa específica de muerte no fue verificada en estos experimentos, sino fue inferida por comparación con los controles. Los camarones muertos hubieran sido invadidos por bacterias del agua, invalidando análisis bacteriológicos. Además, el autólisis los hubiera vuelto impropios para histología. Podría haber sido posible muestrear los camarones moribundos para diagnóstico específico pero esto requiere un monitoreo continuo de los acuarios.

Flegel *et al.* (1992) sugirieron que los camarones son invadidos constantemente por bacterias a un tasa fija. Si esto es correcto, entonces los números elevados de bacterias presentes en el agua de los estanques de camarón fácilmente inundarían los hemocitos del camarón y aunque sólo una pequeña fracción de estos vibrios fuera patógena, el efecto podría ser extremadamente dañino. Debido a esta sugerencia, el modelo de infección experimental desarrollado incluye inocular los camarones diariamente, en un intento de invadirlos a una tasa constante. También se observó que los camarones sólo empezaban a morir después de dos días de ser alimentados con nauplios de *Artemia* colonizados con HL58. Experimentos anteriores en los cuales los camarones sólo eran inoculados una vez por baño para establecer infecciones, resultaron en niveles de mortalidad no significativos. En estos experimentos el autor adicionaba bacteria al agua una vez; los niveles altos de bacteria sólo se mantenían hasta 72 horas en los acuarios y luego se disminuían dramáticamente (Roque, 1995). Este estudio anterior llevó al diseño del presente estudio, en el cual la infección con *V. parahaemolyticus* fue lo más constante posible. Una infección experimental hubiera sido posible como técnica de infección experimental de camarones. En este estudio, la infección pudiera tener su origen en el agua o ser proveniente de bacterias pasadas desde la *Artemia* al agua, pero esto es improbable ya que en la gran

sugestión, the developed challenge model included challenging the shrimp daily, in an attempt to invade them at a constant rate. It was also observed that the shrimp only started to die after two days of being fed with *Artemia* nauplii colonized with HL58. Previous experiments in which shrimp were challenged only once by bath in order to establish infections resulted in no significant levels of mortalities. In those experiments, the author added bacteria to the water only once; high levels of bacteria were kept for up to 72 hours in the tanks and after that, the levels decreased dramatically (Roque, 1995). This earlier study led to the design of the present study in which the challenge with *V. parahaemolyticus* would be as constant as possible. A bath challenge might be a possible approach for an experimental infection of the shrimp. In this study, the infection could have been by bacteria that came directly from the water or leaked from the *Artemia* nauplii, but this is unlikely since many other challenges have been performed in different shrimp stages where the presence of high levels of bacteria in the water did not result in significant mortalities (Peña *et al.*, 1992; Esteve and Quijada, 1993; Roque, 1995; Gómez-Gil, 1998). Moreover, the water used in the experiments was mechanically- and UV-filtered. Therefore, as it seems very difficult that shrimp get infected through a water-borne bacteria in a challenge trial, then the mortalities observed must be caused by the bacteria bioencapsulated or firmly attached to the nauplii. Another point to take into account is the specific cause of death. Shrimp could have died from excessive numbers of bacteria in their body; however, other studies with injection challenges have demonstrated that shrimp do not die if injected with other types of bacteria, such as *Micrococcus* sp. (Leong and Fontaine, 1979) or *Escherichia coli* (Gómez-Gil, 1998; Salvador-Contreras, 1999) even in high levels.

The same trial was done twice to verify the

parte de infecciones experimentales por baño que se han desarrollado para los diferentes estadios de camarón, la presencia de niveles altos de bacterias en el agua no resultó en niveles de mortalidad significativos (Peña *et al.*, 1992; Esteve y Quijada, 1993; Roque, 1995; Gómez-Gil, 1998). Además, el agua usada en estos experimentos estaba filtrada mecánicamente y por UV; por lo tanto, parece ser difícil infectar a camarones a través del agua en una técnica de infección experimental. En este caso, las mortalidades observadas se deben probablemente a las bacterias bioencapsuladas o bacterias ligadas muy firmemente a los nauplios. Otro punto a tener en cuenta es la especificidad de la causa de muerte de los camarones. Los camarones pudieron haber muerto debido a números excesivos de bacteria presentes en su cuerpo; sin embargo, otros estudios han demostrado que los camarones no mueren cuando son inyectados con otro tipo de bacteria, como son *Micrococcus* sp. (Leong y Fontaine, 1979) o *Escherichia coli* (Gómez-Gil, 1998; Salvador-Contreras, 1999), aun en niveles altos.

El mismo experimento se realizó dos veces para verificar la reproducibilidad de los datos. En vista de que en ambos experimentos hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, esta técnica tiene potencial para ser usada para probar nuevos productos para el tratamiento o prevención de la vibriosis en las fases tardías de laboratorio o en la preengorda, porque en estas fases los camarones son alimentados con nauplios de *Artemia*. La vibriosis está frecuentemente relacionada con la calidad del agua y, por tanto, este método podrá también contribuir al estudio de cuáles son las condiciones más recomendadas para la prevención de esta enfermedad. El hecho de que las mortalidades son bajas (10–15%) en condiciones de calidad de agua recomendables, permitirá aumentar este número cuando el agua no sea adecuada para el

reproducibility of the results. Since both experiments showed significantly different levels of mortalities between the treatments, this technique has the potential to be used for testing the effect of new products for the treatment or prevention of vibriosis in the late hatchery stages and nursery phase, because these are phases when shrimp can be fed with *Artemia* nauplii. Vibriosis is often related to water quality and, thus, this method would also be of value to study the most suitable water conditions for the prevention of this disease. The fact that mortalities are low (10–15%) in recommended water quality conditions will allow this number to increase when the water quality is not suitable for the shrimp to be grown. However, further studies to improve the technique should be made using other species of shrimp and other bacterial isolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Ana Luisa Guerra-Flores, from the Universidad Autónoma de Sinaloa, for lending the BIOLOG system and to Carmen Bolan for her help in the laboratory.

English translation by the authors.

crecimiento de camarones. Sin embargo, se necesitan más estudios para mejorar esta técnica y usando otras especies de camarón y otras cepas bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

A Ana Luisa Guerra-Flores, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por prestar el equipo de BIOLOG y a Carmen Bolán por su ayuda en el laboratorio.

REFERENCIAS

- Alday-Sanz, M.V. (1994). Studies on the pathogenesis of *Vibrio* spp. infection in *Penaeus monodon* Fabricius. Ph.D. thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK, 227 pp.
- Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Nelis, H., Sorgeloos, P. and De Leenheer, A.P. (1994). An oral challenge for turbot larvae with *Vibrio anguillarum*. *Aquacult. Int.*, 2: 270–272.
- Esteve, M. and Quijada, R. (1993). Evaluation of three experimental techniques for *Vibrio anguillarum* infection in *Penaeus brasiliensis*. In: Discovery to Commercialization World Aquaculture 93. European Aquaculture Society, Spec. Publ., 19.
- Flegel, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, B., Vuthikornudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chanachookin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. (1992). Occurrence diagnosis and treatment of shell disease in Thailand. In: W. Fulks and K.L. Main (eds.), Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the USA. Oceanic Institute Honolulu, Hawaii, pp. 57–112.
- Gherna, L.R. (1994). Culture preservation. In: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg (eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 278–292.
- Gómez-Gil, B. (1998). Evaluation of potential probiotics for use in penaeid shrimp larval culture. Ph.D. thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK, 259 pp.
- Gómez-Gil, B., Herrera-Vega, M.A., Abreu-Gorbois, A. and Roque, A. (1998). Bio-encapsulation of two strains of *Vibrio* spp. in *Artemia* nauplii. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2318–2322.
- González-Gallardo, V.I. (1997). Evaluación de la carga bacteriana en un ciclo comercial de cultivo larvario de camarón blanco *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México, 73 pp.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P. and Ollevier, F. (1996). Mode of infection of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feeds. *Dis. Aquat. Organisms*, 26: 181–187.
- Jiravanichpaisal, P., Miyasaki, T., Limsuwan, C. and Somjetlerdchalern, A. (1993). Comparative histopathology of vibriosis in black tiger prawn *Penaeus monodon*. Diseases of Asian Aquaculture II, Asian Fisheries Society, Fish Health Section.
- Leong, J.K. and Fontaine, C.T. (1979). Experimental assessment of the virulence of four species of *Vibrio* bacteria in penaeid shrimp. In: Proc. Second Biannual Crustacean Workshop.
- Lizárraga-Partida, L., Montoya-Rodríguez, L. and Gendrop-Funes, V. (1997). The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. *Ciencias Marinas*, 23(1): 129–140.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, P., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. (1995). Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture*, 134: 325–337.
- Peña, L.D. de la, Momoyama, K., Nakaim, T. and Muroga, K. (1992). Detection of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 27: 223–228.
- Pérez-Farfante, I. and Kensley, B. (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. *Mem. Mus. Nat. Hist.*, 175: 1–233.
- Prayitno, S.B. and Latchford, J.W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*, 132: 105–112.
- Roque, A. (1995). The experimental induction of *Vibrio* spp. infection in *Penaeus monodon* (Fabricius). Ph.D. thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK, 226 pp.
- Roque, A., Turnbull, J.F. and Gómez-Gil, B. (1998). Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to the marine shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *J. World Aquacult. Soc.*, 28: 249–251.
- Salvador-Contreras, G. (1999). Efecto de la salinidad en la patogenicidad de bacterias del género *Vibrio* en infecciones experimentales de camarón. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México, 48 pp.
- Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza-Meza,

- M. and Persoone, G. (1977). Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, 12: 311–315.
- Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W. and Jaspers, E. (eds.) (1987). *Artemia* Research and its Applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universal Press, Wetteren, Belgium, 556 pp.
- Touraki, M., Rigas, P. and Kastritsis, C. (1995). Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals. *Aquaculture*, 136: 1–10.
- Touraki, M., Mourelatos, S., Karamanlidou, G., Kalaitzopoulou, S. and Kastritsis, C. (1996). Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry. *Aquacult. Eng.*, 15: 133–147.