

## THE USE OF BACTERIAL COUNTS IN TWO MEXICAN SHRIMP HATCHERIES

### EL USO DE CONTEOS BACTERIANOS EN DOS CRIADEROS MEXICANOS DE CAMARÓN

M.L. Lizárraga-Partida<sup>1</sup>  
L. Montoya-Rodríguez<sup>1</sup>  
V. Gendrop-Funes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)  
Apartado postal 2732  
Ensenada, CP 22860. Baja California, México

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Oceanológicas  
Universidad Autónoma de Baja California  
Apartado postal 453  
Ensenada, CP 22860. Baja California, México

*Recibido en enero de 1996; aceptado en noviembre de 1996*

#### ABSTRACT

Counts of viable heterotrophic bacteria, *Vibrio*-like bacteria and total coliforms were performed in seawater supply, food stocks and broodstock pools at two aquacultural facilities located in Mexico. The high abundance of these bacterial groups indicates risk areas that must be monitored to control potential pathogens, such as *Vibrio* spp. Filtering systems and food supplies, such as *Artemia* spp. and fresh or frozen sea food, were found to be the most important sources of potential pathogens.

*Key words:* *Vibrio*, marine bacteria, shrimp hatcheries, hatchery water quality.

#### RESUMEN

En dos laboratorios situados en la República Mexicana, se realizaron conteos de bacterias heterótrofas viables, bacterias tipo *Vibrio* y coliformes totales en muestras de agua del sistema de aprovisionamiento, en alimentos marinos y en estanques de reproductores. Las altas concentraciones de estos grupos bacterianos indican la existencia de puntos de riesgo, los cuales deben ser vigilados sistemáticamente para poder controlar patógenos potenciales, tales como *Vibrio* spp. En este trabajo, se encontró que los sistemas de filtración y el alimento utilizado, tal como *Artemia* spp. y organismos marinos frescos o congelados, son las principales fuentes de patógenos potenciales en los laboratorios de acuicultura estudiados.

*Palabras clave:* *Vibrio*, bacterias marinas, criaderos de camarón, calidad del agua del criadero.

#### INTRODUCTION

Bacterial diseases such as vibriosis or furunculosis are major problems in aquaculture (Austin and Allen-Austin, 1985; Sindermann and Lightner, 1988). Different procedures to

#### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacterianas, tales como la vibriosis o la furunculosis, causan graves problemas en la acuicultura (Austin y Allen-Austin, 1985; Sindermann y Lightner, 1988).

control bacterial populations have been implemented to reduce the risk of disease: drug treatments are applied, and different filters as well as ozone and ultraviolet (UV) irradiation systems are placed along the water pipelines (Brown and Russo, 1979; Cross and Peterson, 1987). Paradoxically, the systematic enumeration of the bacterial populations is not routinely carried out to evaluate the efficiency of the filtering systems or drug treatments. Filters can become bacterial culture media if they are not properly cleaned, ultraviolet efficiency may decrease with time and drug-resistant strains of bacterial pathogens can be produced by mutation.

According to Elston (1984), pathogenic agents can enter intensive molluscan husbandry systems from three principal routes: seawater sources, food stocks and broodstocks. Each of these potential sources must be quantitatively monitored and a criteria of normal bacterial concentrations should be defined for each hatchery. This will allow some clarification of the role of bacteria in disease outbreaks.

Heterotrophic bacteria can be counted both directly, using epifluorescent microscopy, or indirectly, by counting in culture media. Selective culture media, such as EMB for coliforms (Ávila *et al.*, 1989) or TCBS for *Vibrio*-like bacteria (Kobayashi *et al.*, 1963), can be employed to quantify selected populations among the heterotrophic community. The selection of a suitable method is a function of the organisms under culture, the equipment and personnel available. The enumeration of viable heterotrophic bacteria, total coliforms and *Vibrio* spp. involves techniques that have been standardized worldwide and that are used in some aquaculture hatcheries (Gilmour *et al.*, 1976; Austin, 1982; Sohier and Bianchi, 1986; Fitt *et al.*, 1989). Our contribution describes bacterial population counts in two Mexican shrimp hatcheries and covers three pathogen sources: seawater supply, food stocks and broodstock pools.

## **MATERIALS AND METHODS**

Water samples were collected in sterilized, screw-cap bottles and processed immediately.

Se han implementado procedimientos distintos para controlar las poblaciones bacterianas y así reducir el riesgo de enfermedad: se aplican tratamientos químicos y, a lo largo de la tubería de agua, se instalan diferentes filtros y sistemas de irradiación de ozono y ultravioleta (UV) (Brown y Russo, 1979; Cross y Peterson, 1987). Sin embargo, no se realiza una evaluación sistemática de las poblaciones bacterianas para evaluar la eficiencia de los sistemas de filtración o de los tratamientos químicos. Los filtros pueden convertirse en medios de cultivo bacterianos si no se limpian adecuadamente, la eficiencia ultravioleta puede disminuir con el tiempo y cepas de patógenos bacterianos resistentes a los químicos pueden evolucionarse por mutación.

Según Elston (1984), hay tres rutas principales por donde agentes patógenos pueden entrar a los sistemas de cría intensiva de moluscos: las fuentes de agua de mar, las fuentes de alimento y las poblaciones de reproductores. Cada una de estas fuentes potenciales se debe vigilar cuantitativamente y se debe establecer un criterio de las concentraciones normales bacterianas de cada criadero. Esto permitirá determinar el papel que juegan las bacterias en los brotes de enfermedades.

Se pueden contar las bacterias heterótrofas directamente mediante microscopía epifluorescente o indirectamente con medios de cultivo. Se pueden emplear medios de cultivo selectivos, tales como EMB para coliformes (Ávila *et al.*, 1989) o TCBS para bacterias tipo *Vibrio* (Kobayashi *et al.*, 1963), para cuantificar poblaciones selectas dentro de la comunidad heterótrofa. La selección de un método adecuado está en función de los organismos bajo cultivo, el equipo y el personal disponible. La enumeración de bacterias heterótrofas viables, coliformes totales y *Vibrio* spp. involucra técnicas que se han estandarizado a nivel mundial y que se usan en algunos criaderos de acuicultura (Gilmour *et al.*, 1976; Austin, 1982; Sohier y Bianchi, 1986; Fitt *et al.*, 1989). Este trabajo describe el conteo poblacional bacteriano de dos criaderos mexicanos de camarón y cubre tres fuentes de patógenos: el suministro de agua de mar, los alimentos y los estanques de reproductores.

For live or frozen sea food and pellets, 200 g were homogenized with 200 ml of saline solution (0.9% NaCl). With all the samples, ten-fold dilution series were performed with saline solution, based on the expected bacterial concentration. These dilutions were seeded by the spread plate method onto: ZoBell 2216-E medium (Oppenheimer and ZoBell, 1952) for viable heterotrophic bacteria (VHB) counts, TCBS medium (Difco) for *Vibrio*-like bacteria (VLB) counts and, for selected samples, EMB medium (Difco) for total coliform (TC) counts. The inoculated plates of ZoBell and TCBS media were incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  and those of EMB at  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . After 48 h, the colony-forming units (CFU) were counted. The results are presented as the mean number of three determinations.

The shrimp hatcheries sampled are involved in commercial and research activities and are located at Puerto Peñasco, in the upper Gulf of California, and in Ensenada, on the north Pacific coast of Baja California, Mexico. Both places have an open seawater supply system, but at Puerto Peñasco, the seawater was pumped from a well drilled 10 m down from the sandy beach.

At Ensenada, where the most continuous sampling was carried out, the seawater was pumped from a coastal area to a 3,000-l reservoir; it was then conducted through two high flow rate sand filters (Triton, TR 60) to different working areas, where it was filtered through 5 and 1- $\mu\text{m}$  Cuno filters, and irradiated with UV light (Ultraviolet Technology Inc.; 20,125 to 28,750  $\mu\text{W s/cm}^2$  of light dosage range).

Microalgae cultures were carried out with standard successive inoculation procedures. Stock cultures of 20 ml were used to inoculate 1,800-ml Fernbach flasks, with which 18-l carboys were inoculated, and then the carboys were used to inoculate 180 to 1,000-l tanks. The time elapsed between each inoculation was seven days. For cultures of less than 18 l, autoclave sterilized media were used; for large tanks, UV-irradiated seawater supplemented with nutrients was used as a culture medium.

The broodstock pools in Puerto Peñasco have a dimension of  $3 \times 30 \times 0.6$  m. They were operated with an open flow to assure 200%

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras de agua en frascos con rosca esterilizados y se procesaron inmediatamente. Para el alimento marino vivo o congelado y los comprimidos, se trituraron 200 g con 200 ml de solución salina (0.9% NaCl). Se hicieron diez series de dilución con una solución salina para todas las muestras, con base en la concentración bacteriana esperada. Mediante el método de vetado en placa, estas diluciones se sembraron sobre: medio ZoBell 2216-E (Oppenheimer y ZoBell, 1952) para los conteos de bacterias heterótrofas viables (VHB), medio TCBS (Difco) para los conteos de bacterias tipo *Vibrio* (VLB) y, para muestras selectas, medio EMB (Difco) para los conteos de coliformes totales (TC). Las placas inoculadas de los medios ZoBell y TCBS se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y las de EMB a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Después de 48 h, se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU). Los resultados se presentan como el número medio de tres determinaciones.

En los criaderos de camarón muestreados se realizan actividades comerciales y de investigación. Se encuentran en Puerto Peñasco, en el alto Golfo de California, y en Ensenada, en la costa del Pacífico norte de Baja California, México. Ambos lugares tienen un sistema abierto de suministro de agua de mar; sin embargo, en Puerto Peñasco, el agua de mar se bombea de un pozo de 10 m de profundidad en una playa arenosa.

En Ensenada, donde se realizaron la mayoría de los muestreos continuos, se bombeó el agua de mar de un área costera a un depósito de 3,000 l; se canalizó, a través de dos filtros de arena de alto flujo (Triton, TR 60), a diferentes áreas de trabajo, donde se pasó por filtros Cuno de 5 y 1  $\mu\text{m}$  y se irradió con luz ultravioleta (Ultraviolet Technology Inc.; intervalo de 20,125 a 28,750  $\mu\text{W s/cm}^2$  de dosis de luz).

Los cultivos de microalgas se realizaron con procedimientos estándares de inoculación sucesiva. Se utilizaron 20 ml de cultivos depurados para inocular frascos Fernbach de 1,800 ml, con los cuales se inocularon garraones de 18 l, que se usaron para inocular estanques de 180 a 1,000 l. El tiempo entre cada inoculación fue de siete días. Para los cultivos

replacement of seawater per day and a continuous volume of 20 m<sup>3</sup>. Shrimps were stocked at a density of 6/m<sup>2</sup>. A vacuum cleaning of the pool was accomplished periodically, followed by a two-day drug treatment with cuprine (0.25 ppm) and formalin (25 ppm), applied to avoid filamentous bacterial disease caused by *Leucothrix mucor* (Sindermann and Lightner, 1988). In order to follow the evolution of VHB and VLB during the treatment, four pools at two experimental temperatures (23 and 28°C) were used. The seawater in these pools was conducted through a pipeline from the well without any further treatment.

## RESULTS

### Water supply system

The time series of the bacterial concentration of the three populations studied in Ensenada are shown in fig. 1: (a) viable heterotrophic bacteria (VHB), (b) *Vibrio*-like bacteria (VLB) and (c) total coliforms (TC).

The results observed for the VHB (fig. 1a) could be separated into those corresponding to normal and abnormal operation of the water supply. From February to mid-April, water was not pumped continuously and the sand filters were not properly cleaned; as a result, the VHB counts after filtration and UV treatment were, in many sampling instances, higher than those recorded from the seawater source. Based on these results, daily backwashing was proposed.

From April until May, when water was pumped continuously and the sand filters were backwashed daily, a reduction of VHB concentrations occurred, as was expected with the normal operation of filters and UV systems.

The VHB in the seawater source fluctuated between 10<sup>2</sup> and 10<sup>3</sup> colony-forming units per milliliter (CFU/ml), concentrations normally reported for coastal waters (Rheinheimer, 1971; Lizárraga-Partida *et al.*, 1982; Lizárraga-Partida and Vargas-Cárdenas, 1996). The treatment of the seawater supply with sand filters and UV reduced the VHB to concentrations between 10 and 10<sup>2</sup> when they were operated properly; therefore, a total reduction of the VHB population was not achieved.

menores de 18 l. se usaron medios de cultivo esterilizados en autoclave; para los estanques grandes, se usó agua de mar irradiada con UV y complementada con nutrientes.

Los estanques de reproductores en Puerto Peñasco midieron 3 × 30 × 0.6 m. Se operaron con un flujo abierto para asegurar el 200% de reemplazo de agua de mar por día y un volumen continuo de 20 m<sup>3</sup>. Los camarones se sembraron a una densidad de 6/m<sup>2</sup>. Se limpió el estanque periódicamente con una aspiradora, seguido por un tratamiento químico de dos días con cuprina (0.25 ppm) y formol (25 ppm) para evitar la enfermedad bacteriana filamentosa causada por *Leucothrix mucor* (Sindermann y Lightner, 1988). Se utilizaron cuatro estanques con dos temperaturas experimentales (23 y 28°C) para seguir la evolución de las VHB y VLB durante el tratamiento. El agua de mar de estos estanques se condujo por tubería del pozo sin otro tratamiento.

## RESULTADOS

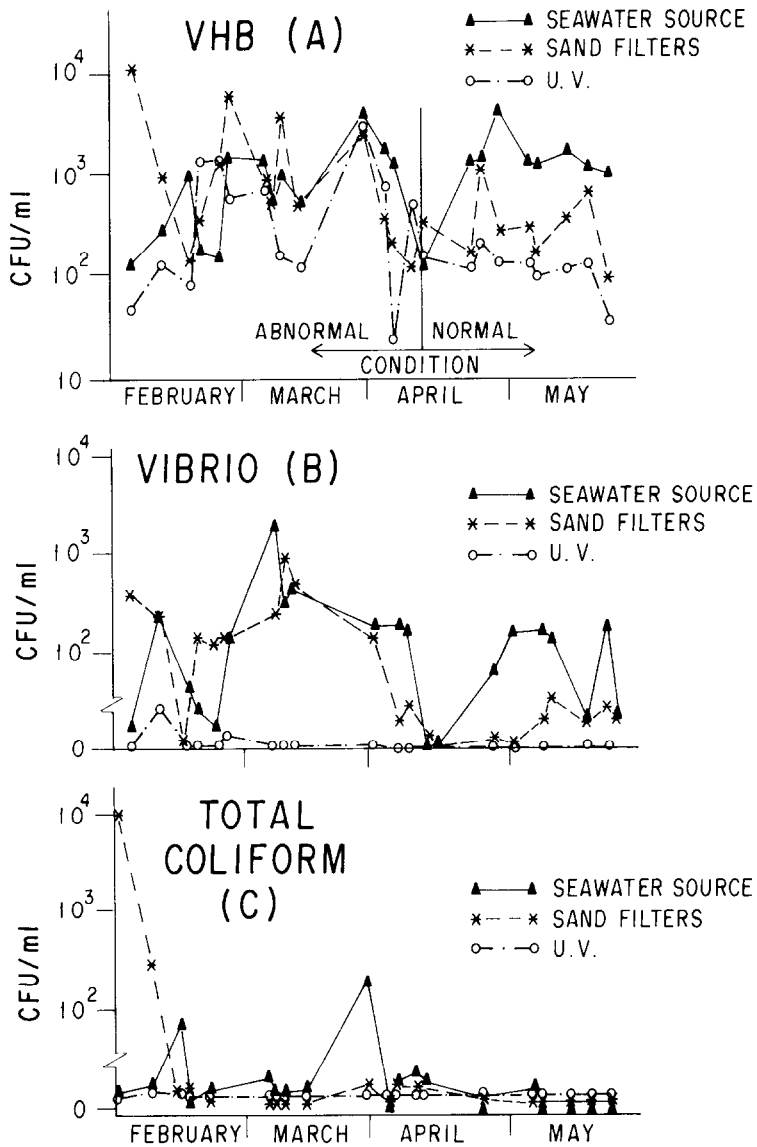
### Sistema de suministro de agua

En la fig. 1 se presentan las series de tiempo de la concentración bacteriana de las tres poblaciones estudiadas en Ensenada: (a) bacterias heterótrofas viables (VHB), (b) bacterias tipo *Vibrio* (VLB) y (c) coliformes totales (TC).

Los resultados observados para las VHB (fig. 1a) se pueden dividir en los que corresponden a la operación normal y anormal del suministro de agua. De febrero a mediados de abril, el agua no se bombeó continuamente y los filtros de arena no se limpiaron adecuadamente; por tanto, los conteos de VHB después de la filtración y el tratamiento con UV resultaron, en muchos casos, mayores que los registrados para la fuente de agua de mar. Con base en estos resultados, se propusieron enjuagues diarios.

De abril a mayo, cuando el agua se bombeaba continuamente y los filtros de arena se enjuagaban diariamente, hubo una reducción en las concentraciones de VHB, como se esperaba con la operación normal de los filtros y los sistemas de UV.

Las VHB en la fuente de agua de mar fluctuaban entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> unidades formadoras de



**Figure 1.** Time series of bacterial counts in seawater source, sand filters and Cuno filters-UV system in Ensenada, BC, Mexico.

**Figura 1.** Series de tiempo de conteos bacterianos en la fuente de agua, los filtros de arena y filtros Cuno-sistema UV en Ensenada, BC, México.

The VLB counts (fig. 1b) also indicated an abnormal operation of the system before mid-April, especially in the sand filter data. Concentrations ranged from 10 to  $10^3$  CFU/ml at the water source. The reduction observed after passage through two sand filters showed their efficiency when they are routinely cleaned, because most of this bacterial population is attached to suspended biotic and abiotic particles.

Irradiation with UV reduced the VLB to 0 CFU/ml or to concentrations undetectable with the dilutions that were seeded ( $0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). These results indicate that all the VLB that could be cultured on TCBS medium showed the same sensitivity to UV irradiation.

Total coliform (TC) counts recorded at the source of seawater from Ensenada fluctuated between 0 and  $10^2$  TC/ml (fig. 1c). These results indicate that the coastal area of Todos Santos Bay is sporadically polluted by urban sewage discharges located along the north coast of the bay. Sand filters and ultraviolet irradiation are extremely effective in the elimination of coliform bacteria. The counts after treatment were mostly equal to 0 TC/ml, even when high concentrations ( $10^2$ /ml) of total coliforms were registered at the water source.

The efficiency of the seawater well at Puerto Peñasco, where the water is naturally filtered through the beach sand, can be observed in table 1. This system drastically reduced the VHB and VLB found in the coastal seawater adjacent to the well. In the case of VLB, it was necessary to filter 100 ml in order to achieve any growth on TCBS medium, using concentrations of 5 CFU/100 ml at low tide and 12 CFU/100 ml at high tide. No coliforms were detected at the seawater well.

### Broodstock pools

The evolution of bacterial counts of VHB and VLB during the cleaning and the two-day drug treatment with cuprine and formalin is presented in table 1. The bacterial populations show the same evolution at 23 and 28°C. Vacuum cleaning does not show any effect on VHB and VLB, even after the cleaning session. Although the concentration of VLB was drastically reduced 6 h after the treatment, 24 h later

colonias por mililitro (CFU/ml), concentraciones que normalmente se reportan para aguas costeras (Rheinheimer, 1971; Lizárraga-Partida *et al.*, 1982; Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas, 1996). El tratamiento del suministro de agua de mar con filtros de arena y UV redujo las VHB a concentraciones entre 10 y  $10^2$ , cuando fueron operadas adecuadamente, por lo que no se logró una reducción total de la población de VHB.

Los conteos de VLB (fig. 1b) también indicaron una operación anormal del sistema antes de mediados de abril, sobre todo en los datos de los filtros de arena. Las concentraciones variaron entre 10 y  $10^3$  CFU/ml en la fuente de agua. La reducción observada después de pasar por dos filtros de arena mostró la eficiencia de éstos cuando se limpian de manera rutinaria, ya que casi toda esta población bacteriana se adhiere a partículas bióticas y abióticas.

La irradiación con UV redujo las VLB a 0 CFU/ml o a concentraciones no detectables con las diluciones que se sembraron ( $0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Estos resultados indican que todas las VLB que se pudieron cultivar en el medio TCBS mostraron la misma sensibilidad a la irradiación UV.

Los conteos de coliformes totales registrados en la fuente de agua de mar en Ensenada fluctuaron entre 0 y  $10^2$  TC/ml (fig. 1c). Estos resultados indican que el área costera de Bahía de Todos Santos se contamina esporádicamente por descargas urbanas de aguas residuales ubicadas en la costa norte de la bahía. Los filtros de arena y la irradiación UV son extremadamente eficaces para eliminar bacterias coliformes. Los conteos después del tratamiento fueron casi igual a 0 TC/ml, aun cuando se registraron concentraciones altas de TC ( $10^2$ /ml) en la fuente de agua.

Se puede observar en la tabla 1 la eficiencia del pozo de agua de mar en Puerto Peñasco, donde el agua se filtra naturalmente por la arena de la playa. Este sistema redujo drásticamente las VHB y VLB encontradas en el agua de mar costera adyacente al pozo. En el caso de las VHB, fue necesario filtrar 100 ml para lograr cualquier crecimiento sobre el medio TCBS, con concentraciones de 5 CFU/100 ml en bajamar y de 12 CFU/100 ml en pleamar. No se

**Table 1.** Counts of viable heterotrophic bacteria (VHB) and *Vibrio*-like bacteria (VLB) in broodstock pools and their seawater source in Puerto Peñasco, before and after cleaning and cuprine-formalin treatment at 23 and 28°C.**Tabla 1.** Conteos de bacterias heterótrofas viables (VHB) y bacterias tipo *Vibrio* (VLB) en los estanques de reproductores y su fuente de agua de mar en Puerto Peñasco, antes y después de una limpieza y tratamiento con cuprina y formalina a 23 y 28°C.

Seawater source		VHB CFU/ml	VLB CFU/ml
Seawater: Beach		$1.0 \pm 3.5 \times 10^3$	$4.5 \pm 8.2 \times 10^3$
Seawater: Well, low tide		$1.8 \pm 7.4 \times 10^2$	$5.0 \pm 4.0/100$ ml
Seawater: Well, high tide		$1.1 \pm 5.5 \times 10^2$	$12.0 \pm 8.0/100$ ml

Broodstock pools		28°C CFU/ml	23°C CFU/ml
Water supply to pools	VHB	$1.5 \pm 4.0 \times 10^2$	$1.5 \pm 4.0 \times 10^2$
	VLB	0	0
Before cleaning	VHB	$5.0 \pm 6.0 \times 10^5$	$5.5 \pm 1.3 \times 10^5$
	VLB	$2.2 \pm 4.5 \times 10^3$	$1.7 \pm 3.0 \times 10^3$
After cleaning	VHB	$5.1 \pm 0.5 \times 10^5$	$3.4 \pm 4.0 \times 10^5$
	VLB	$2.9 \pm 0.2 \times 10^3$	$5.1 \pm 0.5 \times 10^3$
24 h after cleaning and just before drug treatment	VHB	$2.5 \pm 0.6 \times 10^5$	$2.6 \pm 1.4 \times 10^5$
	VLB	$2.5 \pm 3.0 \times 10^3$	$4.5 \pm 2.0 \times 10^3$
6 h after drug treatment Cuprine 0.25 ppm Formalin 25 ppm	VHB	$1.1 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.1 \pm 2.0 \times 10^5$
	VLB	$3.2 \pm 2.0 \times 10$	$8.0 \pm 2.0$
24 h after drug treatment	VHB	$7.2 \pm 3.0 \times 10^5$	$1.2 \pm 0.2 \times 10^6$
	VLB	$1.4 \pm 0.2 \times 10^4$	$1.3 \pm 2.3 \times 10^4$

the concentration of VLB was higher than that registered before cleaning the pool walls, even when VLB were found in low numbers in the seawater supply. This fast growth of VLB was probably due to the benthic green algae (*Enteromorpha* sp.) attached to the pool walls, where we detected high concentrations of VLB of  $2 \times 10^5$  to  $1.5 \times 10^6$  per gram of wet algae. In contrast with these results, the VHB changed within narrow limits (table 1). It is interesting to note that even though this treatment is not applied to eliminate VLB, their numbers are reduced drastically just after its application.

detectaron coliformes en el pozo de agua de mar.

#### Estanques de reproductores

En la tabla 1 se presenta la evolución de los conteos bacterianos de VHB and VLB durante la limpieza y el tratamiento químico de dos días con cuprina y formol. Las poblaciones de bacterias muestran la misma evolución a los 23 y 28°C. La aspiración no muestra ningún efecto sobre las VHB y VLB, aun después de la aspiración. Aunque la concentración de VHB se

**Table 2.** Counts of viable heterotrophic bacteria (VHB) and *Vibrio*-like bacteria (VLB) per milliliter of culture in microalgae cultures: 1, Ensenada; 2, Puerto Peñasco.

**Tabla 2.** Conteos de bacterias heterótrofas viables (VHB) y bacterias tipo *Vibrio* (VLB) por mililitro de cultivo en cultivos de microalgas: 1, Ensenada; 2, Puerto Peñasco.

Organism	Vol. of culture	VHB CFU/ml	VLB CFU/ml	Ref.
<b>Stock cultures</b>				
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	20 ml	$1.8 \pm 0.5 \times 10^7$	0	2
<i>Isochrysis galbana</i>	20 ml	$1.3 \pm 0.3 \times 10^7$	0	2
<i>Tetraselmis suecica</i>	20 ml	$2.0 \pm 1.0 \times 10^7$	0	2
<b>Batch cultures</b>				
<i>Isochrysis galbana</i>	1,800 ml	$2.2 \pm 1.2 \times 10^6$	0	1
	18 l	$3.3 \pm 1.5 \times 10^6$	0	1
72 h after inoculation	180 l	$2.5 \pm 1.1 \times 10^6$	0	2
<i>Skeletonema costatum</i>	500 l			
24 h after inoculation		$2.4 \pm 1.0 \times 10^4$	0	2
72 h after inoculation		$1.4 \pm 0.4 \times 10^4$	$10.0 \pm 4.0$	2
<i>Isochrysis galbana</i>	500 l			
96 h after inoculation		$3.0 \pm 1.4 \times 10^5$	0	1
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	500 l			
72 h after inoculation		$2.0 \pm 0.6 \times 10^5$	0	1
<i>Tetraselmis suecica</i>	1,000 l			
72 h after inoculation		$1.4 \pm 0.3 \times 10^6$	0	2
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	1,000 l			
72 h after inoculation		$3.2 \pm 2.0 \times 10^6$	0	2

**Table 3.** Counts of viable heterotrophic bacteria (VHB) and *Vibrio*-like bacteria (VLB) per gram of wet weight in live or frozen sea food: 1, Ensenada; 2, Puerto Peñasco.

**Tabla 3.** Conteos de bacterias heterótrofas viables (VHB) y bacterias tipo *Vibrio* (VLB) por gramo de peso húmedo en alimento marino vivo o congelado: 1, Ensenada; 2, Puerto Peñasco.

Organism	VHB CFU/g	VLB CFU/g	Ref.
Artemia (Utah)	$1.0 \pm 3.0 \times 10^7$	$1.0 \pm 1.8 \times 10^6$	2
Artemia (Biomarine)	$1.0 \pm 1.6 \times 10^7$	$9.0 \pm 0.7 \times 10^6$	2
Shrimp heads	$5.0 \pm 2.3 \times 10^5$	$5.0 \pm 1.7 \times 10^3$	1
Clam ( <i>Chione fluctrifraga</i> )	$2.0 \pm 0.8 \times 10^6$	$3.0 \pm 1.3 \times 10^3$	2
Squid ( <i>Loligo</i> sp.)	$8.0 \pm 4.8 \times 10^2$	$1.0 \pm 0.4 \times 10^2$	2
Polychaete ( <i>Glycera</i> sp.)	$3.2 \pm 2.5 \times 10^5$	0	2
Fish ( <i>Scomberomorus</i> sp.)	$8.3 \pm 1.2 \times 10^5$	0	2



**Table 4.** Counts of viable heterotrophic bacteria (VHB), *Vibrio*-like bacteria (VLB) and total coliforms (TC) per gram of dry weight in pellets: 2. Puerto Peñasco.**Tabla 4.** Conteos de bacterias heterótrofas viables (VHB), bacterias tipo *Vibrio* (VLB) y coliformes totales (TC) por gramo de peso seco en comprimidos: 2. Puerto Peñasco.

Pellets	VHB CFU/g	VLB CFU/g	TC CFU/g	Ref.
Puerto Peñasco, nursery-grade	$1.9 \pm 0.6 \times 10^5$	0	$1.0 \pm 4.8 \times 10^4$	2
Puerto Peñasco, growth-grade	$5.5 \pm 2.2 \times 10^5$	0	$1.0 \pm 3.2 \times 10^4$	2
Rangen, growth-grade	$2.8 \pm 2.0 \times 10^4$	0	$8.7 \pm 0.2 \times 10^3$	2

### Food stocks

The bacterial concentrations in food currently employed in aquaculture (microalgae, live or frozen seafood and pellets) are presented in tables 2, 3 and 4. From these results, it is evident that food is one of the major sources of bacteria that could result in a severe epizootic of the organisms under culture.

Microalgae normally have high concentrations of VHB, between  $10^4$  and  $10^7$  CFU/ml, irrespective of whether they are cultured in small volumes (*ca.* 20 ml) or large tanks (*ca.* 1,000 l), as is shown in table 2. For VLB, only one sample shows a concentration of  $10.0 \pm 4.0$  CFU/ml; no VLB were detected in the other samples. Similar numbers for VHB have been reported by Nicolas *et al.* (1989) for 20-l cultures of *Platymonas suecica*, where VHB show concentrations of  $2.6 \pm 1.7 \times 10^6$  CFU/ml and VLB of  $0.01 \times 10^3$  CFU/ml, and for 50-l cultures of *Pavlova lutheri*, where VHB reach  $6.1 \pm 7.2 \times 10^6$  CFU/ml and VLB,  $0.3 \pm 0.6 \times 10^3$  CFU/ml.

*Artemia* spp., which is extensively used in aquaculture, has been found to be a major source of VLB. Table 3 shows the results of 200-l cultures of two *Artemia* brands (Utah and Biomarine), where their VLB concentration ( $10^6$  to  $10^7$  CFU/ml) is extremely high. This is a critical point for shrimp aquaculture, because *Artemia nauplii* are furnished as food for postlarvae stages, when organisms are more sensitive to disease.

Fresh or frozen seafood (table 3) is also a major source of bacteria. Squid, shrimp heads, clams, etc., currently employed as food for

redujo drásticamente 6 h después del tratamiento, 24 h después, la concentración de VLB fue mayor que la registrada antes de limpiar las paredes del estanque, aun cuando el número de VLB encontrado en la fuente de agua de mar fue bajo. Este crecimiento rápido de VLB probablemente se debió a las algas verdes bentónicas (*Enteromorpha* sp.) pegadas a las paredes del estanque, donde se encontraron concentraciones de VLB de  $2 \times 10^5$  a  $1.5 \times 10^6$  por gramo de alga húmeda. En contraste a estos resultados, las VHB sólo variaron ligeramente (tabla 1). Es interesante notar que aunque no se aplica este tratamiento para eliminar las VLB, sus cantidades se redujeron drásticamente justo después de su aplicación.

### Fuentes de alimento

Las tablas 2, 3 y 4 presentan las concentraciones de bacterias en el alimento actualmente utilizado en la acuicultura (microalgas, alimento marino vivo o congelado y comprimidos). Estos resultados muestran que el alimento es uno de las principales fuentes de bacterias que pudiera ocasionar una epizootia severa en los organismos bajo cultivo.

Las microalgas normalmente tienen altas concentraciones de VHB, entre  $10^4$  y  $10^7$  CFU/ml, independientemente de que sean cultivadas en volúmenes pequeños (*ca.* 20 ml) o en estanques grandes (*ca.* 1,000 l), como se observa en la tabla 2. Para las VLB, solamente una muestra presenta una concentración de  $10.0 \pm 4.0$  CFU/ml; no se detectaron VLB en las otras. Cantidades similares de VHB han sido reportadas por Nicolas *et al.* (1989) para culti-

broodstock animals, contain concentrations of VHB between  $10^2$  and  $10^6$  CFU/g. The VLB counted in the TCBS medium, number from 0 to  $10^5$  CFU/g.

Pellets are another important source of bacteria. The examples shown in table 2 indicate that they could harbor between  $10^3$  and  $10^5$  VHB/g, and more than  $10^4$  TC/g of pellet. The high TC counts indicate deficient sanitary control in the production line.

## DISCUSSION

Bacterial enumeration as supporting technology has been useful in Ensenada and Puerto Peñasco hatcheries to set the frequency of sand-filter backwashing and enhance the drilling of wells near the shore. TCBS counts are now used to control the quality of seafood and as a routine test in microalgae cultures, where we now filter 10 ml to assure the absence of VLB. From the commercial point of view, axenic cultures of microalgae or *Artemia* would be economically prohibitive, so VHB will always be present. Therefore, it becomes important to control the potentially pathogenic bacteria, such as those belonging to the genus *Vibrio*, especially if they will be used to nourish larval stages of marine organisms.

For UV systems, 100 ml of irradiated water are now used to enumerate VLB, as an indication of their quality and to determine the best time to replace lamps.

The enumeration of different bacterial populations by means of selective culture media is a simple methodology useful in aquaculture, not only to survey critical points during cultivation, but also for the certification of culture areas and final product quality. Knowledge of normal bacterial concentrations at critical points during the culture of aquatic organisms constitutes the first stage in finding the cause of an epizootic disease or to control the bacterial community within the system.

Seafood could be the main source of VLB in aquaculture, as is indicated in table 3. Epizootics of vibriosis in penaeid shrimp could present a mortality rate from inconsequential to 100% of affected populations (Lightner, 1988). The great effort normally made in aquaculture

vos de 20 l de *Platymonas suecica*, donde las VHB presentan concentraciones de  $2.6 \pm 1.7 \times 10^6$  CFU/ml y las VLB de  $0.01 \times 10^3$  CFU/ml, y para cultivos de 50 l de *Pavlova lutheri*, donde las VHB alcanzan  $6.1 \pm 7.2 \times 10^6$  CFU/ml y las VLB,  $0.3 \pm 0.6 \times 10^3$  CFU/ml.

Se ha encontrado que *Artemia* spp., extensivamente empleada en la acuicultura, es una fuente principal de VLB. La tabla 3 presenta los resultados de cultivos de 200 l de dos marcas de *Artemia* (Utah y Biomarine), donde la concentración de VLB ( $10^6$  a  $10^7$  CFU/ml) es extremadamente alta. Esto es un punto crítico para la acuicultura del camarón, porque los nauplios de *Artemia* se usan como alimento para los estadios postlarvales, cuando los organismos son más susceptibles a enfermedades.

El alimento marino fresco o congelado (tabla 3) también es una fuente principal de bacterias. El calamar, las cabezas de camarón, almejas, etc., actualmente utilizados como alimento para los animales reproductores, contienen concentraciones de VHB entre  $10^2$  y  $10^6$  CFU/g. Las VLB cuantificadas en el medio TCBS fueron de 0 a  $10^5$  CFU/g.

Los comprimidos son otra fuente importante de bacterias. Los ejemplos en la tabla 2 indican que pueden contener entre  $10^3$  y  $10^5$  VHB/g, y más de  $10^4$  TC/g de comprimido. Los conteos altos de TC indican un control de sanidad deficiente en la línea de producción.

## DISCUSIÓN

La cuantificación de bacterias, como apoyo tecnológico, ha sido útil en los criaderos en Ensenada y Puerto Peñasco para establecer la frecuencia de enjuague de los filtros de arena y para mejorar la construcción de pozos en la costa. Los conteos de TCBS actualmente se usan para controlar la calidad del marisco y constituyen una prueba rutinaria en los cultivos de microalgas, donde ahora se filtran 10 ml para asegurar la ausencia de VLB. Desde el punto de vista comercial, los cultivos axénicos de microalgas o *Artemia* serían económicamente imposibles, por lo que las VHB siempre estarán presentes. Por lo tanto, es importante controlar las bacterias potencialmente patógenas, tales como las pertenecientes al género *Vibrio*,

to work with high bacteriological water quality loses its meaning when large amounts of bacteria are introduced with food.

Effort has to be focused on the correct management of the bacterial community rather than on its elimination. Bacteria play many important roles; unfortunately, one of them is the acute pathogeny of some microorganisms. A major advancement in aquaculture can be reached with a deeper understanding of the role of the microbial community in the biological control of pathogens (Gil-Turnes *et al.*, 1989; Maeda and Nogami, 1989) and its production of bioactive compounds (Kimura *et al.*, 1990; Sugita *et al.*, 1991).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Gaxiola-Castro, J. García-Pámanes and G. Hammann for their comments and suggestions on this article. Guadalupe Vargas-Cárdenas, Olga Lelevier, José María Domínguez and Francisco Ponce provided us with technical assistance. This study was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, P218-CCOC 880080).

#### REFERENCES

- Austin, B. (1982). Taxonomy of bacteria isolated from a coastal marine fish-rearing unit. *J. Appl. Bacteriol.*, 53: 253-268.
- Austin, B. and Allen-Austin, D. (1985). Bacterial pathogens of fish. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, 58: 483-506.
- Ávila, M.J., Moriñigo, M.A., Cornax, R., Romero, P. and Borrego, J.J. (1989). Comparative study of coliform enumeration media from seawater samples. *J. Microbiol. Methods*, 9: 175-193.
- Brown, C. and Russo, D.J. (1979). Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery seawater. I. Elimination of five pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 17: 17-23.
- Cross, V.K. and Peterson, L. (1987). Efficacy of ultraviolet after treatment at the Green Lake, Maine, National Fish Hatchery. *The Progressive Fish-Culturist*, 49: 233-235.
- Elston, R.A. (1984). Prevention and management of infectious diseases in intensive

especialmente si se usarán para alimentar los estadios larvales de organismos marinos.

Para los sistemas de UV, actualmente se usan 100 ml de agua irradiada para cuantificar las VLB como un indicador de su calidad, así como para determinar el mejor momento para cambiar las lámparas.

La cuantificación de las poblaciones bacterianas con medios de cultivo selectivos es una manera fácil y útil en la acuicultura, no sólo para establecer los puntos críticos durante el cultivo, sino también para determinar las áreas de cultivo y la calidad final del producto. El conocimiento de las concentraciones normales de bacterias en los puntos críticos durante el cultivo de organismos acuáticos constituye la primera etapa en la búsqueda de la causa de una enfermedad epizootia o del control de una comunidad de bacterias dentro del sistema.

El alimento marino puede ser una fuente principal de VLB en la acuicultura, como se indica en la tabla 3. Epizootias de vibriosis en camarones peneidos pueden presentar una mortalidad desde inconsecuente hasta el 100% de las poblaciones afectadas (Lightner, 1988). El gran esfuerzo normalmente desempeñado en la acuicultura de trabajar con una calidad bacteriológica alta de agua se pierde cuando se introducen cantidades grandes de bacterias con el alimento.

Se debe enfocar el esfuerzo en el manejo apropiado de la comunidad bacteriana y no en su eliminación. Las bacterias juegan un papel muy importante; desafortunadamente, uno de ellos es la patogenia aguda de algunos microorganismos. Un adelanto muy grande en la acuicultura se puede lograr con un mejor entendimiento del papel de la comunidad microbiana en el control biológico de patógenos (Gil-Turnes *et al.*, 1989; Maeda y Nogami, 1989) y su producción de compuestos bioactivos (Kimura *et al.*, 1990; Sugita *et al.*, 1991).

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece a G. Gaxiola-Castro, J. García-Pámanes y G. Hammann sus comentarios y sugerencias sobre este artículo; y a Guadalupe Vargas-Cárdenas, Olga Lelevier, José María Domínguez y Francisco Ponce su asistencia tecnológica. Este trabajo fue apoyado por el

- mollusc husbandry. J. World Maricul. Soc., 15: 284-300.
- Fitt, W.K., Labare, M.P., Claiborne Fuqua, W., Walch, M., Coon, S.L., Bonar, D.B., Colwell, R.R. and Weiner, R.M. (1989). Factors influencing bacterial production of inducer for settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. Microbial Ecol., 17: 287-298.
- Gil-Turnes, M.S., Hay, M.E. and Fenical, W. (1989). Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from pathogenic fungus. Science, 246: 116-117.
- Gilmour, A., McCallum, M.F. and Allan, M.C. (1976). A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice (*Pleuronectes platessa*) L. Aquaculture, 7: 161-172.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kamei, Y. (1990). An antiviral agent (46NW-064A) produced by *Pseudomonas* sp. and its activity against fish viruses. J. Aquatic Animal Health, 2: 12-20.
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. and Kuwahara, S. (1963). A new selective isolation medium for pathogenic vibrios: TCBS Agar. Jap. J. Bacteriol., 18: 387-391.
- Lightner, D.V. (1988). Vibrio disease of penaeid shrimp. In: C.J. Sindermann and D.V. Lightner (eds.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Develop. Aqua. Fish Sci. 17. Elsevier, Amsterdam, pp. 42-47.
- Lizárraga-Partida, M.L., Rodríguez-Santiago, H. and Romero-Jarero, J.M. (1982). Effects of the Ixtoc I blowout on heterotrophic bacteria. Mar. Poll. Bull., 13: 67-70.
- Lizárraga-Partida, M.L. and Vargas-Cárdenas, G. (1996). Influence of water circulation on marine and fecal bacteria in a mussel growing area. Mar. Poll. Bull., 32: 196-201.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, bajo el convenio P218-CCOC 880080.
- Traducido al español por Jennifer Davis.
- 
- Maeda, M. and Nogami, K. (1989). Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. In: S. Miyachi, I. Karube and Y. Ishida (eds.), Current Topics in Marine Biotechnology. Japanese Society for Marine Biotechnology, Tokyo, pp. 395-398.
- Nicolas, J.L., Robic, E. and Ansquer, D. (1989). Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. Aquaculture, 83: 237-248.
- Oppenheimer, C.H. and ZoBell, C.E. (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Mar. Res., 11: 10-18.
- Rheinheimer, G. (1971). Aquatic Microbiology. John Wiley, London, 184 pp.
- Sindermann, C.J. and Lightner, D.V. (eds.) (1988). Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Develop. Aqua. Fish Sci., 17. Elsevier, Amsterdam, 431 pp.
- Sohier, L. and Bianchi, M. (1986). Evolution de la communauté bactérienne hétérotrophe de l'eau de mer lors d'une expérience d'aquaculture de crevettes pénéides en systèmes clos. In: GERBAM-IFREMER (eds.), Deuxième Colloque International de Bactériologie Marine. Actes de Colloques, 3, pp. 283-292.
- Sugita, H., Miyajima, C. and Deguchi, Y. (1991). The vitamin B-12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture, 92: 267-276.