

Comportamiento de las principales comunidades bacterianas durante un ciclo de cultivo larvario de *Penaus (Litopenaeus) vannamei*.

Paredes, V.^a, Herrera, J.^a, Bayot B.^{b,c}, Sotomayor, M.^{b,*}

^a Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, FIMCBOR, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

^b Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

^c Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, FIMCBOR, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

Resumen

La producción de camarón blanco *Penaus (Litopenaeus) vannamei* en el Ecuador está directamente vinculada en la calidad de la larva que es producida en los laboratorios de la Península de Santa Elena, punto primordial que determina el éxito de muchas producciones. Este estudio tuvo la finalidad de estudiar el comportamiento de las comunidades bacterianas dentro un ciclo larvario realizado en un laboratorio comercial de la zona de Mar Bravo-Santa Elena, utilizando dos protocolos de manejo en 4 tanques (P1= 1A, 1B y P2= 2A, 2B) tomándose muestras de animales y agua de los tanques desde nauplio hasta PL8. Siendo determinada mediante microbiología Aerobios totales, Vibrios totales, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Enterobacterias sp.*, junto a la determinación de la presencia o ausencia del gen de la toxina precursora de la enfermedad AHPND en animal y fuentes posibles de contaminación. Considerándose el análisis histopatológico en el caso de positividad en muestras de animal a AHPND. Obteniéndose como resultado conteos de 10^9 UFC/gr Aerobios *sp.* y 10^4 UFC/gr *Pseudomonas sp.* en larvas. Se encontró positividad para el gen de la toxina AHPND desde el inicio del cultivo en el agua de los tanques y en animal apartir del estadio Mysis 3-PL1. Las bacterias predominantes durante el cultivo en agua y animal fueron *A. hydrophyla* para ambos protocolos, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* para el protocolo 1 y 2 respectivamente en animal. El 70% de las muestras analizadas en el estadio Misis 2 presentaron necrosis a nivel del hepatopáncreas grado 3 o 4. La mortalidad de los animales no pueden ser relaciona por la presencia de AHPND pues existieron factores extrínsecos como problemas de desinfección y deficiencia de oxígeno que influyeron durante el cultivo.

Palabras claves: Comunidad bacteriana, larva, AHPND.

Abstract

The production of white shrimp *Penaus (Litopenaeus) vannamei* in Ecuador is directly linked to the quality of the larva that is produced in the laboratories of the Peninsula of Santa Elena, a prime point that determines the success of many productions. This study aimed to study the behavior of bacterial communities within a larval cycle conducted in a commercial laboratory in the Mar

Bravo-Santa Elena area, using two management protocols in 4 tanks (P1 = 1A, 1B and P2 = 2A , 2B) by taking samples of animals and water from the tanks from nauplio to PL8. Being determined by microbiology Total aerobes, Total vibrios, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. and *Enterobacterias* sp., together with the determination of the presence or absence of the precursor toxin gene for AHPND disease in animals and possible sources of contamination. Considering the histopathological analysis in the case of positivity in animal samples to AHPND. As a result, counts of 109 CFU / gr *Aerobios* sp. and 104 UFC / g *Pseudomonas* sp. in larvae. Positive for the AHPND toxin gene was found from the beginning of the culture in the water of the tanks and in animal from the stage Mysis 3-PL1. The predominant bacteria during water and animal culture were *A. hydrophyla* for both protocols, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* for protocol 1 and 2 respectively in animal. 70% of the samples analyzed in the Mysis 2 stage presented necrosis in the level 3 or 4 hepatopancreas. The mortality of the animals can not be related by the presence of AHPND because there were extrinsic factors such as disinfection problems and oxygen deficiency that influenced during cultivation.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país la larvicultura de camarón es considerada como la piedra angular del proceso de producción de camarón blanco, que inició aproximadamente en 1979 por la necesidad de garantizar el suministro de larvas al sector camaronero ecuatoriano cuando incrementaba la producción de camarón en el país. Actualmente más del 90 % de la producción de larvas está concentrada en la provincia de Santa Elena y un porcentaje menor en la provincia de El Oro generando una importante comercialización a nivel de toda la costa ecuatoriana y fuera del país. En la actualidad el sector camaronero del Ecuador tiene que lidiar con la competitividad del mercado mundial (Acuicultura, CNA, 2015) y para mantener un alto nivel de producción necesita mantener su producción de manera que es imperativo que las larviculturas puedan proveer de forma sostenible su demanda manteniendo una buena condición de salud (FAO).

En cada una de las etapas de la larvicultura existen factores de riesgo que afectan al desarrollo normal del ciclo larvario. Entre los factores de mayor relevancia están los hongos, virus y bacterias (Unidos, 1993).

Por lo que según (Espinoza Pico, 2014) es necesario tomar precauciones y cuidados específicos en las diferentes etapas larvianas de este crustáceo. Las bacterias son particularmente perjudiciales porque ocasionan problemas de crecimiento y mortalidad, destacándose las bacterias de la familia *Vibrionaceae* dada su alta patogenicidad en camarones *P. vannamei*, capaces de ocasionar erosiones cuticulares, necrosis y septicemias (Lightner, 1992), junto a las familias *Pseudomonaceae* y *Aeromonaceae* (Arguello Lavayen, 2014). Dentro de la familia *Vibrionaceae*, el género más representativos son los *Vibrios* que habitan de manera natural en la flora marina siendo declarado como patógenos el *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterranii*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus* y *V. vulnificus* (Cuellar-Angel, Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPND), 2013).

Las larviculturas de *P. vannamei* en Ecuador desde sus inicios como industria han presentado problemas y decrecimiento en las sobrevivencias relacionados a la presencia de enfermedades tipo bacterianas y/o virales que afectan a los diferentes estadios larvarios desde zoea a post-larva. En 1999, (Vandenbergh, y otros, 1999) reportaron varias especies de *Vibrios* asociados al Síndrome

de Zoea 2 y Síndrome de la muda desde Mysis-postlarva, que provocaron una alta mortandad en larvas de camarón *P. vannamei*, donde el *V. harveyi* y *V. alginolyticus* fueron los más encontrados mediante análisis microbiológicos BIOLOG-GN2, de este estudio los aislados S2 y E22 (*V. harveyi*) provocaron infecciones en ensayos controlados con larvas de *P. vannamei* el síndrome de Bolitas (San Miguel Figueroa, 2009), síndrome también reportado por otros autores como (Morales, 1992), (Robertson, Calderon, Carrera, Zherdmant, & Austin, 1988) en larvicultura de camarón ecuatoriana. Los problemas de larvicultura no son exclusividad de Ecuador si no del sector camaronero mundial, uno de los países donde esta industria está muy desarrollada es México en la región noreste (Sinaloa, Sonora, Baja California Sur y Nayarit) donde a pesar de haberse desarrollado diferentes técnicas para el cultivo de camarón blanco reporta mortalidades significativas (Pérez-Morales, Band-Schmidt, & Martínez-Díaz, 2016) siendo no concluyentes los estudios encaminados a determinar las infecciones y mortalidades causadas por bacterias (Aguirre-Guzman, López-Acavedo, & Vásquez-Sauceda, 2013).

La enfermedad AHPND (Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda) llamada comúnmente como síndrome de mortalidad temprana (EMS), es una de las enfermedades emergentes de mayor preocupación de este sector, pues desde su aparición en el año 2009 la camarinocultura ha sido afectada drásticamente en las primeras semanas de cultivo. El AHPND fue considerado como idiopática hasta el 2013, debido a que se desconocía su agente causal sin embargo (Tran, y otros, 2013) mediante bioensayos entre animales infectados y sanos determinaron al agente causal a un tipo de cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, el que afectaba a los animales al liberar toxinas degeneradoras de los túbulos de los hepatopáncreas, degeneración que podía causar mortalidades del 100%, no siendo detectable en las primeras fases de la enfermedad por las técnicas convencionales, lo que ha dificultó su diagnóstico y control.

Desde su aparición en países como China (Mejía & Navarro, 2012) Vietnam en el 2010, Malasia en el 2011, Tailandia en el 20012. (Cuellar-Angel, 2013); (MarcadorDePosición1); (Lightner, 2013); (Lightner, y otros, 2013); (Varela & Peña, 2013); (NACA, 2012) y México (Soto-Rodriguez, Gomez-Gil, Lozano-Olvera, Bentancourt-Lozano, & Morales-Covarrubias, 2014), consituye para el ecuador uno de los principales peligros para la produccion de camaron por alta patogenicidad y desiminacion entre paises.

En el país y en toda América Latina se busca generar herramientas que permitan combatir las enfermedades causadas por patógenos y que representan pérdidas en términos económicos para el sector camaronero, “herramientas” que abarcan el manejo de la calidad del agua mediante la aplicación productos tipo antibióticos, aceites esenciales, ácidos orgánicos, extractos naturales, probióticos, etc. (FAO). Obteniendo en las producciones resultados son variables puesto que en la mayoría de los casos existe el desconocimiento a que se debe controlar. En CENAIM a mediados del 2015 identificó mediante el método AP4 (Dangtipa, y otros, 2015) la presencia de AHPND en larvas en la Provincia de Santa Elena, este estudio determinó las principales comunidades bacterianas de los cultivos, la posible positividad al gen causal del AHPND y los factores asociados a su presencia.

2. METODOLOGÍA

2.2.1 Análisis microbiológico en nauplios y larvas de camarón

Se recolectaron larvas usando mallas micradas relativo el estadio, y colocadas en fundas estériles con agua del tanque de origen de las larvas y transportadas a las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marina (CENAIM) para su posterior procesamiento. En el

laboratorio las larvas se filtraron y se lavaron con agua de mar estéril (2 veces) para eliminar sedimentos, carga bacteriana externa y exceso de humedad. Cada muestra se pesó (0.3 g aprox) y se macero para homogenizar la carga bacteriana, realizándose diluciones sucesivas seriadas con solución salina al 2% de cloruro de sodio, seguida por la siembra en Agar Marino (AM) de 10^{-3} hasta 10^{-5} , Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) de 10^{-1} hasta 10^{-3} , Agar Glutamate-Starch-Penicillin (GSP) de 10^{-1} hasta 10^{-3} , Agar McConkey (MAK) 10^{-1} hasta 10^{-3} y Agar CHROM (CHRO) de 10^{-1} hasta 10^{-3} . Se tomó por duplicado 100uL de cada dilución y mediante la técnica de extensión en superficie se sembró individualmente en los respectivos agares, incubaron (Incubadora Heratherm) a 30°C y 35°C respectivamente. El conteo de todas las colonias bacterianas se realizó al cumplir las 48 horas de incubación, excepto el conteo de bacterias luminiscentes que se realizó al cumplir 24 horas. Se cuantificó Aerobios totales (AM), Vibrios totales (TCBS), Pseudomonas/Aeromonas (GSP), Enterobacterias (MAK) y *V. alginolyticus*/*V. vulnificus*/*V. cholerae*/*V. parahaemolyticus* (CHRO). Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por g de muestra (UFC/g). Para la cuantificación de bacterias presentes en cada muestra se consideró la dilución que presentó número de colonias en un rango entre 30 y 300 UFC/g.

2.2.2 Análisis microbiológico en agua

Se colectó muestras (500 mL) de todas las fuentes de agua con potencial positivismo para AHPND (agua de reservorio, agua de entrada a los tanques y agua de cada tanque) en cada uno de los estadios (Siembra, Zoea 2, Zoea 3, Mysis 2, Mysis3/PL1, PL2, PL4, PL6, PL8). El muestreo se realizó en condiciones asépticas y utilizando recipientes estériles, posteriormente las muestras se transportaron a las instalaciones del CENAIM para su procesamiento. Después de homogenizar la muestra (agitación por 20 segundos) se realizó diluciones seriadas al 2% de cloruro de sodio en solución salina para sembrar en los agares AM de 10^0 hasta 10^{-3} , TCBS de 10^0 hasta 10^2 , GSP de 10^0 hasta 10^{-2} , MAK de 10^0 hasta 10^{-2} y CHRO: 10^0 hasta 10^{-2} . La incubación y el conteo se realizaron de la misma forma que se realizaron con las muestras de larvas.

2.3 Aislamiento de bacterias

Todas las cepas bacterianas diferenciadas por criterios morfológicos fueron aisladas y congeladas a -80 °C en medio de cultivo Trypticase Soy Broth (TSB) al 20% de glicerol. Esta práctica fue aplicada solo para muestras de larvas y agua de tanques. Los aislados bacterianos que resultaron positivos para AHPND fueron reactivados en medio Trypticase Soy Agar (TSA) al 2% de cloruro de sodio e incubados a 30°C por 24 horas. Los aislados reactivados fueron clasificados en Gram positivas y Gram negativas por medio de la prueba de Gram (Gregersen, 1978), las cuales solo las Gram negativas se sometieron a la prueba de oxidasa (REF) y catalasa(REF) dependiendo de estos resultados se inoculó las bacterias aisladas en kits API20 NE (Oxidasa +, Catalasa + y Gram-) o API20E (Oxidasa -, Catalasa + y Gram-) (bio-Merieux), que fueron incubados a 30°C por 48 horas, posterior de realizo la lectura y la respectiva identificación.

2.4 Detección de AHPND

Todas las muestras de nauplios, larvas, agua, Artemia, algas, probióticos y dietas secas fueron procesadas para análisis de AHPND. Cada muestra fue diluida hasta 10^{-2} en solución salina, de la cual se tomó 100 µL de cada dilución y se transfirió a tubos con 5 mL de medio TSB, al 2% de cloruro de sodio para enriquecimiento bacteriano. Se tomo 1 mL para centrifugar a 8000 rpm (2 min). El pellet obtenido del centrifugado fue procesado con 500 µl de buffer de lisis (100 mM

NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA) e incubado con solución de sodio dodecyl sulfato (10 %) por 2 horas a 55 °C. Se realizó una extracción de ADN con fenol-cloroformo: extracción con fenol (600 µl), centrifugación a 13000 rpm por 10 min y recuperación del sobrenadante. Se añadió un volumen de cloroformo-isoamil 24:1 y centrifugando a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recuperado y el ADN bacteriano fue precipitado por 4 horas a -20 °C con etanol al 100 % y 0.5 volúmenes de acetato de amonio (5 M). El ADN fue precipitado por centrifugación a 13000 rpm por 15 min, lavado dos veces con etanol al 70%, centrifugado a 10000 rpm por 5 min, secado a 45°C durante 2 horas y re-suspendido en 50 µl de agua Mili-Q. Los genes que codifican para las toxinas PirA y PirB fueron amplificados por un PCR anidado, utilizando los iniciadores AP4-F/R (Sritunyalucksana et al. 2015). La mezcla de reacción del primer paso de PCR estuvo constituida por buffer PCR (1x), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (0.2 mM), iniciadores (0.2 µM), 0.15 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®), agua Milli-Q y 1 µl de ADN extraído. En tanto que, la mezcla de la reacción del segundo paso de PCR fue similar a la anterior pero varió la concentración de iniciadores (0.15 µM) y Taq DNA polimerasa (0.1 U). La amplificación se realizó en un termociclador comenzando con una temperatura inicial de 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 90 seg y una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados fueron verificados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen). Los aislados bacterianos reactivados obtenidos de larvas y agua de los tanques que resultaron positivos para AHPND, fueron también sometidos al proceso de detección de la bacteria, para lo cual, una solución de 500 µL de buffer de lysis, 75 µL de SDS (10%) y 50 µl de la bacteria, fue colocada en baño maría para digestión a 55°C por 2 horas. El proceso posterior de extracción y amplificación de ADN fue similar al realizado para las muestras a las cuales se les realizó el enriquecido bacteriano.

2.5 Determinación del índice de estadio larval (IEL)

Se calculó un índice de estadio larval basado en cambios morfológicos de las larvas. El estadio larvario de las larvas de cada muestra (n = 50) fue determinado y calculado el porcentaje de animales en cada estadio. Los estadios N5, Z1, Z2, Z3, MYSIS 1, M2, M3, PL1, PL2, PL3 y PL4 fueron categorizados con los valores de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente. El índice de estadio larval final se determinó con un promedio ponderado, donde el peso y valores del promedio ponderado fueron el porcentaje de larvas que presentaron un determinado estadio y los valores entre 0 y 8, respectivamente.

2.6 Análisis histopatológico

Una muestra de larvas (n=20) colectada el día anterior en los tanques y que resultaron positivos para AHPND fue analizada para cambios histopatológicos. Las muestras fueron preservadas con solución Davidson AFA (alcohol, formalina, y ácido acético glacial). Los tejidos fueron procesados siguiendo la metodología de Bell & Lightner (1988) y examinados para observación de cambios histopatológicos.

3. RESULTADOS

Microbiología de Animal

Los animales presentaron una carga bacteriana alta de aerobios, vibrios y enterobacterias desde nauplio, los que presentaron *Aerobios sp.* 10⁹ UFC/g., Vibrios 10⁵ UFC/g., Vibrios luminiscentes 10⁴ UFC/g. y *Pseudomonas sp.* 10⁴ UFC/g. valores que se mantuvieron durante el ciclo larvario a

excepción de los vibrios luminiscentes que tendieron a aumentar desde PL2 en ambos protocolos (Figura 1).

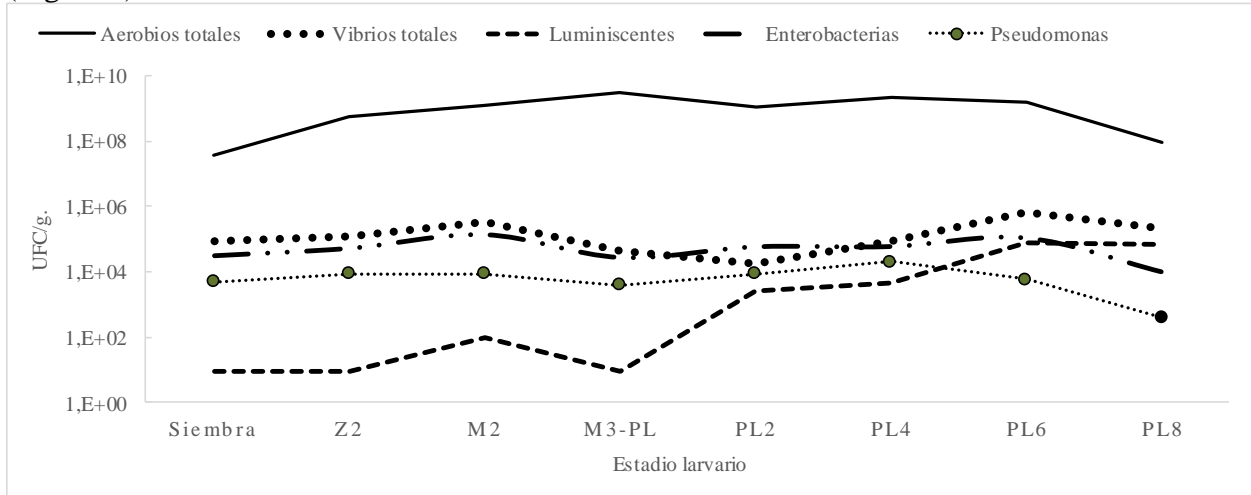


Figura 1. Promedio de carga bacteriana total en animal de protocolo 1 y 2 (UFC/g.) desde nauplio a PL8 durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

Microbiología de Agua

El agua de los tanques 1A, 1B y 2A, 2B al día de siembra de los nauplios presentó concentraciones de 10^6 UFC/mL de *Vibrios sp.* totales, 10^1 UFC/mL Vibrios luminiscentes y 10^6 UFC/mL *Aeromonas sp.* (Figura 2, 3, 4).

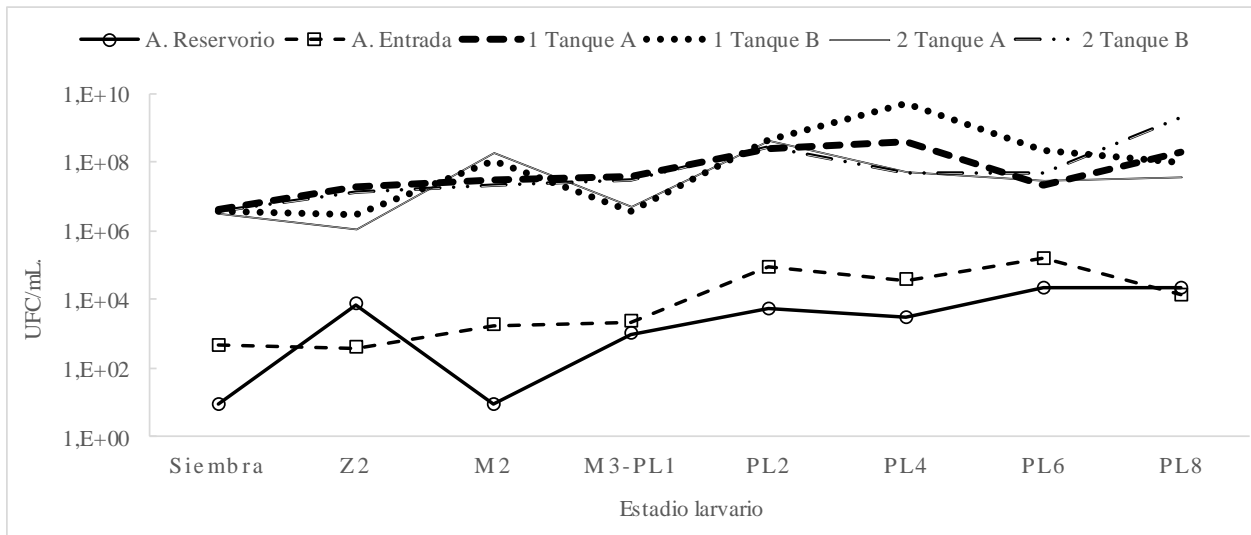


Figura 2. Carga bacteriana total (UFC/mL.) de Aerobios totales en agua de reservorio, entrada al tanque y tanques 1A, 1B y 2A, 2B durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

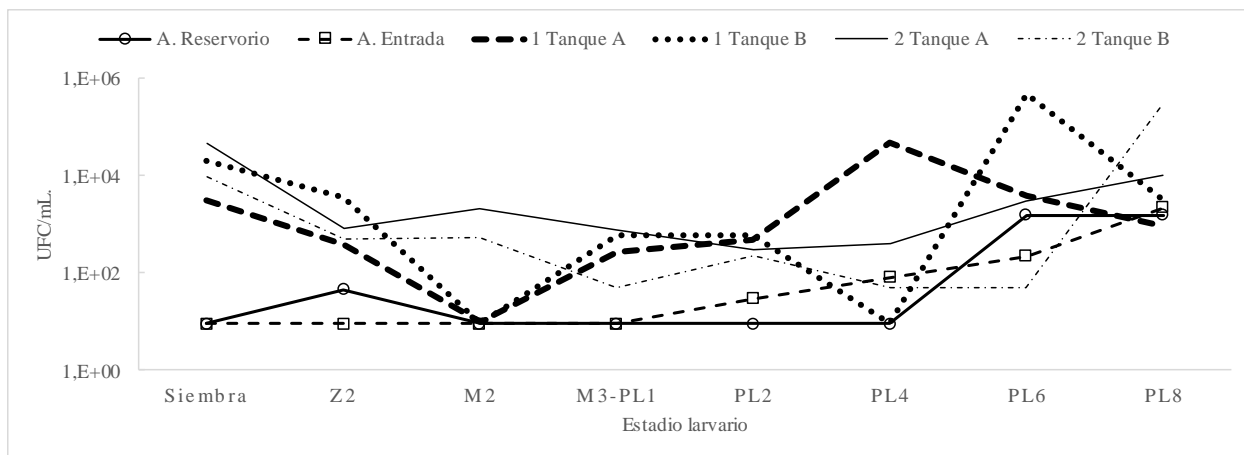


Figura 3. Carga bacteriana total (UFC/mL) de *Vibrios* totales en agua de reservorio, entrada al tanque y tanques 1A, 1B y 2A, 2B durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

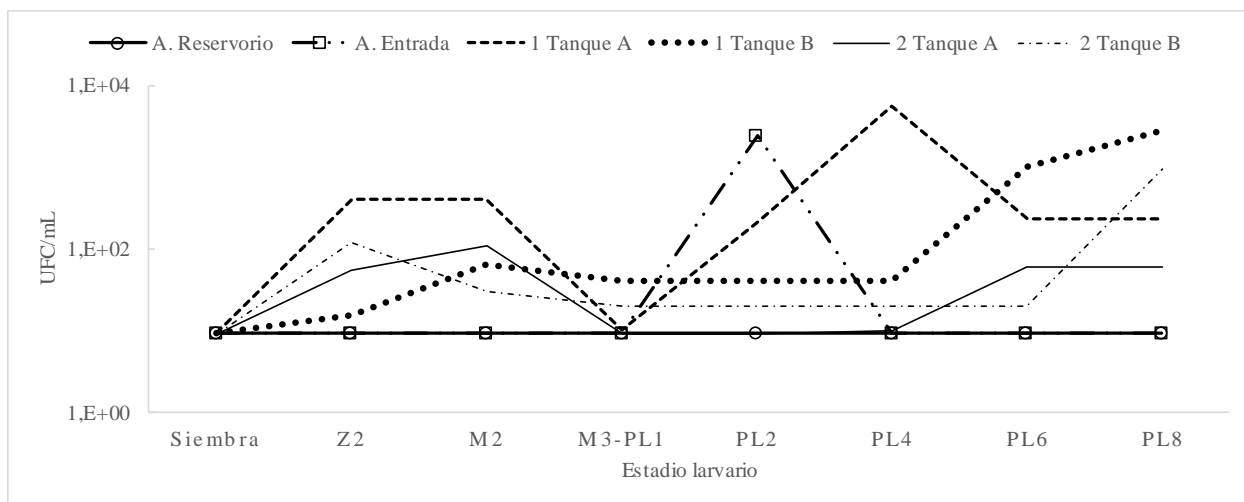


Figura 4. Carga bacteriana total (UFC/mL) de *Pseudomonas* en agua de reservorio, entrada al tanque y tanques 1A, 1B y 2A, 2B durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

Los conteos de aerobios en el agua de los tanques fue influenciado por la adición de 6 probióticos en el protocolo 1 y 8 probióticos en el protocolo 2 (Tabla 1) observándose concentraciones desde 3^6 a 5^9 UFC/mL. Más esta aplicación no significó que géneros considerados problemas caso *Vibrios sp.* y *Pseudomonas sp.* sean controlados.

Aislamiento de Bacteria Predominantes

Durante todo el ciclo larvario se observó en las larvas 6 formas bacterianas predominantes y en agua de tanque 4 formas bacterianas, que fueron identificadas como *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Serratia liquefaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Siendo constante *A. hydrophila* en agua y animales en ambos protocolos, mientras que el *V. alginolyticus* en el protocolo 2 fue predominante tanto en agua y animal (Figura 5, 6).

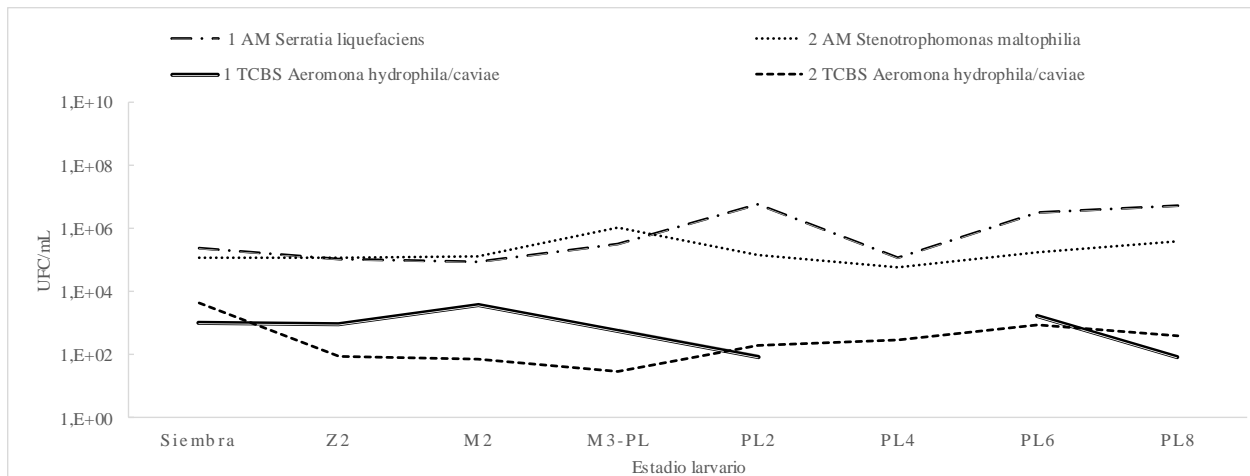


Figura 5. Aislados predominantes durante el ciclo larvario bajo dos protocolos de manejo en agua de tanques.

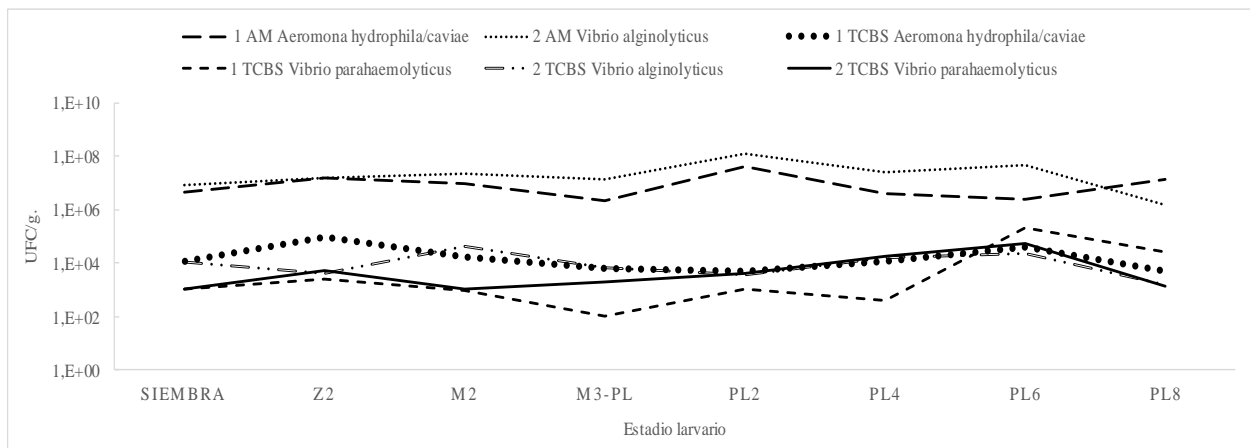


Figura 6. Aislados predominantes durante el ciclo larvario bajo dos protocolos de manejo en animales.

Considerando los resultados de AHPND en animal se seleccionó el estadio mysis 2 para la identificación bioquímica de los aislados tipo Gram negativos, encontrándose 10 especies (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de aislados identificados en el estadio Mysis 2

	P1		P2	
	Agua	Larvas	Agua	Larvas
<i>Aeromona hydrophila/caviae</i>	20	13	13	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	7	0	19	36
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7	40	6	0
<i>Serratia plymutica</i>	0	13	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	20	0	13	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	6	0
<i>Protobacterium damsalae</i>	7	0	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	7	0	0	9

<i>Pseudomona luteola</i>	0	0	0	27
<i>Pseudomona oryzihabitans</i>	7	0	0	0
Gram negativos NI	7	7	0	18
Gram positivos	20	27	44	9

La presencia del gen de la toxina causal del AHPND fue evidenciado el agua de los tanques al momento de siembra de los nauplios. siendo detectado en las larvas a partir de Mysis 3-PL1 en dos tanques de cada protocolo. El AHPND también fue detectado en de agua (mar, reservorio, entrada del tanque y agua de tanques), algas, probióticos (activados y no activados) y *Artemia salina* (Foto 1 y tabla 3).



Foto 1. Visualización de la amplificación del primer AP4 (fragmento de 100 pb) en gel de agarosa para la detección de AHPND para pools de bacterias. En el gel se observa los positivos para las muestras Agua de reservorio **1**, Agua de Mar **2**, Agua de entrada al tanque **3**, Control Positivo **17** Control Negativo **18, 19** y Estándar de Peso Molecular **EPM**

Muestras	Estadios							
	Siembra	Z2	M2	M3-PL1	PL2	PL4	PL6	PL8
Agua de mar	-	-	-	-	-	-	+	-
Agua de resorvio	-	-	-	-	-	-	-	+
Agua de ingreso a tanques	+	+	+	+	-	-	+	-
Agua de tanques	1A	-	-	-	-	-	-	-
	1B	+	-	-	-	-	-	-
	2A	-	-	-	+	-	-	-
	2B	-	+	+	-	-	-	-
Artemia	-	-	-	+	-	-	-	-
Algas	-	-	-	+	-	-	-	-
Probióticos	+	-	-	+	-	-	-	-
Animales	1A	-	-	-	-	-	-	-
	1B	-	-	-	+	-	-	-

Nauplio	2A	-	-	-	-	-	-	-	-
	2B	-	-	-	+	-	-	-	-
		-							

Tabla 3. Detección de gen de la toxina causal AHPND en todas posibles fuentes de infección, teniendo positivo (+), negativo (-).

El índice larvario indicó que los animales bajo el protocolo 1 presentaron mejor disposición al cambio de estadio entre Zoea 3 a Mysis 1 presentando el 86% Mysis 1, mientras que en el protocolo 2 sólo se presentó el 32%. Como resultado las larvas en PL1 mostraron 2 estadios predominantes mientras que en el protocolo 2 se observó 4 estadios siendo el 7% de la población en PL7. En el paso de PL1 las larvas del Protocolo 1 el 45% ya estaban en ese estadio mientras solo el 7% en el protocolo 2, siendo en el segundo protocolo el que tuvo mayores estadios larvarios atrasados.

Al final de cultivo la supervivencia e índice larvario fue mejor el protocolo 1 vs al protocolo 2 (tabla 4).

Tabla 4. Resultados finales de un ciclo larvario con dos protocolos en agua

		Supervivencia (%)	IEL
P1	Tq. 1A	72,0	6,31
	Tq. 1B	71,1	6,49
P2	Tq. 2A	14,2	5,3
	Tq. 2B	72,7	5,99

Histología

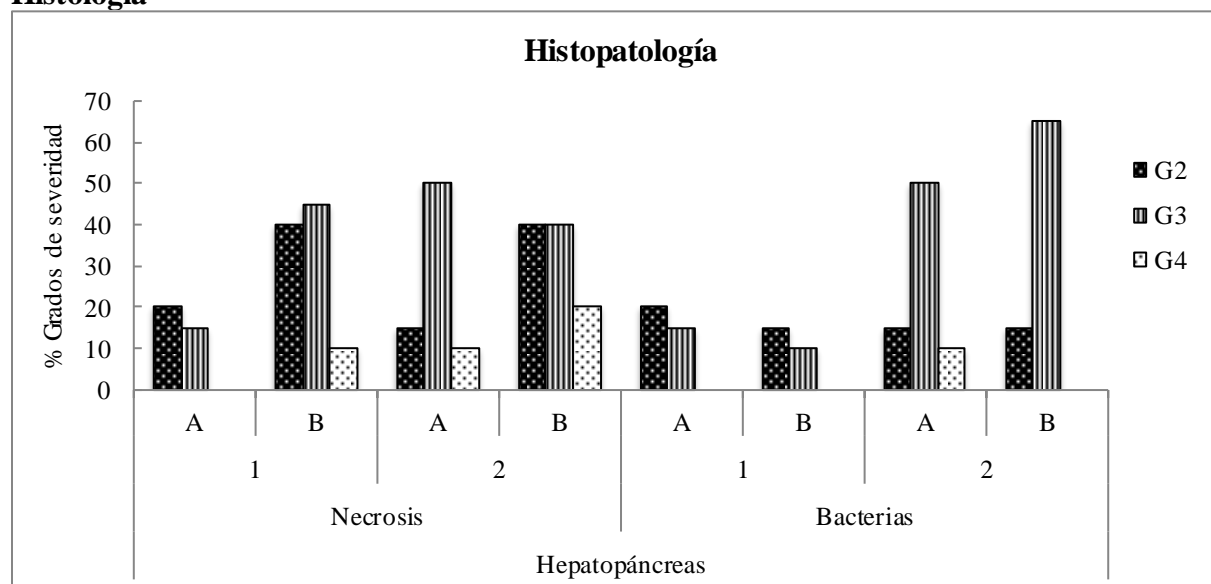


Figura 7. Grados de severidad de necrosis y bacterias a nivel de hepatopáncreas de animal de los tanques 1A, 2A y 2B. Los análisis histopatológicos indicaron que los animales mostraron necrosis a nivel de hepatopáncreas grado 2, 3 en ambos protocolos, siendo el protocolo 2 con mayor porcentaje de severidad

4. DISCUSIÓN

Los protocolos de manejo de las larviculturas ecuatorianas han modificado sus buenas practicas de manejo a fin de incrementar en sus producciones evitando problemas de indole viral en la ultima decada por ejemplo: incrementando el uso de temperaturas, la utilizacion de mezcla de dietas secas y formulas con probióticos. En este estudio los animales analizados provinieron de diferentes protocolos en donde difiriendo en el tipo de alimento seco, en la proporsion y tipo de probioticos aplicados.

Análisis Microbiologico

El análisis microbiológico de agua de tanques y larvas determinó conteos de Aerobios máximos a 10^9 UFC/mL en agua y en animal 10^9 y Vibrios totales en agua 10^5 en larvas 10^5 .

Las deficiencias en la desinfección del suministro de agua y nauplios junto a un exceso de productos, hicieron necesario un fuerte recambio a los tanques en un estadio tan vulnerable como es mysis 2 que ya presentaba problemas bacterianos y daños que conllevó posteriormente en mysis 3-PL1 el aumento de los conteos bacterianos y que positividad de larvas a WSSV, AHPND. (De Schryver, Defoirdt, & Sorgeloos, 2014), han demostrado que la desinfección puede influir en la propagación de la EMS/AHPND en lugar de controlarla, puesto que como sucedió en este experimento después del recambio, la alta disponibilidad de nutrientes junto a la desatilización microbiana de los tanques favoreció el crecimiento de los vibrios luminiscentes considerados patógenos, por lo que es recomendable que la desinfección del agua sea un punto primordial, puesto tenemos bacterias tradicionalmente problemáticas portadoras del gen a AHPND, por lo que las medidas de bioseguridad junto a las prácticas de manejo deben ser encausadas a reducir su impacto en las producciones.

Debemos considerar que se observó más aislados tipo Gram positivos en los animales del protocolo 1 en el estadio mysis 2, lo que podrían indicar que los productos bacterianos de este protocolo tienen más capacidad de colonización, y posiblemente fue lo que incidió en la supervivencia de los animales, a semejanza a lo encontrado con estos productos en camarones juveniles, pero no podemos verificarlo.

Analisis Histologico

La histopatología de los animales en estadio mysis 2 en ambos protocolos indica necrosis del hepatopáncreas grado 2-4 que podría asociarse con la presencia y predominancia de los *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* respectivamente, vibrios reportados como patógenos en larviculturas de *P. vannamei* por (Vandenbergh, y otros, 1999) y (Aguirre-Guzmán, López-Acevedo, & Vázquez-Sauceda, 2013), y causales de AHPND en juveniles (Li, y otros, 2017) falta el *V. alginolyticus*. Sin embargo, deben realizarse observaciones en estadios previos y posteriores a mysis 2 a fin de confirmar o descartar que estos daños son provocados por la toxina causal de AHPND, o por otras toxinas aún no determinadas típicas del Síndrome de Zoea 2 o Bolitas negricans. (Robertson, Calderon, Carrera, & Stark, 1998)

Lamentablemente afirmar que la mortalidad observada sobre todo en el protocolo 2 sea causada no puede ser asociada a AHPND, puesto existieron muchos problemas a lo largo del cultivo como son altos conteos bacterianas, presencia de bacterias patógenas predominantes en el tiempo como el *V. parahaemolyticus* o *V. alginolyticus* junto a problemas técnicos como deficiencia en la oxigenación, exceso de carga orgánica, recambio del 50% en mysis 2 que pudieron ser los causales de estas mortalidades, a más que tanques del protocolo 1 y 2 positivos a AHPND en agua o animal tuvieron sobrevivencias entre el 71%.

La eficiencia de los probióticos utilizados en los dos protocolos estaría asociados a la presencia de aislados Gram positivos y mayor diversidad de especies en el protocolo 1, donde el tipo utilizado posiblemente influyeron en las supervivencias a semejanza a lo encontrado con estos productos en camarones juveniles. (Balcázar, Rojas-Luna, & Cunningham, 2007)

Análisis de Presencia de AHPND

La presencia de AHPND en el agua de mar, es un problema como sugiere (Nunan, Lightner, Pantoja, & Gomez-Jime, 81-86) por lo que el peligro a esta enfermedad es persistente, por lo que las medidas de seguridad junto con las a las prácticas de manejo deben ser encausadas a reducir su impacto en las producciones. Es recomendable tener buenas practicas de manejo y sobre todo junto la desinfeccion del agua de ingreso a los cultivos a fin de que la carga microbiologica sea aceptable y evitar la profileracion de patogenos tipo AHPND.

Es recomendable una correcta desinfección de los tanques de cultivo y un buen manejo de los criterios de bioseguridad, esto baja las cargas bacterianas que vuelven susceptible a algún evento.

5. CONCLUSIÓN

Los animales presentaron una carga bacteriana alta de 10^9 UFC/gr *Aerobios sp.* y 10^4 UFC/gr *Pseudomonas sp.*, mientras que en el agua de los tanques presentan valores 10^6 UFC/mL de Vibrios totales, 10^1 UFC/mL Vibrios luminiscentes, 10^6 UFC/mL *Aeromonas sp.* y 10^6 a 10^9 UFC/mL Aerobios totales, valores que superan a los estandares permitidos en un cultivo.

Se obtuvo 6 formas bacterianas predominante en animal y 4 formas bacterianas en agua de tanque, las cuales son identificadas como *Aeromona hydrophila/caviae*, *Serratia liquefaciens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Siendo constante en agua y animal fueron *A. hydrophila* para ambos protocolos, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* para el protocolo 1 y 2 respectivamente en animal

La presencia del gen de la toxina causal del AHPND dio positivo desde el inicio del cultivo en el agua de los tanques y en animal apartir del estadio Mysis 3-PL1. También fue detectado en de agua mar, reservorio, entrada del tanque y agua de tanques, algas, probióticos (activados y no activados) y *Artemia salina*.

El 70% de las muestras analizadas en el estadio Misis 2 presentaron necrosis a nivel del hepatopáncreas grado 3 o 4 en ambos protocolos, siendo el protocolo 2 con mayor porcentaje de severidad

La mortalidad de los animales no puede ser relacionada por la presencia de AHPND pues existieron factores extrínsecos como problemas de desinfección y deficiencia de oxígeno que influyeron durante el cultivo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), en el marco del proyecto de investigación PIC-14-CENAIM-003 “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura y repoblación”.

REFERENCIAS

- Acuicultura, C. N. (11 de 08 de 2015). CNA. Obtenido de <http://www.cna-ecuador.com/prensa/1735-11-08-2015-produccion-de-larvas-de-camaron-bajo-30>
- Aguirre-Guzmán, G., López-Acevedo, E., & Vázquez-Sauceda, M. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobre vivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*, 4(2).
- Arguello Lavayen, B. (2014). Identificación molecular de comunidades bacterianas gram negativas en agua de un sistema pre-criadero de *Litopenaeus vannamei*. *Bachelor's thesis*.
- Balcázar, J., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147-150.
- Cuellar-Angel, J. (2013). Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPND). *Videoconferencia de la Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA*.
- Dangtipa, S., Sirikharinb, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Kallaya, S., Taengchaiyaphumb, S., & otros. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolated of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture reports*, 2, 158-162.
- De Schryver, P., Defoirdt, T., & Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS pathogens*, 10(4), e1003919.
- Espinoza Pico, J. (2014). Estudio Microbiológico del Agua en Diferentes Puntos de Recorrido en un Laboratorio de Larvicultura. *Bachelor's thesis*.
- FAO. (s.f.). FAO. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB487S/AB487S08.htm>
- FAO. (s.f.). FAO. Obtenido de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/es
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 5(2), 123-127.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V., Chen, I., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., y otros. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428, 297-302.
- Lightner, D. (1992). Shrimp Pathology mayor disease concern to the farming industry in Americas. *Memorias del primer congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 18-23 de octubre de 1992*, (págs. 177 - 195). Guayaquil, Ecuador.

- Lightner, D. (2013). Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS). *Videoconferencia de la Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA*.
- Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Noble, B., Nunan, L., Loc Tran, & otros. (2013). Documentation of a Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia & Varela. A.
- Li, P., Kinch, L., Ray, A., Dalia, A. B., Cong, Q., Nunan, L. M., y otros. (2017). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-Causing *Vibrio parahaemolyticus* Strains Maintain an Antibacterial Type VI Secretion System with Versatile Effector Repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13), e00737-17., 83(13), e00737-17.
- Mejía, A., & Navarro, I. (2012). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión.
- Morales, I. (1992). Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. *Memorias del primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*, 1993, (págs. 203-207).
- NACA. (2012). Network of Aquaculture Centers in AsiaPacific Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS) / Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS).
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jime. (81-86). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of aquatic organisms*, 111(1), 111(1).
- Pérez-Morales, A., Band-Schmidt, C., & Martínez-Díaz, S. (2016). Changes in mortality rates during the larval stage of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the basis of algal (*Chaetoceros*, *calcitrans* or *Tetraselmis*, *suecica*) food density. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(9), 415-420.
- Robertson, P., Calderon, J., Carrera, L., Zherdmant, M., & Austin, B. (1988). Experimental vibrio harveyi infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2, 151-155.
- San Miguel Figueroa, L. (2009). Caracterización de una bacteria probiótica en *Penaeus vannamei* y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena. *Bachelor's thesis*.
- Soto-Rodríguez, S., Gómez-Gil, Lozano-Olvera, R., Bentancourt-Lozano, & Morales-Covarrubias. (29 de Dec de 2014). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Environm Microbiol*.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohny, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., & et al. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*(105), 45-55.
- Unidos, D. d. (1993). *Los laboratorios de larvas de camarón en el Ecuador*. Guayaquil-Ecuador.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., y otros. (1999). Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2592-2597.
- Varela, A., & Peña, N. (2013). El Virus del Síndrome de las Manchas Blancas (WSSV): una revisión y su impacto en la camaronicultura costarricense. *Revista Ciencias Veterinarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Costa Rica.*, 2, 51-69.