

**CAPACIDAD PROTECTORA DE UN SISTEMA ACUÍCOLA CON RECIRCULAMIENTO (SAR) PARA *Penaeus vannamei* CONTRA *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE AHPND**

**PROTECTIVE CAPACITY OF A RECIRCULATED AQUACULTURE SYSTEM (SAR) FOR *PENAEUS VANNAMEI* AGAINST AHPND-CAUSING *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS***

Renato Leal-Espinoza\*, Píndaro Álvarez-Ruíz\*\*, Francisco Valdez-González\*\*\*, Carina Gámez-Jiménez\*\* Jorge Soto Alcalá\*

\*Universidad Autónoma de Occidente-Unidad Regional Guasave

\*\* Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.

\*\*\*Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera-Universidad Autónoma de Nayarit-San Blas, Nayarit

**Recibido:** 14 de mayo de 2021

**Aceptado:** 27 de junio de 2021

**Resumen**

La aparición de bacterias en cultivos de *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) resistentes a los antibióticos, ha impulsado la investigación para encontrar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Además, durante el segundo ciclo de cultivo de camarón en 2017 se presentaron casos de mortalidad en etapas tempranas, posiblemente por la aparición de cepas bacterianas como el *Vibrio parahaemolyticus* causante del Síndrome de la Mortalidad Temprana (SMT). Esto sugiere que los patógenos ya están establecidos en los sistemas de producción o en los ecosistemas circundantes, y por lo tanto es necesario diseñar estrategias biotecnológicas de evaluación, prevención, contención y erradicación de patógenos, que se puedan implementar en las primeras etapas del cultivo, y que además sean amigables con el ambiente. Por esta razón en el presente trabajo se evaluó una estrategia para contrarrestar patógenos bacterianos en camarón, desde un enfoque sustentable y ecológico. En este

sentido, se evaluó la capacidad del biofiltro en sistemas acuícolas con recirculación (SAR) para contrarrestar a una cepa de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Los resultados mostraron que los SAR promueven el establecimiento de bacterias del género Bacillos sobre el género *Vibrio* en los sistemas de cultivo y confieren protección contra el *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Además, se redujeron los niveles de amonio y nitritos de manera proporcional a la cantidad de sustrato en el biofiltro.

Los resultados obtenidos permitirán determinar que los recursos biotecnológicos aplicados de manera individual protegen en diferentes medidas contra infecciones bacterianas.

**Palabras clave:** SAR, AHPND, Biofiltro, *Penaeus vannamei*

**Abstract**

Currently, the white shrimp is the most important aquatic species cultivated in Mexico. However, viral and bacterial diseases remain a threat during larviculture. The emergence of antibiotic-resistant bacteria has prompted research to find new compounds with antimicrobial properties. In addition, during the second crop cycle in 2017, there were cases of mortality in very early stages of the culture, possibly due to the appearance of bacterial strains resistant to antibiotics such as *Vibrio parahaemolyticus* that cause Early Mortality Syndrome (SMT). This suggests that pathogens can come from postlarvae production laboratories (PLs) and therefore, it is necessary to design biotechnological strategies for the evaluation, prevention, containment and eradication of pathogens, which can be implemented in early stages of culture, and that are also friendly to the environment. For this reason, in the present work, strategies against bacterial pathogens in shrimp were evaluated, from a sustainable approach, techniques applicable to culture systems were designed to prevent the entry of bacterial pathogens.

In this sense, biofilters were evaluated in recirculating aquaculture systems (RAS) that have the ability to harbor microbiota that consume nitrogenous compounds dissolved in the water column, have immunostimulating properties and compete for space with potentially pathogenic bacteria. *V. parahaemolyticus* strain causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) was characterized and the method for performing infections under controlled conditions was standardized. The results showed that RASs promote the establishment of bacteria of the genus *Bacillus spp* and restricted the genus *Vibrio spp* in culture systems. In addition, the levels of ammonium and nitrites in the culture systems were reduced in proportion to the amount of substrate in the biofilter. The results obtained will make it possible to determine that the biotechnological resources applied individually protect in different measures against bacterial infections.

**Key words:** RAS, AHPND, Biofilter, *Penaeus vannamei*

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la acuicultura se ha desarrollado hasta convertirse en una de las actividades más importantes por su capacidad de producir alimentos de excelente calidad nutricional y de generar ingresos para millones de personas en el mundo.

Esta actividad presenta desde hace varios años un crecimiento acelerado (4.5% anual). Actualmente, casi el 88% de los productos pesqueros a nivel mundial están destinados a la alimentación, debido a la gran demanda del mercado por los productos acuáticos (FAO, 2018). Sin embargo, el crecimiento acelerado de la acuicultura ha ocasionado un impacto negativo en el ambiente, debido a que los efluentes de los sistemas de cultivo vierten grandes cantidades de compuestos orgánicos, contaminando los ecosistemas receptores de estas aguas residuales (James, 2009). Para amortiguar el impacto negativo de la acuicultura, se ha propuesto el desarrollo y la implementación de nuevas tec-

nologías acuícolas para el uso sustentable de los recursos (Martínez-Porchas y Martínez Córdova, 2012). Para el cultivo de organismos acuáticos se han utilizado dos tipos de sistemas: 1) Abiertos: como son los extensivos, semi-intensivo y de flujo abierto (FAO, 2018); y 2) De ciclo cerrado: como es el sistema de recirculación acuícola (SAR o RAS, por sus siglas en inglés) (Timmons y Ebeling, 2010; Avnimelech, 2006). Los primeros destacan por ser de bajo costo, por la poca inversión en infraestructura, bajo costos en suministro de alimento y porque los organismos cultivados aprovechan el alimento que en forma natural se produce en los cuerpos de agua, ya que estos cultivos se colocan cerca de las fuentes de agua naturales (FAO, 2013), sin embargo, estos cultivos suelen tener un impacto negativo sobre el ambiente si no se proporciona un tratamiento adecuado de las aguas residuales. En el caso de los sistemas de ciclo cerrado, en las últimas décadas se han evaluado y aplicado en la acuicultura, por su capacidad de disminuir los impactos negativos al medio natural.

Estos sistemas se basan en una reducción del uso del recurso hídrico y promueven un aumento en la densidad de los cultivos, ya que se tienen controladas las condiciones ambientales (Timmons y Ebeling, 2010; FAO, 2013). Otras de las características que distinguen a los sistemas cerrados es la baja o nula tasa de recambio de agua y la bioseguridad dentro del cultivo (Ahmad *et al.*, 2017). Los SAR se basan en el tratamiento y reutilización del agua, aprovechando la capacidad de las comunidades bacterianas que oxidan y consumen los compuestos nitrogenados y la materia orgánica (Timmons y Ebeling, 2010; Jiménez-Ojeda *et al.*, 2018). Los camarones pueden acumular diversas especies de bacterias en su tracto intestinal, branquias y exoesqueleto (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994).

Los *Vibrios*, uno de los géneros que conforman esta microbiota, son microorganismos

oportunistas que responden a los cambios en las condiciones ambientales provocadas por la acuicultura, llegando a tener en algunos casos características tóxicas y patogénicas para los camarones. *Vibrio* es una bacteria Gram negativa de la familia *Vibrionaceae*, en forma de coma, móviles, tolerantes a salinidades y anaerobia facultativa (Thompson *et al.*, 2004). Las enfermedades causadas por esta bacteria son descritas como: vibriosis, enfermedad bacteriana de los peneidos, vibriosis luminiscente, enfermedad de las patas rojas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004) y el síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (VpAHPND). Debido que el AHPND se presenta en los primeros estadios de la engorda del camarón, los productores podrían adoptar estrategias como el SAR como una alternativa aplicable a precrías, disminuyendo así los estadios críticos de la enfermedad. Además, se tiene evidencia que utilizando filtros biológicos en los SAR es posible promover la inmunoestimulación de los organismos mostrando aumentos transcripcionales a nivel genético (Soto-Alcalá *et al.*, 2019) pudiendo hacer más resistentes a los camarones contra la enfermedad producida por *V. parahaemolyticus*. De esta manera, es importante investigar si el material con el que se encuentra constituido el filtro biológico como fibras de polietileno promueve la fijación de bacterias benéficas como *Bacillus sp.* para los organismos y por ende la disminución del impacto producto de la enfermedad por vibriosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos experimentales

Las postlarvas de camarón utilizadas en los experimentos fueron obtenidas de diferentes laboratorios comerciales de producción de postlarvas (PL12 = 80 mg±20 mg). Se obtuvieron lotes (~ 5000 organismos) de unidades de producción (UP) aledañas al CIIDIR-Sinaloa justo antes de ser sembradas en los estanques o de maternidades en la misma UP. Se transportaron en un tinaco de 450 l a las instalaciones del Departamento de Acuicultura del CIIDIR-Sinaloa, se colocaron en una tina de aclimatación. Antes de realizar los experimentos, cada lote fue analizado mediante PCR para descartar

mediante un análisis de PCR la presencia de virus de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la necrosis hipodermal hematopoyética (IHHNV) y de la bacteria causante de VpAHPND (*Vibrio parahaemolyticus*). Para tal efecto, se tomaron 30 organismos por lote y se analizaron de manera individual. Una vez determinada la ausencia de patógenos, los camarones fueron utilizados para realizar los bioensayos correspondientes.

### Análisis bacteriológico

Se tomaron muestras para evaluar las poblaciones de *Vibrio spp* y *Bacillus spp*. Para evaluar la concentración de *Vibrio spp*, en cada muestreo se realizaron diluciones seriales con factor 10, con dos réplicas por dilución, se sembraron en placa 100 µl de cada dilución en medio Agar Tiosulfato Citrato Billis Sacarosa (TCBS) con 2.5 de NaCl y se incubaron durante 18 h a 30 °C. También se evaluaron la cantidad de *Bacillus spp* al inicio, mitad y final de cada bioensayo. Las muestras fueron calentadas a 80 °C por 10 min antes de ser diluidas y sembradas en medio Tripticasa de Soya Agar (TCA) para incubarse a 35 °C por 18 h (López-León *et al.*, 2016)

### Sistemas experimentales de recirculación

Cada sistema de recirculación para evaluar la proporción de sustrato en el biofiltro con respecto a la densidad de camarones en cultivo consistió en tres contenedores unidos entre sí: 1) Un área de cultivo (acuario de 50 L), 2) Un sedimentador (contenedor de 2.5 L) y 3) Un biofiltro (contenedor de 2.5 L donde se colocarán las fibras de PET). El flujo de agua recirculó del contenedor 1 al 3 impulsado por aireación a través de una tubería de PVC. Se probaron 3 cantidades de PET y cada tratamiento fue realizado por triplicado (López-León *et al.*, 2016) Se colocaron 150 organismos por unidad experimental y se alimentaron dos veces al día ajustando la ración de acuerdo al consumo diario.

### Evaluación de la calidad de agua

Las variables de calidad del agua se registraron semanalmente en cada una de las réplicas del experimento. Para evaluar la concentración de amonio ( $\text{NH}_4$ ), nitritos ( $\text{NO}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ) se siguieron las metodologías descritas por Strickland y Parsons (1972) y APHA (1998). Los parámetros físico-químicos como temperatura y oxígeno se midieron dos veces por día con un oxímetro (YSI® model 55), la salinidad con un refractómetro (Vital SINE®) y el pH con un potenciómetro (HANNA®).

### Detección de virus y bacterias mediante PCR en organismos experimentales

Para certificar la sanidad de los lotes de postlarvas experimentales, se realizaron pruebas de PCR dirigidas a detectar la presencia los patógenos virales WSSV e IHNV así como del *V. parahaemolyticus* causante de VpAHPND utilizando oligonucleótidos específicos para cada especie. La detección se realizó en ADN extraído de postlarvas individuales utilizando el organismo completo para cada extracción utilizando la metodología de DNAzol (Invitrogen)

### Cinética bacteriana

Para determinar las condiciones ideales de infección se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones de salinidad

(20, 30 y 35 ups) y temperatura (28, 30 y 33 °C). Las fases de crecimiento del *V. parahaemolyticus* se determinaron registrando la densidad óptica del cultivo a 580 nm durante 30 h a 30 °C de temperatura.

El medio fue inoculado inicialmente con 10,000 UFC/mL del *V. parahaemolyticus* y cada cinética se realizó por cuadruplicado en tubos falcon de 50 mL con 40 mL de muestras se tomaron a las 6, 8, 10, 12, 18, 24 y 30 h. Cada muestra se tomó en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Después de tomar cada muestra los cultivos fueron regresados a la incubadora para continuar con el crecimiento bacteriano.

Posteriormente cada muestra se centrifugó a 6000 xg por 3 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante para dejar una pastilla de bacterias en el fondo, se fijaron con 200  $\mu\text{L}$  de Trizol y se preservaron a -70 °C en un ultracongelador.

### Bioensayo de reto contra *Vibrio parahaemolyticus*

Para determinar el efecto contra VpAHPND en camarones cultivados en SAR se realizó un experimento de reto con camarones ( $3.0 \pm 1.0$  g) colocados en grupos de 10 en acuarios de 4 L con agua de mar a 30 UPS. El diseño experimental del reto se presenta en la tabla 1

Tabla 1: Diseño del experimento de reto contra *Vibrio parahaemolyticus*

No.	Tratamiento	No. de réplicas	Camarones/réplica	Infección
1	Camarones cultivados en SAR (Control -)	3	10	Sin infectar
2	Camarones cultivados sin recirculación de agua (Control +)	3	10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> $2.5 \times 10^4$ UFC
3	Camarones cultivados en SAR	3	10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> $2.5 \times 10^4$ UFC

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Análisis de PCR en organismos experimentales**

Se analizaron mediante PCR dos lotes de camarones experimentales. El análisis de PCR realizado a 30 organismos de cada lote indicó una baja presencia

del virus IHNV que alcanzó el 6 % en el lote 1 y 3 % en el lote 2. En contraste, no se detectaron organismos portadores de WSSV o de VpAHPND (Tabla 2). La incidencia de IHNV fue considerada como aceptable para realizar los experimentos.

Tabla 2. Resultados de la detección de patógenos mediante PCR

Organismo Lote 1	IHNV	WSSV	VpAHPND	Organismo Lote 2	IHNV	WSSV	VpAHPND
1	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
2	+	ND	ND	2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	7	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	8	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	9	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	10	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	11	+	ND	ND
12	+	ND	ND	12	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	13	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	14	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	15	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	16	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	17	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	18	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	19	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	21	ND	ND	ND
22	ND	ND	ND	22	ND	ND	ND
23	ND	ND	ND	23	ND	ND	ND
24	ND	ND	ND	24	ND	ND	ND
25	ND	ND	ND	25	ND	ND	ND
26	ND	ND	ND	26	ND	ND	ND
27	ND	ND	ND	27	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	28	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND	29	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	30	ND	ND	ND

ND No Detectado  
+ Muestra positiva

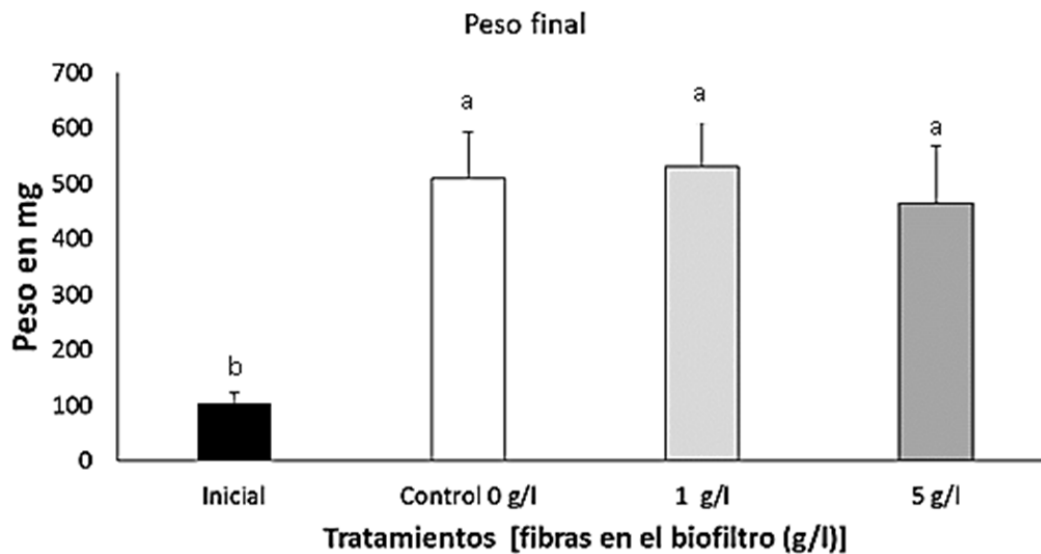
### Crecimiento y supervivencia de camarones en sistemas de recirculación

Los sistemas de recirculación acuícola son un conjunto de procesos y componentes que se utilizan para el cultivo de organismos acuáticos, donde el agua es continuamente limpiada y reutilizada (Otoshi *et al.*, 2003). Los sistemas de recirculación o sistemas cerrados presentan como ventaja, el uso racional del agua ya que el volumen de recambio es menor a un 10 % diario del volumen total del sistema.

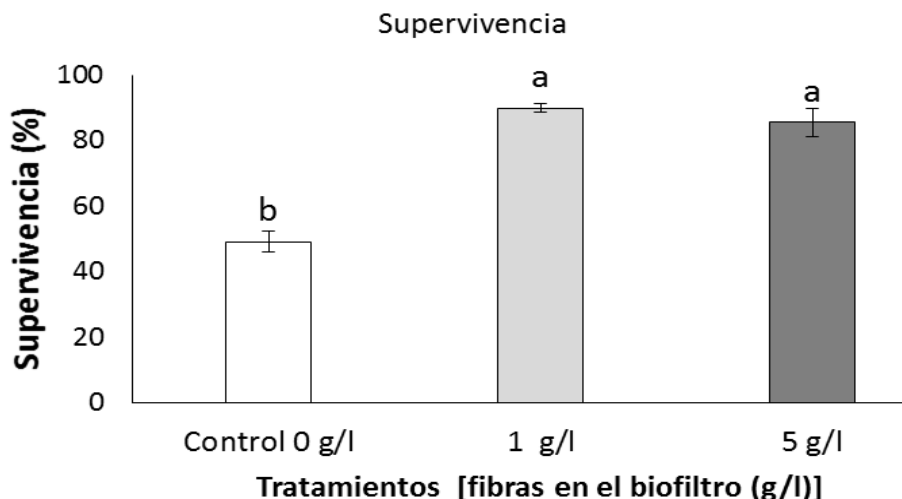
Este tipo de sistemas permite el monitoreo y control de los parámetros fisicoquímicos tales como: la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono, el potencial de hi-

drogeno (pH), la alcalinidad y los metabolitos como el nitrógeno amoniacal, los nitritos y los nitratos. El control de los parámetros fisicoquímicos permiten la producción continua a lo largo del año (Timmons *et al.*, 2002), además si se mantienen los parámetros fisicoquímicos adecuados los organismos cultivados pueden presentar mejores tasas de crecimiento y conversión alimenticia.

Al final del presente experimento, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los camarones cultivados en los diferentes sistemas de cultivo (Figura 1), sin embargo, la supervivencia fue menor en el control (Figura 2).



**Figura 1:** Peso final de los organismos después de 35 días de cultivo en sistemas de recirculación con fibras de PET. T1) 1g de fibras de PET por litro de agua, T2) 5 g de PET por litro de agua y control) sin fibras de PET. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos y el control aplicando una ANOVA de dos vías y prueba de Tuckey con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  en el paquete estadístico STATISTICA 7



**Figura 2:** Supervivencia después de 35 días de cultivo en sistemas de recirculación con fibras de PET. T1) 1gr de fibras de PET por litro de agua, T2) 5 gr de PET por litro de agua y control) sin fibras de PET. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos y el control aplicando una ANOVA de dos vías y prueba de Tuckey con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  en el paquete estadístico STATISTICA 7

No obstante, en un estudio realizado por Otoshi *et al.* (2003) con *L. vannamei*, se evaluó el crecimiento y el rendimiento reproductivo del camarón blanco cultivado en un SAR comparado con un cultivo en un sistema de flujo abierto. En los experimentos usaron organismos de 20 g hasta alcanzar pesos promedio de 40 - 60 g. Los resultados indicaron que el crecimiento del organismo fue mayor en los sistemas de flujo abierto con intervalos de 1.07 - 1.78 g/semana, mientras que en los SRA los organismos tuvieron un crecimiento de 0.83 - 1.53 g/semana. Los autores mencionan que la diferencia en el crecimiento de los organismos cultivados en los sistemas de flujo abierto, puede atribuirse a la producción primaria que contribuyó como alimentación suplementaria en la dieta del organismo.

#### ***Vibrio spp* y *Bacillus spp* en los sistemas de cultivo**

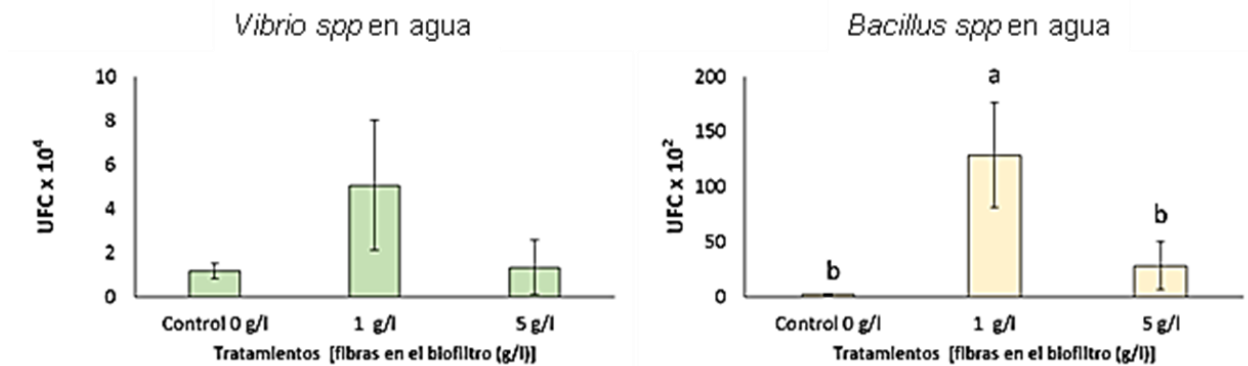
El conocimiento de la diversidad bacteriana durante el desarrollo de un cultivo, es importante para prevenir las enfermedades o comprenderlas cuando se presente, teniendo así un antecedente acerca de las alteraciones que se presentan en ciertos grupos bacterianos cuando las condiciones de

cultivo han sido alteradas a través del tiempo, permitiendo determinar cuáles grupos bacterianos proliferan o disminuyen cuando existe un cambio en el medio y así determinar que especies bacterianas fueron responsables de la mortalidad de los organismos en cultivo.

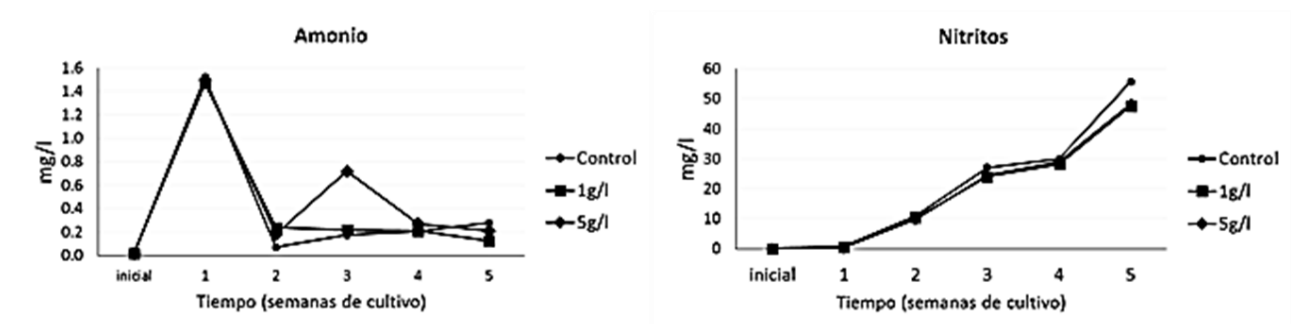
Se han utilizado técnicas clásicas para identificar bacterias en muestras del ambiente marino, en este sentido, Theron y Cloete (2000) reportaron técnicas dependientes de cultivo, combinadas con diferenciación, utilizando pruebas fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, estos métodos no reflejan la totalidad de la comunidad bacteriana debido a que sólo el 1 % de las bacterias pueden ser cultivadas en el laboratorio (Amann *et al.*, 1990) y en el caso de las bacterias marinas está estimado que puede ser menos del 0.1 % (Kogure *et al.*, 1980). Además, las técnicas de bacteriología tradicional requieren de tiempos prolongados para su realización y son de poca confiabilidad, debido a que la morfología de las bacterias es demasiado simple para ser empleada como una base sólida de clasificación (Amman *et al.*, 1995). Contrastante a este

este estudio, se cuantificaron el número de UFC/ml de *Vibrio* y *Bacillus* en los cultivos. Aunque fue mayor la cantidad de *Vibriosis* en el cultivo con 1 g de fibras por L de agua, las cantidades no presentaron diferencias significativas entre los

tratamientos (Figura 3). Por otra parte, el número de *Bacillus spp* fue significativamente mayor en el tratamiento con 1g de fibras por l de agua (Figura 3).



**Figura 3:** Cantidad de bacterias en los tratamientos. A) *Vibrio spp* totales y B) *Bacillus spp*. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos y el control aplicando una ANOVA de dos vías y prueba de Tuckey con un nivel de significancia de P<0.05 en el paquete estadístico STATISTICA 7



**Figura 4:** Valores de compuestos nitrogenados durante el cultivo. A) Amonio y B) Nitritos

### Calidad de agua

En el presente trabajo la concentración de amonio aumentó la primera semana de cultivo hasta alcanzar 1.52, 1.46 y 1.49 mg/l en el control, y en los tratamientos. A la semana 2 de cultivo la concentración bajó significativamente a niveles por debajo de 0.2 mg/l en los tres tratamientos, a la tercer semana el amonio se incrementó en el tratamiento con 5 g/l alcanzando 0.7 mg/l y en las semanas 4 y 5 los niveles se mantuvieron bajos en los tres tratamientos (Figura 4).

La concentración de nitritos aumentó significativamente desde la segunda semana y hasta finalizar el cultivo alcanzando 55, 47 y 48 mg/l respectivamente (Figura 4). En este sentido, Uemoto *et al.* (2014) elaboraron un filtro con la capacidad de realizar procesos de nitrificación y desnitrificación simultáneamente en un sistema de recirculación.



### Cinéticas bacterianas a diferentes salinidades

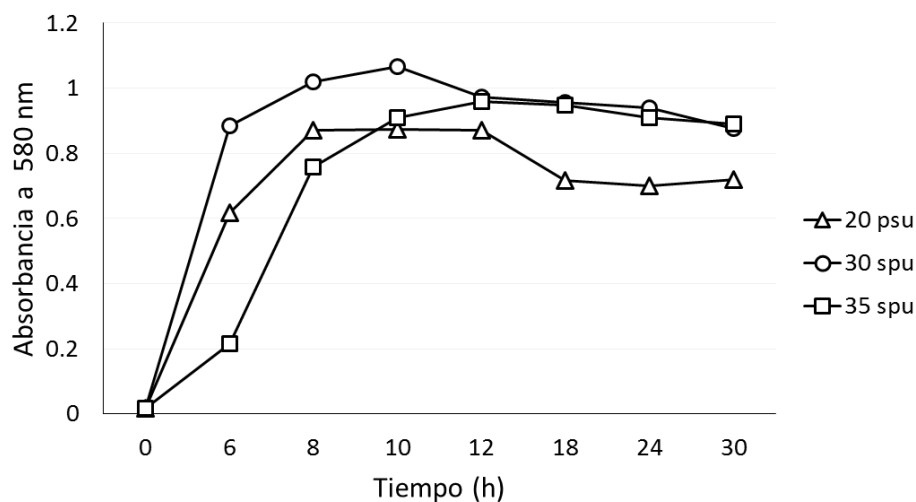
La variabilidad de crecimiento de *V. parahaemolyticus* se hizo notar en las distintas salinidades presentes en el medio inoculado, actuando mejor en salinidades altas alcanzando una absorbancia máxima de 0.958 a las 12 horas de incubación en una salinidad de 35 UPS.

El crecimiento en el medio con 20 UPS también presentó un crecimiento rápido alcanzado 0.87 de absorbancia en las primeras 8 horas y manteniéndose hasta las 12 horas, presentando el declive a las 18 horas de incubación.

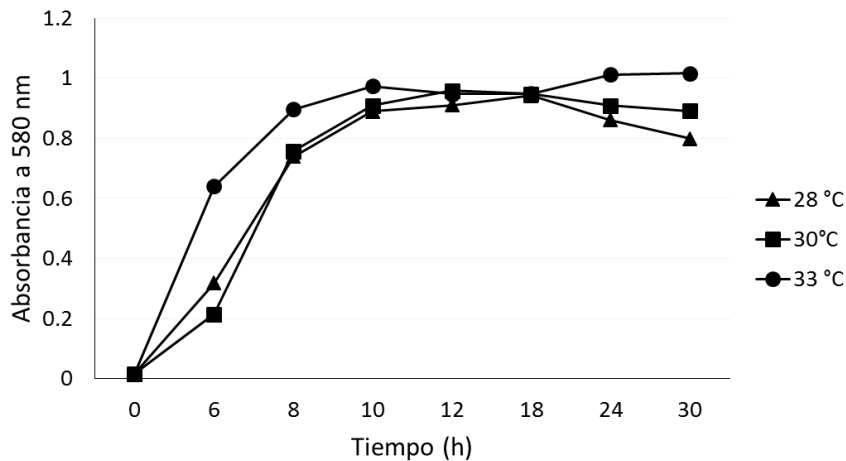
El crecimiento a 30 UPS fue el mayor alcanzando su máximo de 1.06 a las 12 h (Figura 5), a este respecto, Ramaiah y Chandramohan (1991) establecieron como valor óptimo de NaCl para el crecimiento en cepas de las especies *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* y *P. leiognathi*, 3% de NaCl. Estas especies además, no crecieron en ausencia de NaCl en el medio de cultivo, demostrando su naturaleza marina.

Por otro lado Soto *et al.*, (2009), observaron en cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de diversos nichos ecológicos (simbiontes y de vida libre) crecían en un rango de concentraciones de NaCl desde 1% hasta 7%, excepto para una cepa de vida libre que fue capaz de tolerar concentraciones de 9% de NaCl. Algunos autores plantean que concentraciones de NaCl por debajo de los 5 g/L pueden causar ruptura en la pared de la membrana celular, debido a la baja presión osmótica externa del medio (Silva y Duran, 2003).

En la cinética realizada a 25 °C, se obtuvo la fase exponencial de crecimiento entre las 8 y 10 horas. En el caso de la cinética a 28 °C, se obtuvo mayor crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* entre las 6 y 8 horas de incubación, con un ligero aumento entre 8 y 10 horas. De forma similar, en las muestras de 30 °C de temperatura se tuvo un crecimiento significativo entre las 6 y 8 horas, aumentando ligeramente entre 8 y 10 horas y manteniéndose constante entre 10 y 18 horas (Figura 6).



**Figura 5:** Cinética de crecimiento de la cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada en este estudio cultivada a diferentes salinidades



**Figura 6:** Cinética de crecimiento de la cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada en este estudio cultivada a diferentes temperaturas.

### Bioensayo de reto contra VpAHPND

Son escasos los estudios realizados en cultivo intensivo de camarón en sistemas cerrados de recirculación, debido al espacio restringido que comparten estos animales, promueve la competencia por el espacio y así las peleas entre organismos ocasionan laceraciones, raspones o heridas en el exoesqueleto, antenas, Periópodos o en cualquier parte del mismo siendo una puerta de entrada para bacterias oportunista que según Söderhäll y Cerenius (1992) constituye uno de los problemas más comunes que aparece con mayor intensidad en los sistemas con altas densidades de siembra.

Esta afección se considera una infección secundaria, aunque algunas especies o cepas causantes de este proceso como *Vibrios* han sido identificadas como patógenos primarios (Pang *et al.*, 2006).

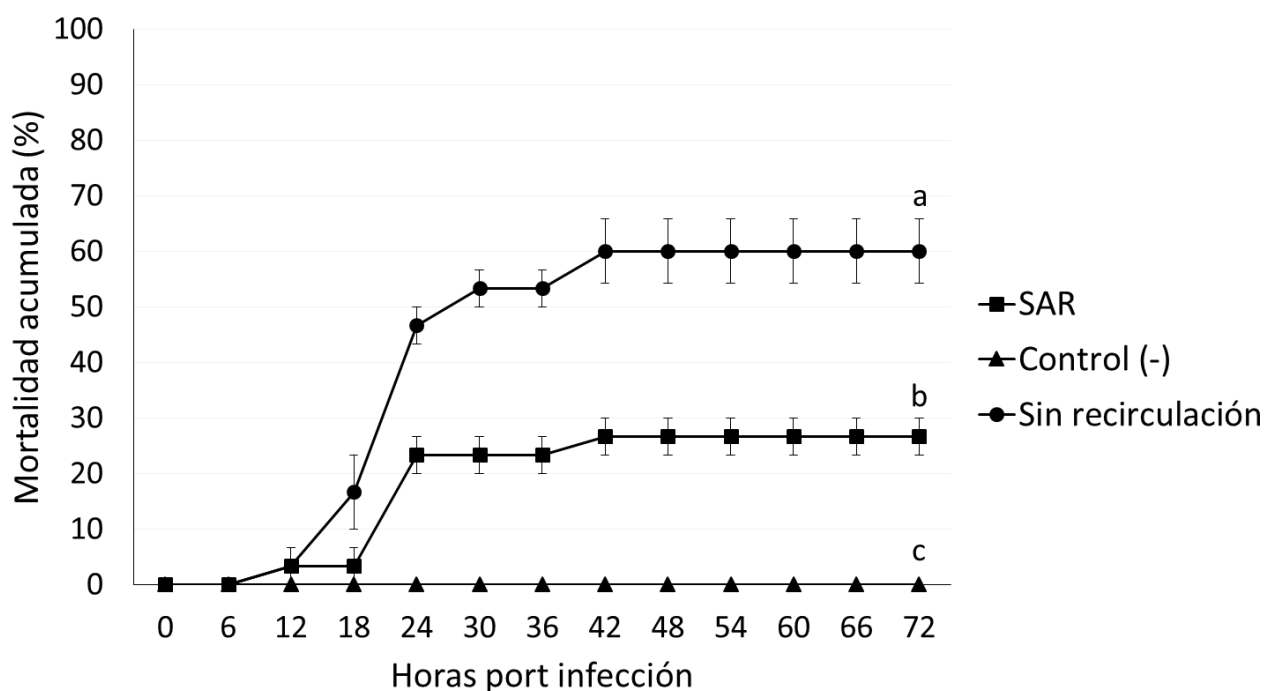
Las enfermedades generadas por estas bacterias han sido descritas como: Vibriosis, Enfermedad Bacterial, Septicemia Bacteriana de los Peneidos, Vibriosis de los Peneidos, Vibriosis Luminescente y Enfermedad de las Patas Rojas. Los camarones afectados por alguna especie patógena de

*Vibrio spp.*, muestran distintos signos de la enfermedad como letargia, intestino semi-vacío, anorexia, flexión dorsal abdominal, fuerte colonización bacteriana en la cutícula, opacidad en el músculo abdominal, cromatóforos visibles en la base de las apéndices, nódulos melanizados en el hepatopáncreas, retardo en la coagulación de la hemolinfa y reducción de hemocitos, esto principalmente en la etapa larvaria (López, 1998).

*Vibrio* habita en aguas marinas, sedimentos y en la superficie de animales marinos. Es también un miembro común de la flora intestinal natural de vertebrados e invertebrados acuáticos (Pang *et al.*, 2006). Esta bacteria es considerada un patógeno dominante que puede infectar postlarvas, ocasionando grandes mortalidades (Pang *et al.*, 2006). Existen diversos factores que contribuyen a la virulencia de esta especie bacteriana, entre los que se incluye la producción de algunas enzimas como proteasas, lipasas, fosfolipasas, hemolisinas y citotoxinas, entre otras (Lee *et al.*, 2008)

Morales (2008), indica que esta infección debe controlarse debido a que cuando no es detenida en la superficie cuticular, las bacterias pueden continuar degradando hasta penetrar al interior de los tejidos dañándolo severamente llegando a convertirse hasta en una vibriosis sistémica (González y Prado, 2003, Morales 2008) con la formación de nódulos sépticos hemocíticos en el órgano linfoide, corazón, tejido conectivo de las branquias, 28 glándula antenal, cordón nervioso, músculos y principalmente al hepatopáncreas (Jiravanichpaisal y Miyazaki, 1994) En el presente estudio, la mortalidad en el bioensayo de reto de los camarones experimentales contra VpAHPND fue menor en los camarones cultivados en el SAR alcanzando 26 % contra 60 % en los camarones

cultivados en un sistema sin recirculación y no se registró mortalidad en el control negativo (Figura 7). Los resultados concuerdan con lo dicho por Lightner, (2012), quien indica que, diferentes *Vibrio* se encuentran presentes en todos los crustáceos marinos y que se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural del hospedero están suprimidos. Los miembros del género *Vibrio* han sido asociados con la mortalidad de camarones peneidos en diferentes países del mundo, siendo *V. harvey*, *V. alginolyticu*, *V. parahaemolyticus*, y *V. mimicus* algunas de las especies reportadas en asociación con importantes daños en todas las fases de cultivo del camarón (Aguirre *et al.*, 2004).



**Figura 7:** Mortalidad acumulada en camarones cultivados en SAR retados contra VpAHPND. El control positivo son camarones cultivados en un sistema sin recirculación y el control negativo camarones cultivados en SAR sin infectar. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos y el control aplicando una ANOVA de dos vías y prueba de Tuckey con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  en el paquete estadístico STATISTICA 7

Por otra parte Gómez *et al.*, (1998), encontraron *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio spp* en hemolinfa de camarones aparentemente sanos, siendo común una carga inferior de  $1 \times 10^3$  UFC

## CONCLUSIONES

Se determinó que el uso de fibras de polietileno como sustrato en un biofiltro tiene limitaciones en el establecimiento de consorcios bacterianos benéficos para un sistema de cultivo. Por lo tanto, se sugiere utilizar fibras de polipropileno, las cuales ya han sido probadas con anterioridad mostrando resultados satisfactorios.

Se determinó que las variables físico químicas como temperatura y salinidad modifican la virulencia del *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND. Por lo tanto, se concluyó que los ensayos de reto deben realizarse a 30 °C y en agua a 30 UPS

Los resultados del presente estudio demuestran que camarones cultivados en SAR son menos propensos a eventos de mortalidad ocasionados por la presencia de patógenos bacterianos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento para este estudio, a través del proyecto multidisciplinario Clave-1972 módulos SIP20180526 y SIP20196634.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Guzmán, G. (2004). ¿Los *Vibrio sp.* Son agentes patógenos importantes para el cultivo de camarón? Boletín Informativo del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, México 1(25): 1-3.

Ahmad, I., Babitha Rani, A. M., Verma, A. K., Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25 (3), 1215-1226.

Amann, R., Krumholz, L. y Stahl, D. (1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770 p.

Amman, R., Ludwig, W. y Schleifer, K. (1995). Phylogenetic identificación and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143- 169 p.

Avnimelech, Y. (2006). Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 172-178.

FAO. (2013). National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Roma.

FAO (2018). The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>. Cited 10 jul 2018 Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>. Cited 10 jul 2018

González, J.B., Prado, P, (2003). Bacteriología. Programa de capacitación. Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras. CECASIN. Mazatlán, Sin. Marzo, pp. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121205/120507.pdf>

James, D. (2009). Aquaculture Production and Biodiversity Conservation. *BioScience*, 59(1), 27-38.

Jiménez-Ojeda, Y. K., Collazos-Lasso L. F., Arias-Castellanos J. A. (2018) Dynamics and use of nitrogen in Biofloc Technology - BFT. *AAFL Bioflux*. 11 (4): 1107-1129

Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki & Limsuwan. (1994). Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health* 61(1): 27-35.

Kogure, K. U., Simidu, U., y Taga, N., (1980). Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Can. J. Microbiol.* 26:318-323 p.

- Lee C., Chen T., Yang T., Ko P., Huang T., Huang Y., Huang F., Lin J., Chen Y., Lin S., Lightner D., Wang C., Wang H., Wang C., Hor I., Lo F. (2008). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(34):10798-803.
- Lightner D.V., Redman R.M, Pantoja C.R., Tang K.F.J., Noble B.L., Schofield P., Mohny L.L., Nunan L.M., Navarro S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 174-183
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M.C., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P. & Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research*.
- López-Torres, M.A. (1998). El género *Vibrio* y su importancia en la acuicultura. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. SEMARNAP. 1(3): 8-11.
- Martinez-Porchas, M., y Martinez-Cordova, L. R. (2012). World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*, 2012, 389623.
- Morales, C.M.S., (2008). Enfermedades bacterianas. Editado por Morales, Q.V., Cuellar, A.J., Guía técnica. Patología e inmunología de camarones penaeidos. Programa CYTED. Área de Agroalimentación. Red II-D: Red vannamei, 2008, pp. 122 - 123. ISBN: 978-9962-661-02-3
- Otoshi, C., Arce, S., and Moss, S. (2003). Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. *Aquaculture Engineering*, 29, 93-107.
- Pang, L., Zhang, H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied Microbiology*, 43:249-255
- Ramaiah, N. & Chandramohan, D. (1991). Bacterial bioluminescence in marine pollution assessment. *Ocean Technology: Perspectives*, 4, 967-980.
- Silva, V. & Duran, N. L. (2003). Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *B. J. of Microbiol.* 34, 91-96
- Söderhäll K., Cerenius L. (1992). Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases* 3-23.
- Soto-Alcalá, J., Álvarez-Ruiz, P., Audelo-Naranjo, J.M., Esparza-Leal H.M., Estrada-Godínez J.A., Luis-Villaseñor I.E. (2019) Transcriptional response of immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* post-larvae cultured in recirculating aquaculture systems with and without biofloc. *Aquacult Int* 27, 209-225
- Soto, W., Gutierrez, J., Remmenga, M. D. & Nishiguchi, M. K. (2009). Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microb. Ecol.*, 57, 140-150.
- Theron, J. y Cloete, J. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26:37-57 p.
- Thompson, F.L., T. Iida & J. Swings. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68: 403-431.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M. (2010). *Recirculating Aquaculture* (2nd ed.), Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY.
- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. y Vinci B.J. (2002). *Recirculating aquaculture systems*. Northeastern Regional Aquaculture Center. E.U.A.
- Uemoto, H., Shoji, T., and Uchida, S. (2014). Biological filter capable of simultaneous nitrification and denitrification for aquatic habitat in international space station. *Life Sciences in Space Research*, 1(1), 89-95. doi: 10.1016/j.lssr.2014.02.002

