

EFFECTOS HISTOPATOLÓGICOS PRODUCIDOS
POR *VIBRIO* SP. EN POSTLARVAS DE
PENAEUS VANNAMEI

HENDER URDANETA¹, ADRIANA PHILIPPI²
Y DAVID CONROY²

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Facultad de Humanidades y
Educación, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo,
Estado Zulia, Venezuela

² Departamento de Patobiología Acuática, Escuela de Ciencias
Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central
de Venezuela, Maracay, Estado Aragua, Venezuela

RESUMEN.- Se describen los efectos histopatológicos producidos por cepas de *Vibrio* sp. en postlarvas de *Penaeus vannamei*. Para el ensayo se utilizó un blanco y 12 cepas de *Vibrio* sp. tomadas al azar. La prueba se realizó por triplicado con postlarvas entre los estadios 3 y 12, inoculados con suspensiones bacterianas diluidas. La densidad poblacional fue de 60 postlarvas/L. Las muestras de tejido de las postlarvas se tomaron a las 24 horas de iniciado el ensayo, se fijaron en solución Davidson, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes y se tiñeron con el método modificado de hematoxilina y eosina de Mayer. Los análisis histopatológicos permitieron observar degradación y presencia de bacilos en el tejido muscular abdominal infectado. Asimismo, a nivel del tejido de hepatopaneas infectado se apreció degradación de las paredes de los túbulos, infiltración de hemocitos, alta vacuolización y presencia de bacilos. Los cambios histológicos manifestados en los especímenes infectados no presentaron diferencias significativas ($P < 0.01$) al considerar tanto las cepas bacterianas como los estadios de las postlarvas. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados por otros investigadores, indicando la existencia de cepas de *Vibrio* sp. tanto en el interior de los camarones como en el agua de mar de la estación de cultivo donde se tomaron las

muestras. *Recibido:* 23 Enero 1997, *aceptado:* 30 Octubre 1997.

Palabras claves: Postlarvas, camarones peneidos, *Penaeus vannamei*, *Vibrio* sp., efectos histopatológicos.

HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS PRODUCED BY *VIBRIO* SP. IN POSTLARVAE OF *PENAEUS VANNAMEI*

ABSTRACT.- The present work describes the histopathological effects produced by cultures of *Vibrio* sp. in postlarvae of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. The assays consisted of 12 randomly chosen *Vibrio* sp. cultures and a control, and three replicas of postlarvae in stages 3-12 with a density of 60 postlarvae/L. Inoculations were made with diluted bacterial suspensions. After 48 hours, tissue samples of both infected and uninfected postlarvae were preserved in Davidson's fixative, embedded in paraffin, cut into 5 μ sections, and stained with hematoxylin and eosin (Mayer's modified method). Degeneration and presence of bacilli in infected abdominal muscle tissue, as well as degeneration in the walls of the tubules, infiltration of hemocytes, marked vacuolization, and presence of bacilli in infected tissue of the hepatopancreas were observed. Infected specimens did not present any significant histopathological differences ($P < 0.01$) due to different bacterial cultures or postlarval stages. The histological effects seen by us in this study are similar to those of other investigators. Thus, *Vibrio* sp. is present within the shrimp as well as in the sea water samples of the culture station. *Received:* 23 January 1997, *accepted:* 30 October 1997.

Key words: postlarvae, penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, *Vibrio* sp., histopathological effects.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela se reporta una producción anual en camaronicultura de 1363 tm (FAO 1994), y las granjas se localizan en los Estados Zulia, Falcón, Anzoátegui y Sucre. Las especies de

mayor interés son del género *Penaeus*: *P. vannamei* y *P. schmitti* (Scelzo 1985, Jory 1989, FAO 1994).

Bajo condiciones artificiales de explotación pueden surgir factores que alteren el equilibrio bioecológico (alta densidad poblacional, deficiencia nutricional, bajo contenido de oxígeno disuelto, aumento de materia orgánica, cambios de pH y temperatura, uso indiscriminado de antibióticos y biocidas y manejo inadecuado), lo que puede traducirse en la aparición de problemas patológicos (Pauley 1975, Johnson 1978, Morales 1983, Barg 1994), que en un momento determinado pueden causar grandes pérdidas económicas.

La mayor parte de los trabajos de investigación sobre camarones en diferentes países latinoamericanos se han centrado en aspectos básicos de la biología, dietas, técnicas de inducción de maduración gonadal, desoves, y sólo recientemente se le está dando importancia a los problemas patológicos, aunque un gran número de enfermedades han sido reportadas como causantes de mortalidad en cultivos de peneidos, especialmente en estado larval, postlarval y juvenil (Johnson 1978, Lightner 1983, Su *et al.* 1994, Hameed 1994).

Las enfermedades que se señalan como causantes de alta mortalidad y por ende de grandes pérdidas económicas son las causadas por bacterias, entre ellas las *Vibrio* (Vanderzant *et al.* 1970, Sindermann y Lightner 1988, Conroy y Conroy 1989, Carvaca-Castro 1990, Brock 1990, Hameed 1994, Moheney *et al.* 1994, Su *et al.* 1994).

Actualmente se trabaja en la aplicación de desinfectantes y antibióticos que impidan la proliferación de bacterias, hongos y otros organismos que afecten en cultivo a los peneidos (Guo y Liao 1994, Hameed y Rao 1994). También se plantea la producción de vacunas que aumenten su inmunidad y la búsqueda de métodos que permitan la identificación confiable de las cepas de *Vibrio*, mediante pruebas bioquímicas (Su *et al.* 1994, Yang *et al.* 1994), y sus efectos a través de pruebas de patogenicidad experimental y análisis histopatológicos

(Philippi 1992, Hameed 1994, Lee y Cheng 1994).

En el presente trabajo se presentan los efectos histopatológicos causados por cepas de *Vibrio* sp. en ensayos experimentales sobre postlarvas de *Penaeus vannamei*. Las cepas se aislaron del hepatopancreas y hemolinfa de adultos, juveniles y postlarvas de *P. vannamei* cultivados en la Península de Cariaco, Estado Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *P. vannamei* se capturaron en una estación de cultivo del Estado Sucre, Venezuela. Una vez corroborada su identificación, se colocaron en bolsas plásticas de 10 L, en número de 15 a 20 ejemplares, en agua de mar filtrada y limpia, con suministro de oxígeno a través de tabletas (Lake Products Co., USA). Las bolsas con su contenido se colocaron en cajas de anime con hielo para ser transportadas al laboratorio, donde se acondicionaron en acuarios de 70 L, con agua de la localidad del sitio de muestreo.

En el estudio bacteriológico se procedió de la siguiente manera: para el análisis cualitativo de la microflora bacteriana asociada a las postlarvas, se realizó una filtración con un tamíz de 120 μm con la finalidad de obtener un concentrado de 1.0 g, se lavó con agua de mar (30-35 ‰), se filtró y esterilizó a 121 ± 1 °C. Posteriormente, se homogeneizó asépticamente en 10 ml de agua de mar con un homogenizador de vidrio. Este homogeneizado se utilizó en diferentes soluciones (1:10 - 1:10000), de las cuales se sembró 0.1 ml por extensión en placas, en los medios TSA y TCBS, y se incubaron por 24 horas a una temperatura de 25 a 28 °C. El aislamiento de las colonias fue aleatorio dando énfasis a las colonias que presentaron características descritas para bacterias de tipo *Vibrio* presentes en el medio TCBS. Éstas fueron transferidas a medios nuevos, incubadas a la misma temperatura hasta la obtención de cultivos puros. Con el agua de cultivo se realizó el aislamiento bacteriano procediendo de la misma manera que se describió anteriormente.

Una vez obtenidos los aislados bacterianos en cultivos puros se replicaron en tubos que contenían agar TSA al 1 % de NaCl o medio marino 2216E de Oppenheimer and Zobell (1952), en pico de flauta. Después de 24 horas de incubación a la temperatura ambiente la superficie del medio fue cubierta con una capa de parafina estéril. Para su mantenimiento las cepas en estudio fueron debidamente codificadas, conservándolas en una nevera a 4 ± 0.1 °C y resembradas cada dos o tres meses.

Para realizar el análisis taxonómico de las cepas bacterianas puras a nivel de género y especie se sometieron a pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas siguiendo a Furnis *et al.* (1978), Koneman *et al.* (1979), Oliver (1982), Buchanan y Gibbons (1984), Sakata (1989) y Philippi (1992).

Con el fin de evaluar la patogenicidad de las cepas bacterianas se estableció un blanco y seis cepas al azar, pertenecientes al grupo de bacterias que presentaron el mayor halo de inhibición al agente vibriostático 0/129 (150 µg/disco) (Philippi 1992).

La prueba de patogenicidad (Philippi 1992) se realizó por triplicado, con postlarvas en estadios entre tres y doce. La densidad poblacional utilizada fue de 60 postlarvas/L (McVey y Fox 1983, Oltra 1987 y Arellano 1990). Éstas se colocaron en envases de vidrio de 3.0 L que contenían agua de mar filtrada y envejecida. El suministro de aire fue aportado por aireadores portátiles, los envases se lavaron previamente y se desinfectaron con Povidex al 1.0 % de yodo orgánico activo, y luego, se esterilizaron en seco a 160.0 °C durante dos horas. Una vez colocadas las postlarvas en sus envases, se inocularon con suspensiones bacterianas diluidas a una concentración equivalente a una suspensión particulada que permitió 70.0 % de transmitancia, a una longitud de onda de 540 nm, a través de un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch y Lomb, USA).

La suspensión contenía aproximadamente 10 células/ml. El crecimiento bacteriano se obtuvo en una mezcla de caldo marino y agua estéril, en proporciones de 25 % y 75 % respectivamente, y se

incubaron a temperatura ambiente (28 ± 1 °C) durante 18 a 24 horas. No se permitieron variaciones mayores de temperatura con la finalidad de evitar estrés en las postlarvas. La salinidad estuvo entre 30 y 35 ‰, y el pH entre 7.50 y 8.20. Los conteos de mortalidad comenzaron a las 24 horas del inicio del ensayo y continuaron hasta una semana después (Philippi 1992).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS

Se tomaron muestras de tejidos de postlarvas de *P. vannamei* moribundos y aparentemente sanos a las 48 horas de haberse iniciado la infección experimental, éstos se fijaron en solución Davidson y luego fueron seccionadas con un procesador automático de tejidos (Autotechnicon Mono, mod. 2A) utilizando la técnica de Bell y Lightner (1988). Los cortes de 5 μ se tiñeron siguiendo el método modificado de hematoxilina y eosina (H y E) de Mayer (Sheehan y Hrapchak 1980).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó análisis de varianza bifactorial para determinar el posible efecto significativo de los factores: cepas bacterianas y estadios de las postlarvas sobre los cambios histológicos ocurridos en los especímenes infectados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis histológicos de los cortes longitudinales de tejido teñidos (H y E) tanto de postlarvas aparentemente sanas como infectadas, permitieron observar en los primeros, un tejido muscular normal (Fig. 1). En los segundos se hizo visible una degradación de las fibras musculares así como la presencia de bacilos, coincidiendo con lo reportado por Brock (1990) al estudiar los efectos histopatológicos presentes en camarones peneidos con el síndrome de la septicemia bacteriana (Fig. 2).

A nivel de hepatopaneas, en los cortes de individuos aparentemente sanos (control) no se observó degradación o destrucción de sus estructuras (Fig. 3). En los provenientes de organismos infectados se detectó degradación de las paredes de los túbulos hepatopancreáticos y alta vacuolización de los mismos. También se apreció alta infiltración de hemocitos en los espacios intertubulares o senos hemolinfáticos, asimismo la presencia de bacilos en los espacios dejados por el lumen de los túbulos hepatopancreáticos (Fig. 4).

El análisis de varianza bifactorial, considerando los cambios histológicos detectados en los tejidos de los especímenes infectados y las cepas bacterianas y los estadios de las postlarvas, no ofrecieron diferencias significativas ($P < 0.01$). Los cambios histológicos observados en el presente trabajo también han sido reportados por Conroy y Conroy (1989) y Brock (1990) en análisis histopatológicos de camarones con el síndrome de la septicemia bacteriana.

En conclusión, los resultados indicaron que es evidente la presencia de cepas bacterianas de *Vibrio* en la microflora normal interior de *P. vannamei* y en el agua de mar de la estación donde se tomaron las muestras, productoras del síndrome de la septicemia bacteriana. Así, en los cultivos de peneidos se debe velar por mantener la calidad del agua y no someter a estrés estos organismos. Un descuido puede conllevar a bajar sus defensas y por ende a ser infectados.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, Univ. Central de Venezuela, por su apoyo financiero, al personal del Laboratorio de Bacteriología General y Especial, Instituto de Investigaciones Veterinarias del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay, quienes colaboraron en la preparación de los medios de cultivo y reactivos, a Cesar Lodeiros por su valiosa orientación en los estudios bacteriológicos, al Centro de Investigaciones Biológicas,

FIGURA 1. Corte longitudinal de tejido muscular abdominal no infectado de postlarva de *Penaeus vannamei*, corte 5 μ , teñido con H y E, 50 x.

FIGURA 2. Corte longitudinal de tejido muscular abdominal de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio* sp., se observa degradación de las fibras musculares, teñido con H y E, 100 x.

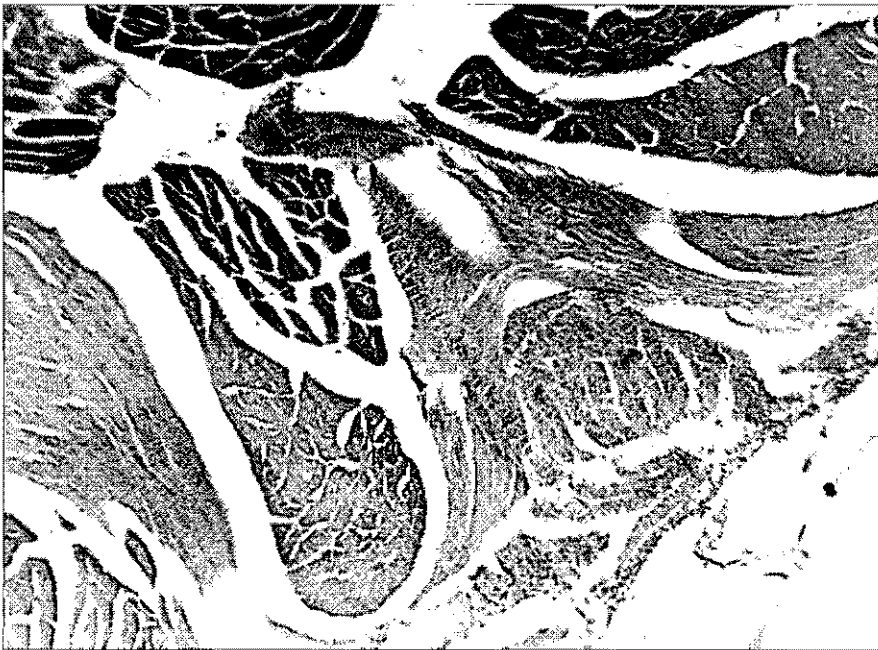
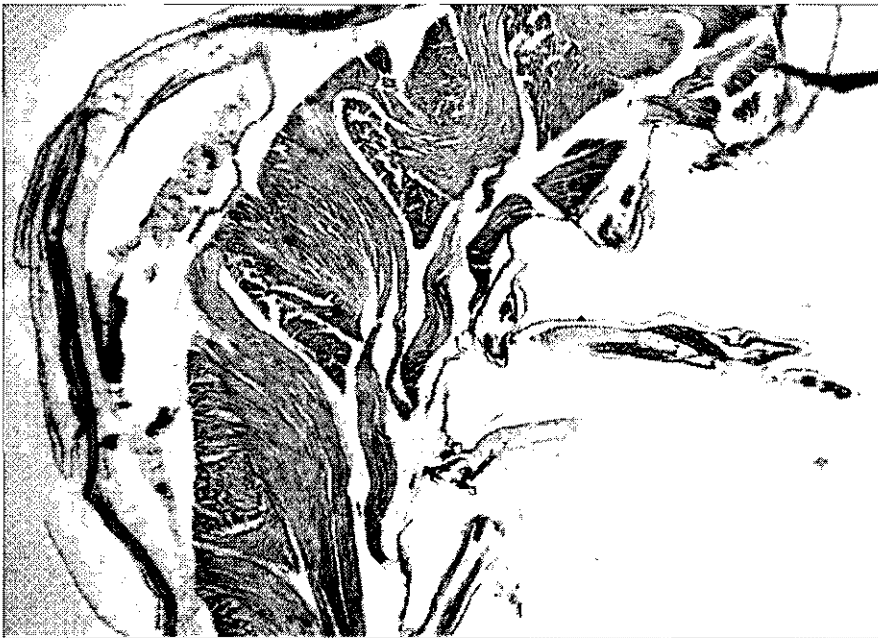


FIGURA 3. Corte longitudinal del cefalotorax de postlarva de *Penaeus vannamei* no infectado, A: Hepatopaneas. Corte de 5 μ , teñido con H y E, 50 x.

FIGURA 4. Corte longitudinal a nivel del hepatopaneas de postlarva de *Penaeus vannamei* infectado con *Vibrio* sp., A: túbulos hepatopaneáticos, B: vacuolas, C: bacilos, D: espacios intertubulares. Corte de 5 μ , teñido con H y E, 100 x.



estudios bacteriológicos, al Centro de Investigaciones Biológicas, Univ. del Zulia, donde se realizaron los ensayos experimentales, a Mayela Yépez por la lectura del manuscrito y a Joaquín León por su labor fotográfica.

LITERATURA CITADA

- ARELLANO, E. 1990. Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador, 42 pp.
- BARG, U. 1994. Orientaciones para la promoción de la ordenación medio ambiental del desarrollo de la acuicultura costera. FAO Documento Técnico de Pesca No. 328, 138 pp.
- BELL, T. Y D. LIGHTNER. 1988. A handbook of normal penaid shrimp histology. The World Aquaculture Society, Allen Press Inc., Lawrence, Kansas, 114 pp.
- BROCK, J. 1990. Manual de enfermedades. Proyecto: Optimización del cultivo de larvas de camarón "ocular". FONAGRE-CAF-Banco Central. Guayaquil, Ecuador, 45 pp.
- BUCHANAN, N. Y N. GIBBONS. 1984. Bergey's manual of determinative bacteriology (8 ed.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, MD, 1268 pp.
- CARVACA-CASTRO. 1990. Manual práctico de bacteriología marina. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) FONAGRE-CAF, Guayaquil, Ecuador, 76 pp.
- CONROY, D. Y G. A. CONROY. 1989. Manual de patología de los camarones peneidos. Univ. Central de Venezuela, Caracas, 165 pp.

- FAO. 1994. Aquaculture production 1986-1992. FAO Fisheries Circular No. 815, Revision 6, 190 pp.
- FURNIS, A., J. LEE Y T. DONOVAN. 1978. The vibrios. Public Health Laboratory Service Monograph Series 11. London, England, 58 pp.
- GUO, J. Y I. LIAO. 1994. Toxicities of Povidone-Iodine to fertilized eggs and larvae of *Penaeus monodon* and to algae. COA Fish. Ser. 47: 37-45.
- HAMEED, A. 1994. Experimental transmissions and histopathology on brown spot disease in shrimp (*Penaeus indicus*) and lobster (*Penulirus homarus*). J. A. Aquacult. Trop. 9: 311-322.
- HAMEED, A. Y P. RAO. 1994. Studies on the chemical control of a *vibrio* campbellil-like bacterium affecting hatchery-reared *Penaeus indicus* larvae. Aquaculture 27: 1-9.
- JOHNSON, S. 1978. Handbook of shrimp diseases. Texas A. & M. Univ., Sea Grand Public TAMU-S6-75-603, USA, 23 pp.
- JORY, D. 1989. La camaronicultura - Una alternativa para incrementar en Latinoamerica la producción de mariscos. Geomundo 13: 192-197. Venezuela.
- KONEMAN, E., S. ALLEN, V. DOWELL Y H. SOMMERS. 1979. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. J. Bact. Lippincot Co., Philadelphia, Penn., 495 pp.
- LEE, K. Y F. CHENG. 1994. Studies of pathogenecity of *Vibrio damsela* isolated from diseased tiger prawn (*Penaeus monodon*). COA Fish. Ser. 47: 21-36.
- LIGHTNER, D. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. Pp. 289-320, en J. P. McVey (ed.), CRC Handbook of mariculture, Vol.

1: Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

MCVEY, J. Y J. FOX. 1983. Hatchery techniques for penaeid shrimp utilized by Texas A. & M.-NMFS Galveston Laboratory Program. Pp. 129-154, *en* J. P. McVey (ed.), CRC Handbook of Mariculture, Vol. 1: Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

MOHENEY, L., D. LIGHTNER y T. BELL. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J. World Aquacul. Soc. 25: 116-125.

MORALES, J. C. 1983. Acuicultura-Marina Animal. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, 670 pp.

OLIVER, J. 1982. Taxonomic scheme for the determination of marine bacteria. Deep-Sea Research 29: 795-798.

OLTRA, R. 1987. Técnicas de cultivo de peneidos en el Centro Oceanológico del Pacífico (Tahiti). Inf. Tecn. Inv. Pesc. 140: 3-20.

OPPENHEIMER, C. Y C. ZOBELL. 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. Mar. Res. 11: 10-18.

PAULEY, G. 1975. Diseases of crustaceans. Mar. Fish. Rev. 37: 1-64.

PHILIPPI, A. 1992. Estudios sobre la septicemia bacteriana en camarones peneidos con especial referencia a la patogénesis experimental. Tesis de Msc., Univ. Central de Venezuela, Maracay, Venezuela, 182 pp.

SAKATA, T. 1989. Microflora of healthy animals. Pp 141-163, *en*

- B. Austin y D. Austin (eds.), *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood Lim., John Wiley & Sons, England.
- SCELZO, M. 1985. El cultivo de camarones en Latinoamerica. Asociación Venezolana de Acuicultura (AVEA) Boletín Informativo 6: 22-25.
- SHEEHAN, D. Y B. Hrapchak. 1980. *Theory and practice of histotechnology* (2 ed.). C. V. Mosby Co., St. Louis, MO, 214 pp.
- SINDERMANN, C. Y D. LIGHTNER. 1988. *Disease diagnosis and control in North American Aquaculture* (2 ed.). *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (17). Elsevier Sci. Publishers B.V., Amsterdam, 431 pp.
- SU, Y., X. CAL, W. WENG, J. WANG Y SH. HUANG. 1994. Relationship between *Vibrio* quantity in cultured peneid and two shrimp diseases. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.)* 33: 421-424.
- VANDERZANT, C., E. MROZ Y R. NICKELSON. 1970. Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. *J. Milk Food Technol.* 33: 346-350.
- YANG, S., H. XU Y H. SU. 1994. Rapid and simple biochemical identification of the prawn-pathogenic bacteria. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.)* 33: 375-379.