

Las Bacterias en el Inicio de la Alimentación Exógena en Larvas de Camarones Peneidos: Efectos de la Calidad del Agua, Tasas de Ingestión y Rutas de Colonización del Tracto Digestivo

Nuno Simões¹, David Jones¹, Sonia Soto-Rodríguez², Ana Roque³ & Bruno Gómez-Gil³

¹ School of Ocean Sciences, University of Wales, Bangor. Menai-Bridge, Anglesey, LL59 5EY, UK. E-mail: nunosimoes@prodigy.net.mx

² Department of Aquaculture, Center of Scientific Research and High Education of Ensenada, (CICESE), Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, A.P. 2735 Ensenada, B. C., México.

³ CIAD, A.C. Mazatlán Unit for Aquaculture and Environmental Management. AP. 711 Mazatlán, Sinaloa 82000 México.

RESUMEN

En este estudio se presentan resultados de la sobrevivencia y desarrollo de *Litopenaeus vannamei* desde Nauplio₅ hasta Zoea₂ provenientes de 5 tratamientos de calidad de agua donde la comunidad bacteriana inicial fue manipulada: 1) agua de mar recientemente filtrada a través de 1 µm; 2) agua de mar esterilizada con un autoclave; 3) agua de mar de un sistema de recirculación sin carga orgánica; 4) agua de mar de un sistema de recirculación con carga orgánica; y 5) agua de mar filtrada con una mezcla de un probiótico comercial. Los resultados de este experimento mostraron que la manipulación de la comunidad bacteriana del agua donde las larvas se alimentan por primera vez influye en su sobrevivencia y capacidad para mudar a los estadios larvales posteriores. Utilizar agua completamente estéril da resultados similares a aquellos donde se utilizó agua de mar con sólidos suspendidos reducidos y con una comunidad bacteriana normal. El agua de un sistema de recirculación sin carga orgánica es preferible a aquella con gran carga orgánica (organismos vivos + alimento). Cepas de probióticos comerciales deben usarse con precaución dado que potencialmente conllevan un incremento rápido de la concentración total de amonio. Estos resultados confirman que la colonización inicial del intestino por bacterias tiene un impacto directo sobre la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo larvario. Entonces se realizaron observaciones para evaluar la capacidad de las larvas para la filtración e ingestión de bacterias, comparándola con las tasas de filtración de microalgas. Una vez que la ingestión de bacterias quedó demostrada, se procedió a estudiar el tiempo de la primera colonización del intestino y la ruta de entrada de las bacterias. Los resultados de la observación de cortes histológicos, observación mediante microscopía electrónica de barrido y las observaciones *in vivo* de bacterias vivas marcadas sugieren que la

Simões, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A., Gómez-Gil, B., 2002. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones Peneidos: Efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

colonización bacteriana comienza desde el estadio de Nauplio₅, ya que estas larvas ya presentan un poro anal y movimientos de antiperistálsis que les permiten la colonización del tracto digestivo por parte de bacterias presentes en la columna de agua.

INTRODUCCIÓN

El inicio de la alimentación exógena en las larvas de camarones peneidos ha sido identificado como una fase crítica en términos de su sobrevivencia, crecimiento y desarrollo, ya que las larvas son expuestas internamente a comunidades microbianas por primera vez durante la muda de Nauplio₅ a Zoea₁ (Jones *et al.*, 1997). La exposición a la dinámica de la comunidad bacteriana presente en el agua en ese momento puede tener efectos benéficos o perjudiciales en la capacidad digestiva y de asimilación de las larvas, en su nutrición, así como en su habilidad para sobrellevar el contacto con cepas patógenas presentes en el agua.

Se ha sugerido que condiciones letales como el Síndrome de la Zoea₂, que induce a las células hepatopancreáticas a separarse y atrofiarse y causa la desintegración del epitelio intestinal, están asociadas a un contacto con bacterias patógenas en los estadios tempranos de Zoea₁ (Figura 1 - Juárez, 1997; Pantoja *et al.*, 1997). Muchos estudios, principalmente en larvas de peces, han demostrado el papel activo de las enzimas exógenas en digestión de alimentos ingeridos dentro del tubo digestivo y a pesar de todavía existir alguna polémica sobre la magnitud de la aportación de estas enzimas a la actividad enzimática total, hay consenso en que si juegan un papel importante en la digestión y asimilación inicial de las larvas (Dabrowski & Glogowski 1977; Lauff & Hofer 1984; Cahu & Zambombino-Infante 1994; Kurokawa *et al.*, 1998; García-Ortega *et al.*, 2000). Además de las enzimas libertadas por los propios alimentos ingeridos, el aporte extra de exoenzimas por bacterias establecidas en el tracto digestivo de las larvas, junto con la exclusión competitiva de bacterias potencialmente patógenas, ha sido el principal argumento en la búsqueda y desarrollo de bacterias probióticas en las investigaciones relacionadas con este tema (Verschuere *et al.*, 2000; Gomez-Gil *et al.*, 2000).

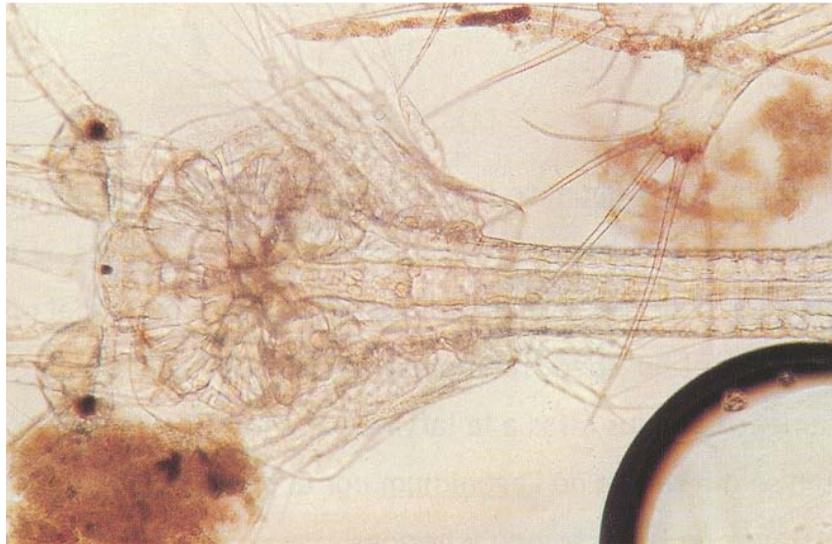


Figura 1.- Zoea de *Litopenaeus vannamei* con síntomas de “bolitas” o “síndrome de la zoea” donde se nota claramente la desintegración de las células epiteliales del tubo digestivo mediano (foto: Marisol Hernández).

La modificación de la flora bacteriana del agua de cultivo mediante el uso de probióticos ha sido comprobada en el mejoramiento del cultivo de larvas de crustáceos (Nogami & Maeda, 1992; Garriques & Arévalo, 1995) y bivalvos (Douillet & Langdon, 1993; Douillet & Langdon, 1994; Riquelme *et al.*, 1996; Riquelme *et al.*, 1997; Riquelme *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2001), así como ha sido sugerido que el mantenimiento de una comunidad bacteriana natural y equilibrada puede beneficiar los cultivos larvarios de camarones peneidos (Alabi *et al.*, 1997). Sin embargo, se desconocen todavía las consecuencias de la ruta de colonización y periodo del primer contacto con comunidades bacterianas externas en larvas de camarones peneidos.

En el presente estudio, primeramente se presentan resultados de sobrevivencia, crecimiento y desarrollo larvario de Nauplios₅ de *Litopenaeus vannamei* provenientes de 5 tratamientos de calidad de agua, donde la comunidad bacteriana inicial fue indirectamente manipulada. Dado que los resultados de este tipo de estudios son difíciles de repetir, en segunda instancia nos concentramos en demostrar la ingestión de bacterias por parte de larvas de peneidos que se alimentan por primera vez y la comparamos con la filtración de microalgas. Mediante una técnica novedosa para hacer el seguimiento de bacterias vivas dentro del tracto digestivo de larvas de crustáceos, también observamos la ingestión, retención intestinal, y excreción de una cepa de probiótico *Vibrio* potencial por parte de Zoeas₁ y Zoeas₂. Finalmente, observaciones anatómicas realizadas a partir de técnicas histológicas y microscopía electrónica de barrido permitieron cierto conocimiento sobre las rutas de la primera colonización bacteriana del intestino. Así mismo, se presentan argumentos sobre el uso potencial de cepas de probióticos bajo la luz de los descubrimientos más recientes.

MATERIALES y MÉTODOS

Manipulación de la comunidad bacteriana en el agua de cultivo inicial

Nauplios de *Litopenaeus vannamei* originarios de Industrias Pecis, Yucatán, México (Mayo 2001) fueron aclimatados a las condiciones de temperatura, salinidad y pH del agua del laboratorio (38 ‰, 29°C, 7.9 pH) por un periodo de 2 horas. Los Nauplios fueron entonces divididos en números similares (estimaciones volumétricas) y transferidos a cinco contenedores de plástico de 15 L llenos con agua de los 5 tratamientos (Tabla 1). Los Nauplios fueron aclimatados al agua de los contenedores respectivos durante 20 horas antes del inicio del experimento. Las larvas fueron posteriormente sembradas en frascos de fondo redondo de 1L previamente esterilizados a una densidad de 100 larvas L⁻¹. Se usaron cinco réplicas por cada tratamiento de agua. Para la aireación se utilizaron pipetas de vidrio esterilizadas y aire filtrado a 0.22 µm. Se fijó un foto periodo de 13 -11 h luz-oscuridad y 0 % de recambio de agua durante los 5 días que duró el experimento. Cualquier otro instrumento utilizado fue desinfectado con cloro y perfectamente enjuagado con agua corriente previo a su uso. Al inicio del experimento las larvas fueron alimentadas con una sola dosis de microalgas *Chaetoceros gracilis* vivas en una concentración de 5000 células ml⁻¹ de acuerdo a lo recomendado por Jones *et al.* (1998). De ahí en adelante fueron alimentadas cuatro veces al día (7-12-17-22 horas) con CAR ULTRA FI No1 (INVE Technologies) a razón de 1 mg L⁻¹. La concentración de amonio total y nitritos fue medida al inicio y final del experimento mediante las técnicas de fenol-nitroprusiato y de sulfanilamida (Parsons *et al.*, 1984), respectivamente. La fracción no ionizada del amonio fue calculada como el promedio de los resultados de cuatro modelos para la disociación del amonio en agua de mar (Whitfield, 1974; Khoo *et al.*, 1977; Johansson & Wedborg, 1980; Spotte & Adams, 1983) utilizando los valores de pH, temperatura y salinidad obtenidos para cada tratamiento en el día y hora de la determinación de amonio total. Doce horas después de observar los primeros estadios de Zoea₂ se concluyó el experimento y las larvas de todos los tratamientos fijadas con 5ml de formaldehído al 37%. Las larvas de cada frasco fueron contadas e identificado su estadio de desarrollo. Veinte individuos tomados al azar de cada frasco fueron medidos (± 0.5 µm) del rostro a la bifurcación del extremo posterior) con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una cámara de Bogorov para conteo de zooplancton. A partir de estos datos se calculó la mortalidad relativa como:

$$mortalidad_relativa = \frac{LN\left(\frac{N_{final}}{N_{inicial}}\right)}{t} \quad (1)$$

donde la tasa de mortalidad relativa (instantánea o intrínseca se expresa como el número de individuos muertos por unidad de tiempo por unidad de individuos vivos en el instante inmediato anterior. “LN” representa logaritmo natural, “N” representa el número de individuos vivos al inicio y final del periodo experimental y “t” es el tiempo en días.

Tabla 1.- Especificaciones de la manipulación de la calidad del agua inicial de cultivo a partir de modificaciones físicas, químicas y biológicas de las propiedades del agua de mar, resultando en los 5 tratamientos de agua utilizados para la cría larvaria de *Litopenaeus vannamei* en este estudio. Para el Tratamiento Probiótico se siguieron las instrucciones de dosificación dadas por la compañía productora de los mismos.

Origen del agua	Pre-Tratamiento								Tratamiento			Nombre del Tratamiento			
	Filtración (µm)	Carbón activado	EDTA (mg l ⁻¹)	UV	Espumador	Ozonificador	Biofiltro	Volumen (l • 10 ²)	Biomasa (g)	Días previos al tratamiento	Filtración (µm)		Carbón activado	Autoclave	Probiótico comercial (mg l ⁻¹)
Directo del mar									0		1	+		2	Agua de Mar
Directo del mar									0		0.2	+	+	2	Autoclave
S. de recirculación	1	+	10	+			+	4.5	19		1	+		2	Recirculación1
S. de recirculación	1	+	10	+			+	4.5	19		1	+	5	2	Probiótico
S. de recirculación	50			+	+	+	+	0.13	25	40	5	+		2	Recirculación2

El índice de Villegas & Kanazawa (1979) fue utilizado para estimar el grado de desarrollo promedio entre tratamientos (pesos de “0”, “1” y ”2” se usaron para Nauplio, Zoea₁ y Zoea₂, respectivamente). Se utilizó la prueba de Anderson-Darling para comprobar la normalidad de los datos y las de Bartlett o Levene para homogeneidad de varianza entre tratamientos, dependiendo de si los datos tenían o no una distribución normal. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía y comparaciones de medias *a posteriori* utilizando la prueba de Tukey (Zar, 1999). En el análisis de longitud final, los frascos fueron considerados como factor al azar. En el análisis del índice de desarrollo se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y análisis de medianas.

Organismos prueba para la ingestión de bacterias y observaciones anatómicas

Nauplios 2-3 de *Litopenaeus vannamei* provenientes de tres lotes independientes fueron perfectamente enjuagados en agua de mar estéril (filtrada 0.45 µm y esterilizada con, autoclave) sobre una red con 150 mm de luz de malla. Fueron desinfectados utilizando iodo activado en una concentración de 10 µg ml⁻¹ (Argentyne a 10 %) durante 15 min., enjuagados nuevamente y mantenidos en un contenedor plástico blanco de 12 L lleno con agua de mar esterilizada con 20 µg ml⁻¹ de enrofloxacin como antibiótico (Cheminova de México, México) de acuerdo a la concentración mínima de inhibición y la concentración de “no-efecto” reportadas (Williams *et al.*, 1992; Roque *et al.*, 2001). Para la aireación se utilizó una pipeta de vidrio esterilizadas a través de la cual entraba aire filtrado a 0.22 µm. La temperatura se mantuvo constante en 28 ± 1 °C mediante un baño de agua dulce

termoregulado. Las Zoeas₁ que se alimentan por primera vez (Zoeas tempranas o recién mudadas) se obtuvieron entre 36 - 48 h después de una incubación en agua de mar tratada con antibióticos. Las Zoea₁ y Zoea₂ (Zoeas tardías) fueron alimentadas a base de una combinación de microalgas con *Chaetoceros muelleri* (60%), *Tetraselmis sp.* (30%) y *Isochrysis galbana* (10%) en una concentración aproximada de 50,000 células ml⁻¹, con 0 % de recambio de agua. Las microalgas fueron cultivadas axenicamente, aunque muestras del agua de cultivo fueron sembradas para confirmar que *Vibrios* no eran introducidos.

Histología y preparación de muestras para la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las muestras para microscopía electrónica de barrido fueron fijadas, deshidratadas y montadas de acuerdo a la metodología descrita por (Felgenhauer, 1987). La preparación histológica de las muestras se hizo siguiendo el procedimiento estándar de la tinción por haematoxilina-eosina-floxina sin descalcificación y de la tinción bacteriana de Gram-Humberton. La nomenclatura empleada para describir las larvas fue acorde a los términos definidos por Lovett & Felder (1989).

Cepa bacteriana

A lo largo de este estudio se utilizó la cepa Ea, una cepa inocua de *Vibrio harveyi*, fue aislada de un cultivo de *Litopenaeus stylirostris* en el Golfo de Santa Clara, Sonora, México (Soto *et al.*, enviado a publicación). Esta cepa es Gram-negativa, móvil, positiva a la oxidasa, glucosa fermentada, sensible a al compuesto vibriostático 0/129, y usa D-manitol como la única fuente de carbono. Estas características colocan a la cepa como un miembro del género *Vibrio*. Así mismo, es negativa para la arginina dihidrolasa, y positiva para la ornitina y lisina decarboxilasa. Es luminiscente y positiva para el citrato y negativa para Voges-Proskauer. No pudo utilizar L-arabinosa ni D-glucosamina. Pudo crecer en NaCl al 2.5, 6.0, 8.0 % a 40 °C. Todas estas propiedades la identifican como una cepa de *V. harveyi* (Alsina & Blanch, 1994). Esta cepa fue criopreservada a -70 °C de acuerdo a las recomendaciones de Gherna (1994) en un ultracongelador (Revco Scientific, Asheville) formando parte de la Colección de Microorganismos Importantes para la Acuicultura (CMIA) en el CIAD, Unidad Mazatlán.

Preparación de las bacterias marcadas con fluorescencia (BMF)

Para marcar las bacterias con DTAF se utilizó la metodología descrita por Soto-Rodríguez *et al.* (2002). Las bacterias criopreservada fueron recuperadas en caldo de soya triptych (TSB, Bioxon, México) a 30 °C y agitadas a 100 rpm en un baño agitador recíproco (Precision Scientific 25, Winchester) durante 20-24 h. El caldo fue centrifugado a 8,000 rpm durante 6 min. a 15°C, y el pellet bacteriano resultante fue re-suspendido en 10 ml de agua de mar estéril. Para examinar la densidad bacteriana en esta suspensión 24 h después, se llevaron a cabo diluciones seriales en una solución salina estéril de NaCl a 2.5 % (SSE) y sembradas en agar de thiosulphato-citrato-sales de bile - sucrosa (TCBS, Difco, México) y agar de soya triptych (TSA, Bioxon, México) incubado a 30 °C. Como solución de tinción se utilizó 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl) aminofluorescein (DTAF, Sigma Chemical Co. D-

0531, St. Louis) disueltos en un buffer estéril de fosfato salino a una concentración de 0.5 mg ml⁻¹. Un volumen de 0.5 ml de esta solución fueron entonces inoculados en 9.5 ml de la suspensión bacteriana e incubadas durante 2 h a 30°C bajo agitación constante a 90 rpm en oscuridad total.

Para la tinción con verde de malaquita se utilizaron 0.5 ml de una solución de verde de malaquita (1 mg ml⁻¹) para 9.5 ml de la suspensión bacteriana, que fue incubada por 1 h a temperatura ambiente. Al final del periodo de incubación, los cultivos fueron centrifugados y el pellet resuspendido en agua de mar estéril. Este procedimiento se repitió hasta que se observó una suspensión no teñida. (3 a 6 veces). Se realizaron diluciones en serie de esta suspensión de bacterias marcadas con fluorescencia (BMF) mismas que fueron sembradas en agar TSA y TCBS para estimar la densidad bacteriana. Se prepararon BMF nuevas para cada bioensayo.

Microscopía

Muestras de bacterias marcadas con fluorescencia fueron observadas en un microscopio Olympus BX60 con incidencia de luz UV (BX-FLA), filtro de excitación BP 450-490 nm, filtro dicróico DM500 nm, y un filtro de barrera BA515 nm. Las fotografías fueron tomadas con una cámara automática Olympus y una unidad de control de exposición PM-20, utilizando película a color ISO 400 de Kodak. Las larvas vivas y los cortes histológicos fueron observados bajo un microscopio Carl Zeiss Axiolab anbkT con objetivos acromáticos, y se tomaron fotografías digitales con una cámara Sony SSC-DC 54A. Un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM – 531OLU se utilizó para observar la estructura externa de los Nauplios y Zoeas₁. Se tomaron fotografías en blanco y negro con la unidad de exposición del microscopio y placas de Kodak TMAX 100 de 4x5 pulgadas. Se realizaron observaciones de las larvas en los 5-10 min. después del muestreo usando agua de mar casi congelada para disminuir su actividad natatoria. Sin embargo, las fotografías fueron tomadas utilizando larvas fijadas en un porta y cubreobjetos con 2-4 gotas de una solución de glutaraldehído al 3 % en agua de mar estéril para asegurar su inmovilidad total. Para asegurar los colores naturales, ninguna fotografía fue tomada después de dos horas de fijadas las larvas. Se utilizaron ampliaciones de 100 y 400 X para evaluar el llenado intestinal, en tanto que se usó una ampliación de 1000x (lente de inmersión) para revisar la presencia o ausencia de bacterias marcadas con fluorescencia (BMF).

Diseño experimental

Para asegurar que las larvas tenían el tracto digestivo completamente vacío, éstas fueron mantenidas en inanición durante 2-6 h previo a cualquier contacto experimental con BMF en agua de mar filtrada a 0.45 µm. Con la finalidad de que las larvas no reingirieran sus propias heces fecales, se les hicieron recambios de agua cada hora.

Experimento de ingestión bacteriana y de microalgas

Un grupo de Zoeas₁ fueron transferidas a dos frascos de fondo redondo de 1L esterilizados previamente y con aireación filtrada (0.22 µm). Se tomó una muestra de larvas para su observación en el tiempo 0. A un frasco se le adicionaron microalgas (*Chaetoceros muelleri* 50.000 células ml⁻¹), mientras que al otro se le adicionaron bacterias marcadas con verde de malaquita (*Vibrio harveyi*, cepa E_a a 1.26 x 10⁶ CFU ml⁻¹). A partir de ese momento se tomaron varias muestras de larvas mediante un sifón con una pipeta Pasteur estéril a los 5, 15 y 30 min., asumiendo que este tiempo era suficiente para que las larvas comenzaran a alimentarse (Jones *et al.*, 1997). Las larvas fueron inmediatamente montadas en un portaobjetos de vidrio, el agua excesiva fue secada y dos gotas de una solución de glutaraldehído al 3 % adicionadas con el fin de matar e inmovilizar instantáneamente a los organismos para su observación posterior. El llenado intestinal fue evaluado mediante una escala ordinal: 0 – vacío; 1/3 – cualquier materia particulada que no llenase mas de la mitad del intestino; 2/3 – cualquier materia particulada que llenase mas de la mitad del intestino pero menos que el intestino completo; y 1 – intestino lleno completamente desde la boca hasta el ano.

Observaciones de la ingestión de BMF

Entre 60 y 140 larvas fueron transferidas a vasos de precipitados estériles (40, 50 y 100 ml) llenos con agua de mar filtrada (0.45 µm) y esterilizada en autoclave. Las larvas fueron alimentadas ya fuese únicamente con BMF a diferentes densidades (6.60 x 10⁶ – 1.40 x 10⁷ CFU ml⁻¹), o bien en combinación con microalgas (9.7 x 10⁶ – 1.26 x 10⁷ CFU ml⁻¹ y 50.000 – 150.000 células algales ml⁻¹). Se realizaron varias observaciones a diferentes tiempos (15 min. a 12 h) utilizando Zoea₁ y Zoea₂ en condiciones experimentales similares (Tabla 2).

Tabla 2.- Condiciones experimentales para los bioensayos con Bacterias Marcadas con Fluorescencia (BMF) y larvas de *Litopenaeus vannamei*. Las observaciones fueron realizadas inmediatamente después de que las larvas entraran en contacto con las BMF.

Estadio larval	BMF (CFU ml ⁻¹)	Concentración de microalgas (cel/ml)	Tiempo de exposición de BMF (horas)	Volumen (ml)	No. de organismos
Zoea ₁ temprana	1.26 x 10 ⁷	50.000	0, 2/3, 3 1/2	50	± 80
	1.52 x 10 ⁷	-	0, 2/3, 3 1/2	50	± 80
	9.7 x 10 ⁶	150.000	0, 1/4, 1	40	± 60
	9.7 x 10 ⁶	-	0, 1/2, 1 1/2	40	± 60
Zoea ₁ avanzada	6.60 x 10 ⁶	-	0, 2/3, 2, 4	50	± 80
	1.12 x 10 ⁷	-	0, 12	100	± 140
Zoea ₂	8.85 x 10 ⁶	-	0, 2/3	100	± 120
	1.40 x 10 ⁷	-	0, 12	100	± 140

Observaciones de evacuación de BMF

Zoeas₁ recién mudadas fueron transferidas a vasos de precipitados estériles (50 ml) llenos con agua de mar filtrada (0.45 µm) y esterilizada en autoclave. Las larvas fueron alimentadas con 1.52 x 10⁷ ml⁻¹ (BMF) por un periodo de 2 h, después del cual se tomó una muestra al azar de 20 organismos que fueron fijados con glutaraldehido y observados inmediatamente. Este fue considerado el tiempo inicial 0. Las larvas fueron entonces transferidas de nuevo a agua limpia y mantenidas ahí durante un periodo de 30min, después del cual fueron cambiadas una vez más. Cuando habían transcurrido 40 min. se tomó otra muestra de 20 organismos que fueron observados inmediatamente. Todo el procedimiento fue repetido a las 3:30 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) – Tratamientos Iniciales de Agua

La manipulación del agua inicial de cultivo usando métodos mecánicos, químicos y biológicos (Tabla 1) tuvo un efecto evidente en el resultado del cultivo de larvas de *Litopenaeus vannamei* que se alimentan por primera vez. Los organismos cultivados con agua del Tratamiento Recirculación2 murieron significativamente más rápido (p<0.001) que organismos de cualquiera de los otros tratamientos (Fig. 2A). Así mismo, éstas larvas no pudieron mudar a Zoea₂ (Fig. 2B) y, por lo tanto, presentaron una longitud total final significativamente menor (p<0.001) que las larvas de cualquiera de los otros tratamientos (Fig. 2C). Estos resultados se explican por la alta concentración inicial de amonio y, especialmente, por la alta concentración de nitrito presentes en el agua (Tabla 3).

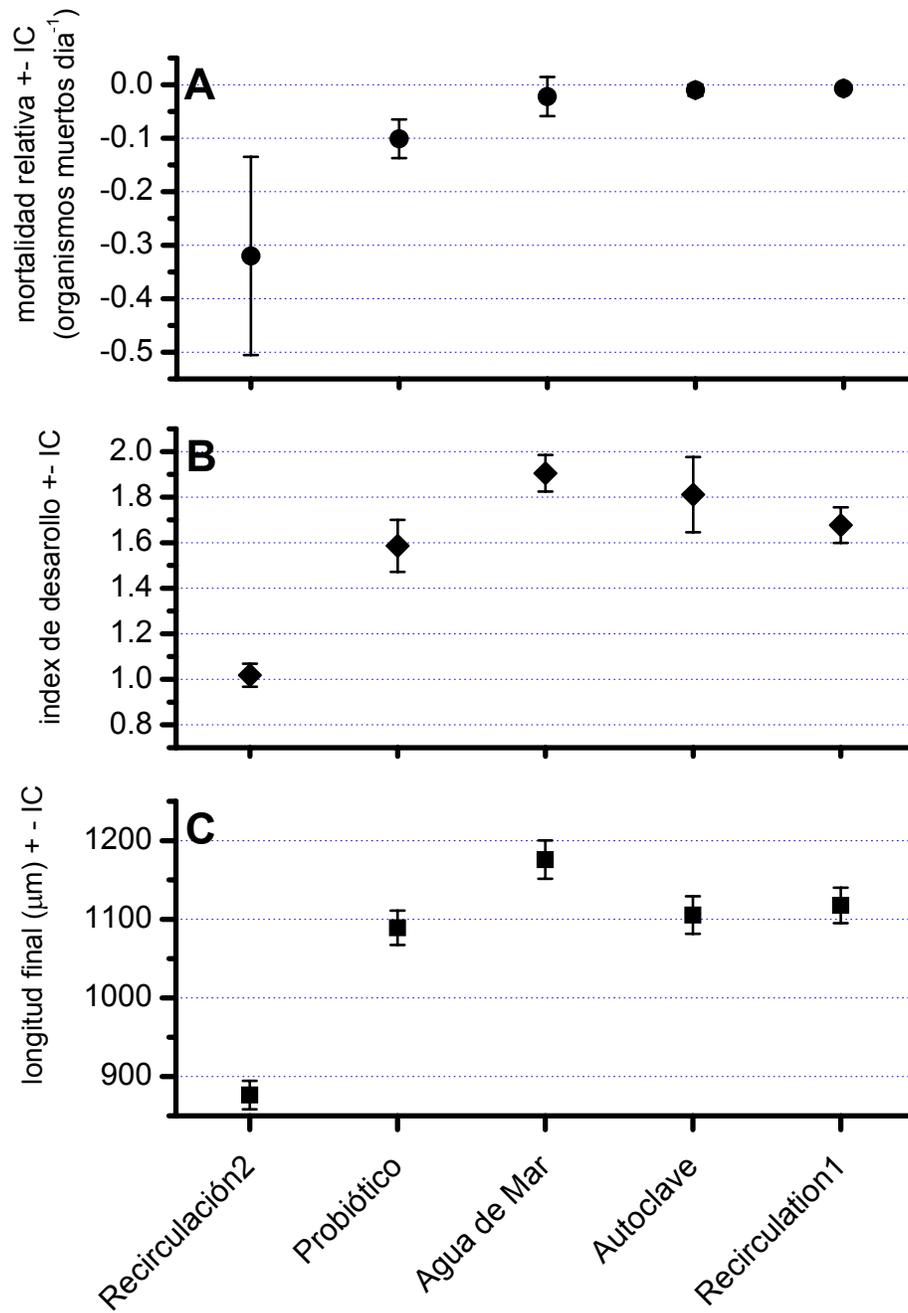


Fig. 2.- Mortalidad relativa (A), índice de desarrollo (B) y longitud final (C) de larvas expuestas a los cinco tratamientos del agua de cultivo inicial. Los nombres de los tratamientos son como se indican en la Tabla 1. Los valores son promedios ± 95% intervalos de confianza (para detalles ver Materiales y Métodos).

Tabla 3. Concentraciones promedio ($\text{mg l}^{-1} \pm \text{desv. est.}$) de amonio total ($-\text{NH}_4^+$ & $-\text{NH}_3$), amonio no ionizado ($-\text{NH}_3$) y nitritos ($-\text{NO}_2$) de cada uno de los 5 tratamientos de agua de cultivo inicial tanto al principio (día 0) como al final del periodo experimental (día 4). Los nombres de los tratamientos son como se indican en la Tabla 1.

día	$-\text{NH}_4^+$ & $-\text{NH}_3$		$-\text{NH}_3$		$-\text{NO}_2$	
	0	4	0	4	0	4
Recirculación2	1.75	4.85 ± 0.24	0.08	0.23 ± 0.01	0.199	0.176 ± 0.002
Autoclave	0.77	4.96 ± 0.17	0.04	0.24 ± 0.00	0.001	0.001 ± 0.001
Probiótico	0.76	7.55 ± 0.36	0.03	0.36 ± 0.01	0.014	0.001 ± 0.003
Agua de Mar	0.71	5.03 ± 0.70	0.04	0.24 ± 0.02	0.002	0.072 ± 0.007
Recirculación1	0.62	3.70 ± 0.21	0.04	0.18 ± 0.00	0.001	0.016 ± 0.10

A pesar de que la concentración total de amonio aumentó a lo largo del experimento, la concentración de nitrito disminuyó en el tiempo, indicando la presencia de una población activa de *Nitrobacter* spp. en el agua. Estos resultados indican que la unidad de biofiltro utilizada en el sistema de cultivo con alta carga orgánica de donde fue tomada el agua para el Tratamiento Recirculación2, todavía no había alcanzado el equilibrio de nitrificación, y que la concentración de nitrito resultó letal para las larvas, ya que estaba muy por arriba de su límite de tolerancia (Chen *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989; Chen & Tu, 1990; Chen & Lin, 1991; Cheng & Chen, 1994).

En tanto que la manipulación del agua no afectó la sobrevivencia de las larvas de ninguno de los otros tratamientos y la mortalidad relativa de las larvas fue similar en todos ellos, si afectó su crecimiento el índice de desarrollo, sugiriendo que aunque con efectos menos severos, la calidad del agua influye en la salud y calidad nutricional de las larvas. El desarrollo de las larvas del Tratamiento Probiótico fue significativamente retrasado comparado con el desarrollo de las larvas de los Tratamientos Autoclave y Agua de Mar. En el otro extremo, las larvas cultivadas con agua del Tratamiento Recirculación1 presentaron un grado de desarrollo similar al de las larvas de los Tratamientos Probiótico y Autoclave. Sin embargo, al ser comparadas con las larvas del Tratamiento Agua de Mar, aquellas más avanzadas ontogénicamente, las del Tratamiento Recirculación1 presentaron un retraso significativo en su desarrollo (Fig. 2B). En términos de crecimiento, las larvas cultivadas en el Tratamiento Agua de Mar alcanzaron una longitud total final significativamente mayor ($p < 0.001$) que las larvas de los Tratamientos Recirculación1, Autoclave o Probiótico (Fig. 2C).

Dado que todas las larvas fueron alimentadas con la misma dieta y sometidas a las mismas condiciones zootécnicas de cultivo, se puede decir que los mejores resultados se obtuvieron con el Tratamiento de Agua de Mar (Fig. 2 A, B y C). Estos resultados sugieren que las características de la materia orgánica y la población bacteriana presentes en el mar en ese momento particular tuvieron un efecto sinérgico en la salud de las larvas. Esta misma agua, la cual fue filtrada ($0.22\mu\text{m}$) para eliminar los sólidos suspendidos y esterilizada en el autoclave (Tratamiento Autoclave), también dio buenos resultados de sobrevivencia, desarrollo y crecimiento larvario, indicando una adecuada recolonización del agua a partir

de bacterias adheridas a los Nauplios de camarón, bacterias presentes en el alimento artificial, y posiblemente de forma más importante, bacterias presentes en los cultivos de algas usados para estimular el proceso de alimentación inicial de las larvas.

Normalmente, los Nauplios saludables que se obtienen bajo condiciones controladas de cultivo tienen el caparazón libre de bacterias (observ. pers.), y la mayoría de los alimentos artificiales son fabricados bajo condiciones estériles, minimizando el potencial para un inóculo proveniente de esta fuente (Jones, 1998). En los sistemas de cultivo de microalgas, por el contrario, existen normalmente bacterias asociadas, las cuales ejercen su influencia sobre la comunidad bacteriana de los tanques de cultivo larvario (Bell & Lang, 1974b; Kellam & Walker, 1989; Skjermo & Vadstein, 1993; Salvesen *et al.*, 1999). Estas cepas bacterianas son seleccionadas por el grado de especificidad de los medios de enriquecimiento utilizados, así como los exudados de microalgas específicos de cada especie que promueven o restringen el crecimiento de ciertas cepas bacterianas. El control de poblaciones bacterianas por exudados de microalgas ha sido ampliamente reportado (Sieburth, 1960; Duff *et al.*, 1966; Guillard & Hellebust, 1971; Bell & Lang, 1974a; Kogure *et al.*, 1979; Cole, 1982; Brock & Clyne, 1984; Austin & Day, 1990; Fukami *et al.*, 1991; Austin *et al.*, 1992; Naviner *et al.*, 1999), así como de extractos de macroalgas (Reichelt & Borowitzka, 1984; Nys *et al.*, 1995; Gram *et al.*, 1996).

Con el agua de los sistemas de recirculación se pueden obtener resultados moderados, como aquellos obtenidos con el Tratamiento Recirculación1 (Fig. 2, A, B, y C), pero se debe tener cuidado en asegurar que las concentraciones de amonio y nitrito no sean tan altas como las observadas en el Tratamiento Recirculación2 (Tabla 3). La mayoría de las unidades de biofiltros comerciales usadas en sistemas de recirculación pueden procesar grandes cantidades de tanto amonio como nitrito únicamente si no hay cambios repentinos en la densidad de siembra y las cantidades y frecuencia de alimentación, lo cual es difícil de asegurar en sistemas de maduración y cría larval. Por lo anterior, se recomienda el uso de sistemas de recirculación sin carga orgánica a no ser aquella de la materia orgánica disuelta normalmente en el agua de mar. Resultados similares a los del presente estudio fueron obtenidos para larvas de rodaballo (Skjermo *et al.*, 1997), y varios camarones peneidos (Jones *et al.*, 2000). El agua proveniente de sistemas maduros tiene la ventaja de ya poseer una comunidad bacteriana nitrificante bien establecida, tal y como lo indica la baja acumulación de amonio y nitrito observada en el presente trabajo (Tabla 3).

El agua tratada con probióticos comerciales no dio resultados tan buenos como se esperaba, probablemente por la rápida acumulación de amonio y nitritos (Tabla 3) y/o la oclusión de las superficies laminares de las branquias de las larvas causadas por el exceso de bacterias (Brock & Lightner, 1990), reduciéndose el intercambio de gases (Fisher, 1977; Fisher, 1988a; Fisher, 1988b). Dado que la mayoría de las mezclas de probióticos comerciales están enriquecidas con nutrientes que promueven el crecimiento bacteriano, rápidamente se pueden alcanzar poblaciones bacterianas muy numerosas y densas lo que conlleva a un bloom bacteriano. Desafortunadamente, ni se midió el número total de bacterias en el agua, ni se realizaron observaciones histológicas de las branquias de las larvas. Se sabe, sin embargo, que las bacterias que fácilmente cumplen con los requisitos necesarios para

constituir una cepa de probiótico exitosa generalmente resultan victoriosas en la competencia con bacterias nitrificantes por superficie de crecimiento, ya que estas últimas crecen más lentamente que las primeras (Wheaton *et al.*, 1994) y por lo tanto disminuyen la capacidad para reducir el amonio y nitrito de las comunidades nitrificantes naturales. Las cepas de probióticos también pueden producir mayor cantidad de amonio como resultado de su actividad heterótrofa al consumir el alimento no ingerido así como las heces y mudas de las larvas. Posiblemente una mejor manera para hacer llegar éstos organismos potencialmente benignos al agua de cultivo es a partir de cultivos simultáneos de microalgas como ha sido reportado por Gómez-Gil (2002).

Los resultados del presente estudio demostraron que la calidad del agua de cultivo inicial puede generar cambios significativos en el resultado final del cultivo tan pronto como los dos primeros estadios larvales. Dado que se asume que los tejidos internos de huevos y Nauplios son estériles, se realizaron más observaciones para determinar la ruta y tiempo de colonización del tracto digestivo virgen.

2) – Morfología de Nauplio₅

La apertura de la boca no fue observada en ninguno de los especímenes revisados con las técnicas histológicas y de MEB. Sin embargo en las preparaciones histológicas se observaron evaginaciones del intestino medio en dirección ventral hacia la región de la boca, indicando que el proceso de formación de la boca estaba por ocurrir (Fig. 3 D, E₂). Tampoco se observó la presencia de una boca como tal en las observaciones de MEB, aunque fue posible identificar cierta invaginación hacia la boca y el primordio del intestino anterior (Fig. 3 H₂). En un Nauplio₅ mudando a Zoea₁ (Fig. 3 J₁, J₂) se observaron los apéndices de alimentación emergiendo a través de tejido rasgado, lo que pudiera coincidir con el momento de apertura de la boca. Lovett & Felder (1989) establecen que el intestino anterior no se comunica con el medio sino hasta Zoea₁, cuando se completa el proceso de formación del intestino y la larva comienza a alimentarse.

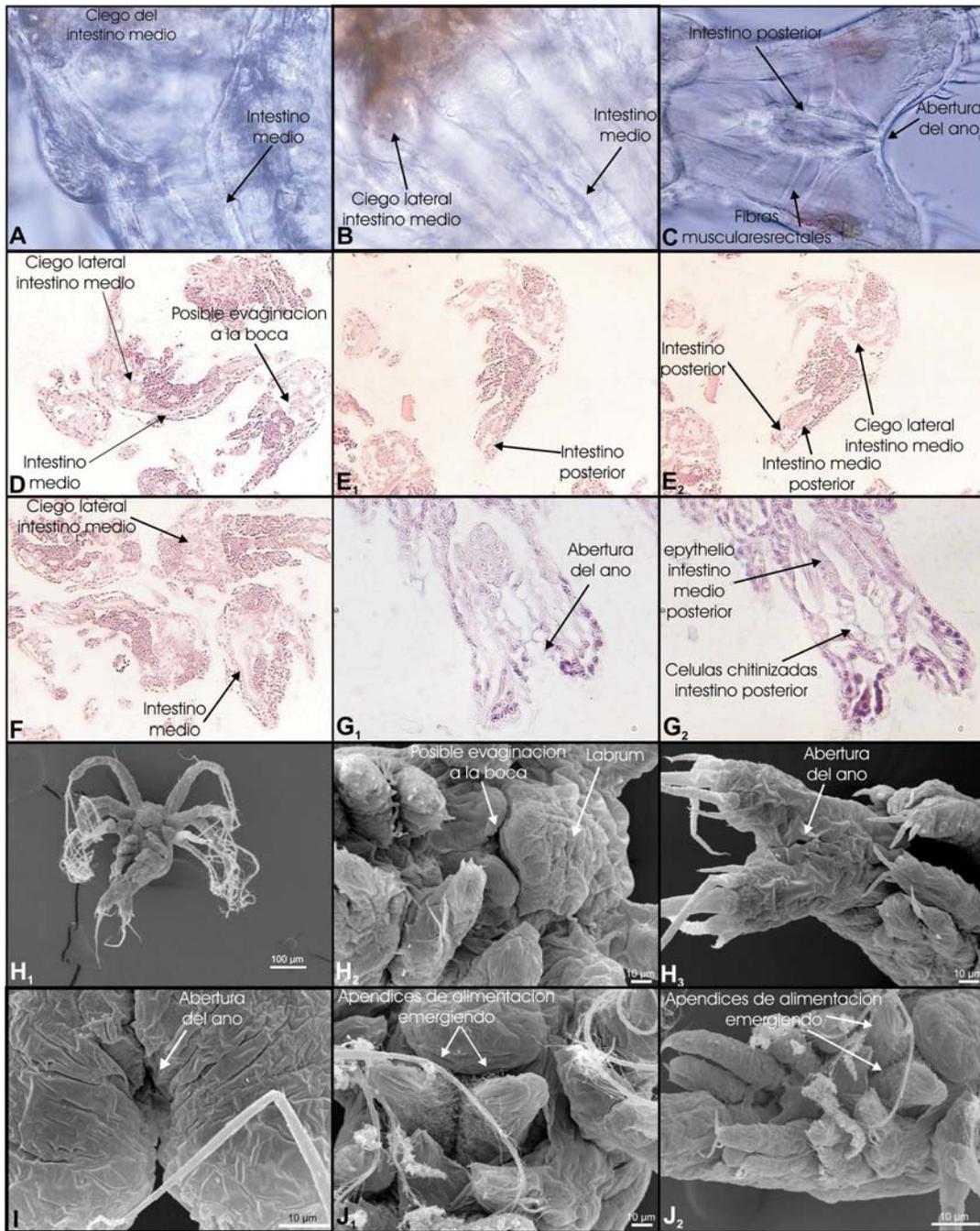


FIGURA 3 - Microfotografías *in vivo*, de cortes histológicos y microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Litopenaeus vannamei* Nauplio, tardío. Las fotografías con la misma letra representan al mismo individuo. Ciego lateral del Intestino Medio (CLIM); Ciego anterior del Intestino Medio (CAIM); Intestino Medio (IM); Intestino Posterior (IP). **A**- CLIM y apertura al IM (40 x 3.3). **B** CLIM y IM (40 x 3.3). **C**- Detalle del IP. Cabe hacer notar las fibras musculares rectales bien desarrolladas (40 x 3.3). **D**- Corte sagital y transversal, intestino y evaginación a la boca. **E**- Corte sagital y longitudinal, intestino completo con CLIM, IM, IP. **F**- Corte sagital, CLIM, CAIM, IP y ano. **G**- Corte longitudinal del IP y la apertura del ano. **H**- Primordio de la invaginación de la boca y los apéndices para la alimentación, así como la apertura anal. **I**- Apertura anal. **J** Nauplio, tardío en ecdisis hacia Zoea. Cabe hacer notar los apéndices para la alimentación emergiendo.

Observaciones microscópicas de Nauplio₅ vivos mostraron que el primordio intestinal, un tubo simple con lumen claramente abierto (Fig. 3 A, F) y alguna actividad peristáltica, puede estar presente desde el estadio Nauplio₅, y que se diferencia progresivamente para conformar regiones distinguibles tales como los primordios de los ciegos anteriores y laterales del intestino medio, el tronco del intestino medio y el intestino posterior (Fig. 3 A, B). Estas observaciones fueron posteriormente confirmadas a partir de los cortes histológicos de Nauplio₅ tardíos, donde tanto los ciegos anteriores y laterales como el tronco del intestino medio fueron identificados claramente (Fig. 3 D, F, G₂). Estos resultados contradicen lo reportado por Lovett y Felder (1989), donde establecen que las paredes del intestino anterior se encuentran colapsadas de tal forma que no existe un lumen y el intestino medio no puede distinguirse en el estadio de Nauplio₅. Aunque esta discordancia puede ser el resultado de diferencias en el desarrollo de las especies, es más razonable pensar que las muestras descritas por los autores no se encontraban en un estadio de Nauplio₅ tardío, ya muy cercanos a la muda a Zoea₁. Las vacuolas de yema descritas por Zilch (1978) para estadios tempranos de Nauplio en *Penaeus trisulcatus* son factibles de verse desarrolladas en los primordios de los ciegos anteriores y laterales del intestino medio observados en la Fig. 3 (A, B, D, E₁, E₂ y F).

Las fibras del músculo que dilata el recto, que se encuentran alrededor de las células quitinizadas del intestino posterior, así como las contracciones y distensiones típicas de la actividad peristáltica de esta región, fueron observadas tanto en los Nauplio₅ tardíos como en los estadios larvales posteriores (Fig. 3 C). A pesar de que estas observaciones fueron confirmadas por los cortes histológicos de Nauplio₅ tardíos, donde el intestino posterior fue identificado claramente (Fig. 3 E₁, E₂, G₁ y G₂), están en desacuerdo con las observaciones Lovett y Felder (1989), aunque estos autores generalizan sus comentarios para todos los estadios de Nauplio. En Nauplio₅, antes de la muda a Zoea₁, se observó de forma evidente el poro anal, junto con una clara diferencia entre las células epiteliales del tronco del intestino medio y las células quitinizadas del intestino posterior (Fig. 3 G₁). La apertura anal en Nauplio₅ fue confirmada con las observaciones de MEB de especímenes que fueron fijados y preservados al mismo tiempo que aquellos usados para los cortes histológicos (Fig. 3 H₁, H₃, I).

Las observaciones del presente trabajo revelan que el ambiente interno del intestino en estadio de Nauplio₅ tardíos puede estar desde este momento expuesto a las condiciones externas. Aún cuando en el estadio de Nauplio₅ todavía no ha ocurrido la apertura de la boca, el ano sí se encuentra abierto, y la existencia de movimientos antiperistálticos (“anal drinking”) demostrado por Lovett & Felder (1990) para los estadios inmediatos de Zoea₁₋₃, sugiere fuertemente que desde Nauplio₅ los tejidos internos del intestino posterior pueden estar en contacto con el ambiente externo y consecuentemente con las bacterias presentes en la columna de agua. Lovett & Felder (1990) proponen una explicación para la antiperistalsis (“anal drinking”) en postlarvas de camarón en donde esta actividad está por un lado asociada a la expansión anterior de los microtúbulos del hepatopáncreas mediante presión hidráulica, y por otro ayuda en la defecación. El agua que entra por el ano puede ser llevada hasta la zona anterior del intestino medio. Esto sugiere que la apertura del poro anal antes que la boca pudiera servir como la entrada principal de agua hacia el tubo

alimenticio primitivo, expandiéndolo y generando alguna presión hidráulica hacia los ciegos. Asumiendo que los tejidos internos de los huevos y Nauplios tempranos son estériles, las implicaciones ecológicas de estas observaciones son que varias horas antes de que comience una actividad alimenticia normal en el estadio de Zoea₁, los ciegos anteriores y laterales en desarrollo y el tronco del intestino medio y posterior pueden estar recubiertos con las bacterias presentes en el agua en ese momento. Así mismo, estos resultados también sugieren que los mecanismos de osmoregulación observados en estadios larvales posteriores deben ser muy similares a lo largo de todo el desarrollo ontogénico.

3) - Morfología de Zoea₁

A pesar de que no se logró observar un corte histológico que claramente mostrara la boca de una Zoea₁, la observación de Zoea₁ recién mudadas (Fig. 4 A₁ y B), consumiendo microalgas (Fig. 4 B, C y G), junto con los cortes histológicos mostrando la presencia de heces en los ciegos anteriores y laterales, el tronco del intestino medio y posterior (Fig. 4 H, I y J), así como las observaciones de MEB mostrando defecación (Fig. 4 F), demuestran que las Zoea₁ son capaces de ingerir microalgas desde algunos minutos después de la muda. Por lo tanto, es muy factible la ingestión accidental de bacterias ya sea adheridas a las células de algas o libres en la columna de agua.

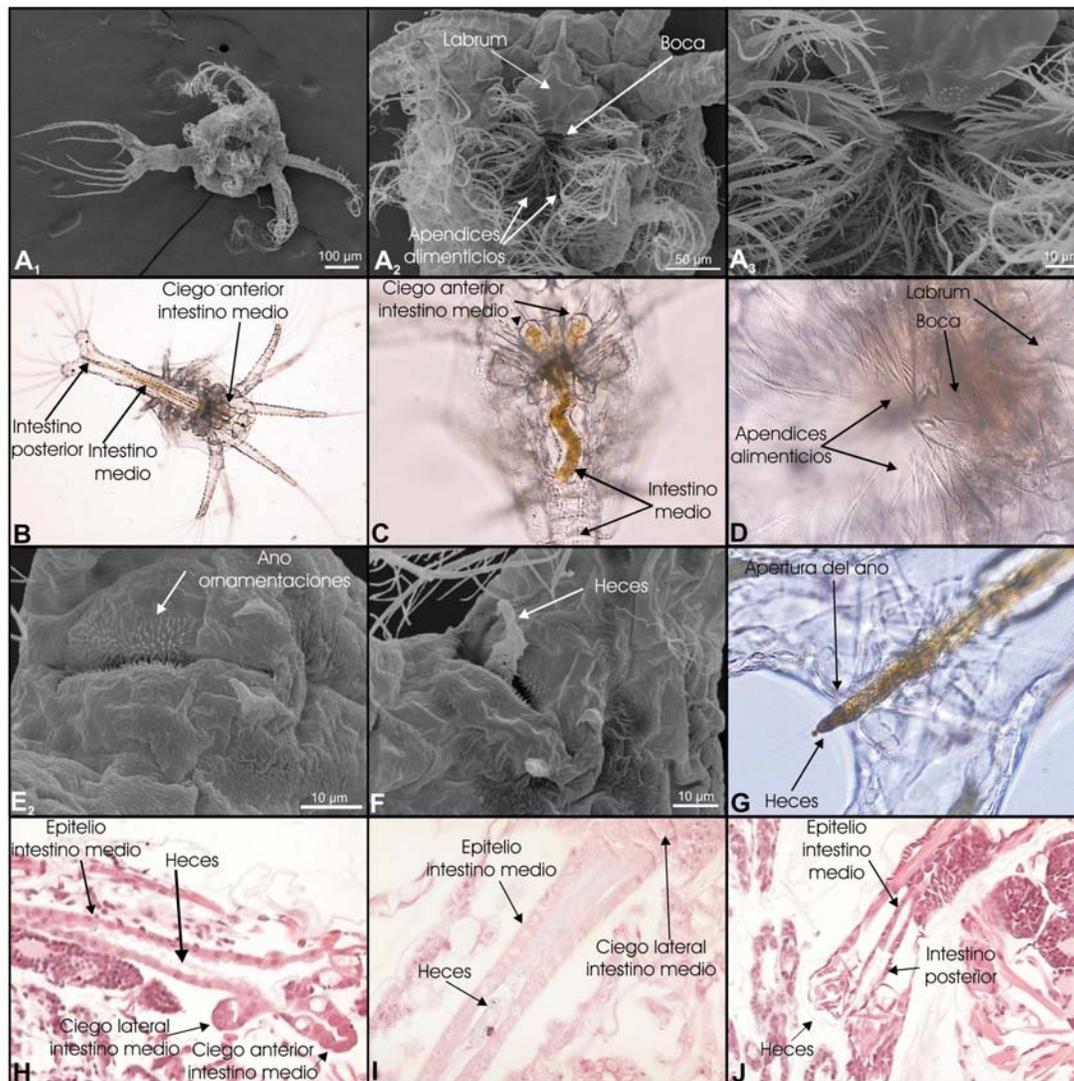


FIGURE 4 - Microfotografías *in vivo*, de cortes histológicos y microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Litopenaeus vannamei* en estadio de Zoea, recientemente mudados. Las fotografías con la misma letra representan al mismo individuo. A- Vista ventral del aparato de alimentación y boca. B Vista ventral de una Zoea, consumiendo microalgas con el tubo digestivo completamente lleno (4 x 3.3). C- Vista dorsal una Zoea, consumiendo microalgas durante 5 min después de un período de 2 h de inanición (10 x 3.3). D- Vista ventral de la región bucal (40 x 3.3). E- Vista de una Zoea, con el detalle de la región posterior. F- Membrana peritrofica de una Zoea₁ que nunca ha sido alimentada. G- Cordón fecal grueso característico de una Zoea₁ consumiendo microalgas (40 x 3.3). H- Corte longitudinal del CLIM y IM de una Zoea₁ (20 x 3.3). I- Corte longitudinal una Zoea, alimentada con bacterias marcadas con fluorescencia (40 x 3.3). J- Corte longitudinal de una Zoea, alimentada con microalgas (*Chaetoceros muelleri*) (20 x 3.3).

El tronco del intestino medio de Zoea₁ y Zoea₂ *Litopenaeus vannamei* es anatómicamente muy similar a las descripciones hechas por Lovett & Felder (1989) para *Litopenaeus setiferus*. Este consiste en un simple tubo recubierto en su interior con células epiteliales y dos pares de ciegos que son similares tanto en estructura como en tamaño.

El intestino posterior de Zoea₁ ya se encuentra bien diferenciado cuando se compara con el poro anal de Nauplio₅. En los estadios de Zoea y durante todo el desarrollo posterior se mantiene como un simple tubo con células quitinizadas y una unión con el tronco del intestino medio a la altura del VI segmento abdominal. El ano presenta un área

ornamentada con espinas cortas organizadas en líneas que, junto con los movimientos peristálticos fuertes y frecuentes del intestino posterior soportado por las fibras del músculo que dilata el recto, ayudan a evacuar los cordones fecales (Fig. 4 E₂, F y G). Es posible que una presión lateral ejercida sobre las líneas de espinas ayuden a romper los cordones fecales en pedazos más pequeños. Estos resultados confirman las observaciones de la cinemática del intestino realizadas por Lovett & Felder (1990).

Cabe hacer notar que a diferencia del crecimiento y desarrollo intermitentes de el intestino anterior y posterior quitinizados los cuales están restringido a la ecdisis, el desarrollo del intestino medio es mas gradual y cualquier residente bacteriano permanente se encontrará adherido preferentemente a esta superficie, ya sea en el tronco del intestino medio o bien dentro de los ciegos anteriores y laterales. Las Zoea₁ saludables, en un ambiente con alimento abundante se alimentarán casi permanentemente, introduciendo alimento nuevo al intestino anterior y dejando pasar algunas partículas directamente hacia el intestino medio y otras pasando cierto tiempo en los ciegos anteriores y laterales (Lovett & Felder, 1990). Por otra parte, la entrada de agua a través de la boca (“oral drinking”) ocurre a partir de ondas peristálticas regulares a lo largo del esófago aún cuando el alimento no esta siendo ingerido, tal y como fue descrito para todos los estadios de desarrollo de *Litopenaeus setiferus* (Lovett & Felder, 1990). Ambos mecanismos contribuyen a la entrada de bacterias hacia el tracto digestivo de las larvas. Entonces el alimento digerido es empacado en la membrana peritrófica mediante ondas de contracción peristáltica y antiperistáltica y eventualmente expulsado al exterior a través del intestino posterior. En tanto que la membrana peritrófica puede proteger el epitelio delicado del tronco del intestino medio de materiales abrasivos ingeridos, Lovett & Felder (1990) también observaron que el intestino medio juega un papel preponderante en la separación del quimo y la materia fecal del agua extraperitrófica que es introducida a través del ano y transportada hacia la parte anterior para expandir el intestino medio. Por lo tanto, las bacterias que sobreviven la digestión, y que se encuentran presentes en el quimo y la materia fecal, seguramente serán expulsadas hacia el exterior, mientras que la nueva colonización del epitelio absorbente del tronco del intestino medio se logra gracias a la entrada continua de agua a través del ano.

Las observaciones de Zoea₁ vivas recién mudadas confirman la ingestión de microalgas, pero permanece abierta una pregunta que exige investigaciones futuras en el campo: ¿El inicio de esta alimentación es producto de un mecanismo pasivo que resulta exclusivamente de cambios anatómicos, o des disparado por la presencia de microalgas u otros componentes alimenticios?

4) – Ingestión de microalgas vs bacterias

La desinfección antibiótica de Nauplios tempranos fue efectiva dado que no se observó crecimiento bacteriano en las placas sembradas con el homogenizado de Nauplios en TSA y TCBS, y las observaciones de Nauplio₅ y Zoea₁ en MEB mostraron la ausencia de bacterias externamente adheridas. Así mismo, las observaciones de los cortes histológicos teñidos con gram-Humberton específico revelaron la ausencia de bacterias. Estos resultados

permitieron asegurar que las bacterias teñidas con verde de malaquita y DTAF fueron aquellas ofrecidas experimentalmente.

Las microalgas fueron filtradas mas eficientemente que las bacterias como lo muestran el porcentaje de llenado intestinal en los experimentos de Zoea₁ (Fig. 5 - graficas). Después de solo 5 min., mas del 50% de las larvas presentaban intestinos 2/3 llenos con microalgas, mientras que para las bacterias, prácticamente no había habido consumos. A los 15 y 30 min., más del 85% de las larvas habían ingerido algunas microalgas. Por el contrario, las bacterias nunca fueron ingeridas en cantidades significativas por el 80% de la población de larvas. Comparadas con las larvas alimentadas con microalgas, aquellas alimentadas con bacterias mostraron una menor extensión intestinal y cordones fecales mas finos ya que considerablemente menos biomasa de bacterias fue ingerida (Fig. 5 - fotos). Ninguna larva alimentada con bacterias fue observada con los cordones fecales largos y continuos, llenos del alimento presente en el intestino, característicos de las larvas alimentadas con microalgas. Esto sugiere que la ingestión de bacterias fue intermitente, mas que continua, tal y como puede observarse en las fotografías del tronco del intestino medio, su ampliación y el intestino posterior en la Fig. 5. De hecho, las observaciones revelaron que la mayoría de los cordones fecales estaban prácticamente vacíos, y aunque presentaban algunas bacterias individuales, presentaban pocas evidencias de que las bacterias estaban siendo consumidas por las Zoea₁.

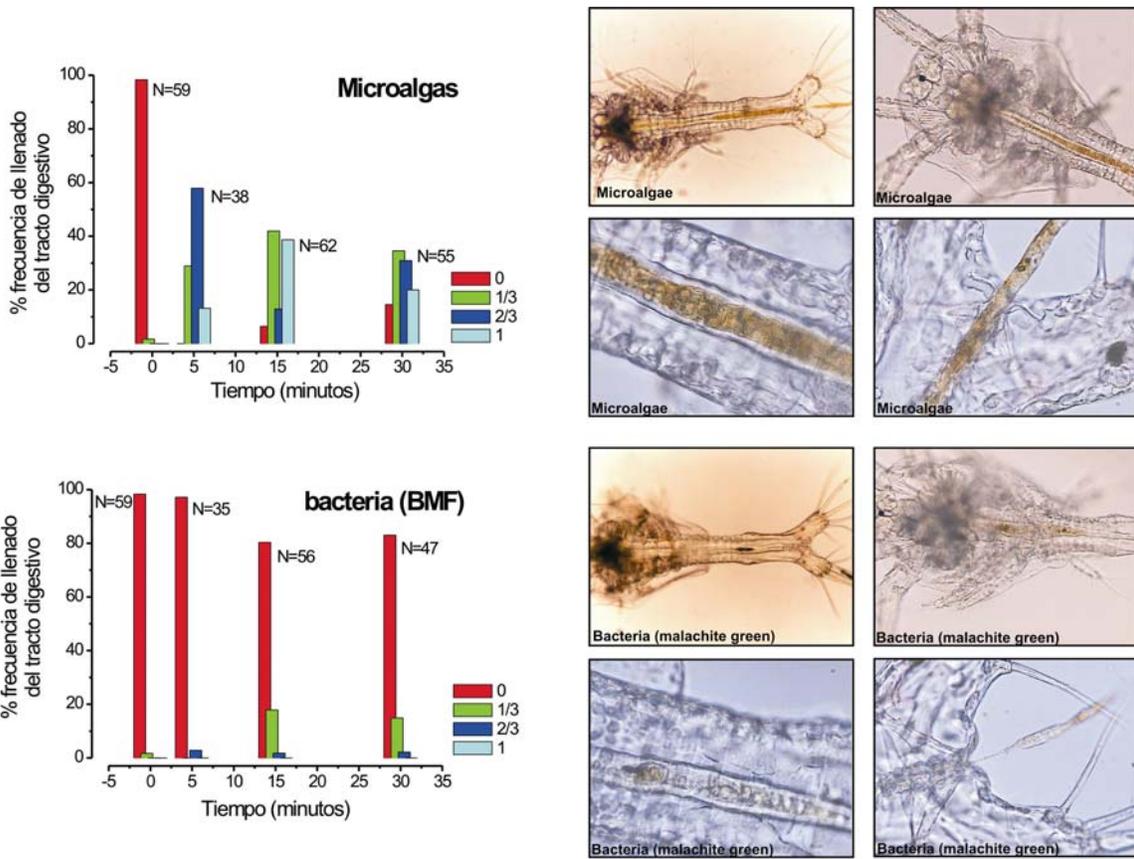


FIGURA 5 - Frecuencia de llenado intestinal (%) de *Litopenaeus vannamei* en estadio de Zoea, recientemente mudada y alimentada con dos dietas diferentes: Microalgas (50.000 células/ml *Chaetoceros muelleri*), y bacterias marcadas con verde de malaquita (*Vibrio harveyi*, cepa Ea 1.26×10^8 CFU/ml). Los números 0, 1/3, 2/3 y 1 representan el grado de llenado intestinal desde vacío hasta lleno total. "N" es el número de individuos observados en cada ocasión. Previo a su alimentación, las larvas fueron mantenidas en inanición por un periodo de 2 h en agua de mar esterilizada y filtrada (0.45 μ m) con recambios cada hora. Las microfotografías de los organismos de cada tratamiento claramente muestran las diferencias en términos del grado de llenado intestinal, así como del grosor de las heces. La ampliación de la 1a y 2a fotografía = 10 x 3.3 y 40 x 3.3; la de la 3a y 4a = 100 x 3.3.

Existen pocos reportes sobre la ingestión de bacterias por crustáceos planctónicos pequeños. Intriago & Jones (1993) reportaron un crecimiento y sobrevivencia moderados de *Artemia* alimentadas con una suspensión de bacterias. Peterson *et al.* (1978) mostraron que *Daphnia* puede alimentarse de bacterias extremadamente pequeñas presentes de forma natural en un lago de Alaska. Sin embargo, es probable que la contribución real de las bacterias a los requerimientos totales de estos organismos sea bastante baja (Tezuka, 1971).

Sin la presencia de microalgas en el agua, la ingestión de bacterias pudo ser accidental, a no ser que las altas densidades de bacterias pudieran resultar en la formación de grandes racimos aumentando la probabilidad de ser retenidos, o bien que esta cepa bacteriana sea particularmente pegajosa facilitando su adhesión a las setas o los apéndices bucales. Se piensa que la actividad de beber en larvas tempranas de peces tiene una función osmoreguladora (Tytler & Blaxter, 1988; Tytler *et al.*, 1990), y que para los organismos filtradores, esta actividad puede servir como un "sistema de muestreo" del alimento.

En la presencia de microalgas, la ingestión de bacterias también puede ser accidental, a no ser que dichas bacterias se encuentren específicamente adheridas a las paredes celulares de las algas. Se requieren de mas observaciones detalladas para confirmar estas hipótesis, así como, para determinar la importancia de la presencia de microalgas en la regulación de la actividad de beber en los estadios larvarios que se alimentan por primera vez

Se sabe que los organismos planctónicos filtradores, tales como copépodos y las larvas de algunos crustáceos, presenta eficiencias distintas para filtrar e ingerir partículas de diferente tamaño presentes en el agua (Grahame, 1983). Para el caso de filtradores exclusivos tales como las Zoea₁₋₂, la tasa de encuentro con el alimento potencial es generalmente un evento al azar que depende de la concentración de las partículas de alimento. Para alimentarse, estas larvas utilizan un complejo grupo de apéndices ramificados que se encuentran cubiertos de finas setas con que mueven el agua por medios de corrientes específicas de alimentación de manera a llevar las partículas de comida a la boca que se encuentra en el centro por debajo del labrum (Fig. 4 A₂, A₃, D). Diferencias en el tamaño entre las microalgas y las bacterias contribuye a explicar las diferencias en la capacidad de retención de unas y otras, ya que quizás las bacterias eran demasiado pequeñas para ser retenidas en el espacio intersetular de los apéndices bucales (Boyd, 1976). Por otra parte, ciertas microalgas, como la diatomea *Chaetoceros muelleri* utilizada en estos experimentos, forman cadenas largas de células adheridas, y en particular esta especie presenta espinas largas que se extienden mas allá del tamaño celular. Así, estas microalgas incrementan la probabilidad de ser retenidas por los apéndices de alimentación de las larvas.

A pesar de la diferencias en los apéndices utilizados para crear las corrientes alrededor de la región oral y las diferencias en los apéndices bucales, el mecanismo general de alimentación de las Zoea₁ de camarón no debe ser muy distinto a aquel descrito para copépodos a través de grabaciones de vídeo y observaciones in vivo (Yule & Crisp, 1983). Normalmente, una amplia gama de tamaños de partículas son colectadas por las diversas superficies de filtración, mismas que son reunidas por debajo del labrum. Las partículas mas pequeñas se acumulan hasta que un bolo de partículas, amalgamado con la secreción de la glándula del labrum, se ha formado a la altura de la boca (Grahame, 1983). Este bolo es en parte introducido a la boca por la base de las mandíbulas y en parte succionado por los movimientos peristálticos del esófago y el intestino anterior. Las partículas mayores individuales que llegan al labrum, cuando son lo suficientemente pequeñas son inmediatamente ingeridas de la misma forma como se describe anteriormente, pero los agregados demasiado grandes para entrar por la boca son partidos en pedazos menores con las mandíbulas, y aunque mucha materia es ingerida alguna se pierde en el agua circundante. Aquellas partículas demasiado grandes para entrar por la boca y a la vez demasiado duras para ser partidas, son rápidamente rechazadas y expulsadas fuera del labrum por las mandíbulas para ser acarreadas por la propia corriente de alimentación. En el presente estudio, racimos de bacterias pudieron ser ingeridas como el primer mecanismo descrito, mientras que las microalgas pudieron ser ingeridas de esa manera o bien sin la acumulación ni la formación del bolo.

El tamaño de partícula y los límites de la filtración mecánica, sin embargo, no los únicos factores que determinan la tasa de ingestión de los organismos planctónicos filtradores. El olor del alimento puede jugar un papel importante en la decisión de cuál partícula seleccionar. Sin embargo, para poder comprender enteramente la forma como un crustáceo planctónico percibe el olor, se requiere primero de una descripción detallada de las características hidrodinámicas del ambiente en el que estos crustáceos viven. Dado que las larvas de camarón son pequeñas (1-10mm), el mundo físico en el que habitan esta dominado por fuerzas de viscosidad mas que de inercia a las que están sujetos otros organismos de mayor tamaño como los seres humanos cuando se mueven entre fluidos. Por ello, los apéndices de las larvas de crustáceos operan con números de Reynolds de solo 10^{-2} a 10^{-1} . Básicamente, esto implica que el flujo es laminar y los apéndices cubiertos por setas funcionan como remos sólidos mas que como una raqueta o mielga. Las partículas no pueden ser ni barridas ni abandonadas porque tanto apéndices como partículas tienen una capa gruesa de agua adherida, y el movimiento tanto del agua como de las partículas se detiene en el momento en que se detiene el batir de los apéndices (Koehl & Strickler, 1981). Los copépodos agitan cuatro pares de apéndices bucales para mover el agua hacia ellos mismos y utilizan el segundo par de maxilas para capturar activamente las parcelas de agua que contienen el alimento (Koehl & Strickler, 1981; Yule & Crisp, 1983; Price *et al.*, 1983). Otra consecuencia probable de tal flujo laminar es que cuando una Zoa₁ agita sus apéndices, no remueve el agua, y por lo tanto, no confunde la dirección de donde provienen los estímulos químicos del alimento. Para una discusión detallada de las consecuencias de operar con números de Reynolds tan bajos sobre la locomoción y alimentación de organismos planctónicos se recomienda revisar los trabajos de Koehl & Strickler (1981).

Las algas celulares no móviles se detienen por completo casi inmediatamente después de que los copépodos dejan de agitar sus apéndices (Alcaraz *et al.*, 1980). Un nado y alimentación intermitentes pueden estar relacionados con periodos de descanso o bien con la detección precisa de estímulos químicos y mecánicos del ambiente circundante. Price *et al.*, (1983), describieron dos métodos para la captura de células por parte de los copépodos *Eucalanus pileatus* y *Paracalanus parvus*, dependiendo del tamaño de las presas (grande - 22µm - *Prorocentrum micans*, un dinoflagelado unicelular; y pequeño - 4.5 y 6 µm - *Isochrysis galbana* y *Thalassiorira spp.* algas celulares aproximadamente esféricas). Los autores consideran que los copépodos seleccionan su alimento sobre la base del tamaño, forma y calidad de las células detectadas. Así mismo, postulan que si la detección remota se consigue por quimiorrecepción, las probabilidades de encuentro con el alimento deben estar relacionadas con las características de la nube de exudados químicos alrededor de cada célula (phycospheres - Bell & Mitchell, 1972). Esto nos permite especular que la baja tasa de ingestión de bacterias por parte de las Zoa₁ observada en el presente estudio está dada no solo por su mucho menor tamaño, sino también pudiera estar relacionada con un “olor negativo” de esta cepa bacteriana en particular.

Cualquiera que haya sido el mecanismo mediante el cual las bacterias fueron seleccionadas y/o ingeridas, debe hacerse notar que la tasa de ingestión de bacterias usando verde de malaquita como marcador seguramente subestima el número de bacterias presentes en el intestino de la larva, aunque en términos de biomasa ingerida puede representar una buena

aproximación, tal y como lo muestra la Figura 5. Para poder estudiar en detalle la ruta de entrada y la localización de las bacterias individuales después de la ingestión se requieren de otra técnica de tinción, como por ejemplo el marcaje con fluorescencia.

5) - Bacterias en el trato digestivo de larvas de camarones peneidos – observaciones de BMF

Bacterias marcadas con fluorescencia (BMF) fueron observadas a lo largo de todas las regiones del tracto digestivo 40 min. después que las bacterias han sido introducidas (Fig. 6 A). Dada el periodo de exposición tan largo, una gran cantidad de ruido de fluorescencia de fondo fue observado en el intestino medio y los ciegos anteriores y laterales. Esto sugiere que algunas bacterias pudieron viajar por todo el intestino sin entrar en contacto prolongado con las encimas del tracto digestivo, y por ello resistieron la digestión, mientras que la mayoría entraron en contacto prolongado con dichas encimas, fueron digeridas parcial o totalmente y la tinción fluorescente esparcida por todo el campo de observación.

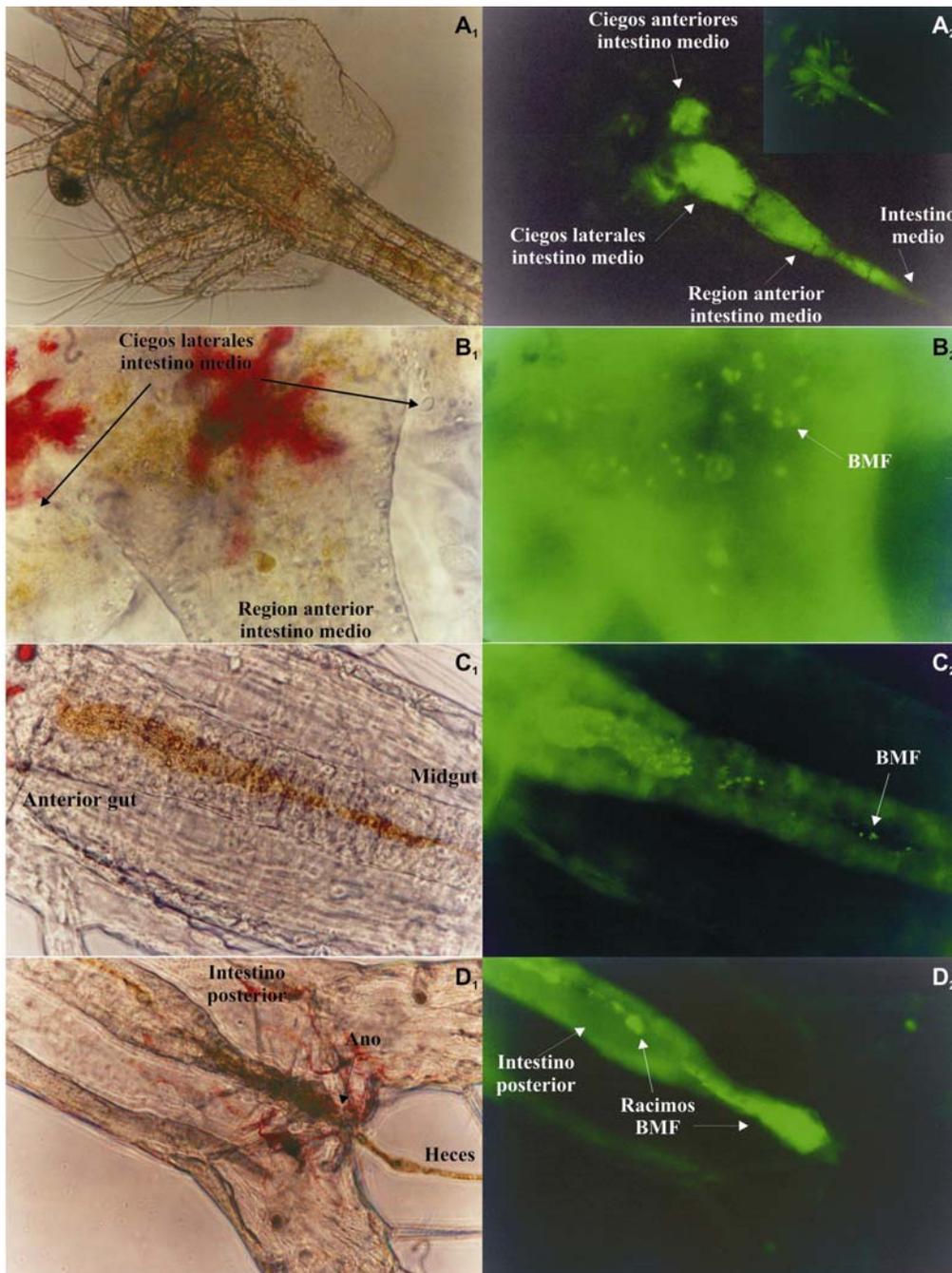


FIGURE 6 - Microfotografías alineadas con aquellas idénticas de epi-fluorescencia de *Litopenaeus vannamei* Zoea₁ y Zoea₂ tempranas, alimentadas sólo con bacterias marcadas con fluorescencia (BMF - *Vibrio harveyi*, cepa Ea) o en combinación con microalgas (*Chaetoceros muelleri* 50.000 células ml⁻¹). Todas las fotografías representan individuos diferentes. Los números indican la ampliación del objetivo y ocular de la cámara. **A**- Vista dorsal de los ciegos del intestino medio y la apertura a la parte anterior del intestino medio de una Zoea₂ tardía alimentada sólo con bacterias (8.85×10^6 cfu ml⁻¹) durante 1-2 h. La fotografía más pequeña muestra el área equivalente en una Zoea₁ onde se puede distinguir mejor los ciegos anteriores y laterales: 10×3.3 . **B**- BMF dispersas en los ciegos del intestino medio y la apertura a la parte anterior del intestino medio de una Zoea, temprana consumiendo bacterias (1.26×10^7 cfu ml⁻¹) y microalgas. Vista dorsal: 100×3.3 . **C**- BMF monodispersas y en racimo en el intestino anterior y medio de una Zoea, tardía consumiendo BMF de 6.6×10^6 durante 15-20 min. : 40×3.3 . **D**- Intestino posterior, ano y heces de una Zoea, en las mismas condiciones que la anterior: 40×3.3 .

Las BMF fueron frecuentemente observadas intactas en la región del intestino posterior dentro de la membrana peritrófica (Fig. 6 D, 7 A). Cuando las bacterias fueron ofrecidas junto con las microalgas, las BMF fueron observadas dentro del intestino inflado después de tan solo 15 min, confirmando observaciones previas usando verde de malaquita como tinción. Se observaron bacterias individuales dispersas aleatoriamente en la región anterior del intestino medio, incluyendo los ciegos anteriores y laterales (Fig. 6 B), y después progresivamente concentradas o empacadas dentro de la membrana peritrófica que cubre el cordón fecal (Figure 6 C). En una mayor ampliación, se observaron racimos (Fig. 6 C, D y Fig. 7 A) y BMF monodispersas (Fig. 6 D y Fig. 7 C, D) que habían viajado por el tracto digestivo siguiendo las contracciones peristálticas de las paredes intestinales. Estos movimientos fueron mas claramente observados en el extremo posterior de la larva donde las heces son expulsadas (Fig. 6 D). Los tramos distales y sueltos de los cordones fecales (Fig. 7 D) normalmente fluorescieron más que el material fecal más interno y proximal (Fig. 7 C). Esto sugiere que la colonización de las heces ocurre cuando estas han sido evacuadas y está dada por las bacterias presentes en el agua que al entrar en contacto con los cordones fecales se fijan a esa superficie. Aunque la microscopía óptica revela la presencia de material fecal en larvas alimentadas únicamente con BMF, la observación de fluorescencia no siempre coincide con el área y la posición de los racimos de BMF (Fig. 6 C y Fig. 7 A). Este patrón es más evidente cuando las larvas son alimentadas con BMF en combinación con microalgas (Fig. 7 C, D). Para comprobar la hipótesis de que no todas las bacterias sobreviven el pasaje por el tracto digestivo de las larvas se requieren estudios posteriores usando kits de tinción fluorescente diferencial (Haugland, 2001) para determinar la proporción de bacterias vivas y muertas a lo largo del tracto digestivo.

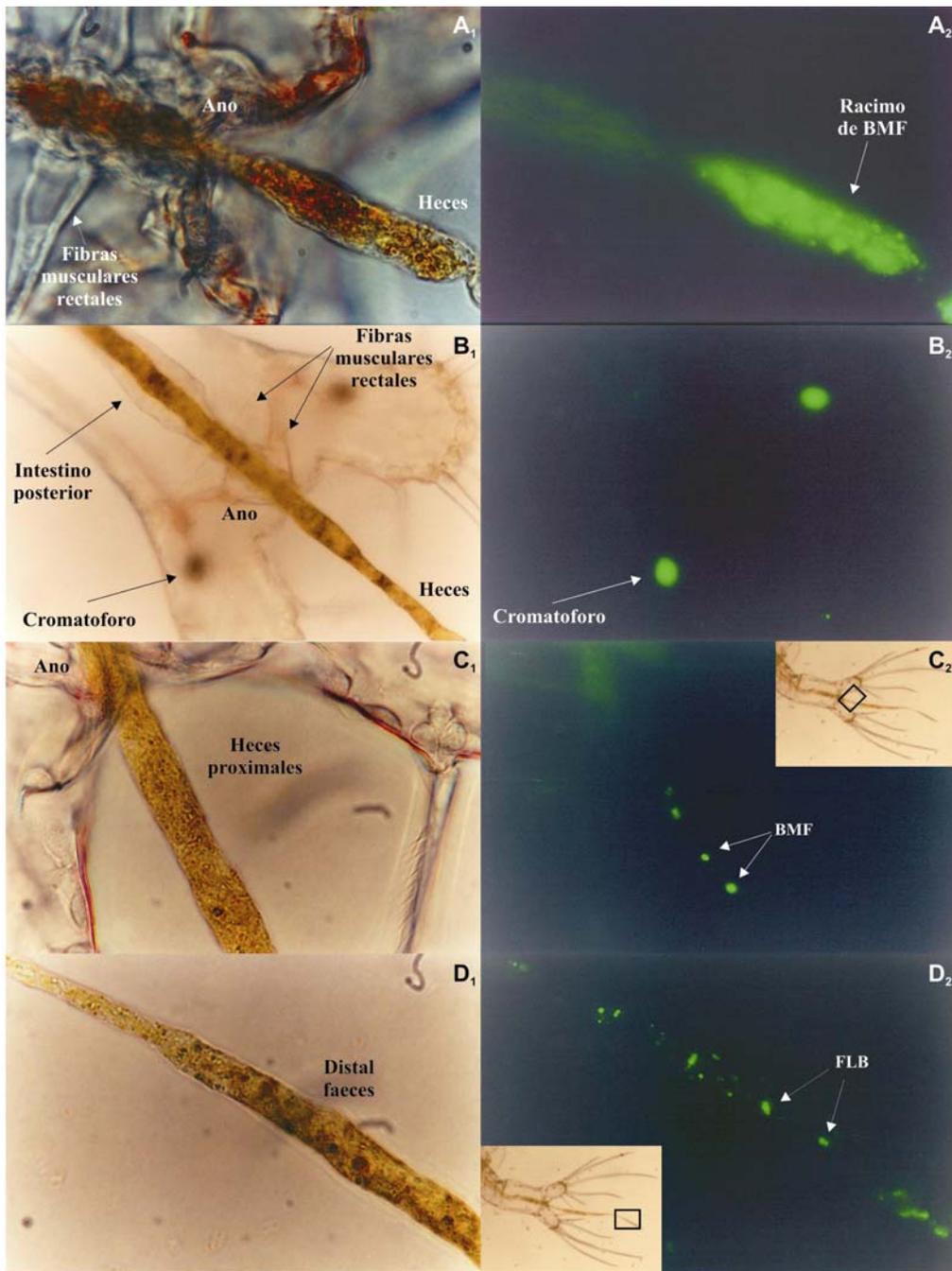


FIGURA 7 - Microfotos alineadas con aquellas idénticas de epi-fluorescencia de *Litopenaeus vannamei* Zoea, y Zoea, tempranas, alimentadas sólo con bacterias marcadas con fluorescencia (BMF - *Vibrio harveyi*, cepa Ea) o bien en combinación con microalgas (*Chaetoceros muelleri* 50.000 células ml⁻¹). Las fotos reducidas del mismo organismo en una ampliación menor muestran las áreas de las fotos C y D. Los números indican la ampliación del objetivo y ocular de la cámara. **A**- Región anal y heces de una Zoa₂, alimentada sólo con bacterias 1.4×10^7 durante 1-2 h: 100 x 3.3 junto con un racimo de BMF. **B**- Intestino posterior y heces de una Zoa, temprana consumiendo bacteria (1.26×10^7 cfu ml⁻¹) y microalgas: 40 x 3.3. **C**- BMF escasas en la región anal y heces proximales de una Zoa, temprana consumiendo bacteria (1.26×10^7 cfu ml⁻¹) y microalgas: 100 x 3.3. **D**- Varias FLB en heces distales del mismo individuo que se muestra en C: 100 x 3.3.

Las larvas alimentadas solo con bacterias (1.52×10^7 CFU BMF ml^{-1}) mostraron que el número de BMF en el intestino tuvo una disminución proporcional al tiempo. En el tiempo de observación "0" se registraron pocos cordones fecales dentro del intestino, aun que las BMF se pudieron observar claramente ya fuera en racimos o monodispersas. Cuarenta minutos después, se observaron todavía menos cordones fecales, y el número de larvas que presentaron BMF monodispersas se redujo a menos de la mitad (Fig. 8). A los 190 min, de 20 organismos inspeccionados solo 1 presentó un grupo de BMF monodispersas. Para los otros 3 especímenes fue más difícil diferenciar entre la fluorescencia del ruido de fondo y las BMF, pero dado que todas presentaron parches de fluorescencia más brillantes en la zona del intestino medio, fueron clasificados como especímenes con BMF presentes. Esta rápida reducción en la presencia de BMF dentro del intestino medio (30 min.) es significativa, especialmente considerando que las larvas no fueron alimentadas con microalgas lo que probablemente hubiese estimulado la peristalsis, acelerando el paso del alimento por el tracto y reduciendo el tiempo de transición (Lovett & Felder, 1990; Jones *et al.*, 1997). Estos datos, junto con las observaciones de larvas *in vivo* con BMF empacadas dentro de la membrana peritrófica, sugieren fuertemente que esta cepa bacteriana es transitoria en el intestino medio y posterior de las larvas que se alimentan por primera vez.

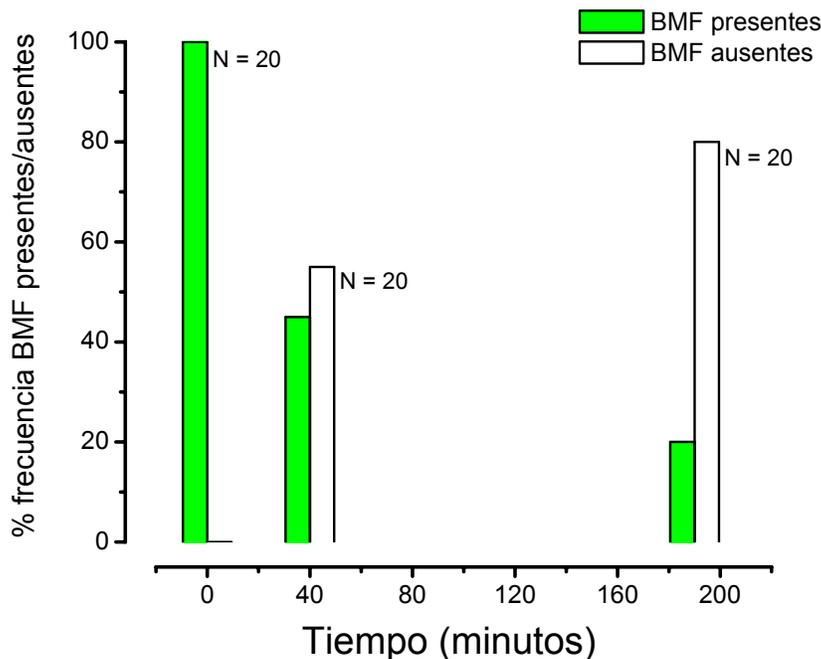


Fig. 8.- Evacuación de bacterias del tracto digestivo de larvas de camarón - Frecuencia de la presencia/ausencia de bacterias marcadas con fluorescencia (BMF) en el intestino medio y intestino posterior de Zoeas₁ de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con una concentración de bacterias de 1.52×10^7 ml^{-1} (*Vibrio harveyi*, cepa Ea).

Los géneros de bacterias presentes en el tracto intestinal de larvas de peces generalmente parecen ser aquellos del ambiente externo o de la dieta que sobreviven y se multiplican dentro del tracto (Cahill, 1990). La mayoría de los estudios sobre flora bacteriana en el tracto digestivo de tanto larvas como postlarvas de camarón han reportado *Vibrio* y *Pseudomonas* como los géneros dominantes, así como en el ambiente circundante (Tabla 4). Dempsey *et al.* (1989), trabajando con adultos de *Litopenaeus setiferus* y *L. aztecus*, encontraron tantas bacterias en el recubrimiento del intestino posterior como en su contenido, y sugirieron que grandes cantidades de bacterias se adhieren al recubrimiento intestinal después de haber hecho las observaciones de bacterias teñidas con epifluorescencia en la misma zona. Se ha observado que *Vibrio cholera* se adhiere preferentemente al intestino posterior en lugar del medio en cangrejos (Huq *et al.*, 1986). Sochard *et al.* (1979) encontraron que después de la evacuación de los pellets fecales en copépodos, había un mucho menor número de bacterias en el intestino. Por lo tanto, la liberación de la flora bacteriana vía los pellets fecales constituye un mecanismo que asegura la amplia distribución de estos organismos en el medio acuático.

Tabla 4.- Resumen de una revisión de trabajos sobre la flora bacteriana de crustáceos, con énfasis en comunidades bacterianas del tracto digestivo.

especie	estadio	intestino	autores
<i>Litopenaeus aztecus</i>	Adultos	+	(Williams & Rees 1952)
<i>Litopenaeus aztecus</i>	Adultos		(Vanderzant <i>et al.</i> 1971)
<i>Litopenaeus aztecus</i>	Adultos	+	(Dempsey <i>et al.</i> 1989)
<i>Litopenaeus aztecus</i>	Adultos		(Dempsey & Kitting 1987)
<i>Litopenaeus setiferus</i>	Adultos		(Hood <i>et al.</i> 1971)
<i>Litopenaeus setiferus</i>	Adultos	+	(Dempsey <i>et al.</i> 1989)
<i>Litopenaeus setiferus</i>	Adultos		(Dempsey & Kitting 1987)
<i>Litopenaeus setiferus</i>	Adultos		(Christopher <i>et al.</i> 1978)
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	Larvas	+	(Hameed 1993)
<i>Fenneropenaeus indicus</i>	Larvas	+	(Singh 1986)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Adultos	+	(Gomez-Gil <i>et al.</i> 1998)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Adultos	+	(Moss <i>et al.</i> 1996)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Adultos		(Christopher <i>et al.</i> 1978)
<i>Litopenaeus japonicus</i>	Larvas	+	(Yasuda & Kitao 1980)
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Adultos		(Christopher <i>et al.</i> 1978)
<i>Penaeus monodon</i>	Larvas	+	(Tanasomwang & Ruangpan 1995)
Varios peneidos	Adultos		(Alvarez 1983)
<i>Portunus trituberculatus</i>	Larvas	+	(Suzuki <i>et al.</i> 1990)
<i>Callinectes sapidus</i>	Adultos	+	(Huq <i>et al.</i> 1986)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Larvas		(Colorni 1985)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Adultos		(Anderson <i>et al.</i> 1989)
<i>Acartia tonsa</i>	Adultos	+	(Sochard <i>et al.</i> 1979)
<i>Limnoria tripunctata</i>	Adultos	+	(Zachary & Colwell 1979)
Varios copépodos	Adultos		(Huq <i>et al.</i> 1983)
<i>Boeckosimus affinis</i>	Adultos	+	(Atlas <i>et al.</i> 1982)

Para que una bacteria sea un colonizador potencial del ambiente transitorio que constituye el tracto digestivo de larvas de camarón, debe adherirse a las paredes intestinales y reproducirse para así poder tener una ventaja selectiva. Teniendo en cuenta que el intestino

anterior y posterior son desprendidas en cada ecdisis y que el tiempo estimado de evacuación (10-20 min. Jones *et al.*, 1997) de larvas alimentadas con microalgas es similar al tiempo generacional de un *Vibrio* bajo condiciones de crecimiento óptimo (observ. pers.), se puede concluir que la mayoría de las bacterias serán evacuadas antes de que consigan reproducirse dentro del intestino de la larva. Así mismo, después de abandonar los ciegos anteriores y laterales del intestino medio, el material digerido, incluyendo las bacterias, son envueltas y comprimidas en la membrana peritrófica aislando el material ingerido del recubrimiento intestinal (Zachary & Colwell, 1979; Lovett & Felder, 1990). Los tiempos de evacuación rápidos observados en este estudio (Fig. 8) sugieren que, bajo las actuales condiciones experimentales, la cepa bacteriana utilizada no pudo colonizar las partes anterior, mediana y posterior del intestino medio y intestino posterior de las Zoeas₁ de *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, fue difícil obtener una buena visualización de los ciegos anteriores y laterales del intestino medio, región considerada óptima para una eventual colonización bacteriana. Para estudiar la colonización de los ciegos anteriores y laterales del intestino medio por bacterias en el futuro, será necesario el montaje de otro tipo de técnicas.

CONCLUSIONES

- 1).- Una vez usando agua con sólidos suspendidos reducidos, la esterilización del agua de cultivo inicial rinde resultados similares a los del agua de mar natural.
- 2).- Es preferible usar el agua de un sistema de recirculación sin carga orgánica que aquel de uno con una gran carga orgánica.
- 3).- Los probióticos bacterianos comerciales deben ser usados con precaución dado el incremento potencial en la concentración de amonio que generan como resultado de la descomposición del medio enriquecido para el crecimiento bacteriano que incluye el producto.
- 4).- Los Nauplios₅ de camarón ya presentan un poro anal con movimientos antiperistálticos (“anal drinking”) que permite la colonización del tracto digestivo por bacterias presentes en la columna de agua antes de que la boca se abra al medio exterior y comience la actividad normal de alimentación.
- 5).- Las Zoeas₁ pueden ingerir bacterias presentes en el agua de cultivo, aunque “prefieren” y son más eficientes filtrando microalgas.
- 6).- No está claro si el inicio de la actividad de beber que sigue la apertura de la boca en Zoa₁ es resultado de un mecanismo pasivo innato o es disparado por la presencia de componentes alimenticios específicos como las microalgas.
- 7).- La manipulación de la comunidad bacteriana inicialmente presente en el agua de cultivo tiene un impacto directo en la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de las larvas, lo que conlleva a la hipótesis de que el éxito del cultivo es una consecuencia de una colonización bacteriana diferencial.

AGRADECIMIENTOS

El financiamiento para esta investigación fue provisto por una beca del FCT PRAXIS-XXI/BD/15909/98 (Gobierno Portugués) y CONACYT Proyecto J-28344. Queremos

agradecer a I. Giffard y L. Lizárraga-Partida por la donación de la cepa bacteriana y a INVE Technologies por el suministro de las dietas micro encapsuladas. Así mismo, deseamos agradecer en Ciudad del Carmen, Campeche.: a la Ing. Adriana Paredes y la Biol. Gabriela Palomino por abastecer el alimento vivo; al M. en C. Pedro Gallardo por sus sugerencias y comentarios en el diseño experimental; y a Industrias Pecis, Mérida, Yucatán. por el abastecimiento de Nauplios de camarón en Ciudad del Carmen, Campeche. En Mazatlán, Sin.: a la M. en C. Selene por su ayuda en la preparación de los cortes histológicos; a la QFB Carmen Bolán por su ayuda en el Laboratorio de Microbiología; y al Ing. Cesáreo Cabrera de Maricultura del Pacífico por el abastecimiento de Nauplios en Mazatlán, Sin. En México, D.F.: a la M. en C. Silvia Rodríguez por su ayuda con la MEB. Así mismo queremos expresar nuestra gratitud a la Dra. Maite Mascaro por la traducción al español.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- Alabi, A. O., Yudiati, E., Jones, D.A., 1997. *Bacterial Levels in Penaeid Larval Cultures*. Manila: Asian Fisheries Society.
- Alcaraz, M., Paffenhofer, G. A., Strickler, J. R., 1980. Catching the algae: a first account of visual observations on filter-feeding calanoids. *American Society of Limnology and Oceanography Special Symposium* 3, 241-248.
- Alsina, M., Blanch, A. R., 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 79-85.
- Alvarez, R. J., 1983. Frequency and distribution of bacterial flora of penaeid shrimp. *Caribbean Journal of Science* 19, 43-48.
- Anderson, I. G., Shamsudin, M. N., Nash, G., 1989. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. *Aquaculture* 81, 213-223.
- Atlas, R. M., Busdosh, M., Krichecsky, E. J., Kaneko, T., 1982. Bacterial populations associated with the Arctic amphipod *Boeckosimus affinis*. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 92-99.
- Austin, B., Baudet, E., Stobie, M., 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Disease* 15, 55-61.
- Austin, B., Day, J. G., 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. By a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90, 389-392.
- Bell, W. H., Lang, J. M., 1974b. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnology and Oceanography* 19, 833-839.
- Bell, W. H., Lang, J. M., 1974a. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnology and Oceanography* 19, 833-839.
- Bell, W. H., Mitchell, R., 1972. Chemostatic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin* 143, 265-277.
- Boyd, C. M., 1976. Selection of particle sizes by filter-feeding copepods: A plea for reason. *Limnology and Oceanography* 21, 175-180.
- Brock, J. A., Lightner, D. V., 1990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms. In: *Diseases of Marine Animals*, pp. 296-422. New York, John Wiley & Sons.
- Brock, T. D., Clyne, J., 1984. Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 731-734.
- Cahill, M. M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 19, 21-41.
- Cahu, C. L., Zambombino-Infante, J. L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A, 213-222.

- Chen, J. C., Chin, T. S., Lee, C. K., Effects of ammonia and nitrite on larval development of the shrimp *Penaeus monodon*. Maclean, J. L., Dizon, L. B., and Hosillos, L. V. 657-662. 1986. Malina, Philippines, Asian Fisheries Society. The first Asian Fisheries Forum.
- Chen, J. C., Lin, C. Y., 1991. Lethal doses of ammonia on *Penaeus chinensis* larvae. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin* 30, 289-297.
- Chen, J. C., Tu, C. C., 1990. Acute toxicity of nitrite to larval *Penaeus japonicus*. *J. Fish. Soc. Taiwan* 17, 277-287.
- Chen, J. C., Tu, C. C., Yang, W. S., 1989. Acute toxicity of ammonia to larval *Penaeus japonicus*. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 16, 17-26.
- Cheng, S. Y., Chen, J. C., 1994. Lethal concentration of nitrite on *Penaeus chinensis* larvae. *Zoological Studies* 33, 228-231.
- Christopher, F. M., Vanderzant, C., Parker, J. D., Conte, F. S., 1978. Microbial flora of pond reared shrimp (*Penaeus stylirostris*, *Penaeus vannamei* and *Penaeus setiferus*). *J. Fd. Prot.* 41, 20-23.
- Cole, J. J., 1982. Interaction between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review on Ecological Systems* 13, 291-314.
- Colomi, A., 1985. A study on the bacterial flora of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 49, 1-10.
- Dabrowski, K., Glogowski, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54, 129-134.
- Dempsey, A. C., Kitting, C. L., 1987. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana* 52, 90-94.
- Dempsey, A. C., Kitting, C. L., Rosson, R., A., 1989. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* 56, 267-278.
- Douillet, P. A., Langdon, C. J., 1993. Effect of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas*. *Biological Bulletin* 184, 36-51.
- Douillet, P. A., Langdon, C. J., 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119, 25-40.
- Duff, D. C. B., Bruce, D.L., Anita, N. J., 1966. The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Canadian Journal of Microbiology* 12, 877-884.
- Felgenhauer, B. E., 1987. Techniques for preparing crustaceans for scanning electron microscopy. *Journal of Crustacean Biology* 7, 71-76.
- Fisher, W. S., 1977. epibiotic microbial infestations of cultured crustaceans. *Proceedings of the World Mariculture Society* 8, 673-684.
- Fisher, W. S., 1988a. Microbial epibionts of Dungeness crabs. In: *Disease Diagnosis and Control of North America Marine Aquaculture* (Ed. by C.J.Sindermann & D.V.Lightner), pp. 222-225. New York, Elsevier.
- Fisher, W. S., 1988b. Microbial epibionts of lobsters. In: *Disease Diagnosis and Control of North America Marine Aquaculture* (Ed. by C.J.Sindermann & D.V.Lightner), pp. 243-246. New York, Elsevier.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., Hata, Y., 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries - Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 2321-2326.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Segner, H., 2000. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 237-244.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. *An Evaluation of the Production and Use of a Live Bacterial Isolate to Manipulate the Microbial Flora in the Commercial Production of Penaeus Vannamei Postlarvae in Ecuador*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society.
- Ghera, L., 1994. Culture preservation. In: *Methods for General and Molecular Microbiology* (Ed. by P.Gerhardt, R.G.E.Murray, W.A.Wood & N.R.Krieg) Washington, American Society for Microbiology.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 19, 259-270.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Velasco, G., 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 211, 43-48.

- Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V., Guerra-Flores, A. L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163, 1-9.
- Grahame, J., 1983. Adaptive aspects of feeding mechanisms. In: *Environmental Adaptations* (Ed. by J.Venberg & U.Venberg), pp. 65-107. Academic Press Inc.
- Gram, L., Nys, R., Maximilien, R., Givskov, M., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. 1996. Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea Pulchra* on swarming motility of *Proteus mirabilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4284-4287.
- Guillard, R. R. L., Hellebust, J. A., 1971. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis pouchettii*. *Journal of Phycology* 7, 330-338.
- Hameed, A. S. S., 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacterial-flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 117, 195-204.
- Haugland, R. P., 2001. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. 8th edition edn. Eugene, Oregon: Molecular Probes.
- Hood, M. A., Meyers, S. P., Colmer, A. R., 1971. Bacteria of the digestive tract of the white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Bacteriological Proceedings* 71, G-147.
- Huq, A., Huq, S. A., Grimes, D. J., O'Brien, M., Chu, K. H., Capuzzo, J. M., Colwell, R. R., 1986. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 586-588.
- Huq, A., Small, E. B., West, P. A. H. M. I., Rahman, R., Colwell, R. R., 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 275-283.
- Intriago, P., 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 113, 115-127.
- Johansson, O., Wedborg, M., 1980. The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25°C. *Journal of Solution Chemistry* 9, 37-44.
- Jones, D. A., 1998. Crustacean larval microparticulate diets. *Reviews in Fisheries and Science* 6, 41-54.
- Jones, D. A., Walton, M., Bridson, P., 2000. The use of recirculated seawater as a pretreatment for the larval culture of *Fenneropenaeus indicus* on microencapsulated feeds. Vanroose, S., Titeca, E., Aspeslagh, L., Joncheere, H., Flos, R., and Creswell, L. AQUA 2000, Responsible Aquaculture in the New Millennium. 28, 318. 2000. Belgium, European Aquaculture Society. European Aquaculture Society, Special Publication. 6-2-2000.
- Jones, D. A., Yule, A. B., Holland, D. L., 1997. Larval nutrition. In: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture* (Ed. by L.R.D'Abramo, D.E.Conclin & D.M.Akiyama) World Aquaculture Society.
- Juarez, L. M., 1997. *The Zoea-II Syndrome: A Recently Recognized Problem in Shrimp Hatcheries*. Tegucigalpa, Honduras.: Asociacion Nacional de Acuicultores de Honduras and the Latin American chapter of the World Aquaculture Society.
- Kellam, S.J., Walker, J. M., 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycology Journal* 24, 191-194.
- Khoo, K. H., Culberson, C.H., Bates, R. G., 1977. Thermodynamics of the dissociation of ammonium ion in seawater from 5-40°C. *Journal of Solution Chemistry* 6, 281-290.
- Koehl, M. A., Strickler, J. R., 1981. Copepod feeding currents: food capture at low Reynolds number. *Limnology and Oceanography* 26, 1062-1073.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve on the growth of marine bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 36, 201-215.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture* 161, 491-499.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- Lovett, D. L., Felder, D. L., 1989. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Morphology* 201, 253-272.
- Lovett, D. L., Felder, D. L., 1990. Ontogeny of kymematics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Crustacean Biology* 10, 53-68.

- Moss, S. M., LeaMaster, B. R., Sweeney, J. N. Effects of water source on gut microflora in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. WAS Meeting. 263. 1996. WAS Book of Abstracts.
- Naviner, M., Berge, J. P., Durand, P., Le Bris, H., 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174, 15-24.
- Nogami, K., Maeda, M., 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2373-2376.
- Nys, R., Steinberg, P. D., Willemsen, P., Dworjanyn, S. A., Gabelish, C. L., King, R. J., 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* 8, 259-271.
- Pantoja, C. R., Lightner, D. V., Redman, R. M., 1997. Morphological pathology of the zoea-II syndrome of penaeid shrimp. Alston, D. E., Green, B. W., and Clifford, H. C. IV symposium on aquaculture in Central America: focusing on shrimp and tilapia. 184-186. 1997. Latin American chapter of the World Aquaculture Society and the Asociacion Nacional de Acuicultores de Honduras and.
- Parsons, T. R., Maita, Y., Lalli, C. M., 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press.
- Peterson, B. J., Hobbie, J. E., Haney, J. F., 1978. *Daphnia* grazing on natural bacteria. *Limnology and Oceanography* 23, 1039-1043.
- Price, H. J., Paffenhofer, G. A., Strickler, J. R., 1983. Modes of cell capture in calanoid copepods. *Limnology and Oceanography* 28, 116-123.
- Reichelt, J. L., Borowitzka, M. A., 1984. Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. *Hydrobiologia* 116/117, 158-168.
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., 2000. selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Riquelme, C., Haayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic *Vibrios*. *Journal of Shellfish Research* 15, 369.
- Riquelme, C., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendano, R. E., Reyes, N., 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192, 111-119.
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolan-Mejia, C., Gomez-Gil, B., 2001. In vitro susceptibilities of *Vibrio* isolates isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico to 15 antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 15, 383-387.
- Salvesen, I., Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during first feeding in relation to the proportion of r/K-strategists in the bacterial community of the rearing water. *Aquaculture* 175, 337-350.
- Sieburth, J. M., 1960. Acrylic acid, an "antibiotic" principle in *Phaeocystis* bloom in antarctic waters. *Science* 132, 676-677.
- Singh, B. I., 1986. Studies on the Bacteria Associated With *Penaeus Indicus* in a Culture System. Ph.D. Cochim University of Science and Technology.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Oie, G., Olsen, Y., Vadstein, O., 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International* 5, 13-28.
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1993. The effect of microalgae on skin and gut bacterial flora of halibut larvae. In: *Fish Farm Technology* (Ed. by H.Reinertsen, L.A.Dahle, L.B.Jorgensen & K.Tvinnereim), pp. 61-67. Rotterdam, Balkema.
- Sochard, M. R., Wilson, D. F., Austin, B., Colwell, R. R., 1979. Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 750-759.
- Soto-Rodriguez, S. A., Simões, N., Jones, D. A., Roque, A., Gomez-Gil, B. 2002. Assessment of fluorescent labeled bacteria (FLB) for evaluation of *in vivo* uptake of bacteria (*Vibrio spp.*) by crustacean larvae. *Journal of Microbiological Methods* in press.

- Spotte, S., Adams, G., 1983. Estimation of the allowable upper limit of ammonia in saline waters. *Marine Ecology Progress Series* 10, 207-210.
- Suzuki, K., Muroga, K., Nogami, K., Maruyama, K., 1990. Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish Pathology* 25, 29-36.
- Tanasomwang, V., Ruangpan, L., 1995. Bacterial flora of larvae of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: *Diseases in Asian Aquaculture II* (Ed. by M.Shariff, J.R.Arthur & R.P.Subasinghe), pp. 151-162. Manila, Philippines, Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Tezuka, Y., 1971. Feeding of *Daphnia* on planktonic bacteria. *Japanese Journal of Ecology* 21, 127-134.
- Vanderzant, C., Nickelson, R., Judkins, P. W., 1971. Microbial flora of pond-reared shrimp *Penaeus aztecus*. *Applied Microbiology* 21, 916-921.
- Verstraete, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655-671.
- Villegas, D. K., Kanazawa, A., 1979. Relationship between diet composition and growth of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. *Fish Res. J. Philipp.* 4, 32-40.
- Wheaton, F. W., Hochheimer, J. N., Kaiser, G. E., Krones, M. J., Libey, G. S., Easter, C., 1994. Nitrification filter principles. In: *Aquaculture Reuse Systems: Engineering Design and Management* (Ed. by M.B.Timmons & T.M.Losordo), pp. 101-126. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, Elsevier.
- Whitfield, M., 1974. The hydrolysis of ammonium ions in seawater: theoretical study. *Journal of the Marine Biology Association UK* 54, 565-580.
- Williams, O.B., Rees, H. B., 1952. The bacteriology of Gulf coast shrimp III - The internal flora. *Texas Journal of Science* 1, 55-58.
- Williams, R. R., Bell, T. A., Lightner, D. V., 1992. Shrimp antimicrobial testing II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae. *Journal of Aquatic Animal Health* 4, 262-270.
- Yasuda, K., Kitao, T., 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 19, 229-234.
- Yule, A. B., Crisp, D. J., 1983. A study of feeding behaviour in *Temora longicornis* (Muller) (CRUSTACEA: COPEPODA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 71, 271-282.
- Zachary, A., Colwell, R. R., 1979. Gut associated microflora of *Limnoria tripunctata* in marine creosote-treated wood pilings. *Nature (London)* 282, 716-717.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th edn. New Jersey: prentice Hall.
- Zilch, R., 1978. Embryologische Untersuchungen an der holoblastischen Ontogenese von *Penaeus trisulcatus* Leach (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphologie* 90, 67-100.