



## NOTA CIENTÍFICA

# Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*

## *Vibrio harveyi* effect under survival of *Litopenaeus vannamei* larvae

Gabriel Aguirre-Guzmán\* ; Edgar Alberto López-Acevedo; María de la Luz Vázquez-Sauceda

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Km 5 Carr. Victoria - Mante, Cd. Victoria, Tam. México, 87000.

Recibido 30 abril 2013; aceptado 29 mayo 2013

### Resumen

Los cultivos acuícolas son de gran relevancia en la alimentación humana, pero crean un medio ambiente artificial que promueve el crecimiento de diferentes especies de bacterias. Las especies del género *Vibrio* son bacterias de la microflora normal de los camarones peneidos y son también agentes patógenos oportunistas que pueden tomar ventaja de éstos cambios ecológicos generados en los cultivos acuícolas causando diferentes enfermedades, sobrevivencias bajas y pérdidas económicas en la producción de camarón. El objetivo de la presente investigación fue determinar la variación en la sensibilidad, de diferentes subestadios larvarios (nauplio, zoea I-III, misis I-III) y en el de postlarva 1, del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* al ser expuestos a tres dosis [ $10^3$ ,  $10^5$ , y  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{ml}^{-1}$ ] de *V. harveyi*, mediante infecciones por inmersión (30 min). Esta especie generó una sobrevivencia baja significativa en las larvas ( $p < 0,05$ ) solamente en las dosis más altas ( $10^5$  y  $10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), siendo la última dosis la que presentó los valores más bajos de sobrevivencia. Además, se observó que los subestadios larvales y en el de postlarva 1 fueron más resistentes a *V. harveyi* al aumentar la edad de los mismos. Esta información tiene gran significado para la industria acuícola, ya que les permite generar estrategias que disminuyan los efectos de *V. harveyi* y que les permita mejorar el crecimiento y sobrevivencia de las larvas y de postlarva 1 del camarón.

**Palabras clave:** *Litopenaeus vannamei*, camarón, infección, sobrevivencia, *Vibrio harveyi*.

### Abstract

The culture of aquatic organisms show a high relevance in the human feeding and the culture activities can create artificial conditions that increase the growth and selection of specific bacteria. *Vibrio* species are normal bacteria's from microflora of penaeid shrimp, those are opportunistic pathogens that can take advantage of the ecological changes generated for the culture of aquatic organisms and which may cause diseases, low survival and economic losses in the shrimp production. The aim of this research was to determine the variation in the survival of different larval substages (nauplius, zoea I-III, mysis I-III) and postlarvae 1, of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed at three doses [ $10^3$ ,  $10^5$ , and  $10^7$  colony-forming unit (CFU)  $\text{ml}^{-1}$ ] of *V. harveyi*, by immersion (30 min) as infection method. This species generated a significant low survival in larvae ( $p < 0.05$ ) only in high doses ( $10^5$  and  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ), where higher doses show the lowest values of survival. Larval substages and postlarvae 1 of shrimp showed sensitivity associate to the increase of *Vibrio* doses and this sensitivity decreased with the growth of larval substages and postlarvae 1. This information has high significance for the fisheries and aquaculture industry, which help to generate strategies to reduce the effects of *V. harveyi* with positive effect in growth and survival of the shrimp larvae and postlarvae 1.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, shrimp, infection, survival, *Vibrio harveyi*.

### 1. Introducción

La producción de organismos acuáticos es una actividad en constante crecimiento,

siendo muy variadas las especies dulce-acuícolas y marinas que se producen bajo este esquema de producción (FAO, 2012).

\* Autor para correspondencia

Email: [gabaguirre@uat.edu.mx](mailto:gabaguirre@uat.edu.mx) (G. Aguirre-Guzmán)

Actualmente, este sector representa una de las fuentes de proteína animal muy valorada por el sabor y calidad de sus productos (FAO, 2012). En 2010, la acuicultura generó 59,9 millones de toneladas métricas de productos para el consumo humano, con un valor comercial de 119 billones USD (FAO, 2012). Sin embargo, este tipo de productos de consumo no están libre de problemas, en 1997 el Banco Mundial determinó se perdieron cerca de 3000 millones de dólares (USA) de productos provenientes de la acuicultura debido a las enfermedades que presentaron los organismos bajo cultivo (Subasinghe, 1997).

Desde sus inicios, el uso de larvas de origen silvestres o provenientes de los laboratorios de producción de larvas de organismos acuáticos (camarón, langostino, peces, moluscos, etc.), han tenido problemas con enfermedades originadas por diferentes microorganismos patógenos, las cuales originan importantes mermas en la producción de esta industria y en las del medio ambiente (Kobayashi y Melkonyan 2011).

Los vibrios son microorganismos que pueden constituir casi un 60% de la población bacteriana del medio ambiente en algunas regiones estuarinas y son parte de la flora autóctona de los organismos marino, además son una fuente constante de posibles infecciones para crustáceos, moluscos y peces (Ravi *et al.*, 2007; Mohajeri *et al.*, 2011). Las principales especies que han sido reportadas como causantes de infecciones en larvicultura de camarones (*Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, y *L. vannamei*) son: *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, y *V. parahaemolyticus* (Widanarni *et al.*, 2003; Austin, 2010; Mohajeri *et al.*, 2011). Mientras que los juveniles y adultos de camarón bajo cultivo son afectados principalmente por *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, y *V. vulnificus* (Austin, 2010; Mohajeri *et al.*, 2011).

La mortalidad en las larvas de camarón (*F. indicus*) que son generadas a causa de *Vibrio* spp. se puede incrementar cuando la población de estas bacterias aumenta en los tanques de cultivo (Abraham, 2006). Ravi *et al.* (2007) observaron una proliferación de *Vibrio* spp. en los subestadios de zoea (Z) del camarón y de *Pseudomonas* spp. en los juveniles, la presencia simultánea de ambas especies retardaron el crecimiento del camarón. Han llevado a cabo estudios a fin de establecer el grado de patogenicidad que poseen algunas especies de *Vibrio* en crustáceos. Hameed (1995) trabajó con el efecto que produce *V. campbellii* a distintas dosis ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , y  $10^9$  UFC/ml) sobre los subestadios larvarios [nauplio (N), Z, misis(M)] y el de postlarva (PL) de *L. indicus*, *P. monodon* y *P. semisulcatus*. Este trabajo, reveló una mortalidad clara de las diferentes especies de camarón y sus subestadios larvarios hacia las infecciones con *Vibrio*. Los subestadios larvarios de N y Z requirieron una dosis menor de infección que los subestadios de M y en las PL; mostrando así una mayor sobrevivencia de estas últimas al verse expuestas a *V. campbellii*. Estas variaciones en la sobrevivencia estuvieron relacionadas con la edad de los subestadios larvales, dosis bacteriana empleada y tiempo de exposición a la misma. Resultados similares fueron detectados por Austin y Zhang (2006) y Wongtavatchai *et al.* (2010) quienes demostraron que los subestadios larvales de camarón son afectados por la presencia constante en su medio de cultivo de *Vibrio* sp. ( $10^7$  UFC/ml).

Karunasagar *et al.* (1994) trabajaron con la susceptibilidad de PL de *P. monodon* expuestas a una cepa de *V. harveyi* silvestre y otra resistente a antibióticos (cloranfenicol y eritromicina); estas PL fueron infectadas con las cepas de *Vibrio* (dosis de  $10^2$  hasta  $10^6$  UFC/ml) y mantenidas en observación durante 5 días. Se determinó que *V. harveyi* resistente a antibióticos, mostró una dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de  $2,6 \times 10^3$  UFC/ml, mientras que

la otra cepa presentó una  $DL_{50}$  de  $1,5 \times 10^5$  UFC/ml. Esto comprobó que la cepa obtenida de los tanques de cultivo logró resistir y crecer en presencia de dichos agentes químicos, sobreviviendo así los más virulentos y generando la mortalidad observada en las postlarvas experimentales. También se ha determinado que una cepa de *V. harveyi* resistente a cloranfenicol, puede transferir esta resistencia a otras bacteria del mismo género y estas generan mortalidad en larvas de camarón (Abraham, 2006).

Las especies que conforman al género *Vibrio*, originan trastornos a las larvas de camarón, los cuales pueden llevar a la muerte de las mismas (Widanarni *et al.*, 2003; Austin y Zhang, 2006; Ravi *et al.*, 2007). Al infectar subestadios larvales de *L. vannamei* con *V. harveyi* ( $10^5$  UFC/ml), Robertson *et al.* (1998) determinaron que esta dosis fue suficiente para generar el trastorno conocido como bolitas negras, cuyos síntomas son degradación de tejido hepatopáncreático, nado lento, reducción en la alimentación, y retardo en el desarrollo larval, además de la bioluminiscencia que puede llegarse a percibir con esta especie de *Vibrio*. Estos trastornos pudieron propiciar la mortalidad de los subestadios larvarios empleados es esa investigación.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la variación en la sobrevivencia de diferentes subestadios larvarios y postlarva del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* (N, Z, y M), además de PL1 al ser expuestos a tres dosis ( $10^3$ ,  $10^5$ , y  $10^7$  UFC/ml) de *V. harveyi*, mediante infecciones por inmersión.

## 2. Materiales y métodos

### Condiciones de cultivo de la bacteria

*Vibrio harveyi* fue aislada de *L. vanammei* enfermos de vibriosis y crio-conservada (-80°C, Revco®, Iowa, USA) y cultivada sobre placas de agar Luria-Bertani o LB [(extracto de levadura (5 g/l), triptosa (10 g/l), agar (20 g/l)] con 2,5% de NaCl, e

incubados a 37°C por 24 h (incubadora Nuairé®, USA). Las colonias bacterianas obtenidas de las placas de agar fueron transferidas a tubos de ensaye con 10 ml de agua de mar filtrada (0,2 µm) hasta obtener una absorbancia de 1 a 540 nm (Spectronic 21d, Milton Roy®, USA). Esto corresponde a una densidad celular de  $10^9$  UFC/ml. La biomasa celular obtenida fue centrifugada a 3000 rpm (centrifuga, Allegra®, Beckman, USA) por 15 min y el pellet fue resuspendido nuevamente en 10 ml de agua de mar filtrada (0,2 µm) y empleado para hacer las dosis experimentales ( $10^3$ ,  $10^5$ , y  $10^7$  UFC/ml).

### Animales experimentales

Nauplios sanos de *L. vannamei* fueron obtenidos de dos lotes provenientes de un laboratorio comercial de producción de larvas de camarón (APSA, La Paz, BCS, México). Los organismos fueron transportados desde el laboratorio comercial en cajas de poliestireno con agua de mar (27 °C, pH = 7,8 - 8,2 y 32‰) hasta el laboratorio de bioensayos (CIBNOR, La Paz, B.C.S.). Los N fueron transferidos desde la caja de poliestireno y aclimatados en un tanque de cultivo larval (400 litros con fondo cónico) con aireación y agua de mar filtrada (1 µm), con 10 mg/l de EDTA, y la cual fue mantenida a pH = 7,8 - 8,2, 27°C y 35‰. Los organismos bajo cultivo fueron alimentados con una dieta estándar a base de microalga (*Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis suecica*) y/o *Artemia* conforme los descrito por Xu-xia *et al.* (2009). Agar de TCBS (Agar-tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa, Difco®) fue usado como medio de cultivo en la evaluación del contenido de *Vibrio* en el agua de mar y en los nauplios del camarón.

### Bioensayo de infección en camarón

El reto experimental fue realizado a fin de evaluar la susceptibilidad de cada estadio y subestadio larval (N, Z I-III, y M I-III) y la PL1 del camarón hacia *V. harveyi* en las siguientes dosis:  $10^3$ ,  $10^5$ , y  $10^7$  UFC/ml. Los subestadios larvales y la de la PL1

fueron colectados independientemente del tanque de cultivo después de su metamorfosis a PL1. Antes de la infección, las larvas seleccionadas fueron lavadas dos veces con agua marina estéril con 10 mg/l de EDTA, a fin de remover las partículas de alimento, detritus, y reducir el número de microorganismos adheridos (Abraham, 2006). Al inicio del experimento los subestadios larvarios y las PL1 fueron aclimatadas en el área de experimentación por 2 h y cultivadas en agua marina estéril (pH 7,8 - 8,2, 27 °C y 35‰).

El reto fue realizado como describen Widanarni *et al.* (2003) y Vieira *et al.* (2007). En resumen, los subestadios larvarios y las PL1 fueron colectados suavemente con red e infectadas por medio de inmersión (30 min) en agua marina estéril con la suspensión bacteriana correspondiente ( $10^3$ ,  $10^5$ , o  $10^7$  UFC/ml de *V. harveyi*). El grupo control fue tratado de forma igual e inmersa en agua marina estéril por 30 min. Posteriormente, los organismos de cada subestadio larvario y las PL1 fueron infectados fueron lavados dos veces con agua marina estéril, y recolectados con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y cultivados independientemente en frascos de vidrio de 0.5 litros a una densidad de 100 larvas/l.

El grupo control y el tratamiento bacteriano, en sus diferentes dosis, fueron evaluados por triplicado ( $n = 3$ ). Los tratamientos fueron monitoreados a las 24 y 48 h, usando un microscopio, y alimentados con una dieta estándar a base de microalga (*Chaetoceros muelleri* y *Tetraselmis suecica*) y/o *Artemia* conforme lo descrito por Xu-xia *et al.* (2009).

La sobrevivencia de los organismos de cada tratamiento fue evaluada a las 48 h y reportada como:

Porcentaje de sobrevivencia (%) = [(número final de organismos - número inicial de organismos) / Número inicial de organismos] x 100.

Fue usado agar de TCBS para determinar el contenido de *Vibrio* sp. en el agua marina del cultivo del camarón y en los correspondientes subestadios larvarios.

### Análisis estadístico

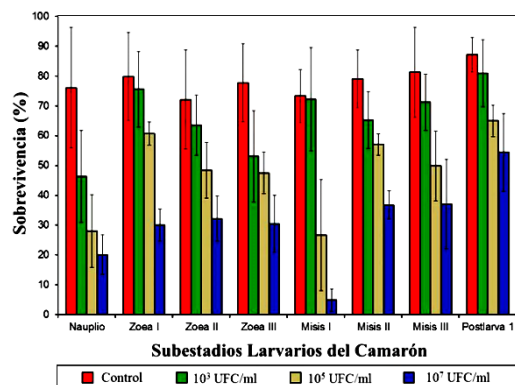
La sobrevivencia producida por las diferentes dosis fue analizada para cada uno de los subestadios larvales y PL1 por medio de una prueba de homogeneidad de varianza de Barlett's, seguido por un análisis de varianza de Duncan, y un análisis de correlación. Todos éstos análisis estadísticos fueron llevados a cabo en una computadora y usando el programa STATISTICA®. El valor de cada uno de las réplicas fue considerado como una muestra estadística. El efecto en la distribución de los cuadrantes, tratamientos, y replicas fueron analizados siguiendo el procedimiento antes descrito.

### 3. Resultados y discusión

En forma general, los signos fuertes de enfermedad que son generados por *Vibrio harveyi* fueron observados en los subestadios larvarios y en la PL1 post-infectados. Estos signos fueron: lesiones y necrosis en los apéndices, letargia, malformaciones del cuerpo y opacidad del mismo. Signos similares han sido reportados en otras especies de camarón (Chatterjee y Haldar, 2012). Sin embargo, estos signos no fueron cuantificados a lo largo de este bioensayo.

Los nauplios del grupo control y los infectados con *V. harveyi* ( $10^3$  y  $10^5$  UFC/ml) presentaron sobrevivencias significativamente mayores al ser comparados con sus homólogos que fueron infectados a una dosis de  $10^7$  UFC/ml. Siendo el grupo control quien presentó la sobrevivencia mayor (Figura 1). Los subestadios desde Z I hasta M II que fueron infectados con una dosis de  $10^3$  UFC/ml no presentaron una sobrevivencia significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) al ser comparados con el grupo control (Figura 1). Sin embargo, los subestadios de Z I hasta M II, que fueron infectados con una dosis de  $10^5$  o  $10^7$  UFC/ml, tuvieron una sobrevivencia significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en comparación con sus homólogos del grupo control. Si comparamos los subestadios de M III y PL

I del grupo control con los que fueron infectados a la dosis de  $10^3$  UFC/ml, éstos no presentaron una diferencia significativa en su sobrevivencia ( $p < 0,05$ ), no así los que fueron infectados a  $10^5$  o  $10^7$  UFC/ml.



**Figura 1.** Sobrevivencia de los subestadios larvarios del camarón (*Litopenaeus vannamei*) infectados con diferentes dosis de *Vibrio harveyi*.

*Vibrio harveyi* mostró una gran variación en términos de su virulencia hacia las distintas especies y subestadios de desarrollo del camarón (subestadios larvarios, PL, juvenil, y adulto) (Ravi *et al.*, 2007). *Vibrio harveyi* genero sobrevivencia baja en todos los subestadios larvales del camarón usados en la presente investigación, siendo desde N hasta Z III los que mostraron una mayor sensibilidad o mortalidad hacia el patógeno, comparado con los subestadios de M I-III, y con las PL1. Resultados similares fueron observados por Hameed (1995) quien mostró progresiva resistencia de los subestadios larvales hacia *V. campbellii* conforme *L. indicus*, *P. monodon* y *P. semisulcatus* crecen y avanzan en su desarrollo larvario. Esta sensibilidad está en función de la dosis de exposición, especie bacteriana, y especie de camarón. Wongtavatchai *et al.* (2010) sugieren que la sensibilidad de los subestadios larvarios de *L. vannamei* y *P. monodon* hacia *V. parahaemolyticus* patógeno es mayor en los primeros subestadios de zoea, esta sensibilidad decrece conforme progresa el desarrollo del organismo.

Alavandi *et al.* (2006) y Mohajeri *et al.* (2011) señalaron que *V. harveyi* es uno de los mayores patógenos que afectan a todos los subestadios larvarios y juveniles del camarón. En la presente investigación no se detectó una diferencia estadística significativa ( $p > 0,05$ ) en la sobrevivencia de todos los subestadios larvarios y el de PL del camarón cuando fueron infectados con esta especie de bacteria con la dosis de  $10^3$  UFC/ml, comparado con sus correspondientes homólogos del grupo control. Las dosis de  $10^5$  y  $10^7$  UFC/ml causaron porcentajes bajos de sobrevivencia en todos los subestadios larvarios del camarón, presentándose la sobrevivencia menor en la dosis de  $10^7$  UFC/ml. Vandenberghe *et al.* (1998) mostró que *V. harveyi*, a la dosis de  $10^4$  UFC/ml, afectó a *F. chinensis* (zoea) y causando 80% de mortalidad después de 24 h post-infección. Karunasagar *et al.* (1994) señalaron una menor sobrevivencia en los subestadios larvarios de *P. monodon* cuando fueron infectados con una cepa de *V. harveyi* resistente a cloranfenicol y eritromicina, comparados con aquellos que fueron infectados con una cepa silvestre de *V. harveyi* (dosis de  $10^3$  y  $10^5$  UFC/ml, respectivamente).

Robertson *et al.* (1998) reportaron infección en los subestadios larvarios de *L. vannamei* con *V. harveyi* a una dosis de  $10^5$  UFC/ml, la cual fue capaz de producir bioluminiscencia y una enfermedad larval denominada como bolitas negras. Por otra parte, Kannapiran *et al.* (2009) y Soto-Rodríguez *et al.* (2012) sugirieron que *V. harveyi* es responsable de diversos problemas en camarón, siendo el síndrome de enfermedad de las patas rojas uno de ellos. También señalaron que esta bacteria puede generar los signos de esta enfermedad a los camarones cuando la bacteria se encuentra a dosis desde  $10^5$  ha  $10^7$  UFC/ml. Srinivas *et al.* (2010) encontraron que *V. harveyi* causó mortalidad significativa ( $p < 0,05$ ) en los subestadios larvarios de *P. monodon* a dosis desde  $10^3$  hasta  $10^4$  UFC/ml.

Los mecanismos por los cuales *V. harveyi* afecta la sobrevivencia de los subestadios larvarios de los camarones aún son desconocidos. Sin embargo, ha sido observado que la cutícula de los subestadios larvarios, las branquias, y el tracto intestinal pueden ser colonizados por bacterias que se establecen en los tejidos del huésped. Por tal motivo, los subestadios larvarios del camarón pueden ser una fuente de contaminación bacteriana para la industria acuícola de engorda de camarón, sobre todo si esta no pasa por algún proceso sanitario previo. Vandenberghe *et al.* (1998) detectaron colonizaciones de *V. harveyi* en los apéndices de alimentación y molino gástrico de las larvas de *F. chinensis*, sugiriendo que las infecciones se presentaron vía oral.

Los factores de virulencia extracelulares han sido sugeridos por diversos autores como uno de los principales agentes de virulencia en las especies de *Vibrio* (Austin y Zhang, 2006). Soto-Rodríguez *et al.* (2012) evaluaron la patogenicidad, en *L. vannamei*, de *V. harveyi* obtenido de camarones enfermos con el signo de patas rojas. Ellos encontraron que las bacterias vivas ( $10^3$  UFC/ml) y sus productos extracelulares fueron virulentos para el camarón. Además se determinó la presencia de amilasas, caseinasas, fosfolipasas, gelatinasas, y lipasas en los productos extracelulares de esta especie de bacteria, sugiriendo que estos pueden jugar un papel importante en la patogenicidad de la misma hacia el camarón.

Futuros estudios con inmunoestimulantes,  $\beta$ -glucanos, probióticos, productos extracelulares, rutas de infección, vacunas, además de estudios en donde se incorporen especies del género *Vibrio* con características especiales obtenidos gracias a trabajos *in vitro* con bacteriófagos y plásmidos pueden ayudar a entender los mecanismos y procesos por los cuales estas bacterias generan enfermedades y ayudar a definir estrategias que se pueden emplear para su control. Trabajos como los

observados en Campa-Cordova *et al.* (2009) y Powell *et al.* (2011) son ejemplos de este tipo de estudios.

#### 4. Conclusiones

Las bacterias *Vibrio harveyi* pueden ocasionar sobrevivencias bajas en los subestadios larvarios y el de PL1, de camarón *L. vannamei*. La sobrevivencia de estos camarones en estas etapas de crecimiento, disminuirá conforme aumenta la concentración de *V. harveyi* a la que estén expuestos, y aumentará conforme las larvas se desarrollan.

#### Referencias bibliográficas

- Abraham, T.J. 2006. Virulence of *Vibrio harveyi* possessing a transferable chloramphenicol resistance determinate to larvae of Indian whit shrimp *Fenneropenaeus indicus* (Decapoda). Indian Journal of Marine Science 35: 275-278.
- Alavandi, S.V.; Manoranjita, V.; Vijayan, K.K.; Kalaimani, N., Santiago, T.C. 2006. Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. Letters in Applied Microbiology 43: 566-570.
- Austin, B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology 140: 310-317.
- Austin, B.; Zhang, X-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology 43: 119-124.
- Campa-Cordova, A.I.; González-Ocampo, H.; Luna-González, A., Mazón-Suástegui, J.M.; Ascencio, F. 2009. Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. Hidrobiológica 19 (2): 151-157.
- Chatterjee, S.; Haldar, S. 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. Journal of Marine Science Research and Development S1:002.
- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Editorial Group. FAO Information Division. Roma, Italia. Pp 1-197.
- Hameed, A.S.S. 1995. Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii*-like bacterium. Journal of the World Aquaculture Society 26: 315-318.
- Kannapiran, E.; Ravindran, J.; Chandrasekar, R.; Kalaiarasi, A. 2009. Studies on luminous, *Vibrio harveyi* associated with shrimp culture system rearing *Penaeus monodon*. Journal of Environmental Biology 30: 791-795.
- Karunasagar, I.; Pai, R.; Malathi, G.R.; Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture 128: 203-209.
- Kobayashi, M.; Melkonyan, T. 2011. Strategic incentives in biosecurity investment: Theoretical and empirical analyses. Journal of Agricultural and Resource Economics 36: 242-262.
- Mohajeri, J.; Afsharnasab, M.; Jalali, B.; Kakoolaki, S.; Sharifrohani, M.; Haghghi, A. 2011. Immunological

- and histopathological changes in *Penaeus semisulcatus* challenged with *Vibrio harveyi*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10: 254-265.
- Powell, A.; Pope, E.C.; Eddy, F.E.; Roberts, E.C.; Shields, R.J.; Smith, P.; Topps, S.; Reid, J.; Rowley, A. F.; Francis, M. J. 2011. Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. Journal of Invertebrate Pathology 107: 95–99.
- Ravi, A.V.; Musthafa, K.S.; Jegathambal, G.; Kathiresan, K.; Pandian, S.K. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. Letters in Applied Microbiology 45: 219–223.
- Robertson, P.A.W.; Calderon, J.; Carrera, L.; Stark, J.R.; Zherdmant, M.; Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei*. Diseases of Aquatic Organisms 32: 151-155.
- Subasinghe, R.1997. Fish health and quarantine. In: Review of the State of World Aquaculture. Compilado por Shehadeh, Z. y Maclean J. FAO, Inland Water Resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division. Roma, Italia. Pp 1-166
- Soto-Rodríguez, S.A.; Gómez-Gil, B.; Lozano, R.; Rio-Rodríguez, R.; Diéguez, A.L.; Romalde, J.L. 2012. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology 109: 307-317.
- Srinivas, S.P.; Abdulaziz, A.; Natamai, S.J.; Prabhakaran, P.; Balachandran, S.; Radhakrishnan, P.; Rosamma, P.; Ambat, M.; Bright Singh, I.S. 2010. *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. Aquaculture Research 41: 847-860.
- Vandenbergh, J.; Li, Y.; Verdonck, L.; Li, J.; Sorgeloos, P. 1998. Vibriosis associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture 169: 121-132.
- Vieira, F.N.; Pedrotti, F.S.; Neto, C.C.B.; Pedreira-Mouriño, J.L.; Beltrame, E.; Martins, M.L.; Ramírez, C.; Vinatea-Arana, L.A. 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Oceanography 55: 251-255.
- Widanarni, A.; Suwanto, S.; Lay, B.W. 2003. Potency of *vibrio* isolates for biocontrol of vibriosis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae. Biotropia 20: 11-23.
- Wongtavatchai, J.; López-Dóriga, M.V.; Francis, M.J. 2010. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 308: 75–81.
- Xu-xia, Z.; Yan-bo, W.; Wei-fen, L. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287: 349–353.