

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**DESARROLLO DE UN BAÑO INFECCIOSO DE *Vibrio parahaemolyticus*
EN JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)
(DECAPODA: PENAEIDAE), USANDO COMO FACTOR
ESTRESANTE EL ORGANOFOSFORADO METILPARATIÓN.**

TESIS PROFESIONAL

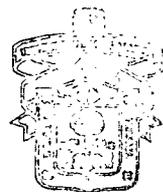
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

PERLA PATRICIA GONZÁLEZ ORNELAS

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO., DE MAYO DE 2004.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

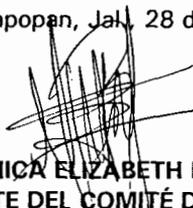
**C. PERLA PATRICIA GONZÁLEZ ORNELAS
PRESENTE.**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título: "Desarrollo de un baño infeccioso de *Vibrio parahaemolyticus* en juveniles de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae), usando como factor estresante el organofosforado metilparatión", para obtener la Licenciatura en Biología.

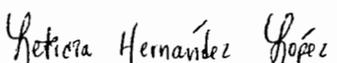
Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ANA MARGARIDA TRIGO DE SOUSA ROQUE** y como Asesor el/la **DR. EDUARDO RÍOS JARA**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. 28 de agosto del 2003


**DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**


COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. ANA MARGARIDA TRIGO DE SOUSA ROQUE**.- Director del Trabajo
c.c.p. **DR. EDUARDO RÍOS JARA**.- Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam



**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITILACIÓN
CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
P R E S E N T E .**

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de Titulación modalidad Tesis, con el título: DESARROLLO DE UN BAÑO INFECCIOSO DE *Vibrio parahaemolyticus* EN JUVENILES DE *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae) USANDO COMO FACTOR ESTRESANTE EL ORGANOFOSFORADO METILPARATIÓN que realizó la pasante: Pelta Patricia González Omelas con número de código 092638979, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, a 20 de mayo del 2004.

EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Dra. Ana Margarida Trigo de Sousa

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

EL ASESOR

Dr. Eduardo Rios Jara

EXCLUSIVO COMISIÓN DE TITILACIÓN:
SINODALES

- 1.- DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA
- 2.- M.V.Z. MIGUEL CARVAJAL SORIA
- 3.- BIOL. MAURILIO SOTO ESPINOZA
- SUPL. M.C. AGUSTIN CAMACHO RODRÍGUEZ

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de estar en este mundo por tener salud, a una hermosa familia y a grandes amigos.

A mi madre por todo su apoyo y todos sus consejos por ser mi primer ejemplo a seguir por confiar en mí.

A mi hermana María Elena por su ayuda y por haberme facilitado una herramienta importante para concluir más rápidamente mi tesis, y por uno de mis regalos más grandes que es Paola.

A mi hermana Ana por brindarme todo su apoyo durante todo este tiempo y darme tan buenos consejos por ser mi ejemplo a ser mejor cada día.

CTIIRA



BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad de Guadalajara por haberme brindado todos estos años tantas experiencias como estudiante y por la alegría de haber concluido mis estudios.

Al proyecto CONACyT No. 34952-B por su apoyo para el desarrollo de este trabajo.

A mi directora de tesis, la Doctora Ana Margarita Trigo de Sousa Roque por confiar en mí, por ser una excelente persona y por todo el invaluable apoyo que me ha brindado durante la realización de este trabajo.

Al laboratorio de bacteriología del CIAD-Mazatlán y a la Q.F.B. Carmen Botán Mejía por el apoyo durante mi trabajo experimental.

A mis maestros ya que muchos de ellos marcaron y fueron fuente de inspiración para seguir esta carrera maravillosa.

A mi Asesor el Doctor Eduardo Ríos Jara por ser uno de mis mejores maestros por brindarme la ayuda y consejos y por todo su apoyo durante todo este tiempo.

A la Doctora Galina Petrovna Zaitseva por el apoyo que me brindó en el presente trabajo.

Mi más profunda gratitud al M. V. Z. Miguel Carvajal Soria por darme tan buenos consejos y ayuda, así como por la confianza que ha depositado en mí.

A el Biólogo Maurilio Soto Espinoza por haberme ayudado durante todo este tiempo para concluir con éxito el presente trabajo.

Al M.C. Agustín Camacho Rodríguez por la ayuda incondicional que me brindó.

Agradezco al Biólogo Alejandro Urias por su amistad, su valiosa ayuda en todo lo estadístico, por sus consejos y orientación en este trabajo.

A todas aquellas personas que, de un modo u otro, han permitido que este trabajo se haya llevado a cabo.

Quiero agradecer en particular a toda mi familia, a mi madre que tomó el papel de ser madre y padre para que yo fuera mejor cada día, le estoy profundamente agradecida, por todo su apoyo, ayuda y cariño. Por ser mi primer ejemplo a seguir, a mis grandes hermanas que en ningún momento me dejaron de apoyar, a ellas por ser tan especiales en mi vida les estoy muy agradecida.

A todos mis amigos que me acompañaron incondicionalmente durante todos estos años y fueron apoyo importante en mis momentos difíciles: Karina, Alejandra, Edith, Rosalba, Dalila, Aida, Vidal, Rafael y Fabian, me considero muy dichosa de tenerlos a todos ellos, gracias por toda su amistad.

Agradecer muy en especial a mi amigo Juan Carlos Salazar Cevallos, por haber hecho mi sueño realidad por ser más que un amigo, un hermano.

A mis padres adoptivos: el señor Telmo Salazar que lo considero como un padre ejemplar por darme siempre todos los consejos que a una hija se le pueden dar, toda mi fortaleza y alegría se la debo a él, gracias por brindarme siempre un espacio en su vida y en su corazón, por todas esas pláticas que han hecho en mí a una persona mejor en este mundo. A Rosita Cevallos por ser un ser humano ejemplar, acogerme en su casa y darme la confianza y oportunidad de convivir con su hermosa familia.

Le agradezco a Dios por poner en mi vida al señor Franklin y a la señora Rosa Elena, les quiero agradecer todo su cariño y confianza, por aceptarme tal cual como soy, por ser más que unos amigos para mí, por toda su ayuda invaluable, mil gracias.

A mis amigos ecuatorianos: JC, mi ñañita Patricia "diluca", Wilder, Jenny, Eduardo, Guinner, Peroco, Capullo 1, Capullo 2, Don Víctor, Homero, Tedi, Carmen, Telmo y Paola, me permitieron conocer su hermoso país, les estoy muy agradecida por su hermosa amistad, soy la persona mas dichosa de este mundo.

A mis amigos del Instituto Nacional de Pesca de Ecuador, Doctor Franklin Ormasa director de la Institución, Doctora Glenda, Mónica, Patricia, Jimmi, Eduardo y Norla por toda su ayuda y amistad.

A Jefferson Antonio Loor Moreira por haber confiado en mi y aceptarme en su laboratorio, por reforzar más mis sueño de esos lindos crustáceos, agradezco siempre todo su apoyo, ayuda y todos los consejos que llenaron mi vida de fortaleza y de seguridad. Por haber sido fuente de inspiración durante estos dos años, a usted va dedicado este trabajo.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	4
2.1. CAMARONICULTURA EN MÉXICO	6
2.2. GENERO VIBRIO	8
2.2.1. Desarrollo de Vibriosis en camarón de cultivo y efectos principales	9
2.2.2. Síntomas de Vibriosis	10
2.2.3. Diagnósis de Vibriosis	10
2.2.4. Infecciones experimentales (ensayos sobre patogenicidad)	12
2.3. CONTAMINACIÓN AGRÍCOLA EN MÉXICO	13
2.3.1. Usos de metilparatió, plaguicida organofosforado	13
2.3.2. Estudios sobre contaminación de organofosforados en crustáceos	14
2.3.3. Características del organofosforado metilparatió	17
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	19
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	22
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	22
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. MANEJO Y PREPARACIÓN DEL ALIMENTO	27
6.2. PREPARACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	28

6.3. PREPARACIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO Y DEL MEDIO ESTÉRIL	30
6.4. EXPERIMENTO FINAL	31
6.5. MÉTODOS HISTOPATOLÓGICOS	36
6.5.1. Fijación y Preservación	36
6.5.2. Selección y deshidratación de tejido	36
6.5.3. Embebido en parafina	37
6.5.4. Obtención de cortes histológicos	37
6.5.5. Tinción hematoxilina-eosina-floxina	37
CAPÍTULO 7. RESULTADOS	39
7.1. PRUEBAS PRELIMINARES	40
7.2. MORTALIDAD DE JUVENILES DESPUÉS DE 10 DÍAS DE APLICACIÓN DE METILPARATIÓN	42
7.3. PATRÓN DE MORTALIDADES DEL CAMARÓN BLANCO EN FUNCIÓN A LA APLICACIÓN DE μg MPA rg^{1*} DE ALIMENTO POR DÍA, DURANTE EL PERIODO DE APLICACIÓN DE UN BAÑO INFECCIOSO DE BACTERIA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43
7.4. EVIDENCIAS HISTOPATOLÓGICAS DE INFECCIÓN BACTERIANA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45
CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN	46
8.1. TOXICIDAD	49
8.2. BACTERIOLOGÍA	50
8.3. INTERACCIÓN PLAGUICIDA - BACTERIA	52
8.4. HISTOPATOLOGÍA	54
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES	55

CAPÍTULO 10. RECOMENDACIONES	57
------------------------------------	----

CAPÍTULO 11. BIBLIOGRAFÍA	59
---------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

1. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE CAMARÓN BLANCO EN FUNCIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE μG MPARg ^{1*} DE ALIMENTO, DESPUÉS DE 96 HORAS DE EXPOSICIÓN.....	40
2. PROMEDIO ESTIMADO DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i> APLICADO DURANTE CUATRO DÍAS DE INFECCIÓN A TRAVÉS DEL BAÑO INFECCIOSO A CAMARONES JUVENILES <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE JUVENILES DE CAMARÓN <i>Litopenaeus vannamei</i> DESPUÉS DE 10 DÍAS DE APLICACIÓN DE 32. μG MPARg ^{1*} DE ALIMENTO Y LA APLICACIÓN DE UN BAÑO INFECCIOSO DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
4. MUESTRAS DE ORGANISMOS ANALIZADOS.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. PATRÓN DE MORTALIDADES DE ACUERDO A CUATRO DIFERENTES TIPOS DE TRATAMIENTO.....	44
--	----

1. INTRODUCCIÓN

CUCEA



BIBLIOTECA CENTRAL

La camaronicultura es una industria de importancia mundial, en la actualidad su producción en el mundo es superior a las 700,000 toneladas de camarón (Unzueta, 2000). En América Latina, esta actividad ha crecido principalmente en las dos últimas décadas (Lightner, 1992). En México, la camaronicultura ha sido favorecida por la diversidad de condiciones geográficas y climáticas predominantes en el país, donde el estado de Sinaloa destaca como mayor productor en el cultivo de camarón; este estado cuenta con 153 granjas (75% del total nacional) que producen 11,000 toneladas métricas anuales (65% del total nacional) (Rosenberry, 1997).

Sinaloa por su gran extensión territorial de aproximadamente 58,092 km. (Olea, 1975), dedicado en parte a la camaronicultura es un estado principalmente agrícola con una gran exportación de productos agrícolas a nivel nacional y tiene el primer lugar en producción de tomate, soya, arroz, chile, cártamo y otros productos agrícolas. Esta importancia a nivel nacional se ha logrado en base a una agricultura tecnificada con un intensivo uso de plaguicidas y otros agroquímicos cuyos residuos son arrastrados por escurrimientos continentales y drenes agrícolas hasta los esteros, lagunas costeras y bahías donde crece y se captura el camarón (Galindo, 1992; Rosales et al., 1985). En la camaronicultura es indeseable un ambiente contaminado ya que este puede reducir los niveles de producción (Couch, 1978). El efecto de contaminantes sobre los camarones de cultivo puede ocasionar alteraciones nocivas tales como reducción en la tasa de crecimiento, supresión del sistema inmune y aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas y virales (Ratcliffe, 1985; Malins y Ostrander, 1991). La contaminación es posiblemente uno de los agentes de mayor impacto sobre el cultivo del camarón (Páez et al., 1998).

Los camarones peneidos son más sensibles a los efectos tóxicos de los plaguicidas, comparados con los peces y los moluscos (Couch, 1985; Juárez y Sánchez, 1989). Esto es debido a su relación filogenética con los insectos. En particular los compuestos organofosforados han demostrado ser mas tóxicos para los camarones que otros plaguicidas (Butcher, 1996), incluso los estadíos larvales de los crustáceos, pueden ser aún más sensibles a los insecticidas que los organismos adultos (Juárez y

Sánchez 1989). El principal efecto de los plaguicidas organofosforados, es la neurotoxicidad y en casos extremos la mortalidad directa. El mecanismo de acción de estos insecticidas es la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE), la cual altera la función nerviosa, por la acumulación de acetilcolina de la membrana postsináptica (Lundebye et al., 1997; Tusaró et al., 1999).

Los organismos patógenos, y la presencia de factores estresantes pueden desencadenar el desarrollo de infecciones en los organismos acuáticos (Pillay, 1992; Overstreet et al., 1997). La principal causa de pérdidas económicas en la acuicultura son las enfermedades, y las de origen bacteriano son las más significativas. La vibriosis es una de las enfermedades más comunes en crustáceos (Park et al. 1991). Las bacterias del género *Vibrio* forman parte de la microflora normal de los camarones peneidos silvestres y de cultivo siendo encontradas en el tracto digestivo; branquias y cutícula (Lighner, 1993) y ocasionalmente en hemolinfa (Gómez Gil et al., 1998). Debido a que son parte de la microflora de camarones sanos y también son responsables de brotes de enfermedad, los vibrios se consideran patógenos oportunistas. La vibriosis puede afectar todos los estadios larvales, juvenil y adulto de los camarones. Las infecciones algunas veces se pueden originar a través de heridas, debido a la muda del organismo o por medio de la ingestión de bacterias presentes en el detritus, por camarones enfermos o por partículas en el alimento. El manejo y un buen control del cultivo del camarón son de vital importancia para reducir el probable desarrollo de vibriosis o de otras enfermedades de tipo bacteriano (Brock y Main, 1993).

En el presente trabajo se planteó evaluar el efecto de un baño de *Vibrio parahaemolyticus* como un agente infeccioso y la interacción con un agente no infeccioso, causante de estrés, un plaguicida organofosforado, metilparatión. En este sentido se pretende evaluar la mortalidad o efecto de estos dos agentes, causantes de estrés e infeccioso a través de un baño para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y así proponer nuevas técnicas de infección de estos crustáceos a nivel laboratorio.

2. ANTECEDENTES

El cultivo de camarón se ha desarrollado en los últimos años como una industria masiva, principalmente en los países que bordean los Océanos Pacífico e Índico. Esta industria se ha encontrado con diversos problemas, siendo el mayor de ellos, las enfermedades (Alderman y Hastings 1998).

La camaronicultura cada vez contribuye más a la actividad acuícola en el mundo. En 1991, el 28% de la cosecha mundial de camarón, fue generado por la acuicultura (Weidner y Rosenberry, 1992). El crecimiento de la producción y demanda del camarón por la acuicultura en todo el mundo ha sido muy importante, de 90,000 toneladas en 1980, a casi 660,200 toneladas en 1997. En el hemisferio oriental, la producción estimada de camarón fue de 462,000 toneladas, es decir 70% del total mundial en 1997, aunque con un decremento del 11%. Esta reducción fue debida a la ocurrencia de enfermedades (Rosenberry, 1997). La producción camaronícola en Asia experimentó un retroceso en los años 1994, 1995 y 1996, debido a las enfermedades (Rosenberry, 1997).

2.1. CAMARONICULTURA EN MÉXICO.

En América, la camaronicultura ha crecido principalmente en los últimos 30 años, hasta convertirse en una industria importante que contribuye con cantidades significativas de camarón en el mercado a nivel mundial (Lightner, 1992). En Latinoamérica, la tasa anual promedio de crecimiento de la producción de camarón es de 11.06% (Martínez y Pedini, 1996).

El desarrollo camaronícola en México se ha concentrado básicamente en los estados del noroeste, que reúnen un total de 268 granjas camaroneras cubriendo una superficie de 25,477 ha. donde, en Sinaloa operan 153 granjas camaroneras, siendo este estado el principal productor con una producción anual de 10,256 toneladas de camarón (Anónimo, 1996). Esta actividad se ha desarrollado desde los 70's, teniendo como especie principal de explotación el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, seguido del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*, (Mazari, 1999).

Aunque la producción de camarón cultivado en México ha demostrado un crecimiento sostenido desde 1984 al 2000, durante 1995-1996 se registró un descenso drástico en la producción de camarón, particularmente en Sinaloa de 10,471 ton/ha¹ para 1995 a 7,763 ton/ha¹ debido a enfermedades (SAGARPA, 2001).

La industria camaronícola en general, se ha visto afectada durante los últimos años en todo el mundo por enfermedades de diferentes orígenes y en todas las fases de cultivo. Se han detectado enfermedades causadas por bacterias, virus y hongos, así como enfermedades relacionadas con factores nutricionales, o bien como resultado del mal manejo en las instalaciones (Figueras, 2000).

Las bacterias juegan un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades en el camarón, ya que una amplia variedad de ellas forma parte de la flora microbiana normal, tanto del camarón cultivado, como del camarón silvestre, sin embargo, cuando se presenta un desequilibrio en las condiciones de cultivo o el camarón se encuentra

bajo factores de estrés, las bacterias, por su carácter oportunista, pueden causar serias enfermedades a los camarones, teniendo fuerte impacto sobre la productividad en las granjas y por ende en su economía (Unzueta, 2000).

Varias especies de bacterias están implicadas como agentes causantes de infecciones y enfermedades en el camarón peneido; las bacterias del género *Vibrio* son las más frecuentes (Lightner 1988).

No se sabe cuales especies de *Vibrio* son las más patógenas, ya que la habilidad para causar enfermedad, varía ampliamente dentro de las especies. Sin embargo, algunas cepas de *Vibrio* pueden generar enfermedades en presencia de ligeras condiciones ambientales adversas, otras cepas pueden infectar al camarón cuando esta severamente dañado (Chanratchakool et al., 1998).

El impacto negativo de las enfermedades bacterianas en el camarón comenzó a ser reconocido con la llegada de la acuicultura intensiva. Aún cuando mucha gente considera a los virus como los agentes infecciosos más importantes en el cultivo de camarón por los limitados medios de control con que se cuenta, las enfermedades bacterianas son responsables de altas mortalidades, tanto en las poblaciones silvestres como en las cultivadas (Lavilla-Pitogo, 1995).

La mayoría de los reportes de infecciones bacterianas parecen presentarse por bacterias oportunistas más que por un patógeno especializado, y la frecuencia de las infecciones es más alta en cultivos intensivos y condiciones ambientales adversas (Bell y Lightner, 1992). Los *vibrios* oportunistas, pueden establecerse debido a factores que incluyen a otras enfermedades infecciosas (Brock y Lightner, 1983, 1990), y nutricionales (Lightner, 1985, 1988; Baticados, 1988).

2.2. GÉNERO *Vibrio*.

El género *Vibrio* pertenece a la familia Vibrionaceae descrita por Veron en 1965 (Baumann y Schubert, 1984). La decisión de formar este género se basa en estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos. Estas bacterias se multiplican en un tiempo de 9 a 15 minutos, la temperatura óptima de crecimiento varía considerablemente, todas crecen a 20°C y la mayoría a 30°C, tolerando condiciones alcalinas moderadas de un pH de 9, D-glucosa y otros carbohidratos que son carbonizados con producción de ácido. El Bergey's Manual on Systematic Bacteriology (1984), los describe como bastones rectos o curvados, Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles, por medio de flagelos polares, no formadores de esporas, quimio-organótrofos, oxidasa positivos sensibles al agente vibriostático (0/129), no desnitrifican o fijan nitrógeno molecular; necesitan sodio para su crecimiento y generalmente requieren de 2 a 3% de NaCl para crecer. Un gran número de especies forman colonias convexas, lisas, blancas cremosas con bordes enteros en medio de agar de soya tripticaseína (TSA). En algunas especies pueden darse algunas variantes en la morfología de las colonias particularmente después de repetidos cultivos y almacenamientos en medios más complejos (Montoya, 1992; Solís, 1996).

El género *Vibrio* es capaz de crecer adecuadamente a distintas temperaturas y concentraciones de cloruro de sodio, lo que indica su potencial para habilitar diferentes medios acuáticos (Colwell, 1984; Roberts y Seidler, 1984). Los *vibrios* son microorganismos que están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, son de vida libre y forman parte de la flora autóctona de los sistemas estuarinos, marinos y de agua dulce, y pueden encontrarse en asociación con animales que viven en estos medios, frecuentemente se han relacionado con camarones (Frerichs y Millar, 1993).

En los camarones peneidos se han reportado varias especies de *vibrio* como responsables de enfermedades: *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. nereis*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harvery* (Lavilla Pitogo, 1995).

Se ha confirmado la existencia de *Vibrio spp*, en la hemolinfa de camarones debido al estrés causado por alta densidad en cultivo, mal manejo y muda (Lightner, 1988) e incluso en organismos aparentemente sanos formando así parte de la flora normal (Gómez Gil et al, 1998). Aparentemente los mecanismos de defensa del camarón son capaces de controlar estas bacterias en cantidades pequeñas, sin embargo, si la invasión no es combatida exitosamente por las defensas del camarón, ocurre una septicemia que puede matar al camarón (Lightner, 1988).

2.2.1. DESARROLLO DE VIBRIOSIS EN CAMARÓN DE CULTIVO Y EFECTOS PRINCIPALES.

La vibriosis es una de las enfermedades más comunes que afecta indistintamente los estadios larvales, juveniles y adultos de camarones peneidos, provocando mortalidades masivas, lo cual puede generar grandes pérdidas económicas (Lightner et al., 1992).

Las infecciones bacterianas en camarones bajo condiciones naturales y de cultivo, pueden desarrollarse de tres maneras: las causadas por lesiones en la cutícula; las provocadas por lesiones en la muda, pérdida de apéndices, y el desarrollo de septicemias generalizadas (Brock y LeaMaster, 1992, Lightner, 1996, 1993).

En la septicemia, los órganos comúnmente afectados son: cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón y músculo estriado (Brock y Main, 1995). Desde el punto de vista histopatológico se observan áreas extensas de necrosis e invasión bacteriana en el órgano linfoide con desarrollos de nódulos hemolíticos melanizados; dichos nódulos están compuestos de una colonia bacteriana en el centro, rodeada por una zona melanizada y múltiples capas de hemocitos encapsulados en colonias. Estos nódulos se desarrollan en la mayoría de los órganos afectados (Egusa et al., 1988; Brock y LeaMaster, 1992).

2.2.2. SÍNTOMAS DE VIBRIOSIS.

Lightner (1988) describe los síntomas de vibriosis en larvas y postlarvas tempranas de camarón; ocurre una melanización y necrosis en la punta de los apéndices y/o la presencia de gran número de bacterias tipo "swarming" visibles en el hemocele de camarones moribundos. Los organismos afectados no se alimentan, carecen de hilos de materia fecal y tienen el intestino vacío.

En camarones juveniles y adultos los síntomas son un comportamiento que puede inducir periodos de nado desorientado alternando con letargia y anorexia. Las infecciones por *Vibrio sp.*, son encontradas en la cutícula y apéndices con lesiones localizadas de un color negro o café (debido a la melanina producida por los hemocitos del hospedero, involucrados en el proceso de inflamación). Este síndrome es llamado la enfermedad de las manchas cafés (black spot), el *vibrio* causa erosión en el caparazón por la producción de la enzima quitinasa, observándose una respuesta inflamatoria del hospedero.

La vibriosis septicémica e infecciones internas se pueden diagnosticar por diversos síntomas clínicos, los camarones afectados frecuentemente presentan síntomas generalmente de estrés severo, tales como opacidad del músculo abdominal, anorexia, expansión de cromatóforos, especialmente negros o pardos (Lightner, 1993) sobre la superficie dorsal, lo que causa una pigmentación ligeramente más oscura en camarones afectados.

2.2.3. DIAGNOSIS DE VIBRIOSIS.

La vibriosis se puede diagnosticar por presencia de números altos de vibrios en la hemolinfa (más de 1000 ml⁻¹). El aislamiento de *Vibrio sp.*, en muestras de tejidos o hemolinfa debe ser realizado asépticamente a partir de camarones moribundos. Las muestras deben ser sembradas en medios de cultivo como agar tiosulfato, citrato, sales

biliares sacarosa (TCBS) o agar soya tripaicasa (TSA) este ultimo suplemento con 2.0% de cloruro de sodio.

El agar TCBS es un medio selectivo para vibrios, pues es altamente inhibitorio para un gran número de bacterias y también es diferencial por la presencia de bacterias sacarolíticas de las que no lo son, observándose las primeras con una coloración amarilla la cual se obtienen al cambiar el pH debido a la producción de ácido a partir de la sacarosa y las que no lo son permanecen del mismo color del medio (verde). El agar TCBS originalmente fue formulado para aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus*, (Kobayashi et al., 1963, Boliches et al., 1988) y puede ser utilizado para el aislamiento selectivo obteniendo diagnósticos presuntivos de infecciones por *Vibrio spp.* El predominio de las colonias "verdes" sobre las "amarillas" puede ser indicativo de potenciales problemas en los cultivos (Solís, 1996).

La hemolinfa obtenida de los camarones afectados por vibriosis, presenta turbidez y una coagulación lenta: 1 minuto o más para formar un gel, a temperatura de 20 a 30°C; mientras que la hemolinfa de los camarones normales gelifica en menos de 1 minuto. El número de hemocitos, también se reduce dramáticamente de un valor normal promedio de 20,000 hemocitos/mm³ a valores de 1,000 a 10,000/mm³ (Lightner, 1993).

Para estudiar una enfermedad es muy útil poder contar con una metodología para reproducirla en condiciones de laboratorio. Un protocolo de este tipo en el caso de vibriosis serviría para evaluar que cepas de vibrios son patógenas para el camarón, qué especies o estadios del camarón son más susceptibles a la vibriosis, qué factores de estrés contribuyen a la vibriosis y probar reglas de manejo o productos químicos (antibióticos y otros) para el control o prevención de vibriosis.

2.2.4. INFECCIONES EXPERIMENTALES (ENSAYOS SOBRE PATOGENICIDAD).

Las infecciones experimentales pueden ser inducidas en condiciones de laboratorio por diferentes métodos como inmersión del hospedero en un medio con patógenos, administrados oral a través del alimento, inyección intramuscular de los patógenos o por introducción del patógeno a través de heridas o lesiones.

Esteve y Quijada (1995) realizaron una estimación de tres técnicas experimentales de infección con *V. anguillarum* en *Penaeus brasiliensis* (inmersión con o sin incisión, inoculación intramuscular e inmersión previa deshidratación) observaron que las técnicas son apropiadas para inducir una infección en los camarones, y principalmente la vía intramuscular es efectiva para este objeto, sobre todo en las áreas de inmunología y patología.

Hameed y Rao (1996) hicieron una infección bacteriana a *Penaeus indicus*, en baños a larvas y postlarvas con dosis de 3.5×10^7 UFCml⁻¹ con una cepa de *Vibrio campbellii* fue posible establecer infecciones, mientras que a 3.5×10^9 UFCml⁻¹ obtuvieron mortalidades del 100% para nauplios, 70% en protozoa y 40% en mysis durante las primeras 24 h de exposición, respectivamente.

2.3. CONTAMINACIÓN AGRÍCOLA EN MÉXICO.

En México, la contaminación agrícola es generalmente asociada con la costa noroeste, donde aproximadamente 1,728,868 ha. son tierra de riego (Anónimo, 1994). Esta área está conformada por cinco importantes valles agrícolas (Mexicali, Yaqui, Mayo, Del Fuerte y Culiacán) donde grandes cantidades de plaguicida son aplicadas, siendo una área crítica de esta región el sistema lagunar de Altata-Ensenada del Pabellón, que recibe las descargas del valle de Culiacán y de la población del mismo nombre. El valle de Culiacán tiene aproximadamente 113,522 ha. (Anónimo, 1994) de tierras agrícolas irrigadas y mecanizadas, las cuales producen hortalizas, granos y caña de azúcar.

Actualmente los plaguicidas organofosforados son de uso común; en México se utilizan compuestos como metilparatión y malatión, estos están autorizados por instituciones gubernamentales tales como SEMARNAT, SAGARPA, (CICLOPLAFEST, 1998).

2.3.1. USOS DEL METILPARATIÓN, PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO.

El metilparatión es utilizado como plaguicida con acción fumigante (Radian Corporación 1991). Se aplica para el control de insectos en los cultivos de algodón, maíz, trigo, cebada y soya (ASTRDR, 1995).

Los compuestos organofosforados (OF) son poco solubles en agua, actúan ligándose de forma irreversible a la enzima acetilcolinesterasa, resultado de una sobre excitación de las neuronas a nivel de la transmisión sináptica. La inhibición de AChE por inhibidores organofosforados toma lugar por el enlace en el centro activo de la enzima. Cuando actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, se generan gran cantidad de impulsos a las células afectoras y esta estimulación continua causa

alteraciones fisiológicas, llegando inclusive a provocar la muerte (CICLOPLAFEST, 1998).

La recuperación de actividad de AChE en organismos que sobreviven a los efectos agudos depende de la capacidad de recuperación de cada organismo, de la lenta desfosforilación del sitio inhibidor y de la síntesis de nueva AChE (Peakall, 1992).

Las concentraciones seguras de plaguicidas organofosforados, han sido estimadas a través de estudios de toxicidad para organismos no blancos. Tagatz et al., (1982) mencionan una CL_{50} 96h (Concentración letal media, a 96 horas) de clopirifos en seis especies de peces estuarinos que fluctúan de 0.0017 a 0.136 mg L⁻¹, mientras que para cinco diferentes crustáceos la CL_{50} 96 h oscilan entre 0.000035 a 0.0052 mg L⁻¹. La toxicidad aguda varía ampliamente entre diferentes especies acuáticas (Livingston, 1997). A pesar de la gran cantidad de plaguicidas que hay en el mercado, solo pocos compuestos organofosforados han sido probados para evaluar sus efectos tóxicos éste podría ser unas 1000 veces mayor para camarones que otro tipo de plaguicidas (Couch, 1979).

2.3.2. ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN CON ORGANOFOSFORADOS EN CRUSTÁCEOS.

Galindo (1987) realizó un estudio de la contaminación por pesticidas en camarón y aguas del estero Urias, Mazatlán, Sin. y se registraron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, salinidad, estado de la marea y velocidad de la corriente. La cuantificación e identificación de los plaguicidas de ambas muestras se hizo por cromatografía de gases. Los resultados indican que las concentraciones más altas de plaguicida encontradas en agua fueron de 4.283 µg/lit, de heptacloro, las cuales son potencialmente peligrosas. La concentración de plaguicida más alta encontrada en camarón fue de 0.154 ppm (partes por millón).

Galindo, (1987) realizó un trabajo sobre la contaminación por plaguicidas en almejas y camarones en dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. El objetivo de este trabajo fue evaluar la contaminación por plaguicidas en agua, sedimento, almejas (*Anadora sp.*) y camarones (*Penaeus sp.*) de bahía de Santa María al norte y el estero de Teacapán al sur de Sinaloa. Se tomaron muestras desde mayo de 1988 a septiembre de 1989 en ambos ecosistemas, se extrajeron los residuos de plaguicida de las muestras y se cuantificaron por cromatografía de gases. El plaguicida más frecuente fue lindano. En los meses de mayo a junio la concentración promedio de lindano fue de $0.57\mu\text{g}/1$ para la muestra de agua de bahía de Santa María y de $0.72\mu\text{g}/1$ para las muestras del estero de Teacapán. En la bahía de Santa María se registraron cantidades mayores de plaguicidas que en el estero de Teacapán, debido a que la bahía de Santa María recibe los aportes de los valles agrícolas aledaños. Los valores encontrados rebasan los máximos permisibles por la FWPA (Federal Water Pollution Control Administration, Departamento del Interior, FWPA permisibles por el departamento federal de administración y control de contaminación acuática. (Anónimo, 1986) El nivel permisible de lindano en estuarios es de $0.2\mu\text{g}/1$ y en vida acuática de 0.020 (ppm).

Juárez y Sánchez (1989) valoraron la toxicidad aguda del (OF) metamidofos sobre larvas de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) en etapa de nauplio utilizando un bioensayo estático con recambio diario. La CL $50-24$ h determinada fue de 10 ng L^{-1} , para protozoas, de 85 ng L^{-1} y de mysis fue de 160 ng L^{-1} . A pesar de ser un producto catalogado como moderadamente tóxico, ocasionó un efecto letal aún en pequeñas concentraciones. Los autores concluyen que este producto organofosforado es altamente tóxico y que a concentraciones muy bajas podría afectar las poblaciones de crustáceos de cualquier sistema estuarino.

Se han realizado estudios sobre la actividad fagocitaria de los fagocitos sanguíneos del camarón tigre (*Penaeus monodon*) expuesto a metilparatión a una concentración de $2\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ la cual causó un decremento significativo en el porcentaje de fagocitosis in vitro, además de la reducción del número de hemocitos circulares en

los camarones expuestos (Bodhipaksha y Weeks-Perkins 1994). Flegel et al., (1992) realizaron una investigación sobre el efecto del metilparatión en postlarvas de *P. monodon* expuestas a varias concentraciones subletales (desde 0.01 hasta 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Los resultados indicaron que durante 10 días mostraron múltiples anomalías tisulares como alargamiento y vacuolización del ganglio nervioso, además de necrosis generalizada del hepatopáncreas y del músculo esquelético. Reddy y Rao (1991) expusieron al langostino *Metapenaeus monoceros* (2.5 ± 0.5 g) a concentraciones de 10, 20, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de metilparatión. Los principales efectos externos observados durante la exposición fueron: nado errático y rápido (hiperexcitabilidad), seguido por temblores en los apéndices, pérdidas de coordinación y equilibrio, acción violenta de las quelas y finalmente la muerte. También presentó inhibición de la acetilcolinesterasa en la masa ganglionar torácica y la acumulación de acetilcolina en las uniones sinápticas.

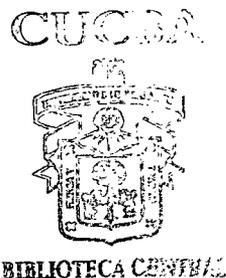
Abdullah et al. (1994), estudiaron la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en el camarón de agua dulce (*Paratya australiensis*) expuesto a profenofos (insecticidas organofosforados) y encontraron que induce un efecto inhibitorio significativo sobre los niveles de enzima. Reddy et al., (1990), expusieron al langostino *Metapenaeus monoceros* a metilparatión a 0.12 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y 1.48 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (LC_{50} a 96 h). Los resultados indicaron que el metilparatión comparado con el malatión causó los mayores efectos sobre la inhibición de acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa y glutaminasa, y el respectivo incremento significativo de la actividad de la acetilcolina, glutamina sintetasa y glutaminasa. Sin embargo, Lignot et al. (1998), encontraron que al exponer a *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul) y *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco) a diferentes concentraciones de fenitrotión (10, 20, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) durante 24 h el camarón blanco no presentó diferencias significativas en ninguna de las concentraciones sobre la actividad de la acetilcolinesterasa, a diferencia del camarón azul, lo cual atribuye a diferencias en la afinidad o a diferencia en la tasa de fosforilación de la acetilcolinesterasa para cada uno de las especies; el fenitrotión puede ser más rápidamente hidrolizado y/o excretado en *Litopenaeus vannamei* que en *Litopenaeus stylirostris*.

2.3.3. CARACTERÍSTICAS DEL ORGANOFOSFORADO METILPARATIÓN.

El metilparatión ($C_8H_{10}NO_5PS$) fue sintetizado por primera vez en 1940. Pertenece a la familia química de los organofosforados y tiene un peso molecular de 263.23 y una densidad de $1.358 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 20 a 40°C , es flamable a 46°C y se hidroliza más rápidamente en medios alcalinos (pH 8.5) que en medios neutros (pH 0.5). Es relativamente insoluble en agua, poco soluble en petróleo, éter y aceites minerales, y muy soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (Badawy y El-Dib, 1984; WHO, 1993). Tiene la característica de no ser persistente y degradarse relativamente rápido en el transcurso de semanas en el suelo y agua por medio de procesos de transformación biótica (*Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.*) y abiótica (fotodegradación y degradación hidrolítica) (WHO, 1993; ATSDR, 1995). Según Bagawy y El-Dib (1984), el metilparatión es más estable en agua dulce. La vida media del metiparatión en sedimentos es de 11 a 13 semanas en un medio natural alcalino, a un pH 9 y 25°C de temperatura (Smith et al., 1978). La vida media por degradación microbiana (considerando 10^7 bacteriana L^{-1}) es de 9 semanas. En el suelo, a tasas muy bajas de aplicación ($24.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), el metilparatión no persiste, pero se vuelve persistente si se aplica en grandes cantidades ($10,015 \text{ mg}\cdot\text{Kg}$), por lo que es difícil predecir el comportamiento de este plaguicida en el suelo (Davidson et al., 1980). Sin embargo, Munnecke (1976) menciona que la degradación de este compuesto es menor a 1 hora bajo condiciones reducidas (anaerobias) en suelos y sedimentos.

Los organismos pueden degradar metilparatión y eliminar de su cuerpos los productos derivados de la degradación en muy corto tiempo, aunque este proceso es más lento en pequeños vertebrados e invertebrados que en mamíferos y aves (WHO, 1993). Este insecticida sólo causa un daño real en el ambiente cuando existe una sobre-explotación resultado de su abuso o riegos accidentales de este organofosforado, puede llegar a causar un efecto negativo, por ejemplo sobre organismos polinizadores u otros insectos benéficos (García-Repetto, 1997 WHO, 1993).

A pesar de su corta persistencia, se ha demostrado que varios organofosforados como el paratión, tienen la capacidad de bioacumularse en la cadena alimenticia. Por ejemplo, Martínez-Tabche et al. (1994), expusieron el alga *Ankistrodesmus falcatus* al organofosforado paratión y encontraron que al analizar a los organismos de la cadena trófica artificial: alga – pulga acuática – pez (*Ankistrodesmus falcatus* – *Moina macroscopa* - *Oreochromis hornoum*) alimentados con el alga expuesta se incremento la cantidad de lípidos y proteínas del cladóceros *Moina macroscopa*, mientras que en el cerebro del pez hubo un decremento en la actividad de la acetilcolinesterasa de hasta un 53.4%. De la Vega Salazar et al. (1997) encontraron que la bioacumulación es posible dependiendo del tiempo de exposición a un insecticida y a la fisiología de cada organismo expuesto. Así mismo, Cooper (1991) menciona que las concentraciones de fenvalerato, permetrín y en especial del metilparatión en el tejido de peces son lo suficientemente persistentes para bioacumularse. Cooper (1991) y de la Vega Salazar et al., (1997) mencionan que el metilparatión pueden encontrarse en un mayor porcentaje en tejidos de organismos acuáticos que en sedimentos y agua.



3. JUSTIFICACIÓN

La vibriosis causada por *Vibrio parahaemolyticus* en el camarón *Litopenaeus vannamei*, es una enfermedad que causa gran impacto económico a la industria de la camaronicultura. Cuando *V. parahaemolyticus* es inyectado a camarones que han ingerido previamente un organofosforado llamado metilparatión, su susceptibilidad a la vibriosis aumenta (Roque et al., 2002). Sin embargo la inyección de *V. parahaemolyticus* es una ruta de infección experimental artificial, ya que en los tanques de cultivo los camarones no se infectan de esa manera.

Por esta razón, el propósito de la siguiente investigación es evaluar una nueva ruta de infección, sustituyendo la inyección de bacterias, por un baño infeccioso de *V. parahaemolyticus*. Con esta nueva ruta propuesta, se espera acercar el modelo experimental a condiciones más parecidas a las de los estanques de cultivo, lo cual permitiría hacer estudios sobre la incidencia de esta enfermedad en su forma crónica, cosa que la inyección experimental no permite, y en un futuro probar tratamientos para esta enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL.

1. Evaluar una técnica de baño infeccioso con *Vibrio parahaemolyticus*, utilizando metilparatión como factor estresante y de predisposición a vibriosis en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Determinar la dosis estresante de metilparatión en el camarón blanco juvenil *Litopenaeus vannamei*.
2. Valorar el efecto de *Virbio parahaemolyticus* en un baño infeccioso para Juveniles *Litipenaeus vannamei*.
3. Evaluar el efecto de metilparatión como factor de predisposicion a Vibriosis provocado por baño infeccioso de bacterias *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco juvenil *Litopenaeus vannamei*.
4. Realizar el estudio histopatologico en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuesto a metilparatión y un baño infeccioso con *Vibrio parahaemolyticus*.

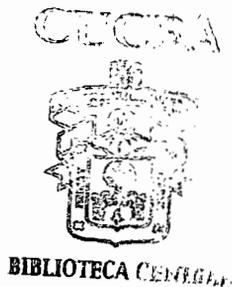
5. HIPÓTESIS

La exposición de camarones *Litopenaeus vannamei* a metilparatión aumenta la susceptibilidad a vibriosis cuando es sometido a un baño con *Vibrio parahemolyticus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El organismo de prueba que se utilizó en este estudio fue el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Los camarones fueron donados por una granja camaronera y se colectaron de estanques de engorda, con técnicas de atarraya. Los organismos fueron seleccionados uno a uno para verificar el estado de salud descartando a los que estaban dañados. El peso requerido en el experimento, que fue de 1 gramo a 1.5 gramos. El transporte se realizó en un tanque (Rotoplas, México) con capacidad de 500 litros de agua, y aeración mediante la conexión a un tanque con oxígeno comprimido. Los camarones se transportaron a las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo- Unidad de Mazatlán (CIAD).

Los camarones se mantuvieron en la planta de producción de organismos acuáticos del CIAD donde se colocaron en un tanque de fibra de vidrio con capacidad de 20,000 litros con una circulación constante y conectado mediante mangueras con aireación, a un aireador (REGENAIR R4110-2, 2.5HP); previamente fueron aclimatados en cuanto a salinidad y temperatura. Se utilizó agua de mar proveniente de la estación de bombeo de la Unidad, los parámetros del agua se mantuvieron constantes (temperatura: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y salinidad: $33 \pm 1\text{‰}$) y los camarones permanecieron dos semanas en aclimatación. Los organismos fueron nutridos con alimento comercial con 30% de proteínas (CENZONE, Aquature, México).



6.1. MANEJO Y PREPARACIÓN DEL ALIMENTO.

La ruta de exposición de los camarones al plaguicida fue la oral. Para esto se hizo uso de alimento comercial contaminado con el metilparatión. Se utilizó alimento comercial (CENZONE) proveniente de un mismo lote, se utilizaron 200 gramos de alimento, este se colocó en un horno (CRAFT) a temperatura de 30°C durante 24 h, para que perdiera toda la humedad, pero sin que afectara su estado nutricional y protéico.

De los 200 g secados se prepararon 4 lotes de 35 g, tres se prepararon con distintas concentraciones de metilparatión y el último se utilizó como control, este fue contaminado con el solvente acarreador del metilparatión, acetonitrilo (Abad- Rosales, 2000). El plaguicida metilparatión (TEKCHEM, S. A de S. V) que se utilizó fue de grado técnico de pureza 80.3%.

Para incorporar las cantidades deseadas de plaguicida en el alimento se utilizaron concentraciones nominales. La concentración nominal del plaguicida metilparatión en el alimento se calculó por medio del volumen absorbido por los pellets de la mezcla metilparatión-acetonitrilo y se calculó en microgramos de metilparatión por gramo de alimento (μg de MPAR g^{-1} de alimento).

Posteriormente el alimento preparado se dejó secar durante un mínimo de 5 horas (Abad-Rosales, 2000) en la oscuridad a temperatura ambiente para asegurar la completa evaporación del solvente acarreador. Este mismo procedimiento se aplicó para todos los lotes de alimento que se necesitó preparar. Durante el desarrollo de los bioensayos se almacenó el alimento preparado en frascos de color oscuros para evitar la degradación del metilparatión y a una temperatura de -20°C.

6.2. PREPARACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.

El objeto de este experimento fue decidir cual de los alimentos preparados sería el más adecuado para ser utilizado en el experimento final. Se seleccionó el alimento de concentración nominal $32. \mu\text{gg}^{-1}$ que causó mortalidades muy puntuales (1-2 organismos) por acuario; con este bajo nivel de mortalidad se asumió que los camarones sobrevivientes se mantendrían estresados y susceptibles al *Vibrio parahaemolyticus*.

Previo al experimento se realizó una selección de camarones con intervalos de peso húmedo de 1 g a 1.5 g. Se seleccionaron cuidadosamente organismos aparentemente sanos evitándose organismos con nado errático, opacidad muscular, necrosis cuticular, pleópodos y telson rojizos, y cutícula suave.

Durante todos los preliminares se utilizaron 5 acuarios de 10 litros de capacidad, previamente lavados con alcohol y agua de mar esterilizada secados después al sol para evitar que cualquier bacteria o protozoarios sobreviviera. Se procedió al llenado de los acuarios con agua de mar. Cada acuario se mantuvo con aireación (Siemens, Germany, 1HP) moderada durante los experimentos. Se realizaron recambios de agua de mar (90% del volumen) diariamente.

El agua de mar se obtuvo por un sistema de filtro de cartucho con tamaño de poro de $10\mu\text{m}$, seguido de un purificador de agua con luz ultravioleta (Water Quality, Modelo IP) el cual estuvo conectado a una manguera lo suficientemente larga para su fácil manejo y manipuleo durante los recambios de agua.

Para el recambio de agua de los acuarios se utilizó una manguera 2.5 m y un diámetro de 2 cm. La manguera se lavó con alcohol al 96% y agua destilada esterilizada para evitar cualquier contaminación posterior a la práctica efectuada.

Para los bioensayos, los camarones se trasladaron en cubetas de plástico de 20 litros de capacidad. Los camarones permanecieron durante dos días en aclimatación sin alimentación, se descartaron a los organismos moribundos o muertos y fueron sustituidos por nuevos camarones. En caso de que durante el periodo de aclimatación se murieran más del 10% de los animales, en el experimento se tomaría la decisión de volver a empezar.

Durante la exposición a las diferentes concentraciones de metilparatión, los camarones se alimentaron 1 vez al día, alrededor de las 9:00 horas durante 1 h; la cantidad de alimento por animal no excedió de 2 pellets por camarón con el fin de que los camarones no tuvieran mas alimento del que pudieran consumir en 1 h, el alimento se dispersó por todo alrededor y centro del acuario para asegurar la inmediata ingestión de los pellets. El experimento duró 96 h y se registraron mortalidades diariamente.

6.3. PREPARACIÓN DEL CULTIVO BACTERIANO Y DEL MEDIO ESTÉRIL.

1. Se preparó medio de cultivo, TSB (Soya tripticaseína, BD Bioxon) 30 g por litro de agua destilada, a lo que se adicionó 25 g de Cloruro de Sodio (NaCl, Faga lab) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2. Se preparó agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa, Bioxon) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3. Se utilizó una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM) HL57 (CAIM) que está preservada en agar TSA Soya tripticaseína (Bacto) con 2.5% de NaCl; esta bacteria fue sembrada en 10 ml de medio de cultivo de TSB y se inoculó durante 24 horas en una incubadora (Fisher) a una temperatura de 30°C.

4. Después de transcurridas las 24 h de inoculación, el cultivo bacteriano fue transferido en su totalidad a un matraz de 250 ml con 150 ml de medio de cultivo TSB + 2% NaCl y se dejó durante 24 h en incubadora a 30°C.

5. Este cultivo fue aplicado a los acuarios a razón de 1 ml de cultivo bacteriano por litro de agua de mar. Cada vez que se aplicó bacteria a los acuarios, se confirmó su densidad a través de la técnica de conteo en las placas, (Tabla 2, pagina 20.) que se realizó en las placas de agar TCBS.

6. Se aplicó medio TSB + 2.5% NaCl estéril a la razón de 1 ml L⁻¹ a los otros acuarios como control.

6.4. EXPERIMENTO FINAL.

Este experimento se realizó dos veces y se aplicaron cuatro tratamientos que fueron los siguientes:

- CONTROL:** Alimento con acetonitrilo +
Aplicación de medio de cultivo estéril en el agua.
- PLAGUICIDA:** Alimento con metilparatión +
Aplicación de medio de cultivo estéril en el agua.
- BACTERIA:** Alimento con acetonitrilo +
Aplicación de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* en el agua.
- BACTERIA + PLAGUICIDA:** Alimento con metilparatión +
Aplicación de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus*
en el agua.

En el experimento final se utilizaron 6 réplicas por tratamiento, cada una con 10 camarones. El experimento duró 10 días, con dos repeticiones y consistió, en el siguiente protocolo:

- DÍA 0.** Se preparó el sistema y se introdujo a los camarones.
- DÍA 1.** Se realizó un recambio de agua y se mantuvo a los organismos en ayunas.
Se registraron mortalidades en los acuarios.
- DÍA 2.** Se realizó un recambio de agua y se mantuvo a los organismos en ayunas.

Se asignaron los tratamientos al azar a cada uno de los 24 acuarios.

Se registraron mortalidades en acuarios.

DÍAS 3 y 4: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó el recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

DÍA 5: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó el recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

Se sembró la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml. De TSB + 2% NaCl y se incubó a 30°C durante 24 horas.

DÍA 6: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó el recambio de agua.

Se registraron las mortalidades en los acuarios.

Se transfirió la bacteria sembrada a 150 ml, de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se sembró más *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml, de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

DÍA 7: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

Se transfirió la bacteria sembrada a 150 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 h.

Se sembró más *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se inoculó a los acuarios que llevaron bacteria, con 1 ml de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* por litro de agua de mar.

A los acuarios sin bacteria se les aplicó 1 ml de medio estéril por litro de agua de mar.

La bacteria sobrante del recipiente de 150 ml, se diluyó serialmente de 1 en 10 hasta tener una dilución final de 10^{-7} y se sembró 3 x 100 μ l en agar TCBS.

DÍA 8: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

Se transfirió la bacteria sembrada a 150 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 h.

Se sembró más *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se inoculó a los acuarios que llevaron bacteria, con 1 ml de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* por litro de agua de mar.

A los acuarios sin bacteria se les aplicó 1 ml de medio estéril por litro de agua de mar.

La bacteria sobrante del recipiente de 150 ml, se diluyó serialmente de 1 en 10 hasta tener una dilución final de 10^{-7} y se sembró 3 x 100 μ l en agar TCBS.

Se realizó conteo de colonias formadoras en las cajas de TCBS sembradas en el día anterior y se reportaron como UFC ml⁻¹ (Unidades formadoras de colonias por mililitro).

DÍA 9: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

Se transfirió la bacteria sembrada a 150 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se sembró más *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se inoculó a los acuarios que llevaron bacteria, con 1 ml de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* por litro de agua de mar.

A los acuarios sin bacteria se les aplicó 1 ml de medio estéril por litro de agua de mar.

La bacteria sobrante del recipiente de 150 ml, se diluyó serialmente de 1 en 10 hasta tener una dilución final de 10^{-7} y se sembró 3 x 100 μ l en agar TCBS.

Se realizó conteo de colonias formadoras en las cajas de TCBS sembradas en el día anterior y se reportaron como UFC ml⁻¹.

DÍA 10: Se alimentó a los camarones con dos pellets del tratamiento asignado por individuo.

Se realizó el recambio de agua.

Se registraron mortalidades.

Se transfirió la bacteria sembrada a 150 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se sembró más *Vibrio parahaemolyticus* en 10 ml de TSB + 2% NaCl y se inoculó a 30°C durante 24 horas.

Se inoculó a los acuarios que llevaron bacteria, con 1 ml de cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* por litro de agua de mar.

A los acuarios sin bacteria se les aplicó 1 ml de medio estéril por litro de agua de mar.

La bacteria sobrante del recipiente de 150 ml, se diluyó serialmente de 1 en 10 hasta tener una dilución final de 10^{-7} y se sembró 3 x 100 μ l en agar TCBS.

Se realizó conteo de colonias formadoras en las cajas de TCBS sembradas en el día anterior y se reportaron como UFC ml⁻¹.

DÍA 11: Se registraron las mortalidades.

Se contaron las colonias formadas en las cajas de TCBS sembradas en el día anterior y se reportaron como UFC ml⁻¹.

Se levantó el experimento.

Durante la exposición del metilparatión los camarones solo estuvieron expuestos durante una hora, ya que fue el tiempo que se determinó para que estos pudieran ingerir el alimento contaminado y realizar el recambio de agua al 90% de todos los acuarios.

6.5. MÉTODOS HISTOPATOLÓGICOS.

Debido a que el número de mortalidades fue más bajo que lo estimado se tomó la decisión de analizar histológicamente a dos de los sobrevivientes de cada acuario con el fin de investigar si presentaban patologías que pudieron ser asociadas con contaminación con el metilparatión o con la presencia de *Vibrio sp.*

6.5.1. FIJACIÓN Y PRESERVACIÓN.

Al momento que se tomaron las muestras, los camarones se fijaron en solución Davidson (Bell y Lightner, 1988), inyectado primeramente en el hepatopáncreas, cefalotórax y cada uno de los segmentos abdominales, procurando la fijación de todo el tejido. Una vez inyectados, se colocaron en solución Davidson durante 24 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se transfirieron a etanol al 70% durante 24 horas a temperatura ambiente.

6.5.2. SELECCIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE TEJIDO.

Los camarones fueron cortados sagitalmente y se tomó la mitad izquierda para su procesamiento. Se cortó el cefalotórax y el primer segmento abdominal, para colocarlos en los casetes (Tissue-Tek[®] UNICASSETTE) y llevarlos al procesador automático de tejidos (Tissue-Tek[®] II, Tissue Processor) programando los tiempos de deshidratación, aclaración y emparafinado según Bell y Lightner (1988). La mitad derecha se guardó como reserva en caso de ser necesario repetir este análisis.

6.5.3. EMBEBIDO EN PARAFINA.

Los tejidos fueron colocados en un infiltrador al vacío durante 15 minutos antes de embeberlos en parafina (Histoembedder, LEICA® mod. R134a). Una vez obtenidos los bloques se procedió a realizar los cortes histológicos previamente descalcificados durante 1 hora en solución descalcificante (Bell y Lightner, 1988).

6.5.4. OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS.

Los cortes fueron realizados con una navaja de acero inoxidable desechable, a un ángulo de 2°, y los cortes de 5 µm en un micrótopo rotatorio (JUNG HISTOCUT, mod. 820, Leica), colocandolos posteriormente en un baño de flotación (Technicare, mod. 134) a 56 - 60°C (Bell y Lightner, 1988), posteriormente las laminillas fueron secadas a temperatura ambiente e incubadas a 42°C durante 24 horas.

6.5.5. TINCIÓN HEMATOXILINA- EOSINA-FLOXINA.

1. Se colocaron las muestras en solución de xilol por 5 minutos, repitiendo de nuevo la misma operación.
2. Las muestras se pasaron dos veces por alcohol al 100% por 10 minutos, repitiendo el mismo procedimiento en alcohol al 96%, seguido de alcohol al 80%.
3. Se sumergió en alcohol al 50% por 10 minutos.
4. Se sumergió por 10 minutos, en agua destilada, repitiendo nuevamente la operación.

5. Se sumergió por 10 minutos, en solución de hematoxilina.
6. Se lavó en agua corriente por 4 minutos.
7. Se sumergió por 2 minutos en solución de Eosina.
8. Se umergió por 10 minutos en alcohol del 96% repitiendo la misma operación tres veces.
9. Se sumergió por 10 minutos en alcohol al 100% repitiendo la misma operación dos veces.
10. Se sumergió por 10 minutos en Xilol repitiendo cuatro veces la misma operación.

7. RESULTADOS

7.1. PRUEBAS PRELIMINARES.

Las pruebas preliminares indicaron una relación directa entre el incremento de la concentración de metilparatión y la mortalidad de los organismos expuestos (Tabla 1). En las concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{g MPARg}^{-1}$ de alimento, no se registraron mortalidades en las 96 horas de duración del bioensayo, tampoco se observaron efectos de hiperexcitabilidad. La concentración de 16 $\mu\text{g MPARg}^{-1}$ de alimento provocó el 10% de mortalidad a las 96 horas de ofrecido. La concentración de 32 $\mu\text{g MPARg}^{-1}$ de alimento, provocó una mortalidad del 10 al 20% e indujo efectos de hiperexcitabilidad. Con estos resultados se tomó la decisión de usar esta concentración en los experimentos finales y se repitió el preliminar con esta misma concentración para corroborar los resultados. Las concentraciones 64, 80, 96 y 160 $\mu\text{g MPARg}^{-1}$ de alimento, provocaron una mortalidad del 30 al 100% aproximadamente entre 1 y 6 horas después de la ingestión y por lo tanto se descartó ya que los efectos de toxicidad fueron casi inmediatos, seguidos de la muerte.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de camarón blanco en función de diferentes concentraciones de $\mu\text{g MPARg}^{-1}$ de alimento, después de 96 horas de exposición.

Concentración $\mu\text{gMPAR}^*\text{g}^{-1}$ de alimento	Mortalidad (%)	Horas
4	0	96
8	0	96
16	10	96
32	20	24
64	30	6
80	40	1
96	100	1
160	100	1

MPAR= metilparatión

Tabla 2. Promedio estimado de *Vibrio parahaemolyticus* aplicado durante cuatro días de infección a través del baño infeccioso a camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*.

		Experimento 1	Experimento 2
Día 7	Inóculo	2.38×10^8 UFCml ⁻¹	6.23×10^8 UFCml ⁻¹
	Acuario	2.38×10^5 UFCml ⁻¹	6.23×10^5 UFCml ⁻¹
Día 8	Inóculo	2.23×10^8 UFCml ⁻¹	2.48×10^8 UFCml ⁻¹
	Acuario	2.23×10^5 UFCml ⁻¹	2.48×10^5 UFCml ⁻¹
Día 9	Inóculo	2.53×10^8 UFCml ⁻¹	1.41×10^8 UFCml ⁻¹
	Acuario	2.53×10^5 UFCml ⁻¹	1.41×10^5 UFCml ⁻¹
Día 10	Inóculo	2.31×10^8 UFCml ⁻¹	2.9×10^8 UFCml ⁻¹
	Acuario	2.31×10^5 UFCml ⁻¹	2.9×10^5 UFCml ⁻¹

Las densidades bacterianas de *Vibrio parahemolyticus* aplicadas fueron de 10^5 UFC/ml, del día siete hasta el día 10. Estos valores nunca fueron significativamente diferentes puesto que siempre estuvieron en el mismo orden de magnitud (10^5).

7.2. MORTALIDAD DE JUVENILES DESPUÉS DE 10 DÍAS DE APLICACIÓN DE METILPARATIÓN.

En la Tabla 3 se puede observar que en el tratamiento metilparati3n-bacteria se registr3 el 35% de mortalidad, siendo esta la m3s alta para este estudio. Posteriormente, el tratamiento metilparati3n-medio de cultivo obtuvo 33%. Los tratamientos que obtuvieron m3s bajo porcentaje fueron el tratamiento control-bacteria con una mortalidad de 19% y, por 3ltimo y m3s bajo el control-medio de cultivo con una mortalidad de 9%.

La prueba de Kruskal Wallis mostr3 que existen diferencias estadisticamente significativas ($P= 0.0021$, $\alpha= 0.05$) entre los cuatro tratamientos. Posteriormente en la prueba de comparaci3n m3ltiple (Prueba de Dunnett's, $\alpha= 0.05$) se formaron dos grupos (Tabla 3). El primer grupo corresponde a los tratamientos donde se aplic3 el plaguicida metilparati3n que es donde se observan las mortalidades m3s altas y el segundo grupo corresponde a los tratamientos en los que no se aplic3 plaguicida y donde se obtuvieron menores porcentajes de mortalidad.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de juveniles de camar3n *Litopenaeus vannamei* despu3 de 10 d3as de aplicaci3n de 32. μg MPARg^{1*} de alimento y la aplicaci3n de un ba3o infeccioso de *Vibrio parahaemolyticus*. Promedios con la misma letra no difieren estadisticamente (Prueba de Dunnett's $\alpha= 0.05$ n= 120 camarones (12 acuarios con 10 camarones en c/u) promedio \pm error est3ndar de la media.

Tratamiento	Mortalidad (%)	Grupo
Metilparati3n / Bacteria	35 \pm 6.2	a
Metilparati3n / Medio	33 \pm 4.47	a
Control / bacteria	19 \pm 5.5	b
Control / medio	9 \pm 5.68	b

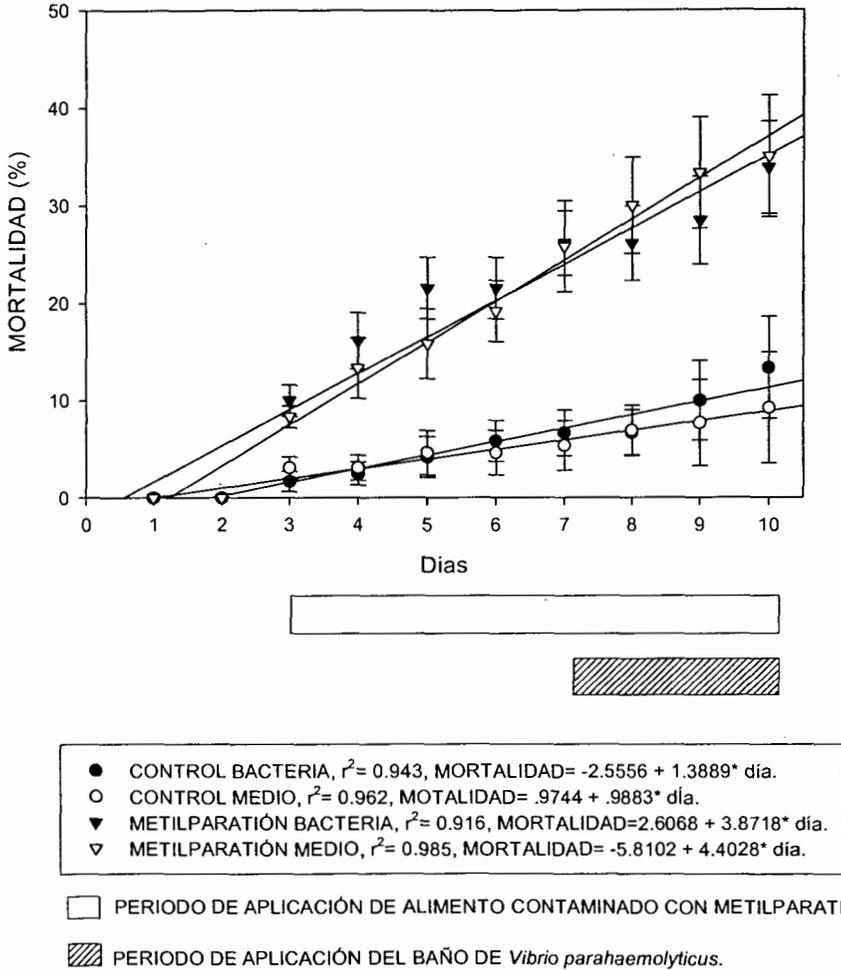
7.3. PATRÓN DE MORTALIDADES DEL CAMARÓN BLANCO EN FUNCIÓN A LA APLICACIÓN DE $\mu\text{g MPARG}^{1*}$ DE ALIMENTO POR DÍA, DURANTE EL PERIODO DE APLICACIÓN DE UN BAÑO INFECCIOSO DE BACTERIA *Vibrio parahaemolyticus*.

Los cuatro tratamientos aplicados fueron analizados mediante regresión lineal, mortalidad y tratamiento. El coeficiente de determinación fue alto, muy cercano a uno, en los cuatro tratamientos (Grafica 1). El tratamiento metilparatión-medio obtuvo el coeficiente de determinación más alto ($r^2 = 0.985$), seguido del control-medio ($r^2 = 0.962$), del control-bacteria ($r^2 = 0.943$) y del metilparatión-bacteria ($r^2 = 0.916$). De esta manera, se describe una relación de tipo lineal directamente proporcional entre la mortalidad y los días de tratamiento.

Como se puede observar en la grafica 1, los organismos empezaron a morir después del tercer día, cuando se les aplicó el alimento con el metilparatión. La mortalidad más alta observada por día fue con el tratamiento metilparatión-acetonitrilo con una mortalidad de cuatro organismos en el último día de tratamiento, debido a la aplicación del alimento contaminado con plaguicida.

En el segundo tratamiento, metilparatión-bacteria, se presentó una mortalidad en el último día de 3 organismos, esta fue menor que en el primer tratamiento metilparatión-acetonitrilo. Además, aplicar el baño infeccioso de la bacteria *vibrio parahaemolyticus* no causó diferencia alguna en la mortalidad de los camarones.

Para el tercer tratamiento, acetonitrilo-bacteria la mortalidad más alta obtenida fue de 1 organismo en el último día del tratamiento. El tratamiento acetonitrilo-medio de cultivo reporto, al igual que el tercer tratamiento, una mortalidad de 1 organismo en el último día del tratamiento.



Gráfica 1. Patrón de mortalidades de acuerdo a cuatro diferentes tipos de tratamiento.

7.4. EVIDENCIAS HISTOPATOLÓGICAS DE INFECCIÓN BACTERIANA *Vibrio parahaemolyticus*.

Se tomaron dos muestras de organismos sobrevivientes de las seis réplicas de cada tratamiento para analizarlos histológicamente con el fin de investigar si presentaban patologías que pudieran ser asociadas con daños por el plaguicida metilparatión o con la presencia de grandes cantidades de *Vibrio*. Debido a que las mortalidades fueron más bajas de lo esperado, los daños encontrados en cada muestra se expresaron en porcentaje para cada tratamiento, tal y como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Muestras de organismos analizados. Los daños encontrados fueron expresados en porcentaje en los cuatro tratamientos.

Tratamiento	n	Grados de Infiltración Hemocítica			# Melanizaciones		# Nódulos Hemocíticos	
		Intestino Medio (%)	Estómago (%)	Cutícula (%)	Cefalotórax (%)	Abdomen (%)	Cefalotórax (%)	Abdomen (%)
Acetonitrilo Medio	22	82	82	77	27	18	9	18
Acetonitrilo Bacteria	24	71	83	67	8	29	0	25
Metilparatión Bacteria	25	64	72	76	16	40	4	16
Metilparatión Medio	26	100	88	85	15	23	4	19

8. DISCUSIÓN

Los organofosforados como el metilpararion, son insecticidas de uso intensivo que se utilizan en gran escala para el combate de plagas en cultivos agrícolas del estado de Sinaloa (Páez-Ozuna et al., 1998). La toxicidad de los plaguicidas depende en la mayoría de los casos, de la estructura química del compuesto, del tiempo de exposición, de parámetros físicos y químicos y de la susceptibilidad de las especies (Copage y Mathews, 1974). En algunos casos, se plantea la hipótesis de que lleguen a presentarse en concentraciones subletales en los ambientes acuáticos, pudiendo interactuar con otros factores como puede ser la presencia inevitable de las bacterias *Vibrio*, afectando ambos directamente sobre los cultivos de camarón, especie susceptible a los compuestos organofosforados debido a su relación filogenética cercana con los insectos (Roque et al, 2002).

Generalmente, la forma más común de exposición a plaguicidas en experimentos de toxicología con organismos acuáticos es directamente en el agua (Juárez y Sánchez 1989). Aún no se han realizado suficientes investigaciones de exposición oral de metilpararion, siendo de importancia esta forma de exposición ya que el camarón blanco, de hábito bentónico desde su etapa juvenil, toma su alimento directamente del sedimento (Adab, 2000). La posibilidad de que el metilpararion pueda ser ingerido en el alimento por los camarones se incrementa ya que este plaguicida, al igual que otros organofosforados, tiene baja solubilidad en agua y por lo tanto, tiende a absorberse a las partículas de los sedimentos del fondo de los cuerpos de agua costeros (Abad, 2000).

Para llevar a cabo el método de exposición oral, se utilizó como solvente acarreador el acetonitrilo, utilizado en investigaciones previas (Abad, 2000). Este es un compuesto de alta toxicidad para cualquier organismo expuesto, sin embargo se volatiliza rápidamente (ATSDR, 1995, Radian Corporation, 1991). Estudios previos demostraron que el acetonitrilo no causa reacciones que se pudieran considerar negativas a los camarones, ya que el acetonitrilo no influye sobre la sobrevivencia de organismos expuestos. El método utilizado para incorporar el plaguicida en el alimento se realizó en aproximadamente 5 minutos y por lo tanto, la mezcla de metilpararion y

acetonitrilo tuvo poco tiempo para su evaporación antes de la medición de la concentración nominal, reduciendo la probabilidad de error en la estimación. Sin embargo, el alimento preparado estuvo durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente para asegurar la completa evaporación del acetonitrilo lo cual, se asume fue suficiente ya que la mortalidad máxima en el tratamiento control para los 2 experimentos fue de un organismo.

La degradación del metilparatión se presenta principalmente cuando se incrementa la temperatura y/o disminuye la salinidad (WHO, 1993). El metilparatión es más estable en aguas de salinidades de 32-35 ‰, que en agua dulce (Bagawy y El Dib, 1984). Las condiciones de agua de mar favorecen la permanencia del metilparatión y el alimento estuvo guardado en la oscuridad a -20°C; además, cuando fue ofrecido al camarón, era rápidamente ingerido. Los parámetros del agua de los acuarios se mantuvieron relativamente constantes (de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y Salinidad de $33 \pm 1\text{‰}$).

8.1. TOXICIDAD.

Los resultados obtenidos de los ensayos preliminares previos a los bioensayos finales para determinar cual era la cantidad de alimento que se requería, indicaron una concentración nominal de $32 \mu\text{g MPA}\cdot\text{g}^{-1}$. Los experimentos de toxicidad (Tabla 1) muestran que existe una relación entre el incremento de la concentración de metilparatión con el aumento de mortalidad de los organismos obtenida en cada preliminar. Las concentraciones mayores a $64 \mu\text{g MPA}\cdot\text{g}^{-1}$ provocaron en los camarones expuestos alteraciones como hiperexcitabilidad, temblor en los apéndices, pérdida de coordinación y aletargamiento, esto dejaba a los camarones incapacitados para consumir alimento y provocaban mortalidades de 30 a 100%. El grado de severidad de estas alteraciones aumentaba conforme se incrementaba la concentración.

Los efectos del metilparatión coinciden con los resultados obtenidos por Reddy y Rao (1991), quienes expusieron a *Metapenaeus monoceros* a metilparatión y melatión, ambos compuestos organofosforados. Estos autores registraron alteraciones en el comportamiento como nado errático y muy rápido, seguido de temblores en apéndices, pérdida de coordinación y del equilibrio, acción violenta de las quelas y finalmente la muerte. Flegel et al. (1992), expusieron larvas de *Penaeus monodon* a tres plaguicidas, un insecticida piretroide y dos organofosforados (cipermetria y metilparatión) y observaron los mismos síntomas descritos arriba, incluyendo inquietud, nado errático de la superficie al fondo y viceversa, acalambamiento de los apéndices y finalmente la muerte. Todos estos síntomas indican un efecto directo de los organofosforados sobre el sistema nervioso de los crustáceos.

8.2. BACTERIOLOGÍA.

La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* empleada para este trabajo (HL57) se obtuvo de la colección de microorganismos con importancia en la acuicultura del CIAD Mazatlán. Lightner (1996, 1993), indica que entre las especies de bacterias aisladas de camarones enfermos se encuentran *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela* y *V. harveyi*. Estas bacterias se encuentran en ambientes acuáticos, marinos y estuarios. (Brock y LeaMaster, 1992; Lightner, 1993; 1996) *Vibrio parahaemolyticus* es un patógeno oportunista que causa enfermedades cuando el sistema de defensa de estos crustáceos se ve perturbado por factores bióticos y/o abióticos tales como factores nutricionales estrés y una mala calidad de agua del estanque (Lightner, 1996).

La técnica de inoculación utilizada en este experimento fue un baño infeccioso con una bacteria *Vibrio parahaemolyticus* potencialmente patógena. Esta técnica es una de las menos estudiadas en crustáceos y menos exitosa (Roque, 1995, Roque et al, 1998). Sin embargo es la técnica con mayor relevancia ecológica, porque es la que mejor imita las condiciones naturales de infección.

La dosis subletal de bacteria de *Vibrio parahaemolyticus* utilizada en la interacción de plaguicida y el desarrollo del baño infeccioso fue de 10^5 UFC/ml, también utilizada por Roque et al. (1998), la cual resultó mas grande que la densidad de *Vibrio* sp reportada en el cultivo de camarones en estanque (Guerra-Flores pers, Comm., 1997 en Roque et al., 1998).

Tsai (1989), reporta que las densidades de bacterias encontradas fueron cercanas a las reportadas (Guerra-Flores pers. Comm., 1997 en Roque et al., 1998) probablemente los camarones que se encontraron en el fondo del estanque y en los sedimentos, pudieron haber sido expuestos a mas altas densidades de bacterias que los que se encontraban en las columnas de agua.

De estudios publicados, Roque (1995) menciona que una alta densidad de bacterias sería requerida para inducir al camarón a que este enferme debido ha el patógeno oportunista. En este estudio no se pudo inducir a que los camarones enfermaran con la aplicación de 10^5 UFC/ml, alta densidad de bacterias oportunistas como es *Vibrio sp*, Flegel et al. (1992) especuló que el camarón era continuamente invadido por bacterias, si esto fuera cierto un gran numero de bacterias en el agua podrían abatir los mecanismos de defensa del camarón, y así una pequeña proporción del conteo total consistiría de *Vibrio sp*, patógeno que podría causar la enfermedad. Se esperaba con este estudio que al ser estresado el camarón juvenil con metilparatión y al ser continuamente invadido por *Vibrio parahaemolyticus*, este enfermara; esto no se pudo lograr.

Roque et al. (1998), realizó una serie de ensayos con inóculo de bacteria del genero *Vibrio parahaemolyticus*, estas fueron adicionadas diariamente, con el objetivo de mantener una alta densidad de bacterias y soportar su crecimiento en acuarios pequeños, ya que es difícil mantener una alta concentración de bacterias *Vibrio sp* con insuficiente materia orgánica, a pesar de la adición de TSB. Con el fin de facilitar la infección de la vibriosis los camarones fueron artificialmente heridos en el tercer segmento abdominal hasta la penetración del caparazón pensando que la herida sería un factor estresante apropiado ya que es un agente primario por el cual se puede inducir la infección y ocurre en condiciones naturales (Rosen, 1970; Ligtner, 1978, 1983, 1988; Ruangpan and Kitao, 1991)

Después fueron desafiados con un baño infeccioso de *Vibrio parahaemoliticus*, se inoculó con 1.5 ml/L de agua de mar, teniendo una mortalidad de 32-52% y fue significativamente diferente a los controles en cada bioensayo. Sin embargo en los resultados obtenidos de mortalidad en estos bioensayos, el factor estresante utilizado, el metilparatión, fue demasiado toxico para el organismo y no hubo interacción con el baño infeccioso aplicado ya que las mortalidades reportadas fueron por el plaguicida organofosforado metilparatión y no las esperadas por infección del *Vibrio sp*.

8.3. INTERACCIÓN PLAGUICIDA – BACTERIA.

Con los resultados obtenidos en los bioensayos de interacción plaguicida-bacteria se descarta la hipótesis principal propuesta en este trabajo. Los resultados de los bioensayos obtenidos de interacción plaguicida-bacteria indican que no se presentó un efecto interactivo entre el plaguicida metilparatión y la cepa HL57, sobre el camarón blanco juvenil *Litopenaeus vannamei* y no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos propuestos en este estudio.

Se observó que las pendientes que mejor describían las mortalidades de los cuatro diferentes tipos de tratamientos fueron lineales, esto indica que al ofrecer el alimento con plaguicida metilparatión las mortalidades se presentan desde el primer día de aplicación del alimento contaminado, y estas se mantuvieron constantes sin presentar un incremento de mortalidades cuando se aplicó el baño infeccioso de la bacteria potencialmente patógena.

Debido a que las mortalidades más altas reportadas fueron para metilparatión-medio con una mortalidad de cuatro organismos por día esto sugiere una vez más que los organismos se estaban muriendo de intoxicación por el plaguicida.

El metilparatión es un organofosforado de fácil incorporación y efectos tóxicos dirigidos al sistema nervioso de crustáceos. En los ambientes acuáticos, los organismos que se encuentran expuestos a este organofosforado sufrirán problemas a nivel fisiológico sobre el sistema de defensa que repercuten directa o indirectamente en los camarones juveniles aumentando de manera potencial o aditiva la posibilidad de infección por organismos oportunistas presentes en el medio o inclusive dentro del mismo organismo (Couch y Courtney, 1997).

Sin embargo Galindo et al., (1994) menciona que los organofosforados pueden afectar directa o indirectamente a los organismos acuáticos a través de la cadena alimenticia, causando mortalidades en poblaciones cuando las concentraciones de

plaguicida son altas (intoxicaciones agudas) y alteraciones bioquímicas, fisiológicas y genéticas cuando las alteraciones son bajas o subletales (intoxicaciones crónicas), principalmente cuando las sustancias tóxicas tienen una larga persistencia en el medio ambiente.

Por todo esto se considera que las mortalidades que se registraron en juveniles en el presente estudio se debieron a intoxicaciones agudas, ya que la concentración de $32 \mu\text{g MPAR} \cdot \text{g}^{-1}$ de alimento parecen haber sido muy elevadas, causando así grandes mortalidades diariamente.

El uso de controles donde se ofreció alimento preparado con acetonitrilo a camarones juveniles aunado con medio de cultivo TSB a los acuarios, permite descartar las muertes de los organismos por efecto estrés como el uso del solvente acarreador o del mismo medio de cultivo. De este modo, aumenta la posibilidad de que los resultados de mortalidad obtenidos sean en primera instancia, por la concentración ofrecida de alimento contaminado con plaguicida a camarones juveniles.

En este estudio se descartaron las muertes por variantes como cambios abióticos tales como: temperatura, pH y salinidad; o a organismos como bacterias ajenas a los tratamientos o protozoarios que pudieran alterar las condiciones de cada uno de los acuarios ya que todas estas variables se tenían previamente controladas, pero si se pudo considerar la mortalidad debido a las variaciones fisiológicas de cada organismo debido a la susceptibilidad de cada organismo al plaguicida metilparatión.

Este trabajo se realizó básicamente en condiciones de laboratorio, sin embargo permite confirmar el efecto tóxico que causa este plaguicida organofosforado sobre el camarón blanco.

8.4. HISTOPATOLOGÍA.

En camarones con infecciones bacterianas, desde el punto de vista histopatológico, se pueden observar áreas con desarrollo de nódulos hemocíticos y melanizaciones, dichos nódulos están compuestos de una colonia bacteriana en el centro rodeada por una zona melanizada y múltiples capas de hemocitos encapsulados. Estos nódulos se desarrollan en la mayoría de los órganos afectados (Egusa et al., 1988; Broca y Lea Master, 1992).

El porcentaje de grados de infiltración hemocítica fue alto para los cuatro tratamientos, al igual que el número de melanizaciones encontradas, para intestino medio, estomago y cutícula. Sin embargo el porcentaje alto de melanizaciones y nódulos hemocíticos no determina que exista un síntoma de infección de los organismos sobrevivientes ya que en los cuatro tratamientos se presentó un alto porcentaje.

9. CONCLUSIONES

-
- ⌘ Se determinó que la técnica de baño infeccioso con *Vibrio parahaemolyticus* utilizando metilparatión como factor de predisposición a vibriosis en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* no tuvo un efecto interactivo.
 - ⌘ La dosis de metilparatión para inducir estrés en juveniles de *Litopenaeus vannamei* es de 32 µg MPARg 1* de alimento.
 - ⌘ El baño infeccioso de *Vibrio parahaemolyticus* con densidad de 10^{-5} UFC/ml, no induce a Vibriosis en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
 - ⌘ El metilparatión con la dosis de 32 µg MPARg 1* de alimento, no aumenta la susceptibilidad de Vibriosis de juveniles de *Litopenaeus vannamei* expuestos a un baño infeccioso con esta bacteria.
 - ⌘ El estudio histopatológico demostró una baja presencia de nódulos hemocíticos en juveniles de *Litopenaeus vannamei* expuestos al baño infeccioso *Vibrio parahemolyticus*. También se observó un alto grado de infiltraciones hemocíticas debido a la alta toxicidad de metilparatión.

10. RECOMENDACIONES

El desarrollo de bioensayos en el laboratorio enfocados al estudio del estrés causado en camarones por organofosforados, son de gran importancia porque proporcionan información sobre los efectos que estos compuestos podrían estar ocasionando en ambientes naturales y bajo condiciones de cultivo comercial.

Debido a que los compuestos organofosforados son utilizados comúnmente en las actividades agrícolas de Sinaloa, es recomendable que en futuros estudios se utilicen diferentes concentraciones de organofosforados como factor estresante y se prolonguen los días de exposición a este compuesto; además, se recomienda elevar la concentración de bacterias patógenas.

Este trabajo es un antecedente que reafirma la existencia de un efecto sobre la inmunidad del camarón, pero es necesaria una evaluación mas afondo para reforzar la investigación. Se recomienda también considerar el presente trabajo como la pauta a seguir para posteriores estudios en los cuales se tome en cuenta otro tipo de análisis como valoración del efecto tóxico bajo condiciones de inanición. Se propone también que se realicen más análisis histopatológicos que se enfoquen más a las alteraciones causadas por exposiciones agudas a este plaguicida.

11. BIBLIOGRAFÍA

-
- ☞ Aldermar, D.J. y T.S. Hastings. (1998). Antibiotic use en aquaculture: development of antibiotic resistance- potential for consumer health risks. *Intenational Journal of Food Science and Technology*. 33:139-155.
- ☞ Anónimo (1994). Estados Unidos Mexicanos. Panorama Agropecuario VII Censo agropecuario 1991. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, México. 178 p.
- ☞ Baumann, P. y R. H. W. Schubert. (1984). *Vibrionaceae*. En: N. R. Krieg y. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore, 516-550 p.
- ☞ Bell, T.A. y D. V. Lightner. 1992. Chemotherapy in aquaculture today: current practices in shrimp culture available treatments and their efficacy, p.45-57. In: C. Michel y D. J. Alderman (ed.), *Chermotherapy in Aquaculture. From Theory to Reality*. Office International de Epizooties. París.
- ☞ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. 1994. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- ☞ Brock, J. A. y B. LeaMaster. (1992). A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. En: *Bacteria, Fungi, & Parasites Review. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA USA., pp 212-226.
- ☞ Brock J. A. y K. L. Main. (1995). A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. En *The World Aquaculture Society (Ed.). Taxonomy, Anatomy and Disease Characteristics*. U.S.A., 242 p.
-

-
- ☞ Brock J. A. y D. V. Lightner. (1990). Microbial pathogens and diseases of marine crustaceans En: O. Kinne (ed.). Diseases of Marine animals. Vol. III Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany.
- ☞ Bodhipaksha, N. y A. P. Weeks. (1994). The effects of methyl parathion on phagocytosis and respiratory burst activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*).
- ☞ Phagocytes En: Stolen y Joanne (eds) Vol 1: models for environmental toxicology biomarkers immunostimulators. SOS Publications, Fair Haven, USA pp 11-12.
- ☞ Bolinches, J., J. Ronalde y A. Toranzo. 1988. Evaluation of selective media for isolation and enumeration of *Vibrio* from estuarine waters. Journal of Microbiological Methods, 8:151-160.
- ☞ Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOOLATEST). (1998). Catálogo Oficial de Plaguicidas. México, D.F., 519 p.
- ☞ Colwell, R. (1984). *Vibrios in the Environment*. J. Wiley and Sons (ed), Interscience, New York, N.Y. 634 pp.
- ☞ Cooper, M. C. (1991). Insecticide concentrations in ecosystem components of an intensively cultivated watershed in Mississippi. Journal of Freshwater Ecology, 6(3). 237-247.
- ☞ Couch, J. A. (1978). Diseases, parasites and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. En Fishery Bulletin, 76 (1): 1- 44.
- ☞ Couch, J., (1979). Shrimp (Arthropoda: crustacea: Penaeidae) En: Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates. Academic Press. 7:235-258.

-
- ☞ Chanratchakool, P., J. I. Turnbull, S. J. Funge-Smith, I.H. MacRae y Ch. Limsuman (1998). Health management in shrimp ponds. En: Aquatic Animal Health . Pornlend (Ed) Third Edition, 151 p.
- ☞ Davidson, J. H., P. S. C Rao, L. T. Ou, W. B. Wheeler, y F. F. Rothwell. (1980). Adsorption, movement, and biological degradation of large concentrations of selected pesticides in soils. Gainesville, Florida University.
- ☞ De la Vega S. M., L. Martinez y C. Macias. (1997). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Ecotox. Environ.*, 38:53-62.
- ☞ Esteve, M. Y R Quijada. (1995). Evaluation of three experimental infection techniques with *Vibrio alguillarum* in *Penaeus brasiliensis* Latreille, 1817. *Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura* . Ecuador . pp 205-208.
- ☞ Frerichs, G.N. y Millar, S.D. (1993). Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, 12-52.
- ☞ Figueras, E. (2000). Problemática actual de los patógenos que inciden en los sistemas acuícolas, p. 189-201. *In: M. Bonilla (ed.), III Simposium Internacional de Acuicultura*. México.
- ☞ Flegel, T., D. F. Fegan, S. Kongsom, S Vuthikomudomkit, S. Siriporn, S. Boonyaratpalin, Ch. Chantanachookhin, J. E. Vickers y O. D. Macdonald. (1992). Occurrence; diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. En: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. W. Fulks y K. L. Main (Eds.). Honolulu, Hawaii., pp 57-112.
-

-
- ☞ Galindo, J. G. R, M. Guerrero, C. Villagrama y L. Quezada. (1992). Contaminación por plaguicidas en almejas y camarones en dos ecosistemas costeros de Sinaloa, UAS. Epoca. México. 1,12:6-11.
- ☞ Galindo R. G. (1987). Estudio de la Contaminación por plaguicidas en camarón y agua del estero Urías, Mazatlán, Sin. Res VII Cong. Nac. Oceanog. 371 p.
- ☞ Garcia-Repeto, R. y D. Martinez. (1997). Biodisposition study of the organophosphorous pesticide, methyl-parathion. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 59:901-908.
- ☞ Gomez-Gil, B. G. (1998). Evaluation of potencial probionts for use in penaeid shrimp larval culture. Tesis inedita de Doctorado. Institute of Aquaculture. University of Stirling. Stirling, Scotland, 177 p.
- ☞ Hamed, S. Y Rao, P. V. (1996). Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii* – like bacterium affecting hatchery – reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards, 1837) larvae. Aquaculture Research, vol: 27: 853-863.1996.
- ☞ Juarez, L. M. y J. Sánchez. (1989). Toxicity of the organophosphorous insecticide metamidophos (O, S- Dimethyl Phosphoramidothioate) to larvae of the Freshwater prawn macrobrachium rosenbergii (De Man) and the blue shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43:302-309.
- ☞ Lightner. D. V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. En: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. C. J. Sindermann y D. V. Lingtner (Eds.). Elsevier, Ámsterdam, pp 8-127.
- ☞ Lightner. D. V. (1992) Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. In: J. Wyban (editor), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 238-253.
-

-
- ☞ Lightner, D. V. (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp. En: CRC Handbook of Mariculture. Segunda Edición Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp 393-486.
- ☞ Lightner, D. V. (1996). Vibriosis. En: A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, La., pp1-5.
- ☞ Lavilla Pitogo, C. R. (1995). Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In: Shariff, M., Arthur, J. R. y Subasinghe, R.P. (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p. 107-121.
- ☞ Livingston, R.(1997). Review of current literature concerning the acute and chronic effects of pesticides on aquatic organism. CRC critical reviews in environmental control. p 325-351.
- ☞ Lignot, J. H.,G. Charmantier y J. C. Cochard. (1998). Effect of an organophosphorous insecticide, fenitrothion, on survival, osmoregulation, and acetylcholinesterase activity in different life stages of two penaeid shrimps: *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*; (Crustacea, Decapoda). Journal of Shellfish Research, 17(4): 1251-1258.
- ☞ Lundebye, A. K., Curtis, T.M., Braven, J. y Depledge, M.H. (1997). Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. Aquatic Toxicology. 40:23-36.
- ☞ Martinez-Tabache, L., C. I, Galar, M.B. Ramirez, R. A Morales y F. C. German. (1994). Pharation effect on acetylcholinesterase from fish through an artificial trophic chain: *Ankistrodesmus falcatus-Moinama crocopa-Oreochromis hornorum*. Bull Environ. Contam. Toxicol., 52: 360-366.
-

-
- ☞ Martínez, M. y M. Pedini. (1996). Review of the estate of the aquaculture in Latin America. FAO Fisheries Department. Circular No 886,6 p.
- ☞ Martínez, M. y M. Pedini. (1996). Review of the state of the aquaculture in Latin America. FAO Fisheries Department. Circular No. 886, 6 p.
- ☞ Munnecke, D. M. (1976). Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:7-3.
- ☞ Montoya Rodriguez, L. 1992. Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura en Ensenada B.C. mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Clasificación del Género *Vibrio*: 1- 4 Tesis de Maestría. U.N.A.M., UACPyP-CCH-ICML, pp.78.
- ☞ Paez, O. F., G. S. Guerrero y F. A. Ruiz. (1998). The Environmental Impact of Shrimp aquaculture and the Coastal Pollution in México. *Mar. Poll. Bull.*, 36(1):65-75.
- ☞ Peakall, D. (1992). Animal Biomarkers as Pollution Indicators.-Biomarkers of the nervous system. Chapman and Hall Ecotoxicology Series. Cap. 2., pp 18-37.
- ☞ Pillay, T.V.R. (1992). Aquaculture and the Environment. Ed. Fishing News Books, oxford, En gland, 189 p.
- ☞ Radial Corporation. (1991). NTP Chemical Repository Methyl parathion. World Wide Web.
- ☞ Ratcliffe, N. A. (1985). Invertebrate Immunity-A primer for the non-specialist. *Immunology letters*, 10:253-270.
-

-
- ☞ Reddy, M. S., P. Jayaprada y K. V. Ramana Rao. (1990). Impact of methyl parathion and malathion on cholinergic and non-cholinergic enzyme systems of penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros*. *Biochemistry International*, 22 (4): 769-779.
- ☞ Reddy, M. S., y K. V. Ramana Rao. (1991). Methyl parathion induced alterations in the tissue carbohydrate catabolism of marine prawn *Metapenaeus monoceros*. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 925-932.
- ☞ Rosenberry, B. (Ed) (1987). *World Shrimp Farming 1997*. Shrimp News International U.S.A., 284p.
- ☞ Rosenberry, R. (1997). *World Shrimp Farming 1997*. Publ. By Aquaculture Digest, San Diego, cA. 56 pp.
- ☞ Roque A, Abad S, Betancourt M, Chavez C, Garcia LM, Gomez-Gil B, Guera Flores AL, Vargas Albores F. 2002 Evaluation of susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when exposed to agriculture pesticides. In Lavilla Pitogo C (ed) *Diseases in Asian Aquaculture IV*. P. 87-91.
- ☞ Roberts, N.C,y R.J Seidler.1984. Methods for monitoring vibrios in environmental. P. 269- 275. En: R.R. Colwell (ed). *Vibrios in the environments*, John Wiley and Sons. Inc: New York.
- ☞ Rosales. M.T.L., R.L. Escalona.R.M.Alarcon and V. Zamora (1985). Organicchlorine hydrocarbon residues in sediments of two different lagoons of northwest Mexico.*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (35): 322-330.

-
- ☞ Smith, J. H., W. R. Mabey, N. Bohanas, B. B. Holt, S. S. Lee, T. W. Chou, D.C. Bomberier y T. Mill. (1978). Environmental Pathways of Selected Chemicals in Freshwater System. Part 2. Environmental Protection Agency, pp 267-269.
- ☞ Smith, J.H.,W. R. Mabey, N. Bohanas. B.B.Holt, S. S. Lee, T. W. Chou, D. C. Bomberier y T.Mill. (1978). Enviromental Pathways of Selected Chemicals in Solis,
- ☞ Solis, P. A. (1996). Miniaturización y simplificación para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil Ecuador, pp.68.
- ☞ Couch, J., (1979). Shrimps (Arthropoda: crustacea: Penaeidae) En:Pollution Ecology of Estuarine invertebrates. Academic Press. 7: 235-258.
- ☞ Juarez, L. y Sánchez, J. (1989). Toxicity of the organophosphorous insecticide metamidophos (o,s-dimethyl phosphoramidothioate)tolarvae of the freswater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de man) and the blue shrimp *penaeus stylirostris*. Stimpsony. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. 43:302-309
- ☞ Olea, R. H. (1975). Ecología descriptiva de Sinaloa. Sociedad Mexicana de Geografía y estadísticas. 201 p
- ☞ Tagatz, M. E., Gregory, N. R., Plaia, G. R. (1982). En Effects of pesticides on estuarine softbottom ecosystems. Forbes V. 1996. Working report No. 22. Ministry of Environment and Energy, Denmark, 61 p.
- ☞ Unzueta, M. L. (2000). Problemas patológicos en camarones peneidos de importancia comercial en las américas, p. 207-222. In: M. Bonilla (ed.). III Simposium Internacional de Aquaculture. México.
-

-
- 3 World Health Organización, (1993). Methyl Parathion. Environmental Health Organization; 145. Geneva. 245 p.