

Identificación de protozoarios parásitos en camarones cultivados del género *Litopenaeus*, colectados en la provincia del Guayas – Ecuador, empleando dos técnicas distintas de histología

Ac. Luis Alejandro Daqui Loureiro¹, M.Sc. María del Pilar Torres García²; M.Sc. Jerry Landívar Zambrano³

¹ Acuacultor, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, 1999.

² Maestra en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1973

³ Maestro en Ciencias, Universidad du Québec au Montreal, Canadá, 1996

Resumen

En los primeros meses de 1998, un grupo de epicomensales se estaban desarrollando de manera descontrolada y evitando el crecimiento de camarones litopeneidos en algunos casos o elevando las tasas de mortalidad semanal en otras facilidades. Los reportes de camaroneros también mencionaban olores a choclo, tierra, moho y podrido. Para identificar sus verdaderos agentes etiológicos, se colectaron camarones moribundos o enfermos de piscinas de engorde en la región del Guayas – Ecuador, en Mayo de 1998. Las especies estudiadas son *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* cuyos ejemplares vivos fueron fijados en R&F, conservados en alcohol y procesados utilizando técnicas de squash en los tejidos y procesamiento histológico por inclusión en parafina con tinción de H&E variante de Gil. Se analizaron hepatopáncreas, lamelas branquiales, apéndices locomotores, en preparaciones de squash y se estudiaron el cefalotórax y los primeros, terceros y sextos segmentos abdominales, en preparaciones permanentes.

Se detectaron protozoarios epicomensales de los géneros *Zoothamnium* y *Acineta*, ciliados apostomados, además de algas rodofitas y crustáceos isópodos, produciendo respuestas inflamatorias de los tejidos sobre los cuales se habían fijado. En algunas muestras se observa destrucción de la mucosa epitelial a nivel subcuticular, en los sitios de fijación. Las gregarinas estuvieron ausentes en todas las muestras analizadas.

El análisis canónico de correspondencia CCA y el análisis de cúmulos, evidenció una fuerte interacción entre los factores ambientales y el sitio, gobernados por el efecto combinado del sitio de colecta, talla y temperatura, los dos últimos generados por el fenómeno de El Niño Oscilación Sur ENOS en Mayo de 1998.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los tejidos del camarón o histología, es esencial para la determinación de los cambios morfofuncionales. Las enfermedades del camarón en los últimos tiempos presentan características asociadas a muchos factores físico-químicos y también a protozoarios parásitos presentes en las piscinas de cultivo. Por tal motivo se hace necesario la identificación de los causantes de tales patologías, y la determinación de la influencia de los patrones ambientales sobre el camarón.

La información disponible acerca de los efectos de los protozoarios sobre camarones peneidos es escasa.

Jiménez (1990), reporta un incremento de poblaciones de protozoarios principalmente los ciliados *Zoothamnium*, *Acineta* y otros ciliados apostomátidos, debido al aumento de la carga de materia orgánica en el ambiente acuático en los últimos meses de 1989 e inicios de 1990 en el área del Golfo de Guayaquil. Así mismo, correlaciona la presencia de grandes cantidades de gregarinas, cuyos efectos dice, producen detenimiento en el crecimiento de camarones de mayor talla,

mortandad de camarones de estadíos iniciales, cuando no existe disponibilidad de alimento natural de origen planctónico.

Jones, Overstreet, Lotz y Frelter (1994), reportan la presencia de una nueva gregarina aseptada *Paraophioidina scolecoïdes* n. sp., que afectaba camarones *Litopenaeus vannamei* en un laboratorio de Texas-USA. Mencionan que las infecciones de gregarinas producen reducción, perforación e hiperplasia en el epitelio del intestino medio. Se concluye en el estudio que *P. vannamei* es un hospedador accidental para esta especie y que bajando la temperatura del medio se reducen las infestaciones de gregarinas.

Becker (1996) estudiando los epibiontes externos de 47 especies de malacostracos del Golfo de Tailandia, estimó la presencia de bacterias, diatomeas, protozoos, hongos, macrofauna y macroalgas. En su revisión menciona que la edad, el estadío de muda, el sexo, el estado fisiológico, los patrones de comportamiento del hospedador y, los factores ambientales, están relacionados con la abundancia y prevalencia de los epibiontes.

Identificó la presencia de ciliados peritrichos como *Zoothamnium*, *Epistylis*, *Vorticella* y *Cothurnia*, así como dos géneros de suctorios *Acineta* y *Ephelota*, ciertos coanoflagelados en camarones y algunos foraminíferos parásitos de cangrejos. En su discusión sugiere que los crustáceos poseen ciertos mecanismos para restringir la colonización de epibiontes tales como la muda, el acicalamiento, el enterramiento en los sedimentos, la defensa química, y la búsqueda de ciertas condiciones ambientales.

Cawthorn (1997), en un estudio sobre el efecto de los cuticociliados *Anophryoides haemophila* en la langosta americana *Homarus americanus*, presenta en su revisión, que Morado y Small en 1995, indican que poblaciones silvestres y en cautiverio de crustáceos están en el riesgo de enfermedades parasíticas inducidas por ciliados, una vez que las condiciones de confinamiento aumentan la concentración de la materia orgánica particulada y reducen la concentración de oxígeno disuelto. Además, concluye que los ciliados pueden ser ecto o endoparásitos de los crustáceos teniendo efectos directos o indirectos sobre sus hospedadores, y causando enfermedades clínicas o subclínicas.

Una de las más importantes revisiones e investigaciones sobre microorganismos epibiontes en copépodos y otros crustáceos marinos, fue realizada por Carman y Dobbs (1997). En esta revisión, se recogen las investigaciones y resultados de los trabajos de Wickstead 1963, Sprague y Couch 1971, Shelton 1974, Turner *et al.* 1979, Granados y Chinchilla 1990, Moohlenberg y Kaas 1990, cuyos criterios se resumen a continuación.

Wickstead (1963) hipotetiza que las demandas nutricionales de los epibiontes pueden hacer que el hospedador muera de hambre, así como ingerir partículas que los copépodos (su hospedador) no coman.

Sprague y Couch (1971), en un inventario de ciliados epibiontes de decápodos, listan 24 géneros de ciliados epibiontes distribuidos en 10 familias en 4 órdenes: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia y Suctoria, sin incluir en esta lista los protozoarios que viven en la cámara branquial o en los filamentos branquiales del hospedador. Además, listaron 52 especies con sus géneros, 22 de los cuales exhibían una alta especificidad con Decapoda.

Shelton (1974) y Mohlenberg y Kaas (1990), sugirieron que aguas con bajas salinidades podrían hacer prevalecer otras microalgas que no sean diatomeas como epibiontes fotoautotróficos de crustáceos, como es el caso de las algas rodofitas. Afirman que los protozoarios epibiontes parecen ser predominantemente miembros del phylum Ciliophora, Subclases Hypostomata, Suctoria, Hymenostomata, Peritrichia y Spirotrichia (Clasificación según Corliss 1979), así como foraminíferos, rizópodos, coanoflagelados y elobiópsidos.

Turner *et al.* (1979), encontraron lesiones atractivas a las bacterias en sitios donde el ciliado peritrichio *Epistylis* se fijaba al copépodo *Acartia tonsa*. La presencia de bacterias epibióticas sugiere que luego emplearán materia disuelta para su alimentación.

Granados y Chinchilla (1990) demostraron que 7 géneros de ciliados del trabajo de Camacho y Chinchilla (1989), no estaban distribuidos al azar en el camarón dulceacuícola *Macrobrachium rosenbergii*, pero estaban posicionados de manera que maximizaban la eficiencia alimenticia exhibida por los diferentes protozoarios y repartiéndose las fuentes hechas disponibles por el hospedador.

Como se aprecia, las contribuciones del trabajo de Carman y Dobbs son altamente específicas, y servirán de base para las investigaciones de la presente tesis.

Jiménez, De Barniol y Machuca (1998), reportan altas mortalidades de camarones peneidos cultivados, en el Ecuador, durante los periodos de aguaje en 1997. Las muertes, según se determinó, eran producidas por bacterias bioluminiscentes, gregarinas y virus, cuya acción conjunta producía una enteritis hemocítica del epitelio intestinal. Se detectaron altas concentraciones de hasta 10.000 gregarinas por camarón, del género *Nematopsis marinus*, y se le determinó como patógena para los peneidos, debido a la gran motilidad, las altas concentraciones por organismo, la fuerte delaminación que lleva a cabo en el epitelio intestinal y a la facultad que posee de adherencia de bacterias en la parte terminal del protozoo. Esta característica concluyen, es la que permite una enteritis del epitelio intestinal, producida por la infiltración de las bacterias en el subepitelio intestinal.

El presente trabajo pretende por tanto, identificar los organismos protozoarios epicomensales asociados al camarón cultivado en piscinas de engorde, y verificar su correlación con variables ambientales presentes, empleando dos técnicas histológicas.

CLIMATOLOGÍA Y AREA DE ESTUDIO

El área de estudio está comprendida dentro del Golfo de Guayaquil, circunscrito a la Provincia del Guayas – Ecuador (2°35'0" S, 80°0'0" O).

El Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador INOCAR, monitorea periódicamente el Estero Salado, ya que por él circulan todos los barcos que accesan al Puerto de Guayaquil, y en sus estudios menciona que el clima de la zona, según Holdridge, está clasificado como Tropical Húmedo, con temperaturas medias del aire de 25,2 °C y un acumulado anual de precipitación de 955 mm, resultado ello de la interacción del océano y la atmósfera y en particular de corrientes oceánicas y la posición de la zona de convergencia intertropical ZCIT.

Los parámetros meteorológicos en la Estación Guayaquil del INOCAR, para el mes de mayo de 1998, presentan temperaturas del aire de 27.9 °C, lluvias por 307.6 mm,

humedad relativa de 82%, vientos en dirección SW de 2.2 m/s de velocidad, nubosidad de 7/8, tensión de vapor de 31.3 mb y heliofanía de 102.7 horas.

Durante la fecha de los muestreos, se sentía fuertemente las influencias del fenómeno climático de El Niño Oscilación Sur ENOS, que altera considerablemente los patrones climáticos de toda la costa oriental del Pacífico Sur. En la Tabla 1, se presentan los valores de las variables medioambientales, recolectados durante las visitas.

Se muestreó la camaronera Jopisa (A) el 5 de mayo de 1998; situada en el margen izquierdo del Estero Salado, Provincia del Guayas, en el área de Sabana Grande, comuna Caballo Muerto. Tiene una superficie de espejo de agua cultivable de 70 Has., con producción extensiva. La salinidad varía todo el año, con promedios de 27 ppt, y lluvias de 500 mm anuales. Su agua tiene en gran mayoría cianofitas, y clorofitas.

Adicionalmente la camaronera Pesquerias Galuver (B) el 7 de mayo de 1998; situada en el margen derecho del Golfo de Guayaquil, Provincia del Guayas, en el área de Balao. Tiene una superficie de espejo de agua cultivable de 215 Has., con producción extensiva. La salinidad varía todo el año, con promedios de 30 ppt, y lluvias de 1000 mm anuales. Su agua tiene en gran mayoría sedimentos en suspensión por el movimiento de barcos de cabotaje en el puerto cercano.

Se muestreó la camaronera Gambalit (C) el 19 de mayo de 1998, está situada en el margen derecho de la Isla Mondragón, Golfo de Guayaquil, Provincia del Guayas. Tiene una superficie de espejo de agua cultivable de 370 Has., con producción extensiva. La salinidad varía todo el año, con promedios de 27 ppt, y lluvias de 900 mm anuales. Su agua tiene en gran mayoría cianofitas, sedimentos en suspensión y vibrios en altas cantidades en el agua.

Finalmente se muestreó la camaronera Veronesi (D) el 28 de mayo de 1998; situada en el margen izquierdo del Estero Salado, Provincia del Guayas, en el área de Puerto Hondo. Tiene una superficie de espejo de agua cultivable de 180 Has., con producción extensiva. La salinidad varía todo el año, con promedios de 15 ppt, y lluvias de 900 mm anuales. Su agua tiene en gran mayoría cianofitas, clorofitas y vibrios.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO, FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CAMARONES PENEIDOS

Para capturar los camarones se empleó una atarraya de 2 metros de diámetro y ¼" de ojo de malla, recorriendo parte de la piscina, en las compuertas de entrada y de salida. De cada piscina muestreada, se tomaron aproximadamente 40 organismos vivos, los cuales fueron fijados, colocados en envases plásticos con fijador para su procesamiento histológico posterior. Así mismo, se colectaron organismos del medio silvestre, esteros y canal reservorio a la altura de la estación de bombeo.

Para la fijación de camarones se empleó el reactivo R&F descrito por Hasson y colaboradores en 1997, dejando al organismo inmerso en el fijador durante 15 días. Luego son conservados en etanol 70%.

Para el procesamiento de las muestras de camarón se emplearon dos técnicas histológicas: preparaciones semipermanentes, y las preparaciones permanentes por inclusión en parafina.

Para las preparaciones de apéndices locomotores y natatorios, se tiñeron las preparaciones con azul de metileno alcohólico al 1%, durante dos minutos, luego se hicieron dos lavados de los tejidos, con agua corriente y agua destilada, respectivamente. Otra preparación de branquias, fue teñida con rojo neutro durante cinco minutos, luego se hicieron dos lavados de los tejidos, con agua corriente y agua destilada, respectivamente.

La observación de las preparaciones se hizo en un microscopio de luz, a 10, 100 y 400 aumentos buscando organismos patógenos en las laminillas branquiales o superficies externas de los apéndices locomotores. En el caso de hepatopáncreas se buscó la presencia de otros organismos patógenos.

Los organismos empleados para histología fueron disectados y las gasas que contenían los segmentos del camarón a ser procesados, fueron sumergidas en el doble de su volumen en cada uno de los alcoholes graduales (50%, 70%, 96% y 100%) durante treinta y seis horas. El tiempo del baño de xilol debe ser de 45 a 60 minutos.

La inclusión en parafina siguió las recomendaciones de Aguilar (1996), con tiempos de inclusión de 48 y 24 horas en cada uno de los baños. Para la tinción se utilizó la técnica de hematoxilina - eosina variante de Gil (Aguilar, 1996). El montaje se efectuó empleando la resina sintética para histología de Sigma Chemical Co.

Para los parámetros ambientales, se obtuvieron de cada piscina y del medio silvestre, dos muestras de agua de cada uno para determinar los nutrientes y el oxígeno disuelto. Para los nutrientes se utilizó un frasco de 1 litro, determinándose nitrito, nitrato, amonio y fosfato, y para el oxígeno disuelto se empleó una botella de DBO, oscura, de 350 ml para oxígeno disuelto, para verificar la exactitud de las lecturas del oxímetro. En un recipiente se colocó una muestra para la medición de pH. Todas las muestras de agua se recolectaron con una botella Van Dorn de dos litros.

Para verificar en el campo los valores de oxígeno disuelto, se midió *in situ* su concentración empleando un oxímetro digital YSI, modelo 55, con compensación de temperatura. El pH es medido con un pHmetro WTW, modelo 131, calibrado con soluciones búffer estándares.

Para las muestras de agua, se aplicaron los métodos Hach para nutrientes y Winckler para oxígeno disuelto.

RESULTADOS

De los análisis realizados a las muestras de agua se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 1. Los niveles de materia orgánica del suelo, no fueron considerados en el presente estudio. Las especies estudiadas fueron camarones *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*.

Los camarones en la camaronera A, presentaban una cutícula amarillenta, aún cuando se estaban alimentado normalmente y no se observaba necrosis en sus segmentos abdominales. Los camarones de la camaronera B, tenían necrosis en todo el cuerpo, y su intestino estaba lleno de alimento. El estero de esta camaronera mostraba una gran cantidad de sedimentos en suspensión. Los camarones de la camaronera C, tenían problemas de vibriosis, una vez que en el agua las concentraciones de *Vibrios* eran elevadas. Adicionalmente, por efecto de las lluvias, se podía percibir un evidente olor a choclo en las muestras. La

camaronera D era la más problemática, 144 días de cultivo tenían ambas piscinas muestreadas, y los crecimientos eran del orden de 0 gramos por semana, estancándose en un peso promedio de 8,51 gramos. La fertilización no se lleva a cabo debido a que en 2 corridas anteriores las piscinas habían desarrollado olores a choclo, podrido, tierra y moho por efecto de las cianofitas.

Tabla 1.- Resultado análisis de aguas: temperatura, pH, salinidad, oxígeno, nitrito, nitrato, amonio y fosfato.

Muestra*	Temp. °C	pH	S o/oo	OD (O) mg/l	Nitrito mg/l	Nitrato mg/l	Amonio mg/l	Fosfato mg/l
A4	32.40		5		0.036	6.820	0.390	0.610
A6	31.40	9.39	6	8.60				
AE					0.030	13.640	0.510	0.490
BPc4	31.70	8.52	5	8.61	0.644	0.220	0.270	0.970
B7	32.40	9.56	3	8.85	0.825	0.660	0.170	0.630
BE	30.70	8.26	11	5.64	11.550	0.000	0.830	0.570
C2	31.80	9.80	4	5.96	0.990	4.620	0.280	0.910
C6	33.30	9.36	3	8.50	0.002	5.280	0.220	0.080
C8	34.10	9.85	4	6.40	0.000	3.740	0.100	0.370
C12	30.30	9.30	4	7.00	0.000	1.450	0.080	2.530
CR	33.30	8.30	4	6.12				
D7	30.50	9.45	3	8.57	0.000	7.040	0.450	0.390
D34	28.70	9.57	3	8.60	0.003	3.740	0.170	0.430
DR	27.60	7.96	3	14.88	0.000	4.840	0.210	0.490

* Muestras: A4 = camaronera A, piscina 4; A6 = camaronera A, piscina 6; AE = camaronera A, estero; BPc4 = camaronera B, precriadero 4; B7 = camaronera B, piscina 7; BE = camaronera B, estero; C2 = camaronera C, piscina 2; C6 = camaronera C, piscina 6; C8 = camaronera C, piscina 8; C12 = camaronera C, piscina 12; CR = camaronera C, reservorio; D7 = camaronera D, piscina 7; D34 = camaronera D, piscina 34, DR = camaronera D, reservorio

Todas las camaroneras presentaban los camarones con cola roja, apéndices alimenticios, locomotores y natatorios de color amarillento pálido, con crecimientos entre 0,0 y 0,6 gramos por semana y con alimentación aparentemente normal. Las anténulas quebradizas y segmentadas, rostro deforme, son otras características observadas con frecuencia.

La ausencia de gregarinas en todas las preparaciones fue notoria, en ningún caso se las registró en estadíos de gametocitos o trofozoitos.

Para determinar la correlación de los datos, se empleó el Análisis Canónico de Correspondencia, Dendrogramas, y un Análisis No Paramétrico de los cuadrados de Pearson.

DISCUSION

La influencia de las condiciones del Fenómeno del Niño, que gobernaba el clima en el momento del muestreo, es bastante notoria. Para otros años la presencia de gregarinas y algas cianofitas es altamente perceptible durante la estación invernal, que va de Diciembre a Mayo de cada año.

Inusuales niveles de temperatura del agua, así como la presencia de elevadas concentraciones de materia orgánica favorecieron la aparición de protozoarios (Arredondo, 1998) y otros organismos patógenos, así como otros crustáceos isópodos, larvas de peces y algas cianofitas y rodofitas, cuya velocidad de metabolismo en gran medida está controlada por la temperatura.

Los olores a choclo y podrido, y la falta de crecimiento de los camarones cultivados en el momento de la colecta, son atribuidos a la presencia de hongos actinomicetos y algas cianofitas, muchas de estas últimas detectadas inclusive en el intestino medio del camarón, y algunas algas rodofitas presentes en las branquias. No se detectaron los hongos actinomicetos en los carapachos de los camarones, ni en sus cámaras branquiales. Es bien sabido que los hongos actinomicetos y las algas cianofitas producen dos compuestos la geosmina y el 2-Metilisoborneol, que pueden permanecer buen tiempo en el camarón, libernándose una vez muertas y desconociéndose al momento su excreción activa.

Una vez que los camarones tienden a enterrarse en las épocas de quiebra, y la presencia de una cantidad considerable de materia orgánica, producto de la erosión de los bordes de los ríos y cauces de aguas lluvias, así como la acumulación de alimento balanceado no consumido y no oxidado en el fondo de las piscinas, generan grandes concentraciones de amonio, que debilita al camarón y contamina el medio, haciendo propenso el ambiente para el desarrollo de organismos patógenos.

Así mismo, las erosiones cuticulares, producidas por los protozoarios en el momento de la fijación, permitían el ingreso de bacterias y otros organismos. Estos epibiontes, que se fijan en los extremos apicales de los protozoarios o infectan directamente los orificios de fijación aprovechan estas vías de entrada al organismo para afectarlo, y generar lesiones secundarias producto de su infección directa.

En muchos casos las lesiones necróticas de la cámara branquial son producto de la colonización masiva de protozoarios, observada hasta en un número de 30 al borde de 5 lamelas, producen un retardo en el crecimiento al disminuir la actividad osmótica y de respiración y al reducir su velocidad de natación.

Así mismo, la percepción del alimento y la velocidad de muda, se ven influenciadas por el grado de nutrición del camarón y la medida en que los patógenos inhiben su gestión alimenticia. Cuando se observó una mayor infestación de protozoarios, coincidentemente las mudas habían ocurrido mucho tiempo atrás, posiblemente con dos agujajes de anterioridad, lo que permite una fijación de organismos epibiontes considerable.

El análisis de cúmulos en la figura 1.2, explica la influencia de las variables biológicas (grupo-especie-talla), con la presencia de los protozoarios en los organismos procesados con histología permanente. Se observa claramente una fuerte relación entre la talla y la presencia de organismos epibiontes, y así mismo una relación entre todas estas últimas y la relación especie-grupo. Es decir hay una alta especificidad de especies y tallas con respecto a la presencia de organismos, debido al tiempo de muda de los organismos.

La figura 2.2 presenta el mismos análisis con las observaciones squash, y nos muestra la misma relación pero mucho más acentuada.

Si en estos dos análisis se incluyen todas las demás variables, nos damos cuenta en ambos casos, figuras 1.1 y 2.1, que para las dos preparaciones de tejidos, la especie-localización tiene una fuerte correlación con la temperatura, la talla y en menor grado las demás variables ambientales.

Esto nos explica la real incidencia de la temperatura y la longitud del periodo intermudal sobre la presencia de los organismos como tal y determina como concluyente una estricta participación de estos factores como altamente influyentes.

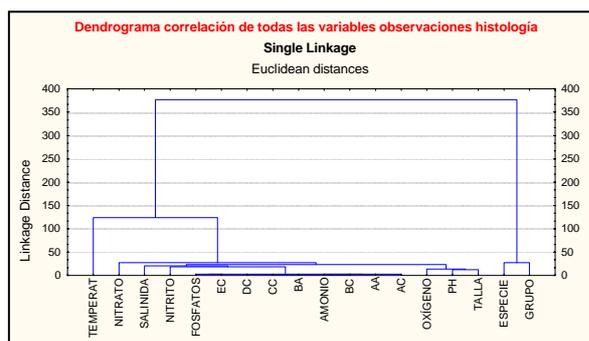


Figura 1.1.- Dendrograma de correlaciones de todas las variables en observaciones de histología permanente.

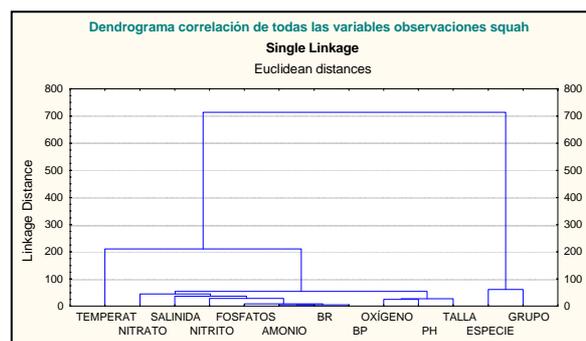


Figura 2.1.- Dendrograma de correlaciones de todas las variables en observaciones de histología semipermanente.

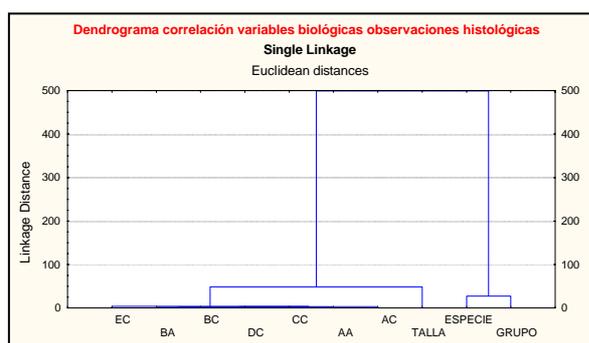


Figura 1.2.- Dendrograma de correlaciones de la presencia de organismos epibiontes y las variables biológicas en observaciones de histología permanente.

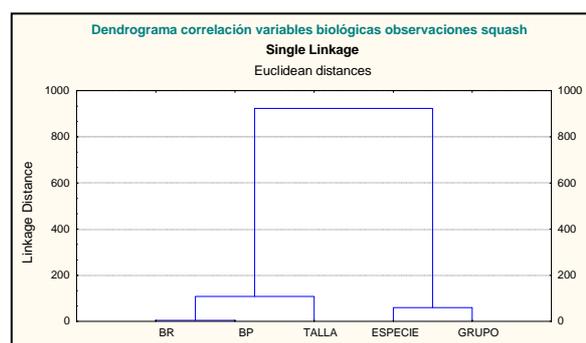


Figura 2.2.- Dendrograma de correlaciones de la presencia de organismos epibiontes y las variables biológicas en observaciones de histología semipermanente.

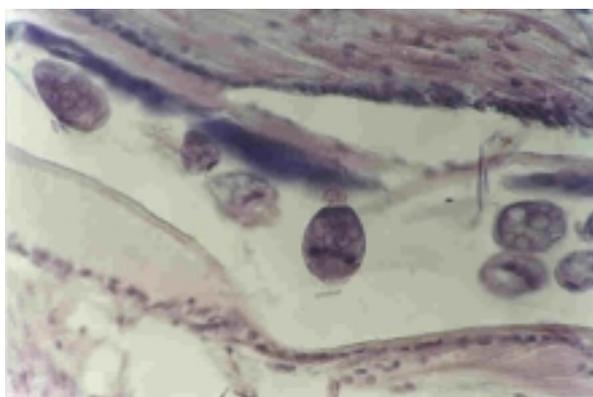


Fig 3.- Ciliados del género *Zoothamnium* y *Epystilis* y ciliados apostomados (ovoidales con caras planas, sin núcleo visible) en los intersticios de las bases de lamelas branquiales, junto a tejido muscular y muy cerca del hepatopáncreas, de camarón *Litopenaeus vannamei* silvestre. Nótese la base de fijación del protozoo ubicado en la parte central. Muestra colectada en un estero de la zona de Sabana Grande, Provincia del Guayas – Ecuador, Mayo de 1998. Microscopía con sistema de luz, 200x, histología permanente, corte longitudinal, tinción H&E variante de Gil.



Fig 4.- Delaminación de la cutícula interna de la cámara branquial producida por la fijación de protozoarios ciliados *Zoothamnium*. No se observa inflamación de las lamelas branquiales. *Litopenaeus vannamei* colectado en la zona del Puerto de Balao, Provincia del Guayas – Ecuador, Mayo de 1998. Microscopía con sistema de luz, 200x, histología permanente, corte longitudinal, tinción H&E variante de Gil.

CONCLUSIONES

Es posible utilizar preparaciones permanentes y semipermanentes para examinar la condición de afectación por parte de protozoarios en camarones del género *Litopenaeus*.

Las preparaciones histológicas permanentes teñidas con la hematoxilina-eosina variante de Gil, permiten una rápida observación de organismos epibiontes y otros patógenos.

Las preparaciones squash teñidas con azul de metileno alcohólico al 1%, durante 2 minutos, son las herramientas más poderosas para observar protozoarios epibiontes en branquias, apéndices locomotores y natatorios.

Los protozoarios asentados sobre la cutícula de las lamelas branquiales, produce daño tisular como consecuencia de una delaminación del epitelio cuticular, y permiten el ingreso por esa vía de bacterias al organismo.

Se reporta la presencia de protozoarios ciliados y ciliados apostomados dentro de los tejidos del animal, junto a tejido conjuntivo, en la zona inferior posterior de hepatopáncreas.

En orden de importancia, la localización de la facilidad, la talla y la temperatura, fueron los factores que explicaron la mayor parte de la presencia de los epicomensales, excluyendo la materia orgánica de los análisis previos.

LITERATURA CONSULTADA

- Aguilar, M., B., Coutiño y P., Salinas, 1996. Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. Las Prensas de Ciencias - UNAM, México DF – México:130 pp.
- Austin, B. and D.A., Austin, 1989. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited, Great Britain:69-97.
- Becker, K., 1996. Epibionts on carapaces of some malacostracans from the gulf of Thailand. J. of Crust. Biol., 16(1):93-104.
- Bell, T.A. and D.V., Lightner, 1988. Handbook of normal penaeid shrimp histology. WAS, Baton Rouge - USA:1-6.
- Boschi, E.E. y V., Angelescu, 1962. Descripción de la morfología externa e interna del langostino con algunas aplicaciones de índole taxonómica y biológica. Instituto de Biología Marina, Mar Del Plata – Argentina:73 pp.
- Brock, J. and K.L., Main, 1994. A guide to common problems and diseases of cultured *Litopenaeus vannamei*. WAS, Baton Rouge – USA:320 pp.
- CAAM, 1996. Desarrollo y problemática ambiental del área del Golfo de Guayaquil. Crearimagen, Quito – Ecuador:354 pp.
- CAAM, 1996. Sistemas biofísicos en el Golfo de Guayaquil. Crearimagen, Quito – Ecuador:223 pp.
- Carman, K.R. and F.C., Dobbs, 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. Microscopy Research and Technique, 37:116-135.
- Cawthorn, R.J., 1997. Overview of “bumper car” disease – impact on the North American lobster fishery. International Journal of Parasitology, 27(2):167-172.
- Dunn, A.M., J., Adams and J.E., Smith, 1993. Transovarial transmission and sex ratio distortion by a microsporidian parasite in a shrimp. Journal of Invertebrate Pathology, 61:248-252.
- García de León Loza, A., 1988. Generalidades del análisis de cúmulos y del análisis de componentes principales. UNAM, México DF – México:29pp.
- Gaviño, G., J.C., Suárez y H.H., Figueroa, 1990. Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo. 10ma reimpression. Editorial Limusa – Noriega, México DF – México:71-99.

- Guevara, R.D., 1992. Principios fundamentales de la ecología ecuatoriana. 2da ed. Gráficas Mediavilla Hnos., Quito – Ecuador:1-37.
- Hasson, K.W., J., Hasson, H., Aubert, R.M., Redman and D.V., Lightner, 1997. A New RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *Jour. of Virological Methods*, 66:227-236.
- INOCAR. 1998. Estudio de impacto ambiental previo al dragado del canal de acceso al puerto marítimo de Guayaquil. Inocar, Guayaquil – Ecuador.
- Jones, T.C., R.M., Overstreet, J.M., Lotz and P.F., Frelie, 1994. *Paraophioidina scolecoides* n. sp., a new aseptate gregarine from cultured pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, 19:67-75.
- Kudo, R.R., 1976. Protozoología. Compañía Editorial Continental, México DF – México:857-867.
- Kuris, A.M. and K.D., Lafferty, 1992. Modelling crustacean fisheries: effects of parasites on management strategies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49:327-336.
- Locquin, M. and M., Langeron. 1985. Manual de microscopía. Editorial Labor, Barcelona – España:373 pp.
- Ludwig, J.A and J.F., Reynolds, 1988. Statistical ecology, a primer on methods and computing. John Wiley & Sons, New York – USA:337pp.
- Maeda, M. And I.Ch., Liao, 1994. Microbial processes in aquaculture environment and their importance for increasing crustacean production. *JARQ*, 28:283-288.
- Martínez, L.R., 1993. Camaronicultura, bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones Peneidos. AGT Editor, México DF – México:xi-xiii.
- Overstreet, R.M., 1978. Marine Maladies? Worms, germs, and other symbionts from the northern Gulf of Mexico. MASGP, Ocean Spring, MI – USA:28-40.
- Pillay, T.V.R., 1992. Aquaculture and the environment. Fishing News Books, Cambridge – UK:89-93.
- Roberts, R.J., 1989. Fish pathology. Second edition. Bailliere Tindall, Great Britain:374-405.
- SEMARNAP, 1998. El síndrome de taura. Semarnap, México DF – México: Volante Informativo para el Sector Acuícola.
- Sinderman, C.J. and D.V., Lightner, 1988. Diseases diagnosis and control in north american marine aquaculture:1-133. In: Sinderman, C.J. and D.V. Lightner (Ed.) *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Second, revised edition. Elsevier, Amsterdam – The Netherlands, (17).
- Stickney, R.R., 1994. Principles of aquaculture. John Wiley & Sons Inc., New York, NY – USA:v-vii, 1-3.
- Söderhäll, K., L., Cerenius and M.W., Johansson, 1994. The prohenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Annuals of the New York Academy of Sciences*, 712:155-161
- Swift, D.R., 1985. Aquaculture Training Manual. Fishing News Books Ltd. Farnhanr – UK:135 pp.
- Ter Braak, C.J.F., 1987. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetario*, 69:69-77.
- Ter Braak, C.J.F., 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5):1167-1179.