

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.

**EVALUACIÓN DE OXITETRACICLINA Y UN BIOCIDA
COMERCIAL A BASE DE SALES CUATERNARIAS DE
AMONIO EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES
BACTERIANAS QUE AFECTAN AL CAMARÓN DE
CULTIVO *Litopenaeus vannamei*.**

POR:

CARLOS JOEL BARAJAS BORGO

**TESIS APROBADA POR LA:
COORDINACION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE DE 2011

Aprobación

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Carlos Joel Barajas Borgo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.


M.C. María del Carmen Bermúdez Almada


M.C. Angelica Espinosa Plascencia



M.C. María Elena Lugo Sánchez

Dr. Armando García Ortega

Declaración Institucional

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del Director de Tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

Agradecimientos

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado que me han permitido crecer en el ámbito profesional y humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la M.C. María del Carmen Bermúdez Almada, por dirigir este proyecto y proporcionarme su total apoyo y disponibilidad.

A la M.C. Angelica Espinosa Plascencia, por la dedicación brindada en todo momento para la realización de esta investigación y aún más por su amistad.

A la M.C. Haydé Hayamaí González Carrillo, por su gran apoyo técnico, enseñanzas, tolerancia y sobre todo por su gran amistad.

Al personal de la Granja Acuícola la Borbolla, en especial a los Ingenieros Roberto Federico Aguayo Valenzuela y César Eduardo Patiño Patiño, por abrirme las puertas de la granja y proporcionarme todo lo necesario para llevar a cabo esta investigación. Especialmente al Biol. Adolfo Pérez Álvarez y al Tecn. Juan Carlos Gastélum Domínguez, por compartir conmigo todos sus conocimientos y experiencias, los cuales fueron muy útiles para cumplir con los objetivos del proyecto. Además, les agradezco la ayuda incondicional que en todo momento me brindaron durante mi estancia en la granja.

Al Dr. Julián Esparza Romero, por dedicarme el tiempo, para mis constantes asesorías en la parte estadística de la tesis.

A la M.C. María Elena Lugo Sánchez, por introducirme al mundo de la investigación y a todo lo que conlleva realizar un estudio y más aún, gracias por ser mi confidente y amiga a lo largo de todos estos años.

Al Laboratorio de Residuos Tóxicos, por permitirme compartir sus instalaciones para el desarrollo de una parte de mi trabajo de tesis. Especialmente a la Q.B. Leticia Miranda Vásquez, Q.B. Rosa Idalia Armenta Corral y la Q.B. Diana Erika Fierros Bujanda, por brindarme siempre su amistad.

Dedicatorias

A Dios, por haberme dado la fuerza necesaria para culminar otro objetivo en mi vida y haber colocado en mí camino personas buenas que me han ayudado a tomar decisiones.

A mis padres **Joel Barajas Bugarín y Rosaura Borgo Prandini**, por ser para mí un gran ejemplo a seguir y darme todo su cariño, confianza y palabras sabias en momentos de incertidumbre en mi vida.

A mis hermanas, **Tania, Karla y Melina** que a pesar de la distancia en todo este tiempo, siempre sentí su apoyo, comprensión y gran cariño.

A mis muy buenos amigos **Rafael Vladimir Ruíz Cruz y Jorge Alonso Bravo Hernández**, por ser parte de mi vida y siempre creer en mí.

A mis amigas y amigos del CIAD, gracias por haber hecho mi estancia más grata, nunca olvidaré los buenos momentos que pasamos juntos.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	2
Problemas en las Granjas Acuícolas.....	2
Patógenos Causantes de Enfermedades en los Cultivos de Camarón	3
Uso de los Antibióticos en la Acuicultura.....	5
Desarrollo de Resistencia Bacteriana	9
Desinfectantes Comerciales Utilizados en los Cultivos de Camarón	11
Persistencia de los Antibióticos y Otros Compuestos Químicos en el Ambiente	17
Alternativas al Uso de Antibióticos	19
Enfermedades Diagnosticadas en Camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> Mediante Preparaciones en Fresco y Microscopía.....	21
Necrosis en Branquias de Camarón	22
Ectoparásitos en Branquias de Camarón.....	23
Bacterias Filamentosas en Branquias.....	24
Túbulos en Hepatopáncreas	24
Importancia de la Determinación de Lípidos en el Hepatopáncreas del Camarón	25
Gregarinas Presentes en el Intestino del Camarón	25
Presencia de Gametocitos en el Intestino del Camarón	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30

Objetivo General	30
Objetivos Específicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Características de los Organismos de Estudio.....	31
Sistema de Agua.....	31
Tratamiento del Agua de los Estanques con el Biocida	31
Diseño Experimental para la Evaluación del Biocida a Base de Sales Cuaternarias de Amonio.....	32
Evaluación de Ganancia de Peso y Talla en los Camarones Expuestos al Biocida	32
Determinación de la Supervivencia en Camarón Expuesto al Biocida....	33
Determinación de Lesiones en Órganos del Camarón Expuesto al Biocida y a Oxitetraciclina.....	33
Evaluación Bacteriológica de Agua, Sedimento y Hepatopáncreas de Camarón de Cultivo	34
Diseño Experimental para la Evaluación del Tratamiento con Oxitetraciclina	35
Composición de las Dietas para Camarón.....	35
Análisis de Alimento y Régimen de Alimentación	37
Análisis de Oxitetraciclina en Alimento para Camarón	37
Determinación de Oxitetraciclina en Músculo y Hepatopáncreas de Camarón por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	38
Activación de sílica gel octadecil-silil derivatizada (C ₁₈)	38
Reactivos.....	39
Procedimiento de extracción y cuantificación de OTC.....	39
Parámetros Físicoquímicos del Agua.....	40
Análisis Estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Evaluación del Incremento en Talla, Peso y Conversión Alimenticia en Camarón de Cultivo.....	42
Evaluación de la Supervivencia de Camarones	42
Determinación del Daño en los Órganos de Camarón	43

Evaluación Bacteriológica de Agua, Sedimento y Hepatopáncreas de Camarón Expuesto al Biocida	46
Análisis de Oxitetraciclina en Alimento para Camarón	47
Acumulación de OTC en Músculo y Hepatopáncreas de Camarón	48
Relación del Daño en Órganos de Camarón y la Aplicación de Terapias con Oxitetraciclina.....	55
Relación de Bacterias en Agua de los Estanques y Hepatopáncreas de Camarón con el Tratamiento de Oxitetraciclina	59
Parámetros Físico-Químicos del Agua.....	62
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Estructura molecular general de las Sales Cuaternarias de Amonio (QAC).....	12
Figura 2. Ciclo de vida de una gregarina en camarón.	28
Figura 3. Concentración máxima de OTC alcanzada en músculo de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	50
Figura 4. Cromatograma de un estándar de OTC a una concentración de 1.5 µg/mL.....	51
Figura 5. Cromatograma de una muestra de músculo de camarón correspondiente a la etapa de tratamiento.....	52
Figura 6. Concentración máxima de OTC alcanzada en hepatopáncreas de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	53
Figura 7. Cromatograma de una muestra de hepatopáncreas de camarón correspondiente a la etapa de tratamiento.....	54

LISTA DE TABLAS

	Paginas
Tabla 1. Enfermedades bacterianas presentes en la etapa larvaria y de desarrollo de camarones <i>peneidos</i>	4
Tabla 2. Estructura general de los grupos que conforman las sales cuaternarias de amonio (QAC).....	14
Tabla 3. Composición del alimento para camarón.....	36
Tabla 4. Porcentaje de daño en órganos del camarón de cultivo <i>Litopenaeus vannamei</i> antes y durante el tratamiento con biocida..	44
Tabla 5. Porcentaje del daño en órganos del camarón de cultivo <i>Litopenaeus vannamei</i> tratado con un biocida (T) y sin tratar (C)...	45
Tabla 6. Porcentaje del daño en órganos del camarón de cultivo <i>Litopenaeus vannamei</i> antes y después del tratamiento con Oxitetraciclina.....	58
Tabla 7. Evaluación bacteriológica de <i>Vibrio</i> en hepatopáncreas de camarón durante y después de las terapias con OTC.....	60
Tabla 8. Evaluación bacteriológica de <i>Vibrio</i> en el agua del estanque durante y después de las terapias con OTC.....	61

RESUMEN

La producción de camarón cultivado en la región Noroeste de México, es considerada de las más importantes en Latinoamérica. Sin embargo, han ocurrido grandes pérdidas económicas en este sector, debido a las enfermedades que se presentan durante el cultivo de estos crustáceos. Para controlar esta problemática, se utilizan antibióticos como la oxitetraciclina (OTC) y algunos biocidas a base de sales cuaternarias de amonio (QAC). Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de OTC y de un biocida comercial en el control de las enfermedades bacterianas que afectan al camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en una granja de producción semi-intensiva del estado de Sonora. El diseño experimental consistió en utilizar nueve estanques con una dimensión de 7 Ha y una profundidad de 1.5 m. En cuatro estanques se aplicó un tratamiento con QAC (185 g/Ha) y otros cuatro se utilizaron como control (sin QAC). En los estanques tratados con las QAC y en los empleados como control, se colocaron jaulas cilíndricas de 1.35 m de altura y 60 cm de diámetro, con 30 camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* en cada una, llevando a cabo evaluaciones de ganancia de talla y peso, sobrevivencia y Tasa de Conversión Alimenticia (TCA). Se determinó la relación del daño en órganos (branquias, hepatopáncreas e intestino) antes y después del tratamiento con el biocida. Además, se efectuó el análisis bacteriológico en agua, sedimento y hepatopáncreas de camarón para establecer la efectividad del biocida en el control de bacterias de *Vibrio*. Otro de los estanques se utilizó para determinar la acumulación de OTC mediante la administración de dos terapias con alimento medicado, a una concentración teórica de 5000 mg/kg de OTC por 11 días. En los organismos tratados con OTC se determinó la Concentración Máxima (C_{max}) acumulada en músculo y hepatopáncreas de camarón, así como una relación del daño en órganos antes y después de las terapias con OTC y una evaluación bacteriológica de *Vibrio* durante y después de la medicación con el antibiótico en hepatopáncreas y agua de los estanques. Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación del biocida en el agua de los estanques, no causó un efecto significativo ($P < 0.05$) en los organismos expuestos, en alguno de los parámetros evaluados, comparados con el grupo control, lo que indicó que la utilización de este producto podría solamente estar generando una contaminación al medio ambiente. La mayor acumulación del antibiótico se logró ocho días después de iniciada la segunda medicación, con niveles de 37.7 ± 4.0 $\mu\text{g/g}$ en músculo y de 111.9 ± 5.8 $\mu\text{g/g}$ en hepatopáncreas. La acumulación alcanzada en la segunda terapia con OTC podría ser adecuada para inhibir a bacterias del género *Vibrio*, que son las principales causantes de enfermedades en estos crustáceos. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la evaluación del daño en órganos y pruebas bacteriológicas durante y después de la administración de OTC. Por lo que se concluye que el uso de biocidas a base de QAC y de antibióticos en la camaronicultura, debe realizarse con precaución, debido a que ambos compuestos son persistentes en los sedimentos y podrían tener un efecto negativo en el ecosistema, y en la generación de resistencia de las bacterias a los antibióticos.

INTRODUCCIÓN

En México existe una problemática de tipo social y ambiental derivada de la sobreexplotación de la captura del camarón silvestre. Una alternativa para cubrir la demanda de este producto, ha sido su cultivo en granjas acuícolas.

El cultivo de camarón en México, inició principalmente a lo largo de la costa Noroeste del Pacífico, durante los años 80's utilizando la especie *Litopenaeus stylirostris* (Roque *et al.*, 2001). Actualmente, el 96% de las 135,458 Ton producidas en el año 2009 por acuicultura, provino de los estados de Sonora, Baja California Sur, Baja California Norte, Sinaloa y Nayarit (CONAPESCA, 2009). La especie de mayor importancia comercial en nuestro país es el camarón blanco *L. vannamei*, tanto por su valor económico, como por la infraestructura empleada en su cultivo (Anónimo, 2008).

Sin embargo, se han presentado grandes pérdidas económicas en la camaronicultura, ocasionadas por las enfermedades virales como, el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSS), el Virus del Síndrome de Taura (VTS), entre otras (Thakur *et al.*, 2002). Otros parásitos, hongos y bacterias pertenecientes al género *Vibrio* también afectan estos cultivos. De ahí que se busquen alternativas por parte del sector productivo, que ayuden a contrarrestar las infecciones bacterianas que afectan la producción de camarón, ya sea mediante el empleo de antibióticos como es la oxitetraciclina ó el uso de biocidas. Por lo que es de suma importancia evaluar el efecto que tienen estos compuestos en el control de enfermedades bacterianas, por los problemas que pueden ocasionar dichos productos en la salud de los consumidores y su impacto al medio ambiente.

ANTECEDENTES

Problemas en las Granjas Acuícolas

Un estanque de cultivo de camarón es un sistema muy dinámico, donde influyen predominantemente factores como la salinidad, pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutrientes orgánicos e inorgánicos, ocasionando modificaciones en las comunidades microbianas. Cambios en las condiciones fisicoquímicas del sistema de cultivo, ocasionan estrés en los camarones, debilitándolos y provocando una mayor susceptibilidad a enfermedades ocasionadas por bacterias y virus (Gómez *et al.*, 2001). La aparición de brotes infecciosos en los estanques de cultivo de camarón, ha sido una de las principales limitantes en el desarrollo de la industria camaronícola del país (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Dentro de las especies de camarón mayormente cultivadas en México se encuentra el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, éste es un organismo omnívoro epibentónico que desempeña una importante función ecológica a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, Centro y Sudamérica. Esta especie es la de mayor cultivo en el Norte, Centro y Sudamérica ya que presenta una mayor tasa de crecimiento en comparación con otras especies de camarón (Bentancourt y García, 2011).

Taxonómicamente el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* pertenece al:

Phylum: Arthropoda

Clase: Malacostracea

Orden: Decapoda

Suborden: Dendobranchiata

Superfamilia: Penaeoidea

Familia: Penaeidae

Género: *Litopenaeus*

Especie: *vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997)

Patógenos Causantes de Enfermedades en los Cultivos de Camarón

Las enfermedades virales y bacterianas son las principales causas de mortalidad en los camarones cultivados. El virus de la mancha blanca puede provocar una mortalidad hasta del 100% de los organismos (Sánchez-Martínez *et al.*, 2007). Referente a las enfermedades bacterianas, la Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) y la Vibriosis, son las infecciones más frecuentes que afectan a los camarones. Las bacterias del género *Vibrio* son clasificadas como halófilas y no halófilas, dependiendo de sus requerimientos de sal (NaCl), para su óptimo crecimiento. Algunas de estas especies, toleran un amplio intervalo de salinidad. Estas bacterias son de vida libre en el medio acuático de todo el mundo, encontrándose comúnmente en aguas cálidas, a temperaturas mayores a los 17°C. (Pruzzo *et al.*, 2005).

Prácticamente todas las especies del género *Vibrio* han sido aisladas de camarones enfermos, pero esto no implica que sean las responsables de la infección. Esto es debido a que son microorganismos oportunistas con una rápida proliferación, que causan la infección cuando el camarón se encuentra debilitado en su sistema inmunológico (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Históricamente, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. damsela*, han causado serios problemas en estanques con camarones en etapa juvenil, mientras que *V. harveyi* ha afectado más frecuentemente a organismos en etapa larvaria, especialmente en los primeros 45 días de cultivo (Tabla 1). Muchas de las especies de *Vibrio* han sido aisladas de hemolinfa y del hepatopáncreas de camarones de la especie *L. vannamei* aparentemente sanos (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Tabla 1. Enfermedades bacterianas presentes en la etapa larvaria y de desarrollo de camarones *peneidos*

ETAPA LARVARIA	ETAPA DE DESARROLLO
Bacterias luminiscentes	Camarón manchado
Bolitas blancas	Vibriosis sistémica
Síndrome Zoea II	Vibriosis luminiscente
Epibiontes bacterianos	Epibiontes bacterianos
	Hepatopancreatitis Necrotizante

(Gómez-Gil *et al.*, 2001)

La bacteria causante de la NHP, es un patógeno intracelular Gram (-) y polimórfico, cuya reproducción se lleva a cabo dentro de la célula huésped. Posee un 83.5 % de similitud con el grupo de las Rickettsias. Actualmente, se ha demostrado que posee una mayor semejanza con dos diferentes bacterias, *Caedibacter caryophila* (87.4%) y *Holospora obtusa* (84.1%). Infecciones de NHP se han encontrado en camarones de las especies *Litopenaeus vannamei*, *L. setiferus*, *L. stylirostris*, *Farfantepenaeus aztecus* y *F. californiensis*, en las cuales el daño del hepatopáncreas ha sido severo, ocasionando la muerte de los organismos en poco tiempo y cuantiosas pérdidas económicas (Vincent y Lotz, 2007).

La aparición de NHP en los estanques es inminente, a menos que se adopten medidas preventivas. Algunas de ellas consisten en disminuir la densidad de siembra de organismos por m², la aplicación de terapias con alimento medicado, la remoción de materia fecal y el retiro de los camarones muertos por esta bacteria, ya que el canibalismo es el principal medio de propagación de la enfermedad (Vincent y Lotz, 2007).

Algunos factores que contribuyen a aumentar las infecciones bacterianas son, la mala calidad del agua, el incremento de la temperatura, las bajas concentraciones de oxígeno disuelto y la elevada densidad de siembra en los estanques de cultivo. Lo que provoca una mayor susceptibilidad en los camarones a enfermedades o incluso la muerte (Brock y Lightner, 1990).

Uso de los Antibióticos en la Acuicultura

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Red de Centros de Acuicultura del Pacífico Asiático (NACA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Acuicultura se define como “el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas”. Durante el cultivo de estas especies, la intervención del

hombre es relevante en el proceso de siembra, alimentación y de protección contra los depredadores, con la finalidad de incrementar la producción (Hernández, 2005). Como cualquier práctica de producción animal, esta actividad es afectada por diversas infecciones de origen microbiano ocasionando enfermedades en los organismos acuáticos, lo que genera grandes pérdidas económicas a los productores. Una forma de controlar las enfermedades de origen bacteriano en los cultivos acuáticos, es mediante la utilización de antibióticos (Hernández, 2005).

Se define como antibiótico a aquella sustancia química producida por microorganismos que posee la capacidad de matar o inhibir el desarrollo de otros microorganismos, y puede ser aplicada de manera parenteral, oral y tópica, entre otras vías (Santiago *et al.*, 2009; Kemper, 2008).

El desarrollo creciente de la acuicultura, ha dado lugar a un mayor uso de medicamentos, específicamente antibióticos y productos químicos para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas. La aplicación de dosis subterapéuticas de antibióticos adicionadas en los alimentos, han sido utilizadas como promotores de crecimiento, haciendo el uso de estos fármacos constante, lo cual ha contribuido a la generación de bacterias resistentes (Hernández, 2005).

Entre los principales antibióticos utilizados en acuicultura, se encuentran, enrofloxacin (ENRO) florfenicol (FFC) y oxitetraciclina (OTC). Enrofloxacin (ENRO) es un antimicrobiano con actividad bactericida contra patógenos Gram (+) y Gram (-) (Scheer, 1987). La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) y la Comunidad Económica Europea (CE) regulan su uso en animales destinados al consumo humano (Linnehan *et al.*, 1999; Reglamento CEE N° 1181., 2002). En el resto del mundo no está normalizado su uso, convirtiéndolo en un antibiótico frecuentemente utilizado en la acuicultura (Tu *et al.*, 2008).

ENRO es un derivado del ácido nalidíxico, el cual contiene un núcleo químico básico denominado "dihidroquinolona" o anillo 4-quinolónico y un grupo etilo en la posición 4, lo que favorece su absorción y biodisponibilidad. Es un antibiótico lipofílico, con bajo peso molecular lo que facilita su penetración tisular (Jun *et al.*, 2006). El mecanismo de acción de ENRO es a nivel del núcleo celular, inhibiendo la síntesis del DNA de las bacterias. El DNA se pliega y se despliega

en forma alternada, debido a la enzima DNA-girasa, la cual es inhibida por ENRO, evitando que la información genética pueda ser copiada, causando el efecto bactericida (Weihai *et al.*, 2006).

Ciprofloxacina (CIPRO) es un metabolito de Enrofloxacina, empleado en el tratamiento terapéutico de humanos y animales. Presenta actividad contra un amplio espectro de bacterias Gram (-) aeróbicas y contra patógenos Gram (+). Su mecanismo de acción, es a través de la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA girasa bacteriana, las cuales actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego uniéndolas una vez que se ha formado la superhélice. Al haber inhibición de estas enzimas, no se lleva a cabo dicho proceso y por tanto no ocurre la multiplicación celular (Banerjee *et al.*, 2007).

Otro de los antibióticos utilizado en acuicultura es Florfenicol, éste pertenece a la familia de los anfenicoles, al igual que el cloranfenicol. Es un antibiótico de amplio espectro para uso veterinario (Neu y Fu, 1980). Su función principal es como bacteriostático y su mecanismo de acción se lleva a cabo cuando se une a la subunidad 50s del ribosoma, impidiendo la síntesis de proteínas (Singer *et al.*, 2004).

Florfenicol ha sido eficaz en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Pasteurella piscicida*, *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio anguillarum*. Se ha reportado su farmacocinética en salmón del atlántico, mostrando una buena distribución en todos los tejidos y una vida media de eliminación menor a 15 h. Sin embargo, en camarón no existe información que permita conocer cuál es el comportamiento cinético que tiene este compuesto en dicho crustáceo (Yanong y Curtis, 2005).

OTC es un antibiótico de amplio espectro utilizado en la acuicultura de todo el mundo, por su baja residualidad en los tejidos comestibles y su corto tiempo de eliminación (Lunestad y Goksoyr, 1990). Su uso se aprobó desde 1970 por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA por sus siglas en inglés), de los Estados Unidos de Norteamérica, para ser empleado en el cultivo de peces (Park *et al.*, 1995). Este antibiótico ha demostrado ser efectivo en las granjas camaronícolas en el tratamiento de enfermedades bacterianas como Vibriosis, NHP y Furunculosis (Prescott *et al.*, 2000).

OTC actúa como bacteriostático contra bacterias Gram (+) y (-) (Gómez *et al.*, 2001). Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la síntesis de proteínas, a nivel ribosomal, manteniendo una difusión pasiva por los poros hidrofílicos de la membrana celular exterior. Una vez en el interior de la bacteria, se une a la subunidad 30s del ribosoma, impidiendo el acceso del aminoacil ARNt al sitio receptor del complejo ribosomal. Esto afecta la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, indispensable para la multiplicación bacteriana (Prescott *et al.*, 2000).

Para determinar la cinética que presenta OTC en camarón de cultivo, se han realizado diversos estudios. Siendo los más representativos el publicado por Nogueira-Lima *et al.* (2006) y por Gómez-Jiménez *et al.* (2008), en los cuales se utilizaron camarones de la especie *Litopenaeus vannamei*. Ambos estudios se llevaron a cabo en condiciones de laboratorio. En el estudio de Nogueira-Lima *et al.* (2006), se administró una dieta con 4 g/kg de OTC en alimento. Gómez-Jiménez *et al.* (2008), aplicaron un tratamiento de 5 g/kg. En ambos estudios se midió la Concentración Máxima (C_{max}) alcanzada del antibiótico en el músculo, siendo la C_{max} obtenida por Nogueira-Lima *et al.* (2006) de 17.21 $\mu\text{g/g}$ de OTC al día siete de administrada la terapia, mientras que la C_{max} reportada por Gómez-Jiménez *et al.*, (2008), fue de 33.54 $\mu\text{g/g}$ al octavo día de iniciado el tratamiento.

En ambos estudios, los niveles en los parámetros fisicoquímicos como, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, no presentaron diferencias significativas, durante el desarrollo de estas investigaciones. El tiempo de retiro establecido para eliminar los residuos de OTC del músculo de camarón fue de 16 días para el primer estudio y de 10 días en el segundo, cumpliendo con los Límites Máximos de Residuos para OTC, establecidos en la normatividad de los Estados Unidos de Norteamérica, Unión Europea y Japón; donde los valores permitidos, son de 0.2, 0.1 y 0.1 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Al momento de aplicar una terapia con OTC, se debe considerar que su efectividad antimicrobiana puede verse afectada por factores como, la especie del microorganismo, el tipo de agua, la concentración de iones de Mg^{++} y Ca^{++} , la temperatura, salinidad y ruta de administración, así como las condiciones ambientales (Nogueira-Lima *et al.*, 2006; Gómez-Jiménez *et al.*, 2008).

El uso inadecuado de grandes cantidades de antibióticos como tratamiento preventivo en la industria acuícola puede traer consigo efectos potencialmente dañinos para la salud humana y animal. Debido a que el alimento medicado no consumido por los organismos o los residuos de antibiótico que se encuentran presente en las heces, se acumulan en el sedimento de los estanques, provocando que el antibiótico residual sea arrastrado por las corrientes de agua a lugares distantes, causando alteraciones en la flora microbiana de otros sitios (Cabello, 2006).

Otro problema importante que surge por la utilización de antibióticos en la acuicultura, ocurre cuando no son respetados los tiempos de retiro del medicamento y residuos de estos compuestos permanecen en los tejidos comestibles, llegando a ser ingeridos por los consumidores, ocasionando una alteración en la flora intestinal normal e incrementando la aparición de bacterias resistentes a antibióticos. Por otro lado, el consumo de alimentos con residuos de antibióticos puede ocasionar problemas de hipersensibilidad y toxicidad, los cuales son difíciles de diagnosticar debido a la falta de información previa sobre la ingesta del antibiótico (Cabello, 2006).

La probabilidad de producir una toxicidad directa por el consumo de alimentos con residuos de antibióticos o sus metabolitos es muy baja. Sin embargo, una excepción es cloranfenicol, el cual causa anemia aplásica, que ha generado la muerte de algunas personas (Hernández, 2005). Otros compuestos de interés son las sulfonamidas, las cuales han sido utilizadas en dosis sub-terapéuticas y terapéuticas en la producción animal y son consideradas tóxicas debido a su potencial efecto cancerígeno y mutagénico (Hernández, 2005).

Desarrollo de Resistencia Bacteriana

El empleo prolongado de dietas adicionadas con antibióticos y la cantidad de éstas que no son consumidas por los organismos y permanecen en el sedimento y en el agua del estanque, incrementan el desarrollo de bacterias

resistentes. Los plásmidos con los genes de resistencia, pueden ser transmitidos entre las bacterias de diferentes géneros y especies (Samuelsen *et al.*, 1992).

La resistencia bacteriana se define como la incapacidad de un antibiótico para llegar al punto diana. Se presenta de dos formas: natural ó intrínseca y adquirida. La resistencia natural se define como aquella que es característica de todos los miembros de una especie ó género dado. Este tipo de resistencia no está relacionada con el uso de antibióticos.

La resistencia adquirida es debida a modificaciones en el material genético de la bacteria, que puede aparecer como resultado de una mutación al azar de genes localizados en los cromosomas ó en sitios extracromosómicos, ó por transferencia de este material. Este tipo de resistencia está relacionada con el uso de compuestos como antibióticos (Woodford y Ellington., 2007; Fernández *et al.*, 2003).

Existen al menos cinco mecanismos básicos por los cuales las bacterias pueden generar resistencia a un antibiótico ó a un grupo de antibióticos. Estos mecanismos incluyen (Sahm *et al.*, 1989):

- 1) Una inactivación enzimática ó modificación de los antibióticos
- 2) Una disminución del ingreso ó acumulación de la droga
- 3) Una alteración ó falta de un sitio diana del antimicrobiano
- 4) Evasión del efecto del fármaco
- 5) Falta de reconocimiento del sitio de acción del antibiótico, para llevar a cabo procesos vitales para la célula, ocasionándole la muerte

Las bacterias Gram (+) y Gram (-) han desarrollado un mecanismo mediante el cual disminuyen la recepción ó acumulación del antibiótico, tal es el caso de OTC. Este mecanismo consiste en un bombeo del antibiótico hacia el exterior de la célula, denominando a este proceso “bomba de eflujo”, en el que intervienen proteínas localizadas en la membrana interna de la bacteria. Estas proteínas actúan expulsando el antibiótico al exterior, con una mayor velocidad de la que entra. Como resultado de este proceso, las moléculas del antibiótico no se unen de manera eficiente con la subunidad ribosomal de la bacteria, generando la resistencia al compuesto (Sahm *et al.*, 1989; Cooksey., 1997).

Desinfectantes Comerciales Utilizados en los Cultivos de Camarón

Se denomina desinfectante químico a aquella sustancia capaz de eliminar plagas y patógenos. Son utilizados comúnmente en la eliminación de hongos y fitoplancton en los criaderos y estanques de crecimiento de camarón. También, ayudan en el control de la oxidación de los sedimentos en el fondo de los estanques y como sanitizante de lugares, equipos de trabajo y en ocasiones para tratar alguna enfermedad (Gräslund y Bengtsson, 2001).

La aplicación de hidróxido de calcio ó Cal, es un procedimiento común en la preparación de los sedimentos de los estanques, antes de la siembra del camarón. En México, el procedimiento consiste en drenar los estanques y dejarlos secar de 30 a 210 días después de la cosecha. Posteriormente, se remueven los sedimentos con la ayuda de un arado y por último, se realiza la aplicación de cal a una profundidad de hasta 20 cm (Lyle-Fritch *et al.*, 2006). En Asia, después de drenar los estanques se les adiciona la cal de dos a cuatro semanas, con la finalidad de mejorar la descomposición de la materia orgánica (Gräslund y Bengtsson, 2001).

La cal neutraliza la acidez del suelo cuando el pH de los sedimentos es bajo ($\text{pH} < 6$) (Lyle-Fritch *et al.*, 2006). El encalado, también aumenta la actividad microbiana en el sedimento, acelerando la descomposición de la materia orgánica llevada a cabo a un pH óptimo de 7.5-8.5. (Gräslund y Bengtsson, 2001). El utilizar cal previene infecciones, como las causadas por el virus de la mancha blanca (WSSV), debido al cambio en el pH óptimo requerido por el virus (Lyle-Fritch *et al.*, 2006).

Las sales cuaternarias de amonio (QAC) son compuestos orgánicos cuyos pesos moleculares oscilan entre los 300 y 400 g/mol. Estos compuestos contienen cuatro grupos funcionales unidos covalentemente a un átomo de nitrógeno central (R_4N^+). Los grupos funcionales (R) que componen las QAC incluyen al menos un grupo alquilo de cadena larga y el resto son grupos metilo o bencilo, como se representa en la Figura 1 (Tezel, 2009).

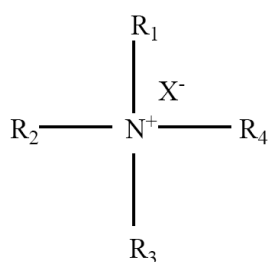


Figura 1. Estructura molecular general de las Sales Cuaternarias de Amonio (QAC)

R= grupo funcional

X=iones como Cl^- , Br^- ó NO_3^-

Las QAC están compuestas de dos unidades diferentes, la primera unidad es un grupo alquilo hidrofóbico y la segunda un grupo alquilo hidrofílico, cargado positivamente a un átomo central de N, el cual hace posible conservar su carácter catiónico (Tezel, 2009).

La longitud de la cadena alquilo le confiere a las QAC distintas propiedades fisicoquímicas. Si la cadena de alquilo es de longitud corta, es más soluble en agua y tiene una mayor absorción en superficies iónicas, como los minerales presentes en la arcilla. Por el contrario, si la longitud de la cadena es más larga la absorción en superficies orgánicas aumenta, disminuyendo su toxicidad debido a una baja biodisponibilidad y una alta partición en superficies orgánicas ó en aquellas cargadas negativamente (Tezel, 2009).

Las QAC como detergentes catiónicos, tienen funciones antimicrobianas y se ha observado una baja toxicidad en tejidos de mamíferos. Estudios publicados han demostrado que estos compuestos son eficaces contra diversas bacterias, virus y hongos (Hung-Hung *et al.*, 2003). En la acuicultura, las QAC cumplen la función de bactericidas y fungicidas (Gräslund y Bengtsson, 2001), variando su actividad dependiendo de la longitud de la cadena de carbonos que componen su estructura química. Las QAC son tóxicas a concentraciones de $\mu g/mL$ (ppm) ó menos para organismos acuáticos como algas, peces, moluscos, percebes, rotíferos, estrellas de mar y camarones, variando, la DL_{50} entre las diferentes especies de crustáceos (Hung-Hung *et al.*, 2003).

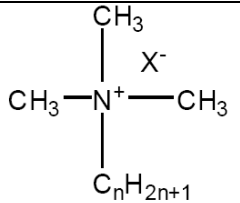
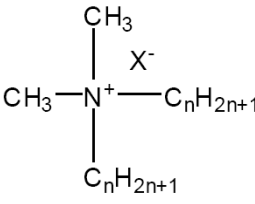
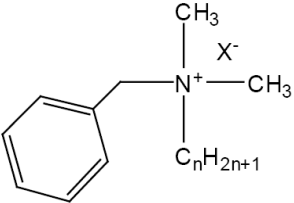
El modo de acción de las QAC en las bacterias Gram (-), se lleva a cabo por la interacción de estos compuestos, con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática y la membrana externa. Este proceso provoca una salida progresiva de los componentes del citoplasma celular. Las QAC se unen en bajas concentraciones a los sitios aniónicos que se encuentran en la superficie de la membrana, causando en las células incapacidad para mantener la regulación osmótica, lo que provoca la salida de iones de potasio y protones (Tezel, 2009).

La acción de las QAC se lleva a cabo a nivel molecular por una asociación entre las interacciones iónicas del nitrógeno cuaternario cargado positivamente con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente. Estas interacciones aumentan la presión en la superficie de la membrana celular disminuyendo su fluidez y produciendo una etapa de transición de su estado natural líquido a líquido cristalino, perdiendo así su función osmoreguladora y fisiológica. Como resultado, la QAC penetra en la célula y llega a su sitio de acción, donde ocasiona una inhibición de las enzimas que participan en la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP de las bacterias (Tezel, 2009).

Concentraciones moderadas de QAC inhiben las funciones de la membrana celular, como es la respiración, el transporte de solutos, y la biosíntesis de la pared celular. Altas concentraciones de estos compuestos, matan a la célula ya que les ocasiona una desintegración de las membranas, la liberación total del contenido citoplasmático y la coagulación de las proteínas y ácidos nucleicos (Tezel, 2009).

Las QAC son clasificadas en tres grupos dependiendo del grupo funcional que las compone, éstos son: halogenuros monoalconio, dialconio y benzalconio (Tabla 2) siendo este último de los más utilizados, solo ó en combinación con otras QAC, como fungicidas, bactericidas ó insecticidas (Tezel, 2009).

Tabla 2. Estructura general de los grupos que conforman las sales cuaternarias de amonio (QAC)

NOMBRE	ESTRUCTURA
Halogenuros de monoalconio	 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1} \\ \text{X}^- \end{array}$
Halogenuros de dialconio	 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{C}_n\text{H}_{2n+1} \\ \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1} \\ \text{X}^- \end{array}$
Halogenuros de benzalconio	 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1} \\ \text{X}^- \end{array}$

X= ión halogenuro

(Tezel, 2009)

El cloruro de benzalconio (BAC) es una sal cuaternaria de amonio de tercera generación (Marchetti *et al.*, 2006), que fue sintetizada por primera vez en 1953, caracterizándose por ser una mezcla de cloruros de n-alquil-dimetil-bencil-amonio, con cadenas alquílicas de diversas longitudes. Generalmente están compuestas de cadenas de carbonos C₁₂, C₁₄, C₁₆ y C₁₈ (Pérez *et al.*, 2009). Cada homólogo de BAC es efectivo contra diferentes microorganismos dependiendo de la longitud de la cadena de alquilos que la constituyen, en el caso del BAC-C₁₂ se ha demostrado su efectividad contra levaduras y hongos, BAC-C₁₄ es efectivo contra bacterias Gram (+) y BAC-C₁₆ contra Gram (-) (Nuñez *et al.*, 2004). El BAC es considerado un agente antimicrobiano que actúa como detergente catiónico, ya que en solución acuosa presenta una baja tensión superficial y gran poder tenso activo, lo que le permite actuar como detergente (Hitosugi *et al.*, 1998; Marchetti *et al.*, 2006).

Entre los usos otorgados al BAC, se encuentra su acción como suavizante de ropa, agente humectante, conservador, antiséptico en medicamentos y también como fungicida, espermicida y virucida. En la última década, el BAC se ha introducido en las formulaciones de la mayoría de los algicidas para piscinas y en los tratamientos industriales en las torres de enfriamiento de agua. Debido a su amplio uso, la presencia de residuos de BAC han sido determinados mediante el análisis químico de aguas residuales (Pérez *et al.*, 2009).

En la acuicultura el uso de BAC es frecuente como desinfectante y se emplea en el tratamiento de hongos y especies microbianas que infectan a los organismos en cultivo. El BAC inhibe el crecimiento de algunas especies de microalgas, como las del género *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros* e *Isochrysis*. Sánchez-Martínez *et al.*, (2007), demostraron que el BAC es altamente tóxico para *Artemia franciscana* con diferencias significativas en los valores de DL₅₀ obtenidos en las diferentes etapas larvarias (Bartolomé y Sánchez-Fortúm, 2005).

Algunos autores sugieren que una concentración de 1.5 mg/L de BAC puede ser suficiente en el control de algas en acuicultura. Pero es importante considerar que la concentración de BAC en los sedimentos ha ido en aumento,

por lo que es importante su cuantificación ya que este compuesto es persistente en el ambiente y es poco degradable (Pérez *et al.*, 2009).

El Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología de las Sustancias Químicas (ECETOC) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de Norteamérica, informaron que los halogenuros monoalconio, dialconio y cloruros de benzalconio, son tóxicos para organismos acuáticos como bacterias, algas, peces e invertebrados. Siendo los valores promedio para la Mínima y Máxima Concentración Efectiva (EC_{50}) dada por estas instituciones de 37 $\mu\text{g} / \text{L}$ y 58 mg / L , respectivamente (Tezel, 2009).

En un estudio realizado por Hung-Hung *et al.*, (2003), se evaluó el efecto antibacteriano de cloruro de benzalconio en agua y hepatopáncreas de camarón *Penaeus monodon*, concluyendo que el BAC, tuvo un efecto en la inmunidad del camarón mejorando la actividad de los fagocitos, pero, también se indujo apoptosis de los hemocitos. Además, se observó que la aplicación de BAC disminuyó la cantidad de bacterias del género *Vibrio* presentes.

En el estudio realizado por Intorre *et al.*, (2007) en peces de agua dulce como el pez dorado (*Carassius auratus*) y en pez zebra (*Danio rerio*) a diferentes concentraciones de BAC (0.5, 1, 2, 6 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tiempos de exposición (1, 24, 48 h y 14 días), se demostró que una Dosis Letal₁₀₀ (DL_{100}) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los tiempos, provocó síntomas de toxicidad en los peces, manifestándose como cambios en la actividad y pérdida del equilibrio antes de morir. Estableciéndose una DL_{50} de BAC en el pez zebra de 6.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para el pez dorado de 5.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, después de una hora de exposición.

Además, se ha reportado que el BAC puede generar dermatitis y tener un efecto broncoconstrictor en personas asmáticas. En humanos, las intoxicaciones con este compuesto pueden provocar la muerte si se ingieren concentraciones mayores de 100 mg/Kg (Hitosugi *et al.*, 1998). Algunos trabajadores de las granjas acuícolas desconocen el daño a la salud que puede provocar el uso de BAC, por tanto es recomendable hacer uso de guantes y cubre bocas para su protección al manipularlas (Holmström *et al.*, 2003).

Persistencia de los Antibióticos y Otros Compuestos Químicos en el Ambiente

Existen tres grupos principales de compuestos utilizados en la camaronicultura que pueden afectar el medio ambiente. Estos son, los químicos tóxicos, los antibióticos y los nutrientes. La acumulación de químicos en el ambiente, es el resultado del uso inadecuado de estos compuestos en algunas actividades productivas como la acuicultura, ya que pueden ocasionar efectos tóxicos, o mutagénicos en la flora y fauna silvestre (Gräslund y Bengtsson, 2001).

La persistencia de residuos químicos tóxicos, antibióticos y los nutrientes depende fuertemente de las condiciones del ambiente como son, temperatura, pH, niveles de oxígeno disuelto, intensidad de luz y la presencia de microorganismos (Gräslund y Bengtsson, 2001). La persistencia de un químico o de un subproducto, puede influir en los organismos en cultivo y en especies de otros ecosistemas, debido a la bioacumulación, biomagnificación o transporte físico de estos compuestos tóxicos a través del aire, agua y suelo (Gräslund y Bengtsson, 2001).

En relación a los antibióticos, una vez que éstos se encuentran en el ambiente, pueden degradarse por las altas temperaturas y la intensidad de la luz, siendo la mayoría de las reacciones por fotodegradación. También, existe degradación de los antibióticos por la actividad microbiana, llevándose a cabo reacciones enzimáticas de hidroxilación y descarboxilación oxidativa (Kemper, 2008).

En un estudio realizado con oxitetraciclina se demostró que solamente de un 20 a 30% de este fármaco es consumido por los peces y que el 70-80% restante es adherido a partículas suspendidas de iones de Ca^{++} o Mg^{++} , acumulándose en el sedimento de los estanques, lo que favorece el desarrollo de resistencia bacteriana (Samuelsen, 1989).

Samuelsen (1989), demostró que oxitetraciclina podía presentar actividad antimicrobiana en los sedimentos 12 semanas después de su administración, comprobando que la descomposición de este antibiótico en los sedimentos es mínima y que una disminución en su concentración podría ser causada por el arrastre del antibiótico en el agua y no por un efecto de degradación.

La formación de productos tóxicos como sulfitos y amonio está relacionado con el efecto negativo que ocasiona la presencia de antibióticos en los sedimentos, ya que alteran la actividad de las bacterias benéficas, provocando una reducción en la degradación de la materia orgánica (Gräslund y Bengtsson, 2001).

Por otro lado, desde los años 30's se ha hecho uso de las sales cuaternarias de amonio (QAC) en grandes cantidades en aplicaciones clínicas, industriales y domésticas, sin una evaluación de la cantidad de estos compuestos que van en las descargas de agua que son vertidas al medioambiente, provocando un efecto negativo en los ecosistemas debido a su acumulación (Tezel, 2009).

Un estudio realizado para establecer el efecto de las sales cuaternarias de amonio en las comunidades microbianas de un ecosistema acuático, mostró que estos compuestos causan una respuesta ecológica importante en concentraciones inferiores a 1 mg/L, afectando la actividad heterotrófica bacteriana del ambiente (Tezel, 2009).

Las bacterias resistentes a las QAC se han convertido en un problema grave. Muchas especies de microorganismos aerobios y facultativos que adquirieron resistencia a las QAC y co-resistencia a muchos otros desinfectantes, antibióticos, solventes y metales se han aislado no sólo en hospitales y centros de procesamiento de alimentos, sino también en ambientes contaminados con estos compuestos. El mecanismo mediante el cual las bacterias desarrollan resistencia a las QAC es una bomba de eflujo. Este mecanismo de resistencia, tiene un origen genético y puede ser transferido entre distintas especies microbianas (Tezel, 2009).

Otro problema que puede ocurrir en el medio acuático está relacionado con la eutroficación, este fenómeno ocurre cuando existe un exceso de alimento ó fertilizantes orgánicos en el agua, debido al uso de estos productos en la camaronicultura, ocasionando un incremento en la concentración de nitrógeno y fósforo en el agua de los estanques, que al ser drenada al ambiente produce un efecto negativo (Gräslund y Bengtsson, 2001).

Alternativas al Uso de Antibióticos

Algunas medidas de seguridad para antibióticos fueron establecidas por la Comunidad Económica Europea (CEE) mediante el documento 52 publicado en el año 2003, donde se incluye el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo Sobre los Controles Oficiales de Piensos y Alimentos. Estableciéndose la prohibición o reducción gradual del uso de los antibióticos como promotores del crecimiento, en la Unión Europea, para tener un mejor control y evitar un gasto innecesario de antibióticos y de esta forma disminuir la generación de bacterias resistentes (Hernández, 2005).

Entre las alternativas que han surgido al uso de antibióticos para prevenir las infecciones por microorganismos en los cultivos, está la utilización de enzimas y probióticos, los cuales provocan una mejora en la absorción de los nutrientes del alimento suministrado. Los ácidos orgánicos, derivados de productos fermentados y sus sales, logran bajar el pH en el sistema digestivo de los organismos, mejorando la digestión de proteínas e incrementando la población de bacterias benéficas propias del organismo.

Por otro lado, en el cultivo de peces han sido utilizadas las vacunas para estimular la respuesta inmune y producir anticuerpos que ayuden a proteger a los organismos de enfermedades. En un estudio realizado por Xu y Lee (2001), se ha planteado como una alternativa en la acuicultura, la utilización de extractos vegetales que contengan flavonoides, a los cuales se les ha atribuido una fuerte actividad antimicrobiana en bacterias resistentes a antibióticos.

La implementación de buenas prácticas en la acuicultura son esenciales para mantener un ambiente y organismos saludables tanto peces como crustáceos. Debe ser prioritario una higiene estricta y otras medidas de prevención para lograr un control en las infecciones causadas por bacterias resistentes (Hernández, 2005).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estableció algunos procedimientos útiles sobre el uso de los antibióticos:

1. Obtener un diagnóstico adecuado del problema antes de la aplicación de cualquier tratamiento con antibiótico.

2. Buscar ayuda profesional si existe la duda sobre el uso de un producto regulado.
3. Utilizar el fármaco específicamente para las especies señaladas y bajo las indicaciones establecidas en la etiqueta. Si no está indicado claramente su empleo, deberá ser prescrito por un médico veterinario.
4. Leer la etiqueta del producto cuidadosamente.
5. Emplear la dosis adecuada para la especie, el área y las condiciones específicas de cultivo.
6. Seleccionar adecuadamente la vía de administración del fármaco.
7. Calcular y respetar los tiempos de retiro del fármaco administrado.
8. Identificar adecuadamente las poblaciones de organismos en cultivo tratados con fármacos mediante marcas claras.
9. No usar medicamentos con fines profilácticos a menos que específicamente esté aprobado el fármaco para ese propósito.
10. No sustituir el nombre comercial de los productos que están etiquetados y aprobados para la acuicultura por productos sin etiqueta o genéricos.
11. Mantener los registros precisos de las terapias aplicadas y las dosis.
12. Considerar el impacto ambiental de la descarga de agua con el fármaco, e incluir los posibles efectos sobre los organismos no tratados.
13. Aplicar un programa de garantía de calidad o un programa de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP), para evitar residuos de antibióticos en los tejidos y de esta forma garantizar productos de alta calidad, que sean sanos para los consumidores.
14. Tomar en cuenta las medidas de seguridad personal y los procedimientos adecuados para los trabajadores acuícolas que manipulan o aplican los antibióticos.
15. Determinar las consecuencias económicas a corto y largo plazo por la utilización de fármacos en la producción de organismos acuáticos (USDA, 1994).

Enfermedades Diagnosticadas en Camarón *Litopenaeus vannamei* Mediante Preparaciones en Fresco y Microscopía.

Realizar un diagnóstico adecuado de una patología es importante para encontrar la solución al problema que se presenta (Gutiérrez *et al.*, 2001). Un diagnóstico completo puede incluir la demostración de una anomalía ocasionada por un agente etiológico específico (Gutiérrez *et al.*, 2001). El diagnóstico puede realizarse mediante una examinación al microscopio de tejidos en fresco de branquias, apéndices orales, hemolinfa y órganos de camarón. El análisis de tejidos en fresco utilizando microscopía puede proveer información rápida y confiable del daño que se pudiera estar generando por bacterias, hongos ó parásitos en el camarón (Brock y LeaMaster, 1992).

Las enfermedades que afectan a los organismos acuáticos se pueden clasificar en a) Enfermedades certificables: son aquellas en las que actualmente no se cuenta con algún tratamiento para su control. b) Enfermedades notificables: en estos casos los patógenos causantes de la enfermedad, son susceptibles de ser controlados mediante la aplicación de algún medicamento ó sustancia química. Pero aún así, se pueden causar mortalidades de hasta el 100% de los organismos y el control de la patología requiere de tiempo y tratamientos costosos. c) Enfermedades comunes: son aquellas causadas por parásitos que pueden ser controladas a través de monitoreos continuos de la calidad del agua, ó con algún tratamiento. Es importante identificar plenamente al agente causal de la enfermedad, para evitar problemas futuros como la generación de resistencia en microorganismos que pueda complicar los tratamientos (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Necrosis en Branquias de Camarón

La necrosis en branquias puede ser ocasionada por diferentes patógenos y ser diagnosticada en distintas etapas del desarrollo del camarón y bajo condiciones ambientales variables. En la etapa larvaria del camarón, se puede encontrar una melanización en las branquias, debido a una infección por bacterias del género *Vibrio*, esta melanización puede ser diagnosticada mediante observaciones al microscopio (Brock y LeaMaster, 1992).

La Fusariosis ó “enfermedad de las branquias negras”, es una enfermedad que afecta a todas las especies de peneidos causando mortalidades en los estadios larvarios, esta infección es causada por el hongo *Fusarium solani* (Gutiérrez *et al.*, 2001). En organismos juveniles y adultos se han detectado lesiones en las branquias y cutícula, muy parecidas a las causadas por *Fusarium sp.* En camarón, las lesiones de melanización expansivas, de color rojo, necróticas, son con frecuencia relacionadas a los ficomicetos *Atkynsiella dubia* y *Haliphthoros spp* (Gutiérrez *et al.*, 2001).

El surgimiento de “la enfermedad de las branquias negras” en los estanques de cultivo de camarón, se ha relacionado con una reducción del oxígeno disuelto (OD) y un incremento de H₂S en el agua. También, la contaminación del estanque con metales pesados como el cadmio (Cd⁺⁺) y el cobre (Cu⁺⁺), pueden ocasionar deformaciones morfológicas, necrosis en los tejidos de las branquias y la muerte de los camarones. Otra razón por la cual se puede generar un obscurecimiento de las branquias, es la falta de nutrientes en la dieta del camarón (Raj, 1995).

Ectoparásitos en Branquias de Camarón

Los camarones tanto de vida silvestre como de cultivo, conviven con ectoparásitos presentes en el medio acuático. Éstos pueden ser epicomensales ó también llamados epibiontes, que son considerados no patógenos para el hospedero (Brock y LeaMaster, 1992). Los ectoparásitos tienden a fijarse en las branquias y en la cutícula del camarón, y pueden ser fácilmente eliminados por el camarón a través del proceso de muda. Cuando el camarón se encuentra en condiciones de estrés, se genera una mayor susceptibilidad a una invasión masiva de epibiontes, lo que provoca en el camarón, una reducción en la entrada de oxígeno e impide el flujo de agua a través de las branquias, afectando el intercambio de gases (CESASIN, 2003 y Gutiérrez *et al.*, 2001). Algunos organismos epicomensales pueden producir exotoxinas y dañar los tejidos e incluso ocasionar la muerte del organismo (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Entre los principales parásitos, comensales y bio-adherentes se encuentran las bacterias *Leucothrix mucor*, *Flexibacter spp*, algas azul-verdes filamentosas y protozoarios como *Zoothamnium sp.*, *Epistylis sp.*, *Acineta sp.*, *Bodo sp.*, *Ascophrys sp.*, *Vorticella sp* y *Lagenophrys sp*. Todos estos parásitos tienen la capacidad de invadir al camarón en cualquiera de las etapas de su desarrollo (Lightner y Pantoja, 2001: Brock y LeaMaster, 1992).

Por tal motivo, es importante realizar un diagnóstico de las infecciones epicomensales basándose en observaciones microscópicas utilizando la técnica de fijación húmeda de órganos como branquias y apéndices de la boca del camarón, buscando sintomatologías como decoloración de las branquias y coloración rojiza de la superficie del cuerpo (CESASIN, 2003).

Mediante el muestreo de poblaciones de camarones, se puede estimar la abundancia de protozoarios en branquias, apéndices y cutícula de los organismos. Un diagnóstico adecuado puede determinar la severidad de la infección por epicomensales y la necesidad de administrar una terapia (Brock y LeaMaster, 1992).

Bacterias Filamentosas en Branquias

En los cultivos de camarón, la bacteria filamentosa denominada *Leucothrix mucor* afecta las branquias de estos organismos, causando mortalidades elevadas en los estanques. Otros géneros de bacterias filamentosas relacionadas con camarón son *Thiothrix sp.*, *Flaviobacterium sp.*, *Flexibacter sp.* y *Cytophaga sp.* (Brock y LeaMaster, 1992). Las infecciones en camarón ocasionadas por bacterias filamentosas pueden ser identificadas microscópicamente mediante el montaje en fresco de órganos como las branquias, piezas bucales ó apéndices nadadoras (Brock y LeaMaster, 1992).

Factores como una baja concentración de oxígeno disuelto en el agua, la muda del camarón, actividades en la captura y la transferencia de los organismos producen estrés en ellos, condición propicia para que las bacterias filamentosas puedan infectar severamente las branquias de los camarones comprometiendo las funciones respiratorias, disminuyendo la tasa de crecimiento e inclusive ocasionándoles la muerte (Brock y LeaMaster, 1992).

Túbulos en Hepatopáncreas

El daño en el hepatopáncreas de camarón se puede presentar debido a las infecciones ocasionadas por bacterias y virus. Las bacterias, que ocasionan la hepatopancreatitis necrotizante (NHP) y hepatopancreatitis séptica (SHPNS) son parásitos intracelulares obligatorios que infectan las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas. Su diagnóstico se logra a través de observaciones microscópicas utilizando un montaje en fresco del hepatopáncreas, donde se pueden apreciar características como un centro “blanquecino” pálido, en lugar de un color anaranjado normal. Un color pálido en el hepatopáncreas con vetas de color oscuro (negras) es indicativo de túbulos melanizados acompañado de una consistencia blanda y acuosa (edema) con fluído en el centro (Lightner y Pantoja, 2001).

Virus como el parvovirus hepatopancreático (HPV) puede afectar el hepatopáncreas de camarón, ocasionándole síntomas como atrofia y decoloración del hepatopáncreas. El diagnóstico de esta enfermedad se puede realizar por medio de microscopía (CESASIN, 2003).

Importancia de la Determinación de Lípidos en el Hepatopáncreas del Camarón

El hepatopáncreas tiene un papel central en la realización de las funciones digestivas, pues ahí es donde se absorben y almacenan los nutrientes, por tanto, cualquier disfunción en el hepatopáncreas altera severamente el desarrollo del camarón (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Mediante la utilización de una metodología de diagnóstico por microscopía denominada “gota de lípido”, se determina la cantidad de éstos en el hepatopáncreas del camarón. Esta técnica utiliza una escala numérica del 0 al 4 para su evaluación. Cuando la presencia de lípidos es muy escasa ó nula se interpreta como un estado de salud pobre y posiblemente los organismos están enfermos. Una infección como la hepatopancreatitis necrotizante (NHP), está relacionada con la disminución de la cantidad de lípidos presentes en el hepatopáncreas y con la presencia de túbulos melanizados en cantidades variables. Estas modificaciones en el hepatopáncreas pueden ser confirmadas mediante un análisis histológico (Lightner y Pantoja, 2001).

Gregarinas Presentes en el Intestino del Camarón

Las gregarinas son un grupo protistas de parásitos pertenecientes al filo *Apicomplexa*. Estos parásitos se hospedan en el intestino de invertebrados como anélidos, insectos, moluscos y crustáceos. Las gregarinas pueden habitar el tracto

digestivo de los camarones en la etapa larvaria ó adulta, llegando a ser consideradas como inofensivas ó sub-letales para sus huéspedes (Brock y LeaMaster, 1992; Shajahan *et al.*, 2007).

La infección del camarón con gregarinas inicia con la ingesta de la forma infectiva del parásito. Una vez en el intestino, el parásito se multiplica y eventualmente forma grandes masas visibles de esporas. En los camarones infectados con estos parásitos, se puede observar el músculo denso y opaco, gónodas inflamadas con forma irregular y una pigmentación de color azul oscuro ó negro (Brock y LeaMaster, 1992).

Un número pequeño de gregarinas parasitando al camarón no representa consecuencias serias para el hospedero. Se considera una infección mayor en el camarón, cuando se tienen más de 100 trofozoítos por cm en el intestino medio del organismo (Bruck y LeaMaster, 1992). Esto puede llegar a producir una alteración en la absorción de los nutrientes, afectar el sistema inmunológico del camarón, dañar la pared celular, fomentar el ataque microbiano, reducir la tasa de crecimiento, causar un efecto negativo en la fecundidad y la sobrevivencia e inclusive, ocasionar la muerte rápida del camarón (Shajahan *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2001).

Los principales géneros de gregarinas causantes de enfermedades en camarón son *Nemetopsis sp.*, *Cephalolobus sp* y *Paraophioidina sp*. Estos parásitos pueden infectar al camarón en cualquier etapa de su desarrollo, ya sean éstos silvestres ó cultivados y a lo largo de todo el Continente Americano (Brock y LeaMaster, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2001).

El diagnóstico de las enfermedades producidas por gregarinas se puede llevar a cabo a través de observaciones microscópicas, utilizando placas en fresco con larvas ú órganos del camarón como el estómago, intestino medio y posterior (Brock y LeaMaster, 1992; CESASIN, 2003), apreciándose en los tejidos una coloración amarilla en el estómago y en el intestino medio, así como la destrucción de los epitelios en dichos órganos (Brock y LeaMaster, 1992; CESASIN, 2003).

Presencia de Gametocitos en el Intestino del Camarón

La infección con gregarinas ocurre cuando los camarones peneidos ingieren moluscos bivalvos y poliquetos del género *Polydora sp*, que contienen gimnosporas del parásito. Las gimnosporas germinan en el camarón, dando como resultado la formación del esporozoito, éstos se adhieren al intestino medio o al estómago hasta convertirse en trofozoitos. Los trofozoitos se desprenden del epitelio y en forma libre se transforman en gamontes (Morales, 2004).

Los gamontes son las formas sexuales (haploides) idénticas morfológicamente, de tal modo que al encontrarse dos de diferente signo o sexo, se fusionan en asociaciones sicigias en el lumen del intestino posterior. En este órgano y en el ciego hepático cada célula se convierte en gametocito dando origen a los micro y macrogametocitos y éstos a su vez al cigoto o gimnospora, el cual es liberado al exterior y se aloja en el hospedero intermediario (moluscos bivalvos y poliquetos) los cuales son ingeridos por el camarón, concluyendo así el desarrollo de la gregarina (Figura 2) (Morales, 2004; Reyes, 2004).

Las observaciones microscópicas del contenido intestinal del camarón, permiten realizar una búsqueda de trofozoitos y gametocitos gregarínidos, esto se puede hacer poniendo el contenido del intestino en un portaobjetos, al cual se le agrega una gota de agua limpia, se homogeniza si es necesario y se coloca encima un cubreobjetos para su posterior observación al microscopio (Lightner y Pantoja, 2001).

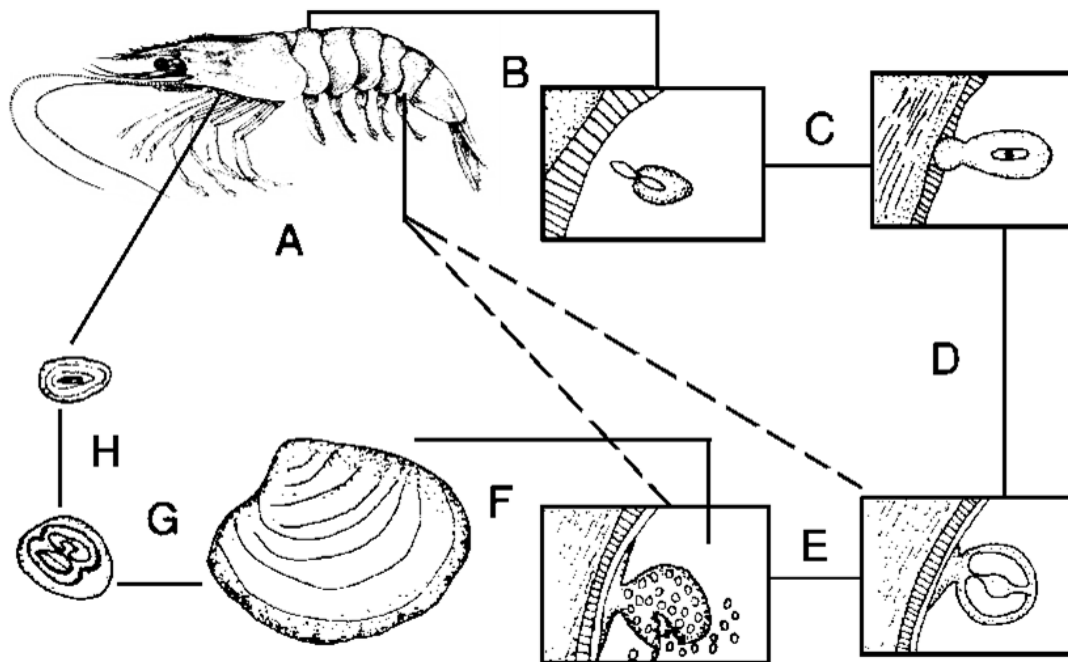


Figura 2. Ciclo de vida de una gregarina en camarón

A. Ingesta de esporas de parásitos. **B.** Germinación de esporozoitos en el intestino del camarón. **C.** Adición en la pared intestinal y formación de trofozoito. **D.** Desarrollo de trofozoitos en el intestino (recto) y formación de gametocitos. **E.** Formación de gimnosporas que son liberadas con la ruptura de los gametocitos. **F.** Ingestión de gimnosporas por almeja. **G.** Desarrollo de esporas en la almeja. **H.** Liberación de esporas (con esporozoitos dentro) mediante hebras de mucosa ó baba de la almeja. (Johnson, 1995).

JUSTIFICACIÓN

El uso de compuestos químicos empleados en el control de enfermedades bacterianas que afectan los cultivos de camarones cada vez es más frecuente. Por ello, es indispensable realizar investigaciones científicas que sustenten la efectividad de los antibióticos y biocidas utilizados en el control de dichas enfermedades, para promover un uso racional de estos compuestos y lograr con ello una reducción en la contaminación y generación de resistencia bacteriana que impacta al medio ambiente y representa un riesgo a la salud humana.

HIPÓTESIS

La utilización de oxitetraciclina y un biocida a base de sales cuaternarias de amonio, aplicados de manera independiente en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*, tienen un efecto significativo sobre el control de las enfermedades bacterianas que afectan la producción de una granja camaronícola.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la efectividad del antibiótico oxitetraciclina y de un biocida comercial en el control de las enfermedades bacterianas que afectan al camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en una granja de cultivo de Bahía de Kino, Sonora.

Objetivos Específicos

1. Detectar el daño ocasionado por infecciones bacterianas en los órganos (branquias, intestino y hepatopáncreas) de camarón blanco de cultivo, mediante observaciones microscópicas en fresco.
2. Evaluar la ganancia de peso, talla y sobrevivencia de camarón blanco de cultivo *Litopenaeus vannamei* sometido a un tratamiento con un biocida comercial.
3. Determinar la Concentración Máxima (C_{max}) de OTC alcanzada en músculo y hepatopáncreas de camarón *Litopenaeus vannamei* en cultivo, al administrar dos terapias con alimento medicado.
4. Relacionar los tratamientos aplicados (biocida y antibiótico de manera independiente) con la presencia de lesiones en los distintos órganos (branquias, intestino y hepatopáncreas) del camarón de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de los Organismos de Estudio

La investigación se realizó en una Granja Acuícola ubicada en Bahía de Kino, Sonora. Se emplearon camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil. Los organismos del estudio fueron sometidos al mismo protocolo de manejo que se sigue en toda la granja camaronícola.

Sistema de Agua

Todos los estanques se llenaron con agua obtenida directamente del mar, la cual fue dirigida a éstos por medio de canales. Se midieron los parámetros físicoquímicos del agua una vez llenos los estanques. La aireación fue provista mecánicamente con aireadores de paleta.

Tratamiento del Agua de los Estanques con el Biocida

Se aplicó en el agua de los estanques un biocida adquirido comercialmente, cuyos componentes fueron cloruro de N-alquil-dimetil-bencil-amonio (20%), cloruro de N-alquil dimetil etilbencil amonio (20%) y un ingrediente inerte (60%), a una dosis inicial de 364 g/Ha. Al cuarto día de haberse aplicado la dosis inicial, se administró una dosis de mantenimiento de 185 g/Ha semanalmente, durante 2.5 meses. El biocida se aplicó inmediatamente después de cada recambio de agua siguiendo las indicaciones de la casa comercial que lo distribuye, permaneciendo el químico en contacto con el sedimento y los organismos durante todo el experimento.

Diseño Experimental para la Evaluación del Biocida a Base de Sales Cuaternarias de Amonio

Con la finalidad de evaluar la ganancia de peso, talla y sobrevivencia de los camarones sometidos al tratamiento con el biocida, se utilizaron ocho jaulas con una estructura cilíndrica de 1.35 m de altura y 60 cm de diámetro, cubiertas con malla de alambre con tamaño de poro de 1000 µm. En cada jaula se colocaron al azar 30 camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* en etapa juvenil, aparentemente sanos, con un peso promedio inicial de 6.44±0.02 g y una talla promedio de 79.82±0.66 mm. Cada jaula se colocó dentro de un estanque con dimensiones promedio de 7 Ha y 1.50 m de profundidad con fondo arcilloso. El estudio se realizó con cuatro repeticiones, por un período de 30 días, manteniendo un grupo control de cuatro estanques sin tratamiento.

Evaluación de Ganancia de Peso y Talla en los Camarones Expuestos al Biocida

Para la determinación de estos parámetros, se llevó a cabo un registro de peso y talla en el 100 % de los camarones al inicio y final del tratamiento con el biocida, empleando para ello una balanza analítica digital marca OHAUS® (Mod. Scout Pro SP202, Parsippany, NJ, E.U.A) y un vernier digital (MITUTOYO, Mod 551-311-10, Aurora, Illinois E.U.A). El valor real de ganancia de peso y talla de los organismos estudiados, se obtuvo empleando la fórmula propuesta por Kitabayashi *et al.* (1971) como sigue:

$$W' = W + (W_i + W_f)/2 \times N$$

Donde:

W' = Peso o talla final total de los organismos sobrevivientes

W_i = Peso o talla promedio inicial de los camarones

W_f = Peso o talla promedio final de los camarones

N = número de camarones muertos

Determinación de la Supervivencia en Camarón Expuesto al Biocida

La supervivencia de los camarones fue monitoreada diariamente durante 30 días en cada una de las jaulas, contabilizando el número de camarones muertos comparado con el número de organismos colocados inicialmente, reportando este parámetro como porcentaje de supervivencia (Li *et al.*, 2007).

Determinación de Lesiones en Órganos del Camarón Expuesto al Biocida y a Oxitetraciclina

La evaluación de lesiones en los órganos de los camarones se realizó antes y durante la exposición de los organismos al tratamiento con el biocida y antes y después de la medicación con OTC, mediante observaciones microscópicas a un grupo de camarones. Los organismos fueron obtenidos de los estanques donde se colocaron las jaulas experimentales y del estanque donde se administró la terapia con OTC, con el fin de establecer en lo posible el diagnóstico presuntivo de alguna enfermedad. Los órganos examinados fueron, hepatopáncreas, branquias e intestino (contenido intestinal).

Se sacrificaron semanalmente cinco camarones de cada estanque (tratados y control) durante 3.5 meses (duración del ciclo de cultivo del camarón). Se extrajo cuidadosamente cada uno de los órganos, haciendo una incisión por la línea media con unas tijeras para disección y tomando los órganos con unas pinzas. Éstos se colocaron sobre un portaobjetos y se adicionó una gota de solución salina. Se colocó un cubreobjetos presionando cuidadosamente con una pinza. Se observó la muestra bajo el microscopio (Labomed, Mod. CX, California E.U.A.) utilizando los lentes de 4, 10, 40 y 100 X.

Para la interpretación de las observaciones microscópicas, se utilizaron los criterios establecidos por Lightner (1996), empleando valores categóricos del cero al cuatro, siendo el valor de cero cuando no existe una lesión en el órgano y el cuatro cuando se presenta un daño muy severo. Se promediaron los valores

obtenidos de los cinco camarones en cada una de las observaciones, llegando a un valor único de dicha población. Este procedimiento permitió determinar cuales fueron los órganos más afectados que limitan el crecimiento de los organismos.

Evaluación Bacteriológica de Agua, Sedimento y Hepatopáncreas de Camarón de Cultivo

El análisis bacteriológico del agua de los estanques se llevó a cabo obteniendo una muestra de 1L de agua semanalmente, en cada uno de los estanques, tanto los tratados con el biocida, como con OTC y en los utilizados como control. Se pipeteó 0.1 mL de agua y se vació a cajas petri, previamente preparadas con Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (Difco™, Diagnostic Systems, E.U.A) realizando la inoculación por extensión en superficie e incubándolas a 37° C por 24 h (Elliot *et al.*, 1992). Posteriormente, se realizó la cuenta bacteriana identificando colonias del genero *Vibrio* de color amarillo y verde.

Para el análisis de sedimento en los estanques tratados con el biocida, las muestras (1 Kg) fueron colectadas en bolsas de plástico estériles semanalmente en cada estanque. Posteriormente, se pesó 1 g de sedimento y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL de diluyente (solución salina a 20 µg/mL), se agitó vigorosamente y se inoculó 0.1 mL en cajas petri con agar TCBS. La incubación de las cajas petri se realizó a 37° C durante 24 h, posteriormente, se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

En hepatopáncreas para ambos tratamientos, el análisis bacteriológico se realizó obteniendo este órgano de cinco camarones juveniles de cada uno de los estanques teniendo cuidado de no tomar parte del intestino y así evitar una contaminación cruzada. Los hepatopáncreas se homogeneizaron con una espátula y se pesó 1g en un tubo con 9 mL de solución salina a 20 µg/mL. Posteriormente, se agitó vigorosamente y se tomó 0.1 mL del diluyente, el cual se colocó en cajas petri preparadas con agar TCBS, se inoculó por extensión en

superficie y se incubó a 37° C por 24 h para posteriormente realizar el conteo de las UFC.

Diseño Experimental para la Evaluación del Tratamiento con Oxitetraciclina

Se utilizó un estanque ubicado en una sección de la granja distinta a la seleccionada para la evaluación del biocida, para la administración de las terapias con OTC a través del alimento. Este estanque fue sembrado con 32 organismos/m². Los muestreos se realizaron diariamente tomando aproximadamente 1 Kg de camarón, los cuales fueron colocados en bolsa de plástico estériles debidamente etiquetadas. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta el análisis de los tejidos (músculo y hepatopáncreas) por cromatografía de líquidos de alta resolución para establecer la Concentración Máxima (C_{max}) acumulada del antibiótico siguiendo la metodología propuesta por Bermúdez-Almada *et al.*, (1999).

Composición de las Dietas para Camarón

Se administraron por dos períodos dos dietas adicionadas con oxitetraciclina (OTC) a una concentración teórica de 5000 µg/g durante 11 días (etapa de tratamiento) cada vez. Posteriormente, se administró la dieta sin antibiótico. Los alimentos medicados y sin medicar fueron adquiridos en una casa comercial de la región y fueron preparados de acuerdo a los requerimientos nutricionales específicos para camarón (Tabla 3).

Tabla 3. Composición del alimento para camarón

Ingredientes	%
Harina de pescado	26.2
Harina de soya	25
Gluten de maíz (40.20)	6
Aceite de pescado	2.03
Lecitina de soya	2.03
Mezcla vitamínica	0.5
Vitamina C	0.05
Aglutinante	0.8
Fosfato monobásico	4.36
Metionina	0.02
Harina de camarón (32.79)	0.8

Análisis de Alimento y Régimen de Alimentación

Las dietas para los camarones en experimentación fueron analizadas antes de ser administradas, para confirmar la concentración de OTC en el alimento medicado y la ausencia de éste en el alimento sin antibiótico. Los camarones fueron alimentados tres veces al día, a las 5:00, 11:00 y 17:00 h, considerando un valor al 3 % de biomasa al día, administrando el 40 % del alimento en la mañana, 20 % en la tarde y 40 % en la noche.

Para verificar la cantidad de alimento consumido y que los camarones se alimentaron a saciedad, se realizaron observaciones directas sobre los organismos para confirmar que mantuvieran el intestino lleno y sobre las charolas testigo (comederos), para determinar con precisión la cantidad de alimento consumido.

La cantidad del alimento administrado fue ajustado durante los días del ensayo dependiendo del consumo. Se cuantificó el alimento no consumido por los organismos, removiéndolo de las charolas y llevando a cabo un registro de peso para estimar la Tasa de Conversión Alimenticia (TCA), la cual se determinó empleando la fórmula propuesta por Chim *et al.* (2008).

TCA= Cantidad de alimento administrado a los camarones / Peso ganado de los organismos.

Análisis de Oxitetraciclina en Alimento para Camarón

El análisis del alimento se realizó siguiendo la metodología descrita por Houglum *et al.* (1997). Ésta consistió en pesar 1 g de muestra en un tubo de centrífuga de 40 mL. Se incluyó un control positivo el cual consistió en una muestra de alimento libre de antibiótico al que se le adicionó 100 µL de una solución estándar de OTC a una concentración de 1500 µg/mL, obteniendo una concentración final en la muestra de 150 µg/g. En cada muestra se adicionaron 25 mL de metanol: ácido (25 mL de metanol + 0.5 mL de HCl) y se agitaron

mecánicamente durante 1 h a 250 rpm en un agitador marca IKA (KS501. Wilmington, NC, E.U.A). Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 2800 g por 15 min a 15° C en una centrífuga (Beckman Coulter™, Allegra 6R, Brea CA. E.U.A). El extracto se filtró empleando filtros de microfibras de vidrio GF/A de 90 mm (Whatman™, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Una vez obtenido el extracto, se sometió a un proceso de limpieza el cual consistió en preparar una jeringa de plástico de 5 mL (Plastipack, Becton Dickinson, México) con fibra de vidrio en el fondo y 1 g de C₁₈ previamente activado. La columna se acondicionó haciendo un lavado con 2 mL de metanol ácido. Posteriormente, se pasaron por la columna 2 mL del extracto obtenido y el eluato fue recogido en un vial ámbar de 4 mL, los residuos del antibiótico que quedaron retenidos en la columna fueron eluidos adicionando otros 2 mL de metanol ácido, teniendo un volumen final en el vial de 4 mL, los cuales fueron filtrados empleando una jeringa de plástico acoplada con un filtro acrodisc con tamaño de poro de 2 µm. Posteriormente, se realizó la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC por sus siglas en inglés) con detección ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm, empleando las condiciones cromatográficas establecidas para la determinación de OTC, del método citado anteriormente.

Determinación de Oxitetraciclina en Músculo y Hepatopáncreas de Camarón por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Activación de sílica gel octadecil-silil derivatizada (C₁₈)

Para la extracción de OTC de las muestras de músculo y hepatopáncreas de camarón, se empleó el adsorbente Octadecil-silil (C₁₈) (JT Baker), el cual fue activado previo a su utilización en la extracción del antibiótico. El procedimiento de activación consistió en pesar 22 g de C₁₈, los cuales fueron colocados en una columna de vidrio de 13.2 cm de largo por 2.7 cm de diámetro, con un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/A (Whatman Internacional, England) en la parte

inferior de la columna y otro en la parte superior, una vez que se ha puesto el adsorbente. Posteriormente, se añadieron 50 mL de los solventes hexano, diclorometano y metanol, todos ellos grado reactivo. El remanente de los solventes fue removido aplicando vacío hasta obtener el adsorbente totalmente seco, el cual fue colocado en un frasco de plástico con tapa hermética hasta su utilización.

Reactivos

Todos los solventes empleados en la extracción de oxitetraciclina, fueron grado reactivo (Omnisolv, Assoc. of Merck, Darmstad, Alemania). El ácido oxálico, ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), fueron adquiridos de Sigma (St, Louis, MO, E.U.A). Los solventes que conformaron la fase móvil y el estándar de hidrocloreto de oxitetraciclina fueron grado cromatográfico adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, E.U.A).

Procedimiento de extracción y cuantificación de OTC

Para extraer OTC de los tejidos del camarón se utilizó la técnica analítica propuesta por Long *et al.* (1990), modificada por Bermúdez-Almada *et al.* (1999). El material de cristalería utilizado fue cubierto con papel aluminio, para evitar la degradación del analito debido a la luz ya que es un antibiótico fotosensible.

En esta técnica analítica se emplea el principio de dispersión de matriz en fase sólida, que consiste en romper las membranas celulares por medio de fuerzas hidrofóbicas y mecánicas para dejar al descubierto los componentes hidrofílicos, como los residuos de OTC. Esto se llevó a cabo colocando 0.5 g de músculo ó hepatopáncreas de camarón en contacto con 2 g del adsorbente C₁₈, el cual se asocia con los lípidos de la membrana celular. Posteriormente, se eliminaron los compuestos cromóforos que causan interferencia adicionando 10 mL de hexano en las muestras de músculo y 20 mL en las de hepatopáncreas. La elusión de OTC se llevó a cabo utilizando 15 mL de una mezcla compuesta de

Acetonitrilo:Metanol, 1:1, v/v con 0.06% de butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT). El extracto se llevó a sequedad total utilizando un baño de agua (VWR Scientific Products, mod. 1202, E.U.A.) a una temperatura de 40°C con un flujo de aire constante.

Posteriormente, las muestras se resuspendieron con 1 mL de fase móvil, que consistió en ácido oxálico 0.02 M:acetonitrilo:metanol (70:27:3, v/v/v), luego se sonicaron durante 30 min en un sonicador Cole Parmer (Mod. 8892, Chicago, Illinois). Enseguida, las muestras se centrifugaron a 2800 g durante 15 min en una centrifuga Beckman Coulter (Modelo, Allegra 6R, E.U.A.). El extracto se pasó a una jeringa de plástico de 3 mL, con un filtro acrodisc de un tamaño de poro de 2 µm (Acrodisc LC13 PVDF) y el filtrado se obtuvo en viales color ámbar de 2 mL.

Se inyectaron 200 µL del extracto en un Cromatografo de Líquidos de Alta Resolución Varian Modelo ProStar (Varian Co. Santa Clara, California, E.U.A.) equipado con un detector ultravioleta visible Varian Prostar (Varian Co., Santa Clara, California, E.U.A.), a una longitud de onda de 365 nm. Ambos equipos estuvieron conectados a una computadora (DELL, Mod. OPTIPLEX™ 755, Tx, E.U.A.) con el paquete computacional Galaxie Chromatography Data System Versión 1.9 (Varian Co. Walnut Creek, CA, E.U.A.) El flujo de los solventes utilizados fue isocrático de 1mL/min. La columna empleada fue de Nucleosil fase inversa, C₁₈ de 150 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm (Supelco, Co., St Louis, MO, E.U.A)

Parámetros Físicoquímicos del Agua

Los parámetros físico-químicos del agua de los estanques, como temperatura y oxígeno disuelto (OD) se midieron todos los días durante la mañana y tarde empleando un Oxímetro YSI (YSI 55, Yellow Springs, OH, E.U.A). La salinidad y pH se tomaron semanalmente utilizando un refractómetro Aquatic Eco-Systems (Vitalsine SR 6, Apopka, FL, E.U.A), y un potenciómetro YSI (Ecosense pH10, Yellow Springs, OH, E.U.A), respectivamente. Los niveles de nitrógeno y producción de Amonio Total (TAN por sus siglas en ingles) en el agua

de mar fueron medidos semanalmente empleando un fotómetro YSI (Ecosense 9500, Yellow Springs, OH, E.U.A). Durante todo el período experimental fueron monitoreados y controlados los parámetros fisicoquímicos en los estanques, de acuerdo a las condiciones establecidas en la granja.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación de ganancia de peso, TCA, talla y sobrevivencia de los camarones, así como de los parámetros fisicoquímicos de los estanques, se llevó a cabo empleando la prueba no paramétrica de Rangos Múltiples de Wilcoxon.

Los datos obtenidos de la determinación del daño en órganos y la evaluación bacteriológica de agua, sedimento y hepatopáncreas de los camarones tratados con el biocida, fueron analizados estadísticamente empleando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.

Para establecer la relación entre el daño en órganos y la efectividad de la medicación con OTC se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Así como la prueba no paramétrica de Rangos Múltiples de Wilcoxon para analizar los datos bacteriológicos del tratamiento con el antibiótico OTC. Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa computacional NCSS 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del Incremento en Talla, Peso y Conversión Alimenticia en Camarón de Cultivo

Los camarones sometidos al tratamiento con el biocida presentaron un incremento promedio en talla de 15.7 ± 1.34 mm, mientras que en el grupo control el incremento fue de 17.1 ± 3.4 mm. El peso final de los camarones se presentó de forma similar en ambos grupos ($P > 0.05$), los organismos tratados con el biocida mostraron un incremento en peso de 5.1 ± 1.1 g y en el grupo control éste fue de 5.2 ± 1.3 g. El incremento en peso obtenido en los camarones utilizados en este estudio, fue mayor al reportado por Paquotte *et al.* (1998), quienes reportaron una ganancia en peso de 0.63 a 0.84 g, después de mantener a los organismos en jaulas durante un mes.

El valor del factor de conversión alimenticia estimado fue de 2.7 ± 0.5 y 2.5 ± 0.3 para el grupo tratado y el control, respectivamente. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a una $P > 0.05$. Este valor en el Factor de Conversión Alimenticia fue similar al reportado por Chim *et al.* (2008), que fue de 2.3 ± 0.19 para camarones alojados en jaulas.

Evaluación de la Supervivencia de Camarones

En relación a este parámetro, se obtuvo en ambos grupos de camarones un porcentaje de supervivencia similar, teniendo en los organismos tratados con el biocida una supervivencia de 88.3 ± 8.8 %. Este valor fue similar al obtenido en otros estudios realizados con camarones alojados en jaulas, donde los rangos de supervivencia estuvieron entre el 87 y 94 % (Zarain-Hezberg *et al.*, 2006; Castex *et al.*, 2009). En el grupo control la supervivencia de los camarones fue de

89.1±9.2 %. El análisis estadístico de los datos no mostró una diferencia estadística significativa a un valor de $P>0.05$, entre ambos grupos.

Determinación del Daño en los Órganos de Camarón

Los datos obtenidos de las evaluaciones semanales de daños en los órganos del camarón antes y durante la aplicación del biocida, no mostraron una diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en ninguno de los parámetros evaluados como fueron, necrosis en branquias (NEC), ectoparásitos (ECT) y bacterias filamentosas (BF), así como la presencia de túbulos festonados (TUB) y lípidos (LIP) en Hepatopáncreas, gregarinas (GRE) y gametocitos (GAM) en el intestino (Tabla 4). Así mismo, entre los estanques del grupo control y los tratados con el biocida durante el ciclo de producción presentaron comportamientos muy similares (Tabla 5).

El análisis en conjunto de todos los parámetros establecidos para la evaluación del biocida a base de QAC, no mostraron un efecto positivo en el camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei*. Esto pudo deberse, a que la eficiencia del biocida puede ser reducida por distintos factores, como es la influencia de la materia orgánica en el sustrato, ya que estos compuestos se adsorben en él debido a que son altamente lipofílicos. Las cargas positivas de las QAC tienen una fuerte afinidad por las cargas negativas de las superficies, ocasionando la remoción de estos compuestos del medio acuoso y limitando su biodisponibilidad. Las QAC pueden formar compuestos solubles con pares iónicos cargados negativamente, como proteínas y lipopolisacáridos, ocasionando que la toxicidad del biocida en un medio orgánico sea menor que en uno inorgánico (Nalecz-Jaweki *et al.*, 2003).

Tabla 4. Porcentaje de daño en órganos del camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* antes y durante el tratamiento con biocida

Órgano	Branquias					Hepatopáncreas					Intestino																								
	Daño					Daño					Daño																								
	NEC (%)					ECT (%)					BF (%)					TUB (%)					LIP (%)					GRE (%)					GAM (%)				
Escaleta de severidad	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Antes (n=20)	100	0	0	0	0	20	30	20	20	10	65	30	5	0	0	15	15	45	25	0	80	15	0	0	5	95	5	0	0	0	65	20	0	5	10
Durante (n=20)	100	0	0	0	0	0	45	55	0	0	90	10	0	0	0	0	15	30	50	5	45	45	10	0	0	95	5	0	0	0	65	5	10	15	5

NEC=Necrosis, ECT=Ectoparásitos, BF= Bacterias Filamentosas, TUB=Túbulos, LIP= Lípidos, GRE= Gregarinas, GAM =Gametocitos

0: Ausencia de lesiones

4: Daño severo

Tabla 5. Porcentaje del daño en órganos del camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* tratado con un biocida (T) y sin tratar (C)

Órgano	Branquias					Hepatopáncreas					Intestino																								
	Daño					Daño					Daño																								
	NEC (%)					ECT (%)					BF (%)					TUB (%)					LIP (%)					GRE (%)					GAM (%)				
Escala de severidad	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Control (n=36)	97	3	0	0	0	8	20	53	11	8	58	42	0	0	0	5	17	56	22	0	86	11	0	0	3	91	3	3	0	3	47	11	6	22	14
Tratamiento (n=36)	100	0	0	0	0	11	22	50	11	6	69	28	3	0	0	8	14	39	39	0	78	19	0	0	3	95	5	0	0	0	50	14	8	17	11

NEC=Necrosis, ECT=Ectoparásitos, BF= Bacterias Filamentosas, TUB=Túbulos, LIP= Lípidos, GRE= Gregarinas, GAM =Gametocitos

0: Ausencia de lesiones

4: Daño severo

Evaluación Bacteriológica de Agua, Sedimento y Hepatopáncreas de Camarón Expuesto al Biocida

El análisis bacteriológico de agua, sedimento y hepatopáncreas mostró la presencia de bacterias del género *Vibrio sp* en todos los componentes del sistema de cultivo, predominando las colonias de color amarillo en las distintas muestras. El mayor recuento bacteriano se obtuvo en el sedimento de los estanques utilizados como control ($4.6 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^4$ UFC/g). En aquellos estanques donde se aplicó el biocida, las cuentas bacterianas promedio fueron menores ($1.1 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^3$ UFC/g). Ambos valores encontrados en las cuentas bacterianas son clasificadas en la categoría de “rango bajo” como lo muestra el Comité de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN, 2003) el cual establece para las muestras de sedimento recuentos $< 3.0 \times 10^4$ UFC/g para colonias de *Vibrio* de color amarillo.

En hepatopáncreas, las cuentas bacterianas estuvieron en el orden de $2.1 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^4$ y $2.7 \times 10^2 \pm 8.6 \times 10^2$ UFC/g, para el grupo control y tratado respectivamente. En las muestras de agua, los recuentos bacterianos fueron similares para ambos grupos en experimentación, siendo de $1.4 \times 10^2 \pm 1.6 \times 10^2$ UFC/mL y $1.6 \times 10^2 \pm 2.7 \times 10^2$ UFC/mL para el grupo control y el tratado respectivamente. Estadísticamente no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$).

En un estudio realizado a nivel laboratorio por Hung-Hung *et al.* (2003), se determinó el conteo de bacterias de *Vibrio sp* en agua salada de un estanque de producción de camarón (*Penaeus monodon*) tratado con un producto comercial compuesto de cloruro de N-alquil-dimetil-bencil-amonio (40%) y urea (60%). Obteniendo recuentos bacterianos en el orden de $0.7 \times 10^2 \pm 0.4 \times 10^2$ UFC/mL y una eficiencia del tratamiento del 93% para reducir las bacterias de *Vibrio* comparados con el control después de 24 h de incubación, mostrando una diferencia estadística significativa ($P < 0.01$).

Comparando los resultados obtenidos por este autor con los generados en nuestra investigación, se puede deducir que la concentración de QAC siguiendo las indicaciones establecidas en el producto fueron 81 veces menores a la

reportada, lo que ocasionó que no fuera apreciado un efecto en el control bacteriano. Esto aunado a que la presencia de materia orgánica en el estanque disminuye la concentración efectiva de las QAC.

La producción de camarón *Litopenaeus vannamei* en la etapa larvaria y juvenil es afectada drásticamente por patógenos oportunistas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* (Hernández y Olmos, 2004; Muñoz *et al.*, 2004). Por ello, fue importante monitorear el comportamiento que presentaron las bacterias de *Vibrio* en órganos tan importantes como el hepatopáncreas del camarón.

Hung-Hung *et al.* (2003), observaron una disminución de las bacterias de *Vibrio* en hepatopáncreas de camarón *P. monodon* mantenido en un estanque tratado con un producto comercial compuesto de cloruro de N-alquil-dimetil-bencil-amonio (40%) y urea (60%), obteniendo en el control una cuenta bacteriana de 5.3×10^5 y en el estanque tratado 3.0×10^5 después de dos aplicaciones. Las cuentas bacterianas obtenidas en nuestro estudio fueron menores, tanto en el grupo control como en el tratado. No se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos y esto pudo deberse a las bajas concentraciones del compuesto activo, comparado con el utilizado por Hung-Hung *et al.* (2003).

Análisis de Oxitetraciclina en Alimento para Camarón

El uso de alimentos de buena calidad, mejora la producción de camarón y aumenta los beneficios, además de minimizar el impacto ambiental en las áreas de producción. La alimentación, es uno de los factores más importantes involucrados en la producción del camarón, que debe mantenerse bajo una observación cuidadosa y frecuente (Achupallas, 2000). Para ello, es recomendable llevar a cabo el análisis de las dietas medicadas y sin medicar, empleando métodos confiables para confirmar la concentración indicada, o bien, la ausencia de antibióticos en el alimento (González *et al.*, 2010).

El análisis por HPLC realizado a la dieta adicionada con OTC para camarón, arrojó una concentración de $5,654.90 \pm 204.77 \mu\text{g/g}$, mayor a la indicada en las especificaciones del producto ($5000 \mu\text{g/g}$). Esto pudo ser debido a fallas en el control de calidad durante la fabricación de las dietas, lo que puede ocasionar que dietas sin medicar presenten residuos de antibióticos, o bien un mayor o menor nivel del antimicrobiano en las dietas medicadas (González *et al.*, 2010).

Acumulación de OTC en Músculo y Hepatopáncreas de Camarón

En la evaluación de la acumulación de OTC en los tejidos de camarón después de las terapias con el antibiótico, se observó que la C_{max} en músculo fue menor en la primera terapia ($13.3 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$), que en la segunda ($37.7 \pm 4.0 \mu\text{g/g}$), lográndose en ésta última la C_{max} a los ocho días de haber iniciado la medicación y en la primera terapia a los cinco días (Figura 3). Los valores obtenidos fueron similares a los publicados por Gómez- Jiménez *et al.*, (2008), quienes reportaron una C_{max} en músculo de camarón de $33.5 \mu\text{g/g}$ al día ocho de tratamiento y a los resultados obtenidos por Santiago-Hernández., (2009), quien encontró una C_{max} de OTC en músculo de $27.9 \pm 1.67 \mu\text{g/g}$ después de 12 días de medicación. Las Figuras 4 y 5 muestran un cromatograma típico de un estándar de OTC a $1.5 \mu\text{g/mL}$ y del análisis de una muestra de músculo de camarón durante la etapa de tratamiento.

Los niveles máximos de acumulación de OTC en el hepatopáncreas de camarón también fueron menores en la primera terapia ($74.21 \pm 4.6 \mu\text{g/g}$), que en la segunda ($111.9 \pm 5.8 \mu\text{g/g}$) (Figura 6). Estas concentraciones fueron menores a las detectadas por Santiago-Hernández., (2009) quien reportó niveles de OTC de $212.5 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ al segundo día del tratamiento. La Figura 7 muestra un cromatograma obtenido de los resultados del análisis de hepatopáncreas de camarón en la administración de la terapia.

Las concentraciones de OTC acumuladas en ambos tejidos fueron adecuadas cuando se relacionaron con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias

(CMI) establecidas para bacterias de *Vibrio sp* aisladas del mismo sistema de cultivo, las cuales fueron de 5 a 100 µg/mL para músculo y de 0.75 a 100 µg/mL para hepatopáncreas (Santiago-Hernández., 2009).

Acumulación de OTC en Músculo

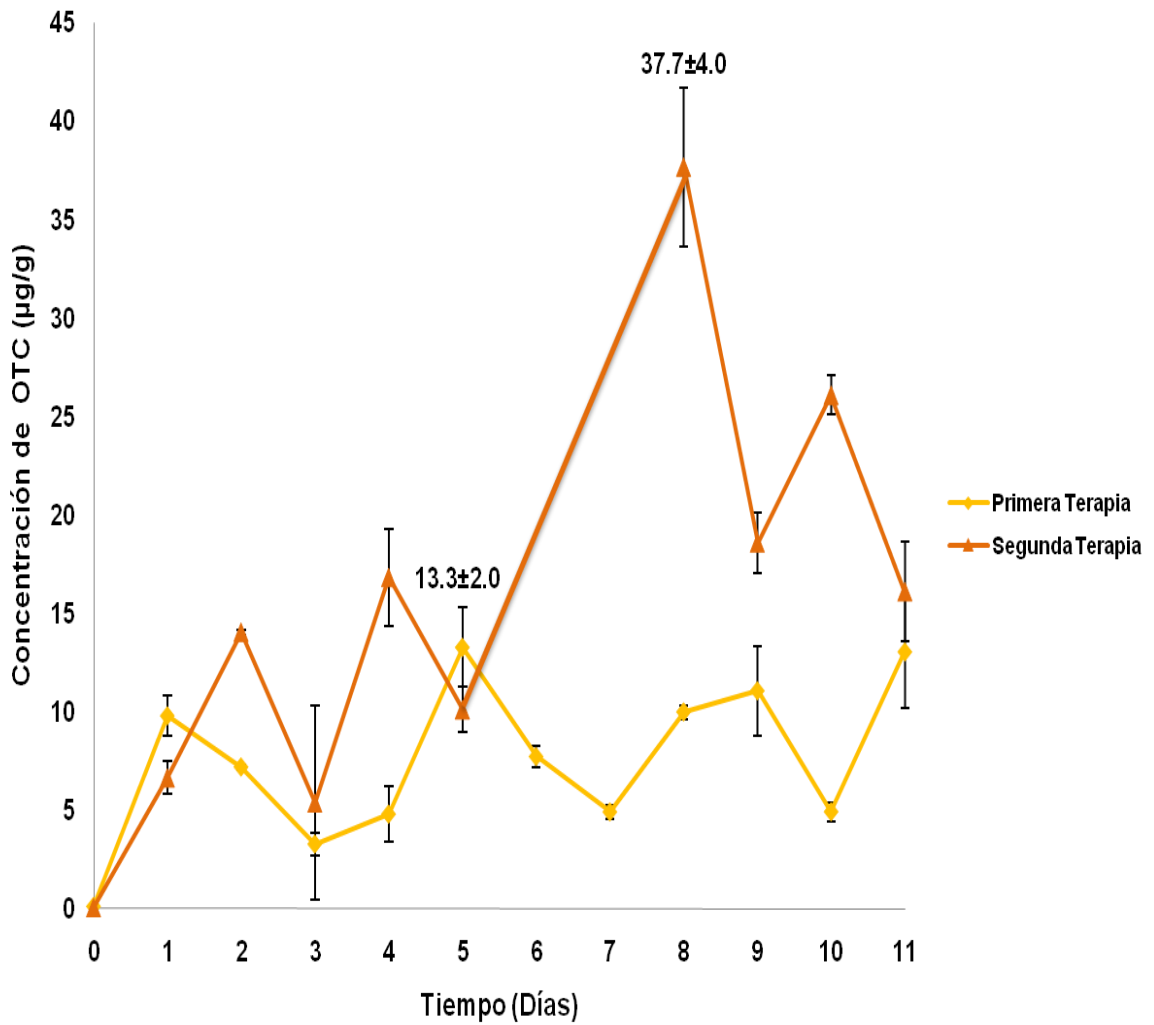


Figura 3. Concentración máxima de OTC alcanzada en músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

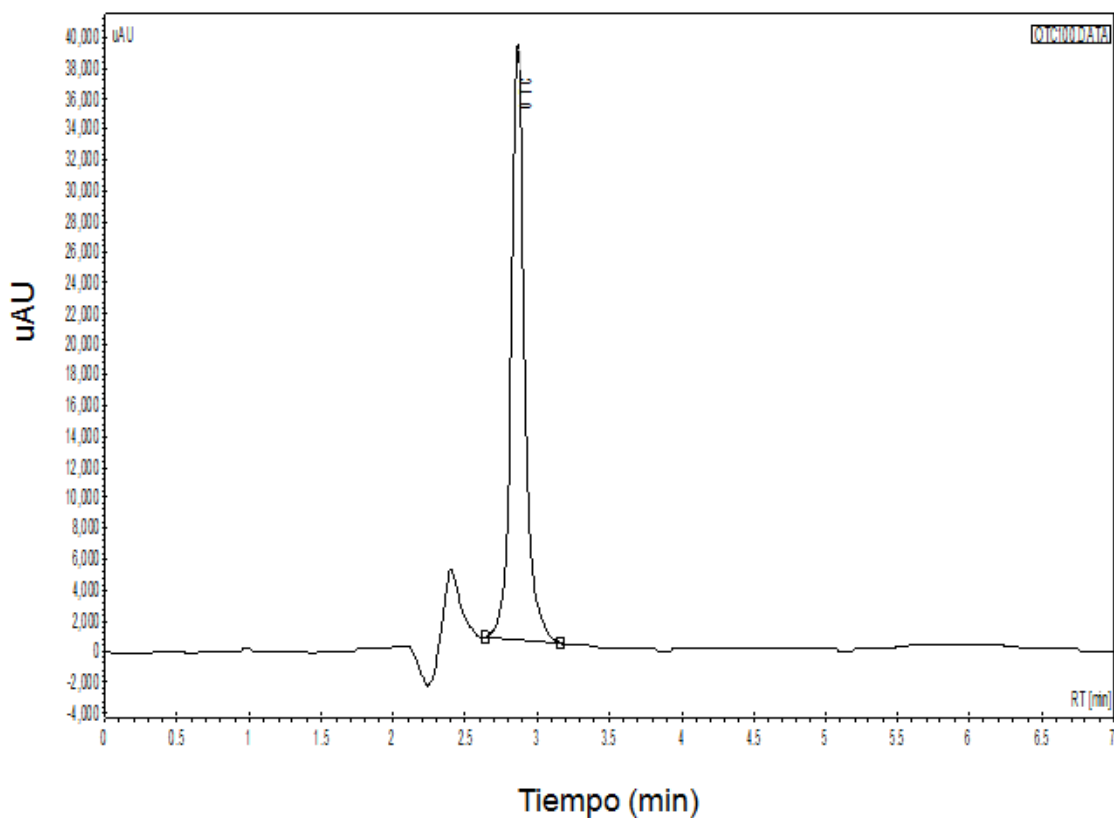


Figura 4. Cromatograma de un estándar de OTC a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/mL}$.

Condiciones de determinación: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian Modelo ProStar. Detector ultravioleta visible Varian Prostar, λ 365 nm. Columna fase inversa, C_{18} de 150 x 4.6 mm DI con tamaño de partícula de 5 μm . Flujo isocrático de 1 mL/min. Tiempo de corrida de 7 min.

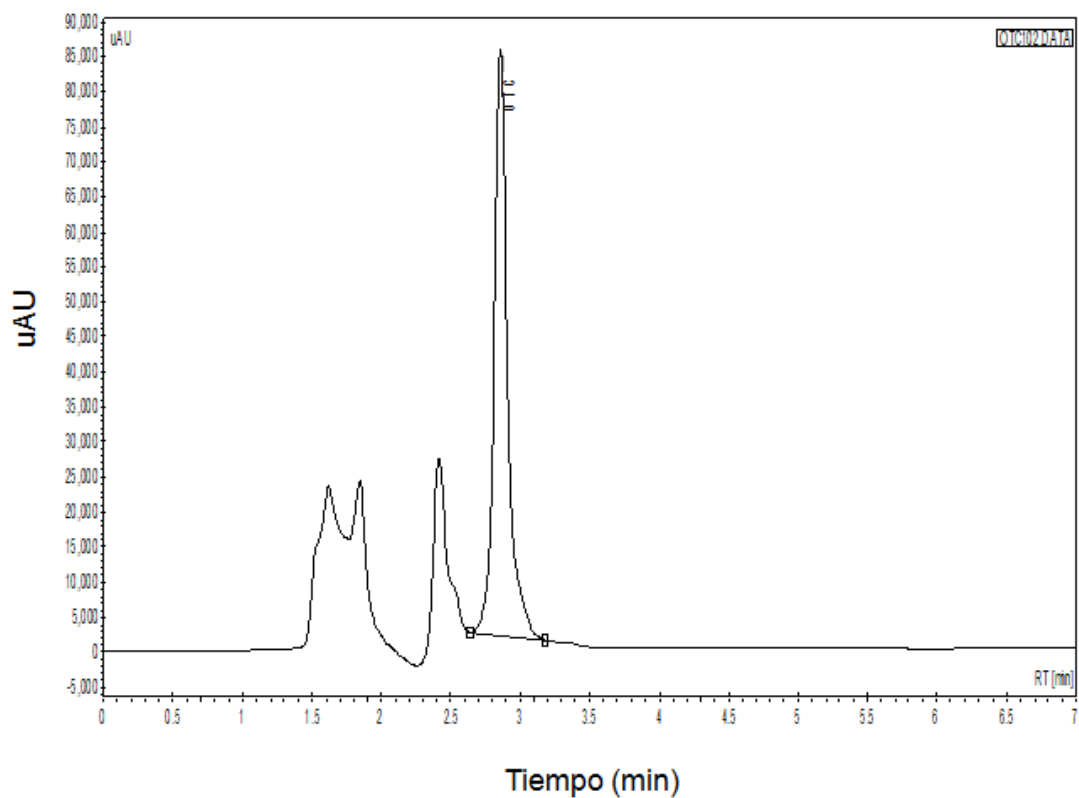


Figura 5. Cromatograma de una muestra de músculo de camarón correspondiente a la etapa de tratamiento.

Condiciones de determinación: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian Modelo ProStar. Detector ultravioleta visible Varian Prostar, λ 365 nm. Columna fase inversa, C₁₈ de 150 x 4.6 mm DI con tamaño de partícula de 5 μ m. Flujo isocrático de 1 mL/min. Tiempo de corrida de 7 min.

Acumulación de OTC en Hepatopáncreas

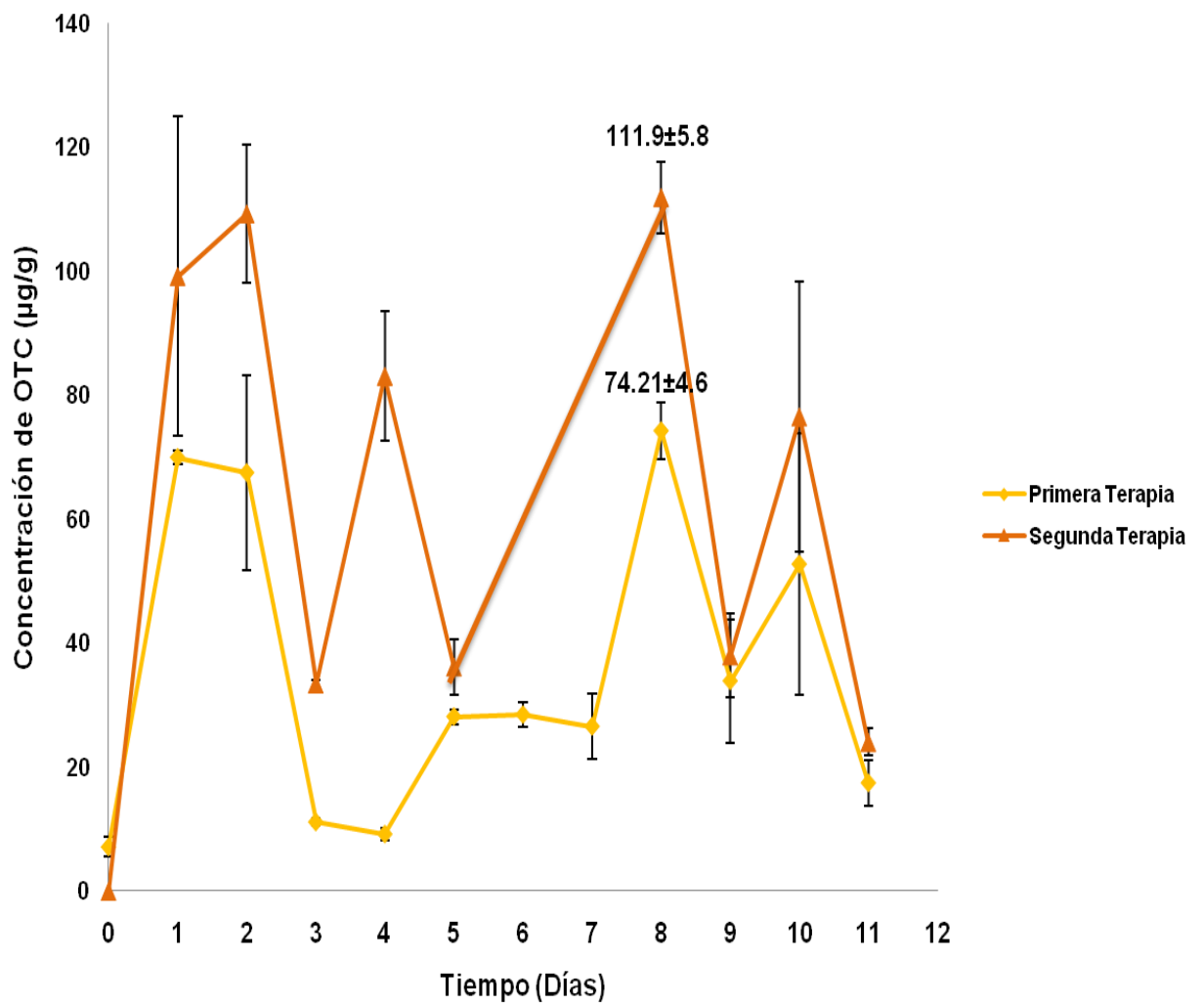


Figura 6. Concentración máxima de OTC alcanzada en hepatopáncreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

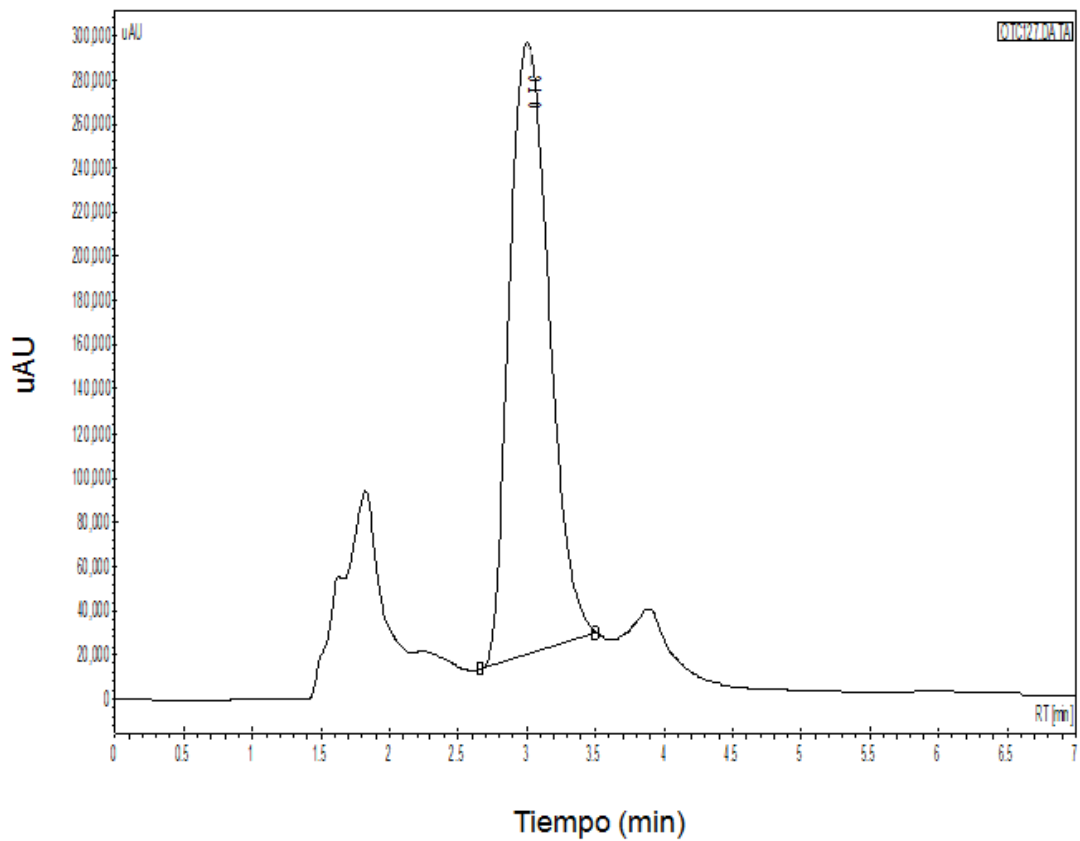


Figura 7. Cromatograma de una muestra de hepatopáncreas de camarón correspondiente a la etapa de tratamiento.

Condiciones de determinación: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian Modelo ProStar. Detector ultravioleta visible Varian Prostar, λ 365 nm. Columna fase inversa, C₁₈ de 150 x 4.6 mm DI con tamaño de partícula de 5 μ m. Flujo isocrático de 1 mL/min. Tiempo de corrida de 7 min.

Relación del Daño en Órganos de Camarón y la Aplicación de Terapias con Oxitetraciclina

Los datos obtenidos de la evaluación de daños en órganos de camarón, antes y después de la administración de las terapias con OTC, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en ninguno de los parámetros evaluados, como fueron presencia de ectoparásitos, bacterias filamentosas, túbulos festonados, lípidos, gregarinas y gametocitos (Tabla 6).

Existe poca información publicada relacionada con el efecto de OTC y la disminución del daño en los órganos del camarón. Sin embargo una posible explicación de este aspecto cuando se presenta necrosis en branquias provocada por el hongo *Fusarium solani*, es debida a que la administración de antibióticos como oxitetraciclina ó la aplicación de algún tratamiento químico, resulta no útil (Gomez-Gil *et al.*, 2001).

Distintos factores pueden ocasionar necrosis en branquias, uno de ellos puede ser una infección con bacterias de *Vibrio*. También, una disminución del oxígeno disuelto en el agua del estanque ó bien, una infección con hongos saprófitos. Una manera de combatir la infección, es a través de medidas preventivas como, limpiar los estanques ó la filtración de los suministros de agua. Se debe considerar que la aplicación de estas recomendaciones no asegura la completa erradicación de hongos o bacterias (Fisher *et al.*, 1978).

Los ectoparásitos ó epibiontes bacterianos más comúnmente reportados son *Leucothrix mucor* y *Flexibacter spp*, debido a los daños que ocasionan en las branquias del camarón. Éstas son bacterias filamentosas, que atacan principalmente a los camarones, en estadíos larvarios y postlarvarios. Poblaciones pequeñas de estos parásitos son inofensivas, pero un incremento de estas especies resulta peligroso, ya que pueden obstaculizar el intercambio gaseoso y ocasionar la muerte de los organismos por hipoxia (Gómez-Gil *et al.*, 2001). La aplicación de baños con OTC se ha recomendado en estadíos larvarios, baños en concentraciones de 40 a 60 ppm, para inhibir el crecimiento de bacterias, pero no existen evidencias contundentes de su efectividad contra

ectoparásitos que infectan a camarón durante las etapas juvenil ó adulta (Gómez-Gil *et al.*, 2001; Liao, 1996).

Cuando existe un daño en el hepatopáncreas de camarón, se sospecha que el agente causal es una bacteria ó un virus. Si es una bacteria intracelular el agente causal de la infección, se diagnostica como Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP-B), ó bien se denomina Hepatopancreatitis Séptica (SHPNS) cuando la infección es causada por especies del género *Vibrio* (Lightner y Pantoja, 2001). Si la infección es ocasionada por virus, se denomina Parvovirus Hepatopancreático (HPV) (CESASIN, 2003).

Investigaciones realizadas por Frelier *et al.* (1992), demostraron que el daño ocasionado en hepatopáncreas de camarón por la enfermedad Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP) se lleva a cabo a una salinidad entre 20 y 40 ‰, influyendo en el contenido de lípidos de las células epiteliales tubulares. Esto se observó cuando ocurrió la segunda etapa de la infección con NHP, presentándose además, hipertrofia en células epiteliales tubulares, congestión hemocítica y necrosis tubular ligera (Frelier *et al.*, 1992). NHP puede ser controlada si es tratada adecuadamente durante su desarrollo, administrando alimento medicado con OTC en concentraciones que van desde 1.5 a 4.0 Kg/Ton de alimento durante 10-14 días (Lightner, 1995). Bajo las condiciones experimentales de este estudio no se detectó presencia de NHP, además, no se observó una disminución en el daño que presentó el hepatopáncreas del camarón después de haber administrado las terapias con OTC.

También, pueden presentarse problemas en el intestino del camarón por la acumulación de gametocitos, que es la fase anterior a la evolución de las gregarinas y el daño es generado cuando se tiene un gran número de estos parásitos en el intestino del camarón. Shajahan *et al.* (2007), demostraron que la mejor forma de reducir la presencia de gregarinas es utilizando antiparasitarios como el Metronidazol y la Griseofulvina, y que los antimicrobianos como las tetraciclinas no tienen un efecto sobre estos parásitos.

Diversas especies bacterianas han sido implicadas como agentes causales de enfermedades en camarones peneidos. La mayoría de las infecciones bacterianas reportadas, consideran al género *Vibrio* como el de mayor

predominancia. Estas bacterias habitan en ambientes marinos y constituyen la microflora normal de camarones silvestres y cultivados (Lightner, 1995).

Factores ambientales como temperaturas elevadas, cambios en la salinidad y altas concentraciones de nitrógeno así como la baja recirculación del agua en el estanque, elevan los conteos de bacterias de *Vibrio*, causando un deterioro en la salud de los camarones (CESASIN, 2003). Prácticamente todas las especies de bacterias patógenas reportadas para camarón (especialmente *Vibrio*) son oportunistas tanto en la fase larvaria como en la de desarrollo de camarón (Lightner, 1995; Gomez-Gil, 2001).

Lightner (1993), observó mediante microscopía electrónica de barrido, infecciones por *Vibrio* en los apéndices de alimentación y en la cavidad oral de larvas de camarón, así como lesiones en el hepatopáncreas de camarón provocadas por *Vibrio harveyi*. La muerte del camarón es ocasionada por una severa inflamación de este órgano observándose melanización, fibrosis y necrosis. En los camarones juveniles de mayor edad (45 días), la infección se presenta de manera crónica, mostrándose solamente unos cuantos túbulos del hepatopáncreas afectados, y un crecimiento lento del organismo.

Tabla 6. Porcentaje del daño en órganos del camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* antes y después del tratamiento con Oxitetraciclina.

Órgano	Branquias					Hepatopáncreas					Intestino																								
	Daño					Daño					Daño																								
	NEC (%)					ECT (%)					BF (%)					TUB (%)					LIP (%)					GRE (%)					GAM (%)				
Escaleta de severidad	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Antes (n=5)	100	0	0	0	0	0	40	40	20	0	60	20	20	0	0	0	40	40	0	20	80	20	0	0	0	100	0	0	0	0	60	20	20	0	0
Después (n=5)	100	0	0	0	0	0	20	60	20	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	40	60	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0

NEC=Necrosis, ECT=Ectoparásitos, BF= Bacterias Filamentosas, TUB=Túbulos, LIP= Lípidos, GRE= Gregarinas, GAM =Gametocitos

0: Ausencia de lesiones

4: Daño severo

Relación de Bacterias en Agua de los Estanques y Hepatopáncreas de Camarón con el Tratamiento de Oxitetraciclina

Se realizó un recuento de Unidades Formadoras de Colonias de *Vibrio sp* en agua y hepatopáncreas de camarón, para confirmar la eficacia de OTC aplicada con dos terapias consecutivas, buscando establecer una relación en el crecimiento bacteriano durante y después del tratamiento con el antibiótico. El análisis estadístico de los datos no mostró una diferencia significativa ($P>0.05$).

En agar TCBS se desarrollan colonias de *Vibrio* de color verde y amarillas. Siendo las verdes las de mayor relevancia por ser las causantes de Vibriosis o síndrome de la gaviota. Las colonias amarillas pueden estar presentes e indicar una infección mixta, cada una de ellas, puede tener factores de virulencia distintos (Lighter, 1995; Gómez-Gil *et al.*, 2001).

El conteo de colonias de *Vibrio* amarillas y verdes se mantuvieron bajos según los valores reportados por el Comité de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN, 2003), que establece para colonias amarillas como rangos bajos $<9.0 \times 10^4$ UFC/g en hepatopáncreas, $<3.0 \times 10^4$ UFC/g en sedimento y $<5.0 \times 10^2$ UFC/mL en agua, y para colonias verdes $<3.0 \times 10^4$ UFC/g en hepatopáncreas y $<3.0 \times 10^4$ UFC/mL en agua.

Los recuentos de colonias de *Vibrio* verdes y amarillas obtenidas en las distintas muestras analizadas se aprecian en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Evaluación bacteriológica de *Vibrio* en hepatopáncreas de camarón durante y después de las terapias con OTC.

Hepatopáncreas				
Colonias de <i>Vibrio</i>	Terapia 1 (UFC/g)		Terapia 2 (UFC/g)	
	Durante	Después	Durante	Después
Verdes	0±0	0±0	0±0	0±0
Amarillas	2.8x10 ² ±4.0x10 ²	0±0	2.0x10 ³ ±2.8x10 ³	0±0

(n=4), X± DE

Tabla 8. Evaluación bacteriológica de *Vibrio* en el agua del estanque durante y después de las terapias con OTC.

Agua				
Colonias de <i>Vibrio</i>	Terapia 1 (UFC/g)		Terapia 2 (UFC/g)	
	Durante	Después	Durante	Después
Verdes	0±0	0±0	10±14.1	5±7.1
Amarillas	4.0x10 ¹ ±1.4x10 ¹	90±5.6x10 ¹	7.0x10 ¹ ±4.2x10 ¹	1.4x10 ² ±1.7x10 ²

(n=4) X ± DE

Parámetros Físico-Químicos del Agua

Los cambios en la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua de los estanques influyen en el estado fisiológico del camarón, favoreciendo el que se genere un daño por patógenos (Castex *et al.*, 2009). Estos factores abióticos modifican y controlan las condiciones fisiológicas de los organismos (Hernández *et al.*, 2006), de ahí la importancia de mantener un monitoreo constante de estos parámetros. Las variaciones particularmente en la temperatura del agua, pueden afectar el metabolismo, crecimiento, muda y sobrevivencia de los organismos de cultivo, además de reducir la capacidad del sistema inmune del camarón y la eficiencia de conversión alimenticia (Martínez-Cordoba, 1998; Hernández *et al.*, 2006; Abad-Rosales *et al.*, 2011). Los valores de temperatura registrados fueron de $28.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante la mañana y $31.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ por la tarde. Estos valores fueron similares a los encontrados por Hernández *et al.*, 2006, donde reportaron como temperaturas óptimas para el cultivo de camarón rangos entre los 27.9 y los 31.3° C.

Li *et al.* (2007), sugirieron que la salinidad óptima para el crecimiento de camarón *L. vannamei* se encuentra en un rango de 17 a 20 ‰. La salinidad promedio registrada en los estanques experimentales fue de 39.8 ± 0.2 ‰. Sin embargo, reportes realizados por Bartlett *et al.*, (1990) y Ponce-Palafox *et al.* (1997), demostraron que el crecimiento de camarón *L. vannamei* no se ve reducido en ambientes con salinidades entre los 30 a 45 ‰

Los niveles de OD en los estanques fueron mayores durante la noche (6.73 ± 0.46 mg O₂/L) que en la mañana (4.16 ± 0.4 mg O₂/L), Las variaciones del oxígeno disuelto en el agua de los estanques son frecuentes y pueden ser debidas a recambios de agua ó al sistema de aireación (Cuzon *et al.*, 2004). El OD es un parámetro importante ya que está directamente relacionado con el estrés que sufren los camarones en cultivo (Jiang *et al.*, 2005). Se ha demostrado que niveles bajos de OD influyen negativamente en el crecimiento de los organismos, limitando el consumo de alimento y su digestibilidad (Cuzon *et al.*, 2004).

Otro factor que es importante considerar es el pH en el agua de los estanques, ya que puede causar la muerte de los organismos, a valores extremos (ácidos ó alcalinos). El valor de pH obtenido fue de 8.3 ± 0.06 sin fluctuaciones importantes durante todo el desarrollo del experimento. El pH del agua juega un papel muy importante en la fisiología del camarón, su incremento o disminución provoca una reducción en los hematocitos, células hialinas y granulares, haciendo a los organismos susceptibles a enfermedades (Li y Chen., 2008). Generalmente, el valor de pH en los estanques fluctúa de 6.6 a 10.2, los factores que intervienen en esta variación pueden ser, lluvias ácidas, remoción de CO_2 debido a la fotosíntesis ó liberación de CO_2 por plantas y animales durante la noche.

Los niveles de amonio no ionizado registrados en los estanques fueron de 0.2 ± 0.03 mg/L de NH_3 , ligeramente mayores al rango óptimo sugerido por el CESASIN, (2003) el cual es <0.01 mg/L de NH_3 . Sin embargo, no se tuvo un efecto tóxico en los organismos debido a las bajas concentraciones en que se mantuvo. El amonio no ionizado, es el producto final principal de los compuestos nitrogenados, se produce como resultado de los desechos de los crustáceos y la descomposición de la materia orgánica. Sin embargo, la acumulación de amonio no ionizado en el agua de los estanques es indeseable por su toxicidad, cuando se conjuga con otros factores fisicoquímicos como el pH, la temperatura y salinidad, ocasionando consecuencias serias en la respuesta fisiológica y/o en el sistema inmune del camarón (Mugnier *et al.*, 2008).

Li *et al.* (2007), reportaron una concentración letal promedio de amonio no ionizado (NH_3) de 39.54 mg/L, en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en condiciones de salinidad semejantes a las obtenidas en este estudio.

CONCLUSIONES

La aplicación de sales cuaternarias de amonio en el agua de los estanques de cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, no mostró un efecto positivo en el crecimiento, ganancia de peso y sobrevivencia de este crustáceo.

No se observó un control inhibitorio significativo en bacterias de *Vibrio* en agua, sedimento y hepatopáncreas de camarón con la aplicación del biocida a base de sales cuaternarias de amonio.

No se encontró una disminución en las lesiones que presentaron los órganos de camarón *L. vannamei* ocasionadas por bacterias y parásitos antes y después de la aplicación de los tratamientos con el biocida y con oxitetraciclina.

Los niveles de acumulación de oxitetraciclina alcanzados en músculo y hepatopáncreas de camarón *L. vannamei* fueron adecuados con relación a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias establecidas previamente para bacterias del género *Vibrio* aisladas del mismo sistema de cultivo. Sin embargo, no se observó una disminución de estas bacterias presentes en agua y hepatopáncreas de camarón.

La aplicación de dos terapias con OTC no tuvo un efecto significativo en la disminución de las lesiones que presentaron los órganos de camarón, sin embargo, sí se obtuvo una mayor acumulación del antibiótico en músculo y hepatopáncreas durante la segunda medicación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio no se observó un efecto benéfico en la aplicación de los tratamientos, con relación a los daños ocasionados por bacterias y parásitos que presentan los camarones durante su cultivo.

Las investigaciones científicas realizadas y publicadas han sido concluyentes respecto al riesgo sanitario que constituye el uso masivo e ilimitado de antibióticos y biocidas en la producción acuícola. Las exigencias comerciales

en relación a la calidad en los productos acuícolas que exigen los mercados nacionales y extranjeros, hacen necesario tener un mayor control en el uso de estos compuestos, con la finalidad de garantizar la inocuidad de los alimentos, y la protección al medio ambiente. Por lo que se sugiere para un mayor control sobre las enfermedades del camarón, la implementación de Programas de Buenas Prácticas de Producción Acuícola (BPPA).

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rosales M.S., Betancourt-Lozano M., Vargas-Albores F., Roque A. (2011). Interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón. En Avances en acuicultura y manejo ambiental. Cap. 9. Ruiz Luna A., Berlanga Robles C. A. y Betancourt Lozano M. (Eds). Editorial Trillas. México, D.F. pp. 151-163.
- Achupallas J. (2000). Tecnología de alimentos para camarón. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18,1998. La Paz, B.C.S., México.
- Anónimo. (2008). 1er Foro de Camarón de Cultivo en el Pacífico Norte. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Julio 10 y 11, 2008. Hermosillo, Sonora. México.
- Banerjee S., Devaraja T., Shariff M., Yusoff F. (2007). Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus spp.*, in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases*, 30:383-389.
- Bartlett P., Bonilla P., Quiros L., Takano M. (1990). Effects of high salinity on the survival and growth of juvenile *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* and *P. monodon*. Abstract, *World Aquaculture*, 90:121/CP6. National Research Council. Ottawa, Ontario Canada.
- Bartolomé M. C., Sánchez-Fortún S. (2005). Acute toxicity and inhibition of Phototaxis induced by Benzalkonium Chloride in *Artemia franciscana* Larvae. *Environmental Contamination and Toxicology*, 75:1208-1213.
- Betancourt-Lozano M., García de la Parra L. M. (2011). Perspectivas ecotoxicológicas de la utilización del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), en ambientes costeros del pacífico mexicano. En Avances en acuicultura y manejo ambiental. Cap. 16. Ruiz Luna A., Berlanga Robles C. A. y Betancourt Lozano M. (Eds). Editorial Trillas. México, D.F. pp. 279-294.

- Bermúdez-Almada M. C., Pérez-Tello M. G., Valenzuela-Quintanar A. I., Vázquez-Moreno L. (1999). Oxytetracycline Residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and microbial receptor assay. *Journal of Food Science* 64:638-640.
- Brock J., Lightner D. (1990). Diseases of crustaceans. Diseases caused by microorganisms. In: Kinne (ed). *Diseases of Marine Animals*, Vol.3. John Wiley and Sons, N.Y. pp. 245-349.
- Brock J.A., LeaMaster B. (1992). A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. *Journal World Aquaculture Society*, 212-226.
- Cabello F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8:1137-1144.
- Castex M., Lemaire P., Wabete N., Chim L. (2009). Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactis* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 294:306-313.
- CEE. (2003). Comunidad Económica Europea. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on Official Feed and Food Controls (presented by the Commission) COM (2003) 52 final 2003/0030 (COD) Brussels, 5.2.2003
- Chim L., Castex M., Pham D., Brun P., Lemaire P., Wabete N., Schmidely P., Mariojous C. (2008). Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. *Aquaculture*, 279:63–69.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) (2009) http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009_capitulo_i_preliminar (14 Diciembre de 2010).
- Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN). (2003). Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras. pp. 1-115.

- Cooksey R. C. (1997). Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. Principles of Medical Biology. Vol.h 9A:199-214.
- Cuzon G., Lawrence A., Gaxiola G., Rosas C., Guillaume J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235:513-551.
- Elliot E. L., Kysner C. A., Tamplin M.L. (1992). Chapter 9. *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and Other *Vibrio spp...* pp. 111-140. In FDA Bacteriological Analytical Manual 7th Edition. AOAC International.
- European Economic Commission. (2002). Commission Regulation (EEC) No. 1181/2002. Regulation of 1 July 2002, amending Annex I of Council Regulation (EEC) No. 2377/ 90, Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. In Official Journal of the European Communities, No. L. 172/13. European Economic Commission, Brussels, Belgium.
- Fernández R. F., López H. J., Ponce M. L. M., Machado B. C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1):44-48.
- Fisher W. S., Nilson E. H., Steenbergen J. F., Lightner D. V. (1978). Microbial diseases of cultured lobsters: a review. *Aquaculture*, 14:115-140.
- Frelier P.F., Sis R.F., Bell T.A., Lewis D.H., (1992). Microscopic and Ultrastructural Studies of Necrotizing Hepatopancreatitis in Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) Cultured in Texas. *Veterinary Pathology*, 29: 269-277.
- Gómez G. B., Roque A., Guerra F. A. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: Páez-Osuna F. (ed.), *Camaronicultura y Medio Ambiente*. UNAM. pp. 315-346.
- Gómez-Gil B., Cabanillas R. S., Paez, B. A. (2001). Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellogg. *Aquaculture*, 196:1-12.

- Gómez-Jimenez S., Espinosa-Plascencia A., Valenzuela-Villa F., Bermúdez-Almada M. C. (2008). Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture*, 274:24-29.
- González-Carrillo H.H., Espinosa-Plascencia A., Bermúdez-Almada M.C. Desarrollo de una metodología para el control de calidad en la elaboración de alimento con Enrofloxacin para camarón de cultivo. VII Congreso del Noroeste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología. 10 al 13 de Noviembre de 2010. Hermosillo, Sonora. México. (In extenso).
- Gräslund S., Bengtsson B. (2001). Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming and their potential impact on the environment a review. *The Science of the Total Environment*, 280:93-131.
- Gutiérrez-Rodríguez M., Linné-Azueta M., Rodríguez-Cázares D. G., Monroy-García Y. M., Mata-Sotres J. A. (2001). Manual de Enfermedades de camarones peneidos en México. Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico. Dirección General de Organización y Fomento. CONAPESCA. SAGARPA. Vol 2, Num 14, pp 1-10.
- Hernández G., Olmos J. (2004). Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63: 722–727.
- Hernández R. M., Buckle F., Palacios E., Barón B. (2006). Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction. *Journal of Thermal Biology*, 31:565-572.
- Hernández S. P. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Technical Paper. No. 469. Roma, FAO.
- Hitosugi M., Maruyama K., Takatsu A. (1998). A case of fatal benzalkonium chloride poisoning. *International Journal Legal Medicine*, 111: 265-266.

- Holmström K., Gräslund S., Wahström A., Pongshompoo S., Bengtsson B. E., Kautsky N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, 38:255-266.
- Houglum J., Larson R., Knutson A. (1997). Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, 80:961-965.
- Hung-Hung S., Su-Ching L., Wen-Liang C., Yun-Yuan T., Wei-Liang C. (2003). Influence of Timsen™ on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 219:123–133.
- Intorre L., Meucci V., Di Bello D., Monni G., Soldani, G., Pretti C. (2007). Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. *Aquatic Animals*, 231(4):590-595.
- Jiang L. X., Pan L. Q., Bo F. (2005). Effect of dissolved oxygen on immune response parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Fish and Shellfish Immunology*, 18:185-188.
- Johnson S. K. (1995). Handbook of Shrimp Diseases. *Aquaculture*, 1-27.
- Jun T., Xian-le Y., Zong-lin Z. (2006). Pharmacokinetics and the active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitten-han-ded crab (*Eriocheir sinensis*). *Aquaculture*, 260:69-76.
- Kemper N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8:1-13.
- Kitabayashi K., Kurata H., Shudo K., Nakamura K., Ishikawa S. (1971). Studies on formula feed for Kuruma prawn I. On the relationship among glucosamine, phosphorous and calcium. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 65:91-108.

- Li C., Chen J. (2008). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:701-709.
- Li E., Chen L., Zeng C., Chen X., Yu N., Lai Q., Qin J. G. (2007). Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*, 265:385-390.
- Liao I. C. (1996). Use of Chemicals in Aquaculture in Asia. The Use of Chemicals in Aquaculture in Taiwan, Province of China. Cap. 16. pp.199.
- Lightner D. V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. In: J.P. McVey (editor) *CRC Handbook of Mariculture. Second Edition, Volume 1. Crustacean Aquaculture.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 393-486.
- Lightner D. V. (1995). *Shrimp Pathology: Major Diseases of Concern to the Shrimp Farming Industry in the Americas.* Published by the American Soybean Association, St. Louis, MO. pp.1-60.
- Lightner D. V., Pantoja C. R. (2001). *Manual para el diagnostico de enfermedades del camarón.* Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). pp.1-92.
- Lightner D.V. (1996). *A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures of diseades of cultured penaeid shrimp.* (ed). World Aquaculture Society, Baton Riuge, Louisiana, USA. pp. 304.
- Linnehan R. M., Ulrich R. W., Ridgway S. (1999). Enrofloxacin serum bioactivity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, following administration of 5 mg/kg in whole fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22:170–173.
- Long A.R., Hsieh C., Malbrough M.S., Short Ch. R., Baker S. A. (1990). Matriz Solid Phase Dispersion Isolation and Liquid Chromatography Determination of Sulfadimethoxine in Catfish (*Ictalurus punctatus*) Muscle Tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73:868-871.

- Lunestad B. T., Goksoyr J. (1990). Reduction in the bacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9:67–72.
- Lyle-Fritch L .P., Romero-Beltrán E., Páez-Osuna F. (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering*, 35:135–146.
- Marchetti V., Mancianti F., Cardini G., Luchetti E. (2006). Evaluation of Fungicidal Efficacy of Benzalkonium Chloride (Steramina G u.v) and Virkon-S against *Microsporium canis* for Environmental Disinfection. *Veterinary Research Communications*, 30:255-261.
- Martínez-Córdoba L. R. (1998). Aspectos fisicoquímicos que determinan la calidad del agua. En: AGT, editor. *Ecología de los sistemas acuícolas*. México. pp. 1-24.
- Morales-Covarrubias M.S. (2004). Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. México, D.F.: Editorial Trillas. Cap. 5. pp.81-82.
- Mugnier C., Zipper E., Goarant C., Lemonnier H. (2008). Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*, 274: 398-407.
- Muñoz M., Vandenbulcke F., Garnier J., Gueguen Y., Bulet P. D., Saulnier D., Bachère E. (2004). Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic *vibrio*. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 961–972.
- Nalecz-Jawecki G., Grabinska-Sota E., Narkiewicz P. (2003). The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 54:87-91.
- NCSS versión 2007 Raysville, UTAH, USA, 2007.

- Neu K. P., Fu H. C. (1980). *In vitro* activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 18: 311–316.
- Nogueira-Lima A. C., Gesteira T. C. V., Mafezoli J. (2006). Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. *Aquaculture*, 254:748-757.
- Nuñez O., Moyano E., Galceran M. T., (2004). Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058:89-95
- Páez-Osuna F., Gracia A., Flores-Verdugo F., Lyle-Fritch L. P., Alonso Rodriguez R., Roque A., Ruiz-Fernandez A. C. (2003). Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*, 46(7):806-815.
- Paquette P., Chim L., Martin J. L., Lemos E. Stern M., Tosta G. (1998). Intensive culture of shrimp *Panaeus vannamei* in floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects. *Aquaculture*, 164:151-166.
- Park E. D., Lightner D. V., Milner N., Mayersohn M., Park D. L., Gifford J. M., Bell T. (1995). Exploratory bioavailability and pharmacokinetics studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 130:113–128.
- Pérez P., Fernández E., Beiras R. (2009). Toxicity of Benzalkonium Chloride on Monoalga Cultures and Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Water Air Soil Pollution*, 201:319-330.
- Pérez-Farfante I., Kensley B. (1997). Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengestoid shrimps and prawns of the world. *Memories du museum national d histoire naturelle*. pp 233.
- Ponce-Palafox J., Martinez-Palacios C. A., Ross L. G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*, Boone 1931. *Aquaculture*, 157:107-115.

- Prescott J. F., Baggot J. D., Walter D. R. (2000). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3^{ra} ed. Iowa State University Press. Ames. 13: 275-289.
- Pruzzo C., Huq A., Colwell R. R., Donelli G. (2005). Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Environment In: Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment New York. US S. Editor, pp. 212-252.
- Raj P. S. (1995). Shrimp farming techniques, problems and solutions. Palani Paramount Publications. pp. 67-79.
- Reyes-Villanueva F. (2004). Generalidades y potencialidad en biocontrol de las gregarinas entomoparásitas. Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León. 7(3):355-359.
- Roque A., Molina A. A., Bolán M. C., Gómez G. B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents, 17:383-387.
- Sahm D. F. (1989). Mechanisms of Antimicrobial Resistance. Clinical Microbiology Newsletter. 11(2):9-14.
- Samuelsen O. B. (1989). Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. Aquaculture, 8:7-16.
- Samuelsen O. B., Tursvik V., Ervik A. (1992). Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. The Science of the Total Environment, 114:25-36.
- Sánchez-Martínez J. G., Aguirre-Guzmán G., Mejía-Ruíz H. (2007). White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. Aquaculture Research, 3:1339-1354.
- Santiago H. M. L., Espinosa P. A., Bermúdez A. C. (2009). Uso de antibióticos en el cultivo de camarón. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 40(3):22-32.

- Santiago-Hernández M.L., (2009). Acumulación de Oxitetraciclina (OTC) en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y pruebas de sensibilidad en bacterias tipo *Vibrio* aisladas de un sistema de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. 45-50.
- Scheer M. (1987) Studies on the antibacterial activity of Baytril®. *Veterinary Medical Review*, 2:90-98.
- Shajahan J., Amber M., Douglas W. W. (2007). Efficacy of eleven antimicrobials against a gregarine parasite (Apicomplexa: Protozoa). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6:15-23.
- Singer S. R., Patterson K. S., Meier E. A., Gibson K. J., Lee L. H., Maddox W. C. (2004). Relationship between Phenotypic and Genotypic Florfenicol Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10):4047–4049.
- Tezel U. (2009). Fate and effect of quaternary ammonium compounds in biological systems. Tesis de doctorado. Georgia Institute of Technology. Atlanta, GA, USA.1-262.
- Thakur P. C., Corsin F., Turnbull J. F., Shankar K. M., Hao N. V., Padiyar P. A., Madhusudhan M., Morgan K. L., Mohan C.V. (2002). Estimation of prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) by polymerase chain reaction in *Penaeus monodon* postlarvae at time of stocking in shrimp farms of Karnataka, India: a population-based study. *Disease of Aquatic Organisms*, 49:235–243.
- Tu H. T., Silvestre F., Bernand A., Douny C., Phuong N. T., Tao C. T., Maghuin-Rogister G., y Kestemont P. (2008). Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture* 285:244–248
- USDA. (1994). Department of Agriculture of United State. Guide to Drug, Vaccine, and Pesticide Use in Aquaculture. Prepared by the Federal Joint Subcommittee on Aquaculture, Working Group on Quality Assurance in

Aquaculture Production, in cooperation with the Extension Service, U.S. Department of Agriculture Texas Agricultural Extension Service. The Texas A and M University System Publication No. B-5085. June 1994.

Vincent A. G., Lotz J. M. (2007). Advances in research of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) affecting penaeid shrimp. *Aquaculture Reviews in Fisheries Science*, 15:63–73.

Weihai X., Xiaobin Z., Xinting W., Liping D., Gan Z. (2006). Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 254:1-8.

Woodford N., Ellington M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13:5-18.

Xu H. X., Lee S. F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic resistant bacteria. *Phytotherapy Research*, 15:39–43.

Yanong P. R., Curtis W. E. (2005). Pharmacokinetic studies of florfenicol in koi carp and threespot gourami *Trichogaster trichopterus* after oral and intramuscular treatment. *Journal of Aquatic Health*, 17:129-137.

Zarain-Herzberg M., Campa-Córdova A. I., Cavalli R. O. (2006). Biological viability of producing white shrimp *Litopenaeus vannamei* in seawater floating cages. *Aquaculture*, 259:283-289.