



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Acumulación de antibióticos y su efecto sobre la
comunidad bacteriana presente en sedimentos de
piscinas camaroneras”**

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

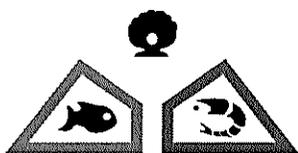
Presentada por:

Miguel Ignacio Uyaguari Díaz

Guayaquil-Ecuador

2002

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:



FUNDACION CENAIM-ESPOL



COOPERACION TECNICA BELGA



UNIVERSIDAD DE GANTE
BÉLGICA



UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BÉLGICA

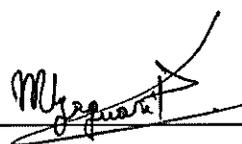
VITA

Miguel Ignacio Uyaguari Díaz, hijo de Miguel Uyaguari Vera y Juana Díaz Heras, nació en Guayaquil (Ecuador) el 6 de Enero de 1978. Estudió su secundaria en el Liceo Naval de Guayaquil, graduándose como Bachiller en Humanidades Modernas en 1995. Ingresó a la Escuela de Biología de la Universidad de Guayaquil en ese mismo año, culminando en 1999. De igual manera siguió estudios de Ingeniería en Acuicultura en la Escuela Superior Politécnica del Litoral, egresando en el año 2000. En Octubre de ese año obtiene la beca de la Cooperación Belga para estudiar la Maestría en Acuicultura Marina.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).


Miguel Ignacio Uyaguari Díaz

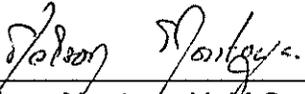
TRIBUNAL DE TESIS



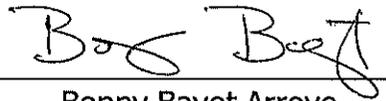
Ing. Bolívar Vaca Romo
Presidente del Tribunal



Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D.
Director de Tesis



Nelson Montoya V. M.Sc.
Co-Director de Tesis
Miembro del Tribunal



Bonny Bayot Arroyo
Miembro del Tribunal



Ricardo Cedeño Campuzano
Miembro del Tribunal

A mis padres:

Miguel y Juana

Nunca es fuerte la mano si le falta

la ayuda del corazón.

Para ustedes les dedico todo mi trabajo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dios de mis padres y hermanos por siempre conservarlos con salud y bienestar.

A toda mi familia, de manera especial a mi tío Pedro M. Uyaguari J., quien me brindó su apoyo incondicional para seguir adelante en mis estudios universitarios.

Al personal del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) que colaboraron de una u otra manera con la realización de este trabajo.

A la Cooperación Técnica Belga (BTC) por otorgarme la beca para participar en el programa de Maestría.

A mi director de tesis Nelson Montoya V., M. Sc. quien me mostró que sólo con tesón, confianza, trabajo constante y sacrificio se puede alcanzar el éxito, gracias.

A Mariuxi Sotomayor M., B. Sc. y a Rosa Malavé O., por su paciencia y colaboración.

Al Sr. Eduardo Casal Torres y todo el personal de la camaronera “Camino Real” por la ayuda logística.

A la Dra. Rosie Coyne, quien desde Noruega estuvo pendiente de la investigación.

A mis amigos de ahora y siempre Jaime Salazar e Iván Alvarez, quienes me brindaron su lealtad incondicional durante estos 2 años de convivencia. Firmes y dignos hasta el final.

Deseo que la fuerza siempre los acompañe.

TABLA DE CONTENIDOS

| | Página No. |
|---|------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMEN | xvi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 1. ANTECEDENTES..... | 7 |
| 1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS AGENTES ANTIBACTERIALES | 7 |
| 1.1.1. Oxitetraciclina..... | 7 |
| 1.2.2. Florfenicol | 11 |
| 1.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS | 15 |
| 1.2.1. Métodos por HPLC | 16 |
| 1.2.1.1. Oxitetraciclina | 17 |
| 1.2.1.2. Florfenicol | 18 |
| 1.3. CONSECUENCIAS E IMPACTO AMBIENTAL..... | 19 |
| 1.3.1. Residuos en sedimentos marinos | 19 |
| 1.4. RESISTENCIA BACTERIANA | 23 |
| | |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 2.1. RESIDUALIDAD DE LA OTC E IMPACTO SOBRE LA MICROFLORA DE PISCINAS CAMARONERAS | 25 |
| 2.2. BIOENSAYO: RESIDUALIDAD DE FLO EN SEDIMENTOS DE PISCINAS CAMARONERAS Y EL EFECTO SOBRE LA FLORA BACTERIANA..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 2.3. METODOLOGÍA..... | 29 |
| 2.3.1. Microbiología..... | 29 |
| 2.3.1.1. Materiales y equipos | 29 |
| 2.3.1.2. Aislamiento de bacterias | 30 |
| 2.3.1.3. Conteo y selección de bacterias..... | 30 |
| 2.3.1.4. Pruebas de identificación bacteriana | 31 |
| 2.3.1.5. Estimación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC)..... | 32 |
| 2.3.2. Análisis de OTC y FLO en sedimentos..... | 34 |
| 2.3.2.1. Reactivos y equipos | 34 |
| 2.3.2.2. Instrumental..... | 34 |
| 2.3.2.3. Soluciones estándares y curva de calibración | 35 |
| 2.3.2.4. Determinación de OTC vía HPLC..... | 36 |
| 2.3.2.5. Determinación de florfenicol (FLO) vía HPLC | 37 |
| 2.4. INGRESO DE DATOS | 38 |
| 2.5. ANALISIS ESTADISTICO | 38 |
| | |
| 3. RESULTADOS..... | 39 |
| 3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS | 39 |
| 3.2. DESARROLLO DEL CULTIVO | 39 |
| 3.3. RESIDUALIDAD DE ANTIBIÓTICOS | 42 |
| 3.3.1. Oxitetraciclina | 42 |
| 3.3.2. Florfenicol | 45 |
| 3.4. IMPACTO SOBRE LA MICROFLORA..... | 47 |
| 3.4.1. Oxitetraciclina | 47 |
| 3.4.2. Florfenicol | 51 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4. DISCUSIÓN | 55 |
| 5. CONCLUSIONES | 67 |
| 6. RECOMENDACIONES..... | 69 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de Oxitetraciclina | 7 |
| Figura 2. Estructura química de Florfenicol | 11 |
| Figura 3. Acumulación y eliminación de OTC durante el período de muestreo en la piscina P1..... | 42 |
| Figura 4. Acumulación y eliminación de OTC durante el período de muestreo en la piscina P2..... | 43 |
| Figura 5. Persistencia de FLO en el sedimento de los tanques tratamiento | 45 |
| Figura 6. Concentración de FLO <i>versus</i> tiempo de permanencia en el sedimento durante el ensayo. Scatter plot y regresión lineal calculada. Tiempo medio de vida estimado: 5 días..... | 46 |
| Figura 7. Persistencia de FLO-amina en sedimentos de piscinas camaroneras luego de un período de medicación..... | 47 |
| Figura 8. Relación entre los promedios de las poblaciones de bacterias totales expresadas en función de \log_{10} y la concentración de OTC en sedimento de Piscina P1 (a) y Piscina P2 (b)..... | 47 |
| Figura 9. Promedio de vibrios totales expresados en \log_{10} hallados en el sedimento de las piscinas P1 y P2 | 49 |
| Figura 10. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de OTC y su relación con las densidades ópticas (D.O.) frentes a las bacterias aisladas de las piscinas P1 y P2 | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 11. Comportamiento de la población bacteriana total presentes en sedimentos de tanques medicados con FLO y control | 51 |
| Figura 12. Comportamiento de los vibrios presentes en el tratamiento con FLO y control a lo largo del período de muestreo..... | 52 |
| Figura 13. Concentraciones mínimas inhibitorias de las bacterias identificadas en el tratamiento con FLO | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diluciones empleadas en las siembras de placas para cada experimento..... | 30 |
| Tabla 2. Concentraciones de antibióticos empleadas en la determinación de MIC..... | 33 |
| Tabla 3. Valores promedio (\pm desviación estándar) de parámetros abióticos obtenidos en las piscinas P1 y P2 durante el experimento con OTC (n=10) | 40 |
| Tabla 4. Valores promedio (\pm desviación estándar) de parámetros abióticos obtenidos en los tanques control y tratamiento durante el bioensayo con FLO (n=12)..... | 41 |
| Tabla 5. Valores promedio (\pm desviación estándar) de parámetros biométricos durante el bioensayo con FLO (32 días) | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| μg | microgramos |
| μL | microlitro |
| μm | micras |
| cm | centímetro |
| cm^2 | centímetro cuadrado |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbant assay (Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima) |
| g | gramo |
| ha | hectárea |
| Kg | Kilogramo |
| Kgf | kilogramos fuerza |
| L | litro |
| m^2 | metro cuadrado |
| mg | miligramo |
| min | minuto |
| mL | mililitros |
| m-RNA | messenger-Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensajero) |
| ng | nanogramos |
| nm | nanometro |
| $^{\circ}\text{C}$ | grados Celsius |
| pH | potencial de hidrógeno |
| PL | post-larva |
| ppb | parts per billion (partes por billón) |

| | |
|-------|---|
| ppm | parts per million (partes por millón) |
| rpm | revoluciones por minuto |
| TM | Tonelada métrica |
| t-RNA | transfer-Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico de transferencia) |
| ups | unidades prácticas de salinidad |

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos: uno “*in situ*” y un bioensayo experimental para evaluar la persistencia de los antibióticos Oxitetraciclina (OTC) y Florfenicol (FLO) y su impacto sobre la microflora bacteriana presente en el sedimento de piscinas camaroneras.

Las muestras de sedimento recolectadas mediante tubos CORE a profundidades de 5 (OTC) y 2 (FLO) cm fueron analizadas en su contenido de antibióticos mediante técnicas de cromatografía líquida (HPLC). Las mismas muestras sirvieron para el análisis microbiológico que contempló la preparación de diluciones y siembras en medios de agar marino (AM) y Tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS). Conteos realizados a las 72 horas permitieron la selección de bacterias persistentes durante los tratamientos; y su resiembra en TSA el aislamiento, identificación bioquímica y pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC).

Se estimaron porcentajes de deposición para OTC menores al 1%. Alcanzándose niveles promedio de acumulación de 0.69 ppm. Este antibiótico mostró una distribución espacial acumulativo desde la entrada, hacia la parte media y salida de las piscinas. Estimándose en las salidas una mayor acumulación de OTC durante el muestreo. La permanencia del agente en el sedimento fue posiblemente afectada por procesos ambientales u otros factores no controlados.

El FLO en sedimentos presentó valores de deposición cercanos al 16%, reportándose niveles promedios de hasta 0.08 ppm durante la medicación. El tiempo medio de vida en el sedimento de este fármaco fue de 5 días. Durante el ensayo, un metabolito del FLO de mayor concentración y persistencia, FLO-amina fue reportado. Los resultados de las pruebas de caracterización fenotípica clasificaron a 5 bacterias persistentes para el tratamiento con OTC (*V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *Aeromonas spp.* y *Staphylococcus*

spp.) y 7 bacterias para el tratamiento con FLO (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. pelagius*, *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Micrococcus roseus*). Las pruebas de MIC para las bacterias aisladas mostraron valores superiores a 1000 ppm y menores a 1 ppm para OTC y FLO, respectivamente.

Ambos antibióticos mostraron comportamientos distintos de acumulación en el sedimento, las concentraciones reportadas para OTC variaron incluso durante el tratamiento, mientras el FLO presentó concentraciones que incrementaron a lo largo de la medicación. La OTC presentó una rápida degradación en el sedimento, no obstante FLO mostró una mayor estabilidad después del tratamiento. La población bacteriana de las piscinas tratadas con OTC no fue afectada por la residualidad de esta droga, a diferencia del FLO que sí redujo significativamente la comunidad bacteriana en sedimentos. Esta investigación revalida el enfoque del uso indiscriminado de antibióticos, mecanismo que a largo plazo puede conducir a una resistencia bacteriana en el medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

En 1998 las exportaciones de camarón ecuatoriano llegaron a superar las 110 mil toneladas y 800 millones de dólares, convirtiéndolo en uno de los mayores productores de camarón a nivel mundial. A partir de mediados de 1999, la producción comenzó a decaer, a consecuencia del virus de la mancha blanca (Intriago 2001). Para el año 2001, la producción de camarón se estimó en alrededor de 45.3 mil toneladas, registrándose a comienzos de este año un incremento del 4% en la producción con respecto a los meses anteriores, generando un promedio de 281 millones de dólares (Fuente: Estadísticas de CNA).

El cultivo de camarón a nivel mundial ha tenido un proceso acelerado, sin embargo conforme esta industria se ha ido desarrollando, un amplio rango de enfermedades bacterianas han causado los mayores problemas en la producción de los cultivos e interferido en la salud de los animales (Alderman y Hastings 1998).

Las enfermedades en camaronicultura se dan como una respuesta del animal frente a un cambio en las condiciones del cultivo. El origen de estas enfermedades para muchos investigadores (Bell 1992; Flegel 1996; Jiménez 1997; Peeters y Rodríguez 1999; Lightner 2001) es una consecuencia de las condiciones de estrés a la que son sometidos los animales con respecto a la densidad de cultivo. El cambio de sistemas extensivos a semi-intensivos e intensivos, provoca variaciones en la respuesta del ecosistema frente a un mayor número de animales que interaccionan con el medio acuático representando esta condición, una situación ventajosa para los patógenos sobre el huésped (CNA en prensa).

Entre las principales patologías que ha tenido que afrontar el sector camaronero en el Ecuador se cuentan:

Síndrome de la Gaviota, que apareció entre 1989 y 1990. Denominado de esta manera por la presencia de gaviotas y otras aves marinas que capturaban camarones moribundos al borde de las piscinas. La mortalidad se debía a bacterias del género *Vibrio spp* principalmente, que originaba infecciones caracterizadas por bacteremia-septicemia (Jiménez *et al.* 1995).

Síndrome de Taura (TSV), enfermedad viral que apareció en 1992, descrito por Brock *et al.* (1995); Hasson *et al.* (1995); también denominado TS (Taura syndrome) por Jiménez (1992). Posteriormente entre 1993–1995 apareció la hepatopancreatitis necrotizante (HPN), originada por bacterias intracelulares, dando un fuerte golpe a la industria camaronera ecuatoriana (Jiménez 1997). Entre las de menor incidencia se cuentan la presencia de bacterias intracelulares tipo rickettsias, síndrome de bolitas, síndrome de zoea, necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (NHHI) en *Penaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei* (Lightner 1996; Pillay 1997).

A partir de Mayo de 1999 el *Síndrome de la mancha blanca* (WSSV) causó pérdidas de \$ 1.200 millones en la industria acuícola ecuatoriana al término del año 2000 (CNA 2001). Siendo esta última patología la que mayores pérdidas económicas ha causado a nivel mundial en la industria camaronera.

Numerosas estrategias han sido empleadas para el control y tratamiento de enfermedades en el cultivo de camarones peneidos. Estas estrategias han ido desde el uso de prácticas mejoradas de larvicultura para tener organismos libres de patógenos o especies resistentes a los patógenos (Lotz 1997), programas de selección genética que aseguren una producción de crías resistente a las enfermedades principales que atacan al

camarón (Lightner 2001), hasta nuevas alternativas que involucran el desarrollo de vacunas a partir de proteínas virales, como es el caso de la proteína VP-28, capaz de neutralizar la infección por WSSV en *Penaeus monodon* (van Hulten *et al.* 2001).

En este mismo orden, la industria acuícola ha incluido en la prevención de enfermedades, la inmunoestimulación a través de la alteración de la dieta, mediante la aplicación de β -glucanos, lipopolisacáridos y péptidoglicanos lográndose un incremento significativo de actividad fenoloxidasa y generación de anión superóxido - mecanismos de defensa relacionados a la liberación de componentes celulares en el plasma de camarones - (Vargas-Albores *et al.* 1996; Otero 2001). Otra alternativa es el empleo de probióticos administrados como suplemento en la dieta con el objetivo de competir con organismos patógenos y evitar las enfermedades (Gatesoupe 1999).

Sin embargo, las técnicas alternativas mencionadas tienen sus limitaciones, en cuanto se refiere al porcentaje de eficiencia de las vacunas, el costo de las técnicas inmunológicas, así como la mayor parte de tratamientos con células vivas, se los realiza de manera preventiva; mas en el momento que está presente el patógeno, los antibióticos resultan ser agentes de primer orden para controlar un brote de la enfermedad.

Los antibióticos han sido empleados como herramienta para combatir las enfermedades en acuicultura y en su mayoría no parecen representar un riesgo potencial para la salud humana y el ambiente, mientras sean aplicados de forma técnica (Subasinghe *et al.* 1999). Una de las grandes ventajas de los antibióticos radica en que su campo de acción en el animal es diverso, debido a su forma de actuar para combatir infecciones en la piel, branquias, órganos internos y aletas; así también su medio de aplicación es muy variado (baños, punción, mediante el alimento).

El método más conveniente para tratar a camarones y peces con antibióticos es el uso de alimento medicado, por la facilidad que implica en el tratamiento de una enfermedad. Sin embargo de investigaciones realizadas por Pouliquen *et al.* (1993), establecen que debido a la reducción en la alimentación del animal, producto de las enfermedades bacterianas y la poca palatabilidad del alimento conferida por la adición del agente terapéutico, solo un 20-30% de los antibióticos administrados por este método son absorbidos. En este mismo orden Samuelsen (1989; 1991; 1993), establece que la mayor parte (70-80%) de los antibióticos suplementados en dietas artificiales, como efecto directo de la lixiviación tienen como destino final el ambiente.

Si consideramos estos niveles de distribución, las concentraciones de antibióticos presentes en sedimentos de sistemas acuícolas podrían revelar valores elevados como consecuencia del uso de agentes antibacteriales en acuicultura.

El uso de antibióticos en alimentos animales está causando preocupación entre los microbiólogos clínicos o médicos debido a que la transferencia de la resistencia a antibióticos de bacterias asociadas con animales hacia patógenos de humanos se está volviendo muy común. La mayor preocupación que ha surgido es la posibilidad de acelerar los procesos de resistencia bacteriana, misma que se desarrolla rápidamente, conllevando a una reducción de la capacidad de los antibióticos para controlar las enfermedades (Samuelsen 1993), surgiendo además bacterias patógenas resistentes no solo a uno, sino a muchos de los antibióticos utilizados hoy en día (Smith *et al.* 1994).

A pesar que la terapia antibiótica puede ser la forma más rápida de combatir a una enfermedad bacteriana en una instalación acuícola, a menudo esta puede ser contraproducente, debido a que los antibióticos también pueden causar un incremento en la virulencia de los patógenos (Price 2000 *fide* Moriarty 2001)

En Asia y América Latina, los camarones utilizan antibióticos en grandes cantidades, incluyendo fluoroquinolonas tales como la sarafloxacin, norfloxacin y enrofloxacin. En ambas regiones no se tienen estadísticas de la cantidad de antibióticos destinados para acuicultura, pero un estimativo conservador podría estar entre 1.000 a 2.000 TM/año (Moriarty 2001). En Ecuador, un monitoreo (1998) realizado en 1800 camarones de Ecuador (Informe interno CENAIM 1998), revela que el 100% de las camarones encuestadas utiliza antibióticos, 60% de manera profiláctica y el restante 40% como terapéutico. Este mismo estudio estima los tipos de antibióticos mayormente aplicados a los cultivos acuícolas siendo estos la oxitetraciclina, enrofloxacin, furazolidona, ácido oxolínico y el florfenicol. La mayor parte de estos antibióticos terminará produciendo bacterias con resistencia antibiótica múltiple en desechos de camarones que contaminarán las aguas costeras, presentando un impacto potencial significativo sobre la salud humana (Gómez-Gil 1998).

Una gran parte de los trabajos sobre antibióticos en peces mencionan que el destino de estos químicos es desconocido tanto en el suelo como en el agua (Jacobsen y Berglund 1988; Björklund *et al.* 1991; Samuelsen 1993; Smith *et al.* 1994; Smith 1996). Tentativamente las cantidades usadas en el alimento contribuirían para que en el ambiente se desarrolle la resistencia bacteriana (Hansen *et al.* 1992; Hektoen 1995; Tendencia y de la Peña 2001), mas hasta el momento trabajos sobre niveles de acumulación de antibióticos en piscinas camarones no han sido reportados, desconociéndose hasta cierto punto el impacto que pueda tener la residualidad de estas drogas sobre la flora bacteriana presente en el sedimento.

En la presente investigación se realiza una evaluación de la residualidad de dos de los antibióticos mayormente empleados por la industria acuícola del país, la oxitetraciclina

y el florfenicol y además se evaluará su efecto residual sobre la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras, luego de un tratamiento terapéutico con dietas medicadas.

1. ANTECEDENTES

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS AGENTES ANTIBACTERIALES

1.1.1. Oxitetraciclina

Su fórmula química es $C_{22}H_{24}N_2O_9$

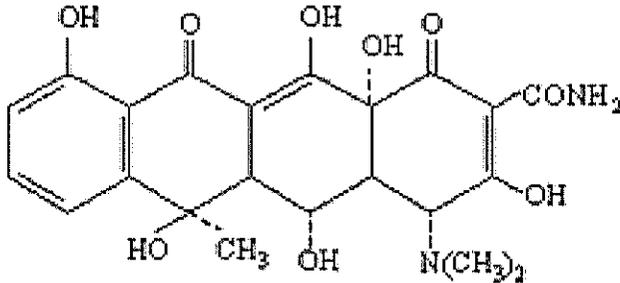


Figura 1. Estructura química de Oxitetraciclina

La oxitetraciclina (OTC), cuya derivación microbiana es *Streptomyces rimosus*, es un antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas, llamadas así por los 4 anillos aromáticos que las conforman. Sus bases cristalinas son compuestos ligeramente amarillos, inodoros y relativamente amargos. Los hidrocloruros y las bases de las tetraciclinas son muy estables en su forma seca.

La OTC es un agente de amplio espectro, su campo de acción incluye bacterias Gram negativas y positivas, rickettsias (bacterias intracelulares), micoplasmas, micobacterias y espiroquetas, virus grandes, actinomicetes y plasmodium (Samuelsen 1993).

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacteriales y su sitio de acción es el ribosoma de la bacteria. Dentro de la célula bacteriana, la OTC se liga a la sub-unidad 30S de los ribosomas bacteriales, evitando de esta manera el acceso del t-RNA aminoacilo al sitio aceptor sobre el complejo m-RNA-ribosoma,

impidiéndose la adición de los aminoácidos hacia la creciente cadena peptídica (Sande y Mandell 1985 *fide* Samuelsen 1993; Brock 2000).

Debido a su amplio espectro bacterial y alta potencia, la OTC es usada en acuicultura para combatir enfermedades de tipo bacteriales tales como vibriosis, furunculosis, y la peste roja en peces (Cravedi *et al.* 1987; Jacobsen 1989; Frelier *et al.* 1994; Bjorklund y Bylund 1990; Ueno *et al.* 1999). En camarones se usa para tratar la hepatopancreatitis necrotizante, vibriosis y rickettsias (Frelier *et al.* 1994; Park *et al.* 1994 *fide* Carson *et al.* 1998; Ueno *et al.* 1999). La administración de este antibiótico para peces incluye dosis junto con el alimento a una concentración terapéutica promedio de 50-100 ppm de biomasa corporal/día durante 8-10 días (Pouliquen *et al.* 1992). En camarones las concentraciones más comunes de OTC en las dietas medicadas se encuentran entre 1000 y 5000 ppm (Peeters y Rodríguez 1999), sin embargo dosis de hasta 7000 y 8000 ppm han sido aplicadas.

Investigaciones desarrolladas para determinar el porcentaje de acumulación de OTC en tejido de peces (salmónidos), reportan al músculo como el órgano de menor porcentaje de residualidad (Namdari *et al.* 1996). Estos resultados son consistentes con los hallados por otros autores, en donde además el hígado y riñones han sido descritos como los tejidos con mayor contenido de OTC. Somsiri *et al.* (1997) reporta en un híbrido de catfish (*Clarias variepinus x C. macrocephalus*) que fue alimentado durante 12 semanas a 3 y 5 ppm, concentraciones elevadas (16-24 ppm) de OTC en sangre, músculo, riñón, bazo e hígado.

De estudios realizados en peces, la biodisponibilidad de la OTC es escasa. Trabajos en *Salmo salar* reportan que existe apenas un 2% de recepción del antibiótico (Elema *et al.* 1996). En estudios similares con otras especies de peces, valores bajos han sido

reportados. Björklund y Bylund (1991) luego de la administración de OTC como una suspensión en trucha arco iris, encontraron un valor de 5.6% de biodisponibilidad. Para la misma especie Rogstad *et al.* (1991), al administrar OTC (mediante cápsulas de gelatina) hallaron solo un 2.6%, siendo la distribución de OTC en los tejidos dependiente del volumen y la afinidad que tenga la OTC frente a ese tejido. En este estudio se observó una lenta eliminación de la droga, estimándose que la OTC tiene un tiempo de permanencia en la sangre de 11.6 días. Trabajos como el desarrollado por Uno (1996) en ayu (*Plecoglossus altivelis*) demuestran que existe un menor o mayor grado de biodisponibilidad para dietas medicadas con OTC (100 mg/Kg de peso corporal) entre peces sanos (9.3%) e infectados con vibriosis (3.8%), no obstante la tasa de eliminación fue similar en ambos casos. Valores tan bajos como 0.38% han sido reportados para *Cyprinus carpio* (Nouws *et al.* 1992). En general los autores mencionados explican esta baja biodisponibilidad como un efecto de la capacidad formadora de complejos iónicos en el medio, demostrada para la OTC (Jacobsen y Berglind 1988; Lunestad y Goksøyr 1990; Smith y Samuelsen 1996). No obstante en camarones *L. vannamei* se ha reportado una biodisponibilidad de alrededor del 59%, al cabo de 24 horas post-inyección (Park fide Mohny *et al.* 1997). A diferencia de lo citado por Mohny *et al.* (1997), Plakas *et al.* (1988) al realizar un tratamiento oral a una concentración de 80 ppm, determinaron una biodisponibilidad de 1.7%.

La residualidad y su impacto en organismos no-objetivo son otros de los aspectos reportados para la OTC. En este orden Le Bris *et al.* (1995), compararon los niveles de OTC en 3 especies comerciales de ostras (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* y *Scrobicularia plana*) expuestas a un efluente de una piscícola que había recibido un tratamiento con OTC por 7 días, determinando una mayor permanencia del agente en *C.*

gigas a una concentración máxima de 1.42 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal al séptimo día de tratamiento y 0.68 $\mu\text{g/g}$ a los 14 días terminada la medicación. Pouliquen *et al.* (1996), demostraron la presencia y acumulación de OTC en moluscos *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* (1.01 y 0.73 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), 10 días después de haber detectado OTC en el agua de estos bivalvos, como efecto de efluentes contaminados con OTC procedentes de granjas piscícolas.

Al momento, gran parte de los trabajos sobre el uso de OTC en acuicultura han sido orientados hacia su inclusión en dietas medicadas para peces, sin embargo durante mucho tiempo la OTC también ha sido utilizada en dietas medicadas para camarones.

Estudios de pérdidas por lixiviación en dietas medicadas (5000 ppm) para camarones (Arango *et al.* 1996) concluyen que la OTC al cabo de 4 horas de permanencia del alimento en el agua sufre una pérdida del 49.4% del antibiótico. Este mismo objetivo fue estudiado por Montoya y Reyes (2001), quienes observaron un rápido desprendimiento de la droga en las 2 primeras horas de experimentación, obteniéndose en el lapso de 6 horas de lixiviación una pérdida total del 40%. Este estudio además demostró la influencia directa de la salinidad en el incremento del nivel de pérdida del antibiótico.

La OTC, al igual que otros fármacos usados en acuicultura es regulada a través del establecimiento de los límites máximos residuales (LMR) por entidades como la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA).

Chanratchakool *et al.* (1989), investigaron el tiempo de residencia de la OTC en músculo de *Penaeus monodon* luego del suministro de dietas medicadas con 1000, 3000 y 5000 ppm de OTC, mientras que Chien y Chen (1998), realizaron un estudio similar

en la misma especie con dietas medicadas similares, incluyendo además una concentración elevada de OTC (7500 ppm). Ambos experimentos determinaron un tiempo mínimo de retiro de 8 días, después de la última medicación, cuando las condiciones de temperatura para *Penaeus monodon* oscilaron entre 28-30 °C.

Montoya y Reyes (2001), realizaron un ensayo similar a concentraciones elevadas del antibiótico (1000, 5000 y 10000 ppm) para determinar la acumulación y eliminación de OTC en tejido de *L. vannamei*. Estos autores estimaron que las concentraciones máximas habían sido alcanzadas para cada uno de los tratamientos al sexto día de medicación. Así también niveles inferiores a los tolerados por la FDA (2 ppm) en el tejido crudo de camarones pudieron ser cuantificados después de 7 días de suspender el tratamiento con las concentraciones evaluadas.

1.1.2. Florfenicol

Su fórmula química es $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$

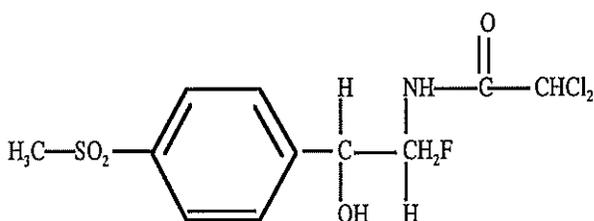


Figura 2. Estructura química de Florfenicol

El florfenicol (FLO), antibiótico perteneciente a la familia de los fenicoles, es un derivado fluorinado del tianfenicol. Es una molécula neutra no ionizable en el rango de pH de 3 a 9, soluble en solventes polares inorgánicos, y ligeramente soluble en agua bajo diversas condiciones de pH. Es altamente soluble en lípidos, reflejando esta característica su distribución extensiva hacia tejidos animales.

Desarrollado por Schering Plough en los años 80, el FLO surgió como una alternativa frente a agentes antibacteriales como el tianfenicol y el cloranfenicol, este último asociado con reportes de anemia aplásica en humanos (Inglis y Richards 1991; Inglis *et al.* 1991; Hottlet 2001). El FLO es un antibiótico de amplio espectro, usado contra bacterias Gram positivas, negativas y rickettsias (Hormazabal *et al.* 1996).

Químicamente se diferencia de sus predecesores (cloranfenicol y tianfenicol), por la presencia de un grupo metil-sulfonil en reemplazo del grupo nitro. El segundo cambio se presenta en el grupo hidróxilo del carbono 3 del tianfenicol por un átomo de flúor no acetilable lo cual protege a la molécula de la inactivación con la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT); de esta forma bacterias resistentes a cloranfenicol y tianfenicol son altamente susceptibles al FLO (Cannon *et al.* 1990; Arcangioli *et al.* 1999; Schering Plough 2000; EMEA/CVMP 2001).

El mecanismo de acción de la molécula se traduce en el bloqueo de la formación de proteínas por acción directa sobre los ribosomas. Este efecto se produce por la difusión del fármaco en la célula bacteriana, la misma que en su interior se fija a la fracción 50S ribosomal, evitando la transferencia de los aminoácidos por el RNA de transferencia a las cadenas peptídicas durante la síntesis proteica (Schering Plough 2000).

A diferencia de otros antibióticos el uso y aplicación de FLO es exclusivo para medicina veterinaria, siendo uno de los pocos fármacos elaborados con este fin y que mantiene los requerimientos básicos de aprobación, esto es seguridad para la salud humana, eficacia para el animal que lo recibe y seguridad para el medio ambiente (Greenless 1997).

A partir de enero de 1995, el uso de FLO fue aceptado por la Agencia Europea para la evaluación de productos medicinales veterinarios (EMEA) (Arcangioli *et al.* 1999). De

acuerdo a información vertida por el proveedor (Schering Plough 2000) el FLO es empleado para combatir enfermedades bacteriales en ganado como neumonía, causada por bacterias del tipo *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, así como para el tratamiento contra pododermatitis (inflamación de la parte interdigital) en ganado vacuno, enfermedad causada por *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides melaninogenicus*.

La forma en que el FLO es administrado varía de acuerdo a la especie. La administración intramuscular, como se emplea en ganado y caballos a dosis de 20 a 22 mg/Kg de peso corporal ha demostrado una biodisponibilidad de alrededor del 80% (Lobell *et al.* 1994; Soback *et al.* 1995; McKeller y Varma 1996). También puede ser administrado oralmente en las mismas especies y a las dosis mencionadas. Un estudio realizado por Varma *et al.* (1986), menciona una biodisponibilidad que varía de 44 a 86% en ganado vacuno cuando FLO fue administrado oralmente 5 minutos después de la alimentación.

En acuicultura el uso del FLO ha sido principalmente enfocado a controlar la furunculosis causada por cepas de *Aeromonas salmonicida* en salmones (Inglis *et al.* 1991). También ha sido utilizado contra la pseudotuberculosis (*Pasteurella piscicida*) en yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), infecciones en ánguila (*Anguilla japonica*) provocadas por *Edwardsiella tarda* y vibriosis (*Vibrio anguillarum*) en goldfish (*Carasius auratus*) (Martinsen *et al.* 1993). La dosificación para peces se incluye en el alimento a razón de 4-10 mg/Kg peso corporal/día durante 5-7 días (EMEA/CVMP 2000). Siendo esta suplementación relativamente baja en comparación con otros antibióticos.

El FLO por su afinidad a moléculas lipídicas se almacena con facilidad en el tejido muscular de los salmónidos. Horsberg *et al.* (1994), determinaron que el FLO se deposita mayormente en el músculo, estimando que un 80% del fármaco se presenta como florfenicol y el 20% restante metabolitos, de los cuales el más importante es florfenicol amina. Este estudio cuantificó un 96.5% de biodisponibilidad para el FLO en salmones a dosis de 10 mg/Kg de peso corporal, cuando la temperatura fue de 10.8 ± 1.5 °C. De acuerdo a los mismos autores, las concentraciones alcanzadas en músculo y sangre fueron similares a la concentración del plasma, esto es 4 ppm.

Otra de las características demostradas para este antibiótico es su rápida eliminación de los tejidos. Martinsen *et al.* (1993), determinaron el tiempo de eliminación en salmones, siendo este relativamente rápido cuando FLO fue administrado de manera intramuscular (12.2 horas) y oral (10.3 horas). Estos tiempos son más cortos que los reportados para otros antibióticos usados en acuicultura.

Actualmente el LMR aceptado por EMEA en peces para FLO es de 1 ppm de masa corporal (EMEA/CVMP 2001). Este límite incluye la suma de florfenicol y sus metabolitos (florfenicol amina, florfenicol alcohol, florfenicol ácido oxámico, monocloroflorfenicol), cuantificados como florfenicol amina.

El FLO es un antibiótico de uso reciente en camaronicultura y la información que se tiene de su farmacocinética y residualidad es escasa. Entre los primeros reportes se cuenta con investigaciones que estiman la concentración mínima inhibitoria (MIC) realizadas por Williams *et al.* (1992), evaluándose el uso de FLO frente a 15 cepas bacterianas. Valores de concentración efectiva letal entre 32 y 84 ppm con índices terapéuticos de 8 a 21 μg fueron reportados por este estudio. De manera similar estudios de sensibilidad realizados por el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo

(CIAD-Mazatlán) muestran un efecto notable contra 5 especies de *Vibrio spp*, aislados de *L. vannamei* (Gómez-Gil y Tron 1996).

En la actualidad, el FLO está siendo utilizado para controlar vibriosis en las piscinas camaroneras, a concentraciones que van de 100-140 ppm de alimento balanceado, siendo la forma más común de emplearlo como recubrimiento en la dieta (Pozo 2001, Informe técnico).

1.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS

Para el desarrollo de estudios farmacocinéticos y/o de detección de residuos de antibióticos y sus metabolitos en organismos, dietas o sedimentos existen varios métodos.

Los *métodos microbiológicos*, fueron los primeros métodos en ser utilizados (FDA 1968). Su empleo se basa en el uso de placas con agares que contienen medios apropiados para el crecimiento de microorganismos. En el agar enriquecido se colocan discos de sensibilidad, previamente humedecidos con el extracto de la muestra, donde posiblemente se encuentra el agente terapéutico. Similar a los antibiogramas, se espera que la presencia del antibiótico sea evidente por la zona de inhibición donde no se observa crecimiento microbiano. El diámetro de la zona es proporcional a la concentración de agente antibacterial en la muestra.

La desventaja de este método es la falta de sensibilidad o especificidad. Los límites de detección citados son frecuentemente mayores a 0.1 ppm, siendo este valor en muchos casos superior a los LMR establecidos para los antibióticos regulados mediante esta normativa (Samuelson 1993). También merece citarse la escasa diferenciación del método entre grupos de antibióticos que pertenecen a una misma familia o sus

diferentes metabolitos. A más de los reportes de falsos positivos como resultado de la producción de autoinhibidores (enzimas lisosomales) por ciertos microorganismos.

Los procedimientos para el análisis mediante los *métodos fisicoquímicos*, incluyen precipitación de proteínas, extracción, aislamiento y enriquecimiento de la muestra. La extracción por estos métodos es laboriosa, siendo esto considerado un factor limitante. Otro factor enunciado es que el agente de interés puede combinarse con componentes celulares de la muestra y de esta manera enmascarar su concentración real. A más de ser un método costoso y de requerir de un alto grado técnico, las ventajas que presenta son su estandarización y potencial para identificar de forma específica el agente terapéutico con precisión y alta sensibilidad.

Tradicionalmente, los residuos de drogas presentes en una gran variedad de muestras biológicas han sido determinados mediante métodos microbiológicos, sin embargo, hace más de una década, es reconocida la mayor especificidad y sensibilidad de los métodos cromatográficos para este tipo de análisis (Medina 1994).

1.2.1. Métodos por HPLC

El método preferido para el análisis cromatográfico de agentes antibacteriales es el sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography). El análisis por HPLC requiere de una técnica de alta especificidad y sensibilidad para aislar el residuo del antibiótico de interés, siendo el método instrumental (HPLC) una forma cualitativa y cuantitativa de determinar al agente. Una variedad de métodos por HPLC han sido empleados para la determinación de antibióticos en acuicultura. Las técnicas más comunes para el análisis de drogas incluyen a la cromatografía de fase de reversa,

basada en columnas analíticas (sílica) de tipo C-8, C-18 o polistireno-divinilbenceno en asociación con detección espectrofotométrica (UV visible).

1.2.1.1. Oxitetraciclina

El análisis de OTC mediante HPLC ha sido ampliamente documentado en trabajos de residuos en tejidos de peces, moluscos, camarones, dietas y sedimentos. Los procesos incluyen homogeneización y extracción de la droga en solución ácida, diluida en una solución de ácido fosfórico con metanol o en buffer ácido en presencia de EDTA (Jacobsen y Berglind 1988; Ueno 1989; Samuelsen 1989; Hansen *et al.* 1992; Rogstad *et al.* 1991; Björklund *et al.* 1991; Pouliquen *et al.* 1993; Coyne *et al.* 1994; Kerry *et al.* 1996). Los extractos son desproteinizados con cloruro de sodio o ácido tricloroacético. Pasos adicionales incluyen extracción en fase sólida o líquida, requeridos para aislar y concentrar las tetraciclinas antes del análisis final (Samuelsen 1993).

Las tetraciclinas también han sido determinadas mediante extracción líquida en fluidos corporales y una variedad de tejidos animales y humanos (Blanchflower *et al.* 1997; Carson *et al.* 1998; Podhorniak *et al.* 1999). La extracción en fase sólida aplicada con cartuchos de sílica del tipo C-8 o C-18, es otro de los procedimientos aplicados a numerosos trabajos para la determinación de la concentración del antibiótico en plasma de peces, tejidos, piel y sedimento (Samuelsen 1989; Pouliquen *et al.* 1993; Xu y Rogers 1995; Uno 1996; Ueno *et al.* 1999; Delépée *et al.* 2000; Montoya y Reyes 2001).

El límite de detección para los diferentes métodos desarrollados o modificados por los autores varía entre 0.005 y 0.08 μg . Mientras que los porcentajes de recuperación de los

métodos detallados están en el rango de 53-102%, dependiendo de la matriz y el proceso de extracción (Samuelsen 1993).

1.2.1.2. Florfenicol

Los primeros métodos desarrollados para la determinación de FLO por HPLC han sido enfocados a la detección del antibiótico en tejidos de animales terrestres (ganado) y fluidos corporales (orina). Estos estudios además han descrito diferentes metabolitos del florfenicol, así: florfenicol amina, florfenicol alcohol, ácido oxámico florfenicol, monocloroflorfenicol y 2 metabolitos no identificados (Varma *et al.* 1986; Powers *et al.* 1988 *vide* Hormazabal *et al.* 1993; Hormazabal *et al.* 1993; Horsberg *et al.* 1994).

A diferencia de la variedad de métodos descritos para la determinación de OTC, pocos son los reportes para la estimación de FLO en acuicultura. Nagata y Saeki (1992) presentaron un método para la determinación de residuos de FLO en músculos de animales y peces de cultivo. Martinsen *et al.* (1993), determinaron la concentración de FLO en plasma de salmones mediante el sistema HPLC, mientras que Hormazabal *et al.* (1993; 1996) realizaron un método para determinación de residuos de florfenicol en tejido de salmónidos y sedimentos respectivamente.

En general la aplicación de los métodos mencionados incluyen homogeneización de la muestra con una fase móvil ácida al 35% de acetonitrilo en agua o también heptanosulfonato y trifosfato sódico, precipitando con este solvente las proteínas. La extracción de FLO se realiza mediante la adición de una solución buffer fosfato y etil acetato. Finalmente el solvente de extracción es rotaevaporado y la muestra rediluida en fase móvil.

Los límites de detección reportados (Hormazabal *et al.* 1996) para FLO y su metabolito florfenicol amina en sedimentos están alrededor de 0.5 μg ; mientras en tejido de peces depende del órgano en que es determinado, variando de 0.02 μg en músculo y 0.05 μg en el hígado. El porcentaje de recuperación de los métodos tiene un rango del 77 al 107% (Hormazabal *et al.* 1996).

1.3. CONSECUENCIAS E IMPACTO AMBIENTAL

1.3.1. Residuos en sedimentos marinos

El conocimiento de los impactos ambientales de los antibióticos usados en acuicultura hasta hace unos años era escaso. Al momento las rutas y/o mecanismos de degradación de los agentes terapéuticos son aún desconocidos.

Debido a los hábitos alimenticios del camarón y a la poca atractabilidad del alimento, existe una cierta cantidad del pellet que no es consumida. De acuerdo a Samuelsen (1991), la mayor parte de los antibióticos lixivian en un 70-80%; en el caso de la OTC este proceso es incrementado por el grado de dureza que tenga el cuerpo de agua. Los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en agua de mar provocan una precipitación del agente y por consiguiente su acumulación en sedimentos marinos (Lunestad y Goksøyr 1990).

Un caso similar para el FLO, se puede producir por un ligamiento a partículas lipídicas (Sams 1994 *fide* Micromedex 2000).

Otros destinos para los residuos de antibióticos provenientes de dietas medicadas para acuicultura también han sido mencionados. Smith (1996), enuncia que un porcentaje incierto de estas drogas debe ir hacia otros organismos presentes en el cultivo, la columna de agua y sólidos suspendidos.

Entre los primeros trabajos de residualidad de antibióticos en sedimentos de granjas piscícolas mediante HPLC, Jacobsen y Berglind (1988) concluyen que la mayor parte de la OTC residual presente es ligada a diferentes partículas y al sedimento. Smith (1996), también destaca al sedimento como el destino final o más importante de acumulación de OTC en granjas marinas de salmones. A paso seguido Kerry *et al.* (1997) reportan en la mayoría de sus estudios niveles entre 1-10 μg de OTC/g de sedimento en cultivo de salmones. Concentraciones superiores a los 300 μg de OTC/g de sedimento también han sido reportadas (Samuelsen *et al.* 1992). De igual manera se han descrito estudios paralelos que correlacionan la acumulación de antibióticos residuales y el incremento en la resistencia bacteriana de la microflora presente en sedimentos. Kerry *et al.* (1995), estimaron las concentraciones de OTC en el sedimento y la frecuencia de aumento de la resistencia microbiana en piscinas de salmónidos, al aplicar 1.5 Kg de OTC por 24 días; encontrando concentraciones de $4.6 \pm 3.7 \mu\text{g}$ de OTC/g de sedimento al tercer día de aplicación, y un aumento del 28% en la resistencia de la microflora al finalizar el tratamiento. De estudios publicados por Tendencia y de La Peña (2001), la OTC dentro de un grupo de antibióticos empleados en medicación para camaronicultura demostró ser el agente que tuvo mayor incidencia (4.3%) en cuanto a resistencia bacteriana a nivel del sistema acuático (sedimento, camarón, agua de la piscina, afluentes y efluentes).

La persistencia de OTC en sedimentos es variable y dependiente de factores como la luminosidad, dureza, salinidad, pH, temperatura y tiempo del cultivo, fluctuando este tiempo entre 9 a 419 días (Björklund *et al.* 1990; Samuelsen *et al.* 1994). No obstante, la mayoría de los trabajos en sedimentos de granjas piscícolas destacan la alta

residualidad y permanencia de la OTC, estimándose valores promedios de residencia de 3-6 meses posterior al tratamiento (Jacobsen y Berglind 1988; Hektoen *et al.* 1995).

Dentro de los factores que podrían variar el tiempo de vida o residencia de la OTC en sedimentos, se cuenta principalmente la velocidad de sedimentación de la piscina o área de cultivo (para el caso de jaulas). Coyne *et al.* (1994) sostienen que a medida aumenta la velocidad de sedimentación, mayor será la posibilidad de que el sedimento conteniendo OTC sea cubierto por una capa de sedimento, incrementando el tiempo de vida de la misma.

Factores como la luz y temperatura están ligados a la eliminación de OTC en el sedimento (Samuelsen 1989; Lunestad *et al.* 1995; Rigos *et al.* 1999). La OTC además puede ser inactivada por cationes di y trivalentes, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , así como también por formación de cristales o ligamiento a partículas de arcilla, sustancias húmicas y proteínas (Lunestad y Goksøyr 1990; Vaughan y Smith 1996). Sin embargo esta aparente inactividad de la OTC puede ser revertida por factores como la misma naturaleza físico-química del sedimento, la tasa de flujo sobre el sedimento y el grado de bioturbación en el sedimento (Smith *et al.* 1994; Vaughan y Smith 1996).

Otro efecto que se puede presentar por residualidad de OTC en sedimento fue investigado por Klaver y Matthews (1994), estos investigadores estimaron que el proceso de nitrificación efectuado por las bacterias nitrificantes, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* se ve afectado por la presencia de OTC. Reportándose una inhibición de la tasa de conversión de amoníaco a nitrito y nitrato cuando la concentración de OTC estuvo en rangos de 12.5-75 mg/l. Pudiendo esta interrupción del proceso alcanzar niveles tóxicos de amoníaco y nitrito, compuestos letales para los animales a ser cultivados.

Un antibiótico de reciente utilización en camarónicas, y que ha surgido como una alternativa ante los problemas bacterianos es el FLO. Al momento son pocos los estudios sobre este agente en camaronicultura, desconociéndose las rutas de acumulación y eliminación que pudiera seguir en los cultivos.

Entre los trabajos que ayudan a explicar parte del mecanismo de liberación del antibiótico al medio acuoso, recientemente en CENAIM, Pozo (Informe técnico 2001), cuantificó los porcentajes de pérdidas por lixiviación de FLO a partir de dietas medicadas para camarones (50, 100 y 200 ppm), reportando valores cercanos al 60% al cabo de 2 horas de inmersión.

Uno de los pocos trabajos de residualidad del FLO en granjas piscícolas reporta la alta degradación del compuesto en sedimentos comparado con otras drogas comúnmente usadas en acuicultura. Hektoen *et al* (1995), determinaron que FLO tiene un tiempo medio de vida de 7.3 días, mas no se pudo determinar si la rápida depuración del químico es debida a la metabolización o lixiviación en el sedimento. En este mismo trabajo se reporta un metabolito aislado del sedimento denominado florfenicol amina, siendo su presencia persistente hasta los 180 días que duró el experimento y alcanzando una concentración máxima de 1.2 ppm.

Estudios del FLO y sus efectos sobre los microorganismos presentes en sedimentos marinos no han sido reportados, sin embargo el FLO *in vitro* ha demostrado un efecto notable contra 5 especies de *Vibrio spp.*, aislados de camarones *L. vannamei* enfermos (Schering-Plough 2000). En otro estudio realizado por Inglis y Richards (1991), para determinar la susceptibilidad en cepas de *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Vibrio spp*, aislados de diferentes fuentes donde tratamientos medicados habían sido

aplicados, el FLO mostró ser un antibiótico con amplio rango bacteriano y uno de los pocos con efecto bacteriostático.

Experimentos desarrollados en laboratorio (Schering Plough 2000), demuestran que tanto el FLO como sus metabolitos son estables y en sustratos acuosos ejercen un efecto tóxico sobre hongos, organismos invertebrados y mohos.

En general, la comunidad científica ha establecido que la presencia de antibióticos en sedimentos por un tiempo prolongado ha inducido a la resistencia bacteriana en el suelo, existiendo además patógenos que pueden sobrevivir en el sedimento durante igual período de tiempo (Björklund *et al.* 1990, Björklund *et al.* 1991; Nygaard *et al.* 1992; Tendencia y de la Peña 2001; Miranda y Zemelman 2001). Microfloras naturales mantenidas bajo estas condiciones, sumado a las condiciones anóxicas del sedimento, reúnen los medios para exponer a los animales que estén siendo cultivados a patógenos genéticamente modificados (Samuelsen 1993).

1.4. RESISTENCIA BACTERIANA

Existen diferentes medios, por los cuales una bacteria puede llegar a ser resistente al antibiótico que esté siendo o hubiese sido aplicado a los cultivos acuícolas. Entre los más importantes: membrana externa Gram-negativa, inactivación enzimática del antibiótico (β -lactamasas y aminoglicosidasas), efluencia activa del antibiótico, plásmidos y genes codificantes (Levy 1992; Smith *et al.* 1994; Miranda y Zemelman 2001).

Un mecanismo que utilizan las bacterias para transferir esta resistencia a las tetraciclinas es mediante genes que codifican proteínas efluyentes, es decir cuando estas proteínas están presentes en el citoplasma bacteriano, la tetraciclina no se liga al

ribosoma y de esta manera no puede impedir la síntesis de las proteínas bacteriales, esta protección de las bacterias se presenta, tanto en bacterias Gram negativas (tet A-tet G) como en Gram positivas (tet K-tet L) (Speer *et al.* 1992). La OTC en sedimentos es capaz de inducir resistencia bacteriana mediante plásmidos, este mecanismo confiere a la bacteria la capacidad de transferir el factor de resistencia a otras bacterias (Sandaa *et al.* 1992; Samuelsen 1993). Además la OTC puede inducir esta resistencia producto de los cambios o mutaciones en las proteínas que conforman la membrana externa de las bacterias (Hansen *et al.* 1992).

En sedimentos marinos, los mecanismos de resistencia bacteriana inducida por adición de FLO en los cultivos no han sido reportados, sin embargo la principal causa de resistencia bacteriana encontrada hasta ahora para FLO es mediante genes codificantes. Arcangioli *et al.* (1999), encontraron un gen que confiere resistencia bacteriana al florfenicol, gen de resistencia de *Salmonella typhimurium* DT104, designado como *floR*. Los autores concluyen que debido a la organización particular del gen y a la localización cromosomal en el segmento 12 de la transmembrana, este puede estar interfiriendo en la estabilidad del patrón de antibioresistencia del gen DT104. Otro gen denominado *pp-flo*, proveniente del plásmido de *Pasteurella piscicida*, también confiere resistencia a FLO por un mecanismo similar al anterior (Kim y Aoki 1996).

Los genes mencionados han sido localizados en plásmidos o estructuras transposonas (llamadas también genes saltarines), estas estructuras se han relacionado con resistencia cruzada a cloranfenicol, florfenicol y a los genes de resistencia a tetraciclinas (tet A – tet R) (Cloeckaert *et al.* 2000).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se realizaron estudios de residualidad para la *OTC (in situ)* en sedimento de 2 piscinas camaroneras, y para el FLO mediante bioensayo experimental. Conjuntamente se evaluaron las influencias de los residuos de OTC y FLO sobre la comunidad bacteriana presente en el sedimento a lo largo del período de medicación y durante su eliminación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. RESIDUALIDAD DE LA OTC E IMPACTO SOBRE LA MICROFLORA DE PISCINAS CAMARONERAS

Para la colección de las muestras se realizaron un total de 12 visitas a una camaronera ubicada en el sector de Las Esclusas del Puerto de Guayaquil, Provincia del Guayas, Ecuador. Los primeros 2 muestreos tuvieron como finalidad determinar la carga bacteriana inicial de las 2 piscinas seleccionadas para el tratamiento con OTC.

El diseño experimental tuvo un tratamiento (OTC) y 2 réplicas (piscinas), divididas imaginariamente cada una de ellas en 3 partes: E = entrada; M = parte media y S = salida, correspondiente a la parte de la compuerta de entrada de agua de las piscinas, niveles intermedios y compuerta de salida de las mismas, respectivamente.

Las piscinas de 10.5 ha (0.90 m de profundidad) y 11 ha (0.84 m de profundidad); P1 y P2 respectivamente fueron sembradas el 30 de Enero del 2002 con larvas de laboratorio (PL14) a densidades estimadas en 0.84 PL/m² (P1) y 0.79 PL/m² (P2). Ambas piscinas fueron medicadas con balanceado recubierto con OTC (6.2 g/Kg dieta) a partir de la tercera

semana del cultivo, durante 7 días. El peso del camarón al momento de la aplicación con OTC era de 1.2 a 1.25 g en ambas piscinas.

A lo largo del período de medicación se usaron un total de 55 lbs de alimento medicado en cada una de las piscinas. Finalizado el tratamiento terapéutico con OTC, en ambas piscinas se aplicaron 2 L/ha de Formyzin (Agripac®) para bajar la carga bacteriana a nivel de sedimento.

El alimento fue suministrado dos veces al día (08h00-14h00), mediante el método de voleo a 5 metros de la orilla de la piscina, por razones de comportamiento de alimentación del camarón durante el estadio de juvenil. Durante el período de medicación no se realizó ningún tipo de recambio de agua.

El período de muestreo se inició a partir del 19 de Febrero hasta el 2 de Abril del 2002. Un total de 10 muestreos fueron realizados en horarios similares (P1: 10h00 y P2: 12h00), correspondientes al día previo a la medicación (Ac_0), 7 días con intervalo de un día (período de medicación Días 1 a 7) y para determinar la eliminación del fármaco se realizaron muestreos a intervalos de 2, 5, 11, 19 y 35 días posterior al último día de medicación (Días 9 a 42).

El protocolo de muestreo contempló la colección de 3 submuestras por área de las piscinas (E, M y S). Las submuestras fueron homogeneizadas, dando origen a una muestra por área. Para el caso se empleó un recolector de sedimentos CORE. La profundidad de sedimento a recolectar fue de 5 cm. Para evitar la toma de muestra en el mismo punto, las áreas de las piscinas donde se tomaron las muestras se marcaron con varillas de madera.

Las muestras de sedimento fueron colectadas en fundas plásticas de color negro de 10 x15 cm para evitar la degradación de OTC debido a su característica fotosensible, rotuladas con el número de piscina y tratamiento, guardadas en una hielera y mantenidas a 4 °C para su posterior transporte. A lo largo de los muestreos se llevó un control de los parámetros abióticos: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto registrados mediante el uso de un equipo YSI-85, pH (TOA pHmeter HM-5S) y turbidez (disco Secchi).

Durante el muestreo en campo, una parte de las muestras fue destinada para análisis en el laboratorio de microbiología, donde se llevaron a cabo pruebas de crecimiento bacteriano, conteo, selección, pruebas bioquímicas y pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC) (ítem 2.3.1.). El sedimento restante fue mantenido a -80 °C para posteriormente determinar la residualidad de OTC vía HPLC (ítem 2.3.2.4).

2.2. BIOENSAYO: RESIDUALIDAD DE FLO EN SEDIMENTOS DE PISCINAS CAMARONERAS Y EL EFECTO SOBRE LA FLORA BACTERIANA.

En la visita inicial a la camaronera mencionada anteriormente, se recogió aproximadamente 1 TM de sedimento maduro con el fin de realizar el ensayo de FLO en las instalaciones del CENAIM, San Pedro de Manglaralto, Provincia del Guayas, Ecuador. Este sedimento provino de una piscina que no había sido tratada con algún tipo de antibiótico al momento de su recolección.

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 1 tratamiento y 3 réplicas (F1, F2, F3) más un control con igual número de réplicas (C1, C2, C3). Se emplearon 6 tanques plásticos con capacidad de 0.5 TM aproximadamente, provistos de una capa de 15 cm de

sedimento maduro. El volumen operativo fue 400 L, y contó con líneas de aire. Los tanques preparados se sembraron con juveniles de *L. vannamei* (3.9 ± 0.3 g) a una densidad de 15 animales/tanque, provenientes de un levantamiento llevado en las instalaciones del CENAIM.

Los animales fueron alimentados a razón del 10% de la biomasa por tanque, asumiendo que los animales durante el tiempo que duró el ensayo crecían 1 g/semana. La ración diaria fue dividida en 2 porciones iguales, suministrándose a las 8h30 y 16h30.

Para el tratamiento terapéutico se empleó balanceado CENAIM 40 (Montoya y Molina 1995) recubierto con florfenicol a una concentración final de 150 ppm y como agente protector aceite de pescado. La dieta control, CENAIM 40 fue recubierta pero no suplementada con FLO.

El período de muestreo se inició a partir del 6 de Marzo hasta el 7 de Abril del 2002. Un total de 11 muestreos fueron realizados en horarios similares (10h00). Durante el período de medicación (7 días) el muestreo se realizó a intervalos de 1 día, en cambio el período de eliminación de la droga siguió hasta 25 días posteriores al tratamiento terapéutico, a intervalos de 1, 3, 5, 7, 10, 18 y 25 días.

El protocolo de muestreo contempló la colección de 6 submuestras por tanque. Las submuestras fueron homogeneizadas, resultando en una muestra por tanque/día; recolectándose las mismas con tubos CORE a una profundidad de 2 cm. En cada uno de los puntos muestreados se colocó una varilla plástica, de forma que no se repitiera en los siguientes muestreos un punto similar de recolección. Los parámetros abióticos:

temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto, también fueron registrados en este experimento.

Las muestras de sedimento colectadas fueron almacenadas en fundas plásticas de 10 x 15 cm, rotuladas con la fecha de recolección y tratamiento. Inmediatamente las muestras fueron trasladadas al laboratorio de microbiología, donde se procedió a realizar las pruebas descritas en el ítem 2.3.1. El sedimento restante fue congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego determinar la residualidad de FLO vía HPLC (ítem 2.3.2.5.).

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Microbiología

2.3.1.1. Materiales y equipos

En el análisis microbiológico se emplearon agares para bacterias heterotrofas y específico de vibrios: Agar Marino (AM) y Agar Tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS), respectivamente. El agar utilizado para el aislamiento de bacterias fue Agar Tróptico de soya (TSA). El medio de preservación de bacterias fue una mezcla de Caldo tróptico de soya (TSB) y glicerol (85:15). Los medios anteriormente empleados fueron adquiridos de DIFCO®. El medio de enriquecimiento de bacterias fue Lennox L Broth Base (LB) proveniente de Oxoid Laboratories Ltd. Todos los medios fueron preparados a una concentración final de 2% NaCl.

Las pruebas bioquímicas fueron realizadas a partir de reactivos Sigma y Difco®. Para las pruebas de Concentración mínima inhibitoria (MIC), se realizaron una serie de diluciones a

partir de soluciones stock, preparadas con estándares de alta pureza: Oxitetraciclina (Sigma Chemical Co.) y Florfenicol (Schering Plough).

La preparación de agares se realizó en una cámara de bioseguridad (Air Tech Japan, Ltd. Mod. BCM-1002W). Para el pesaje de reactivos y muestras se empleó una balanza analítica tipo Mettler AE-240 (0.00001g). La lectura de Densidades ópticas (D.O.) fue realizada en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Bichromatic, tipo 348) y en un espectrofotómetro Jenway 6400 (Jenway Ltd, UK).

2.3.1.2. Aislamiento de bacterias

En el laboratorio de microbiología del CENAIM, se procedió a pesar por cada muestra 10 g de sedimento. El contenido fue depositado en un frasco plástico estéril conteniendo 90 mL de solución salina al 2% previamente esterilizada (121°C; 15 min; 1.1 Kg/cm²) y se realizaron las subsiguientes diluciones de 10⁻² a 10⁻⁵ en tubos con 9 mL de solución salina al 2% esterilizada sembrándose 100 µL de estas diluciones en el respectivo agar (Tabla # 1).

Tabla 1. Diluciones empleadas en las siembras de placas para cada experimento

| Experimento | AM | TCBS |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| OTC | 10 ⁻³ a 10 ⁻⁵ | 10 ⁻² a 10 ⁻⁴ |
| FLO | 10 ⁻³ a 10 ⁻⁵ | 10 ⁻¹ a 10 ⁻³ |

La siembra fue de tipo directo, esparciéndolos con una varilla de vidrio estéril (método de barrido) y se incubó a 28 °C por 3 días.

2.3.1.3. Conteo y selección de bacterias

Los conteos bacterianos fueron realizados a las 72 horas de haber realizado la siembra, empleándose el criterio de contaje para bacterias totales reportado por Bonde (1977). Para

la selección de las cepas bacterianas, las colonias se clasificaron de acuerdo a criterios morfológicos como tamaño, color, márgenes y elevación, según el manual de Norrell y Mesley (1997). Las colonias predominantes a lo largo del período de observación fueron seleccionadas para las pruebas bioquímicas y de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Para el efecto, las bacterias fueron resembradas de los agares marino y TCBS a TSA, tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino y luego sembradas en el medio sólido rayando en forma de estrías. Esta siembra se realizó por agotamiento y se incubó a 28 °C. A las 16 horas del agar TSA se tomó con un asa de platino cada una de las colonias que habían sido inoculadas y se procedió a colocarlas en microtubos (Eppendorf®) de 1.5 mL (n=2), rotulados con el código de bacteria respectivo, llenados con la solución de preservación de bacterias y congeladas las cepas a -80 °C.

2.3.1.4. Pruebas de identificación bacteriana

De las cepas obtenidas en el ítem 2.3.1.3. se procedió a realizar una resiembra en agar TSA y entre 8-12 horas de crecimiento se realizaron las pruebas básicas de identificación, así como 18 pruebas bioquímicas de acuerdo a la metodología reportada por Solís (1996), con una variación en el uso de microtubos (Eppendorf®) de 0.25 mL.

En la identificación de bacterias Gram positivas o negativas se empleó el método de Ryus (KOH al 3%). Mientras para la morfología celular se utilizó un microscopio de contraste de fases (40x). La motilidad se estableció mediante la técnica de gota pendiente empleando láminas excavadas de Koch y observación en el microscopio óptico (100x).

Las pruebas bioquímicas aplicadas para la identificación fenotípica fueron: catalasa, oxidasa, caldo nutritivo, metabolismo oxidativo y fermentativo, producción de indol, reacción de Voges-Proskauer, citrato de Simmons, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa y fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, manosa, manitol, sucrosa, gluconato, gluconato y galactosa). Realizándose la lectura cada 24 horas durante 3 días consecutivos.

2.3.1.5. Estimación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC)

Para realizar las pruebas de MIC se requirió preparar soluciones stock de antibióticos. Partiendo de estas soluciones se seleccionaron diferentes rangos, de manera que se pueda determinar la concentración más baja de ambos antibióticos (OTC y FLO) que produjera la completa inhibición del crecimiento visible de bacterias. Las concentraciones ensayadas para ambos fármacos estimaron valores comúnmente usados en medicación, tanto terapéutica como profiláctica en las camaróteras.

En las pruebas de MIC con OTC se preparó una solución stock de 6250 ppm, pesándose 0.3125 g y se los disolvió en 50 mL de medio de cultivo LB. Mientras que para el FLO se preparó una solución stock de 25 ppm, se pesaron 0.00125 g y se disolvió en 50 mL de LB. Las concentraciones usadas de los antibióticos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de antibióticos empleadas en la determinación de MIC

| OTC (ppm) | FLO (ppm) |
|--------------|--------------|
| 5.0E+03 | 5.0E+00 |
| 4.0E+03 | 1.0E+00 |
| 3.0E+03 | 2.0E-01 |
| 2.0E+03 | 4.0E-02 |
| 1.0E+03 | 8.0E-03 |
| 5.0E+02 | 1.6E-03 |
| 1.0E+02 | 3.2E-04 |
| 5.0E+01 | 6.4E-05 |
| 2.5E+01 | 1.3E-05 |
| 5.0E+00 | 2.6E-06 |
| Control + | Control + |
| Control - | Control - |

Las cepas seleccionadas e identificadas se resembraron en TSA, mediante la técnica por agotamiento y al cabo de 12 horas se inocularon en medio líquido LB preparado con agua de mar filtrada ($55 \mu\text{m}$) y esterilizada. A los inóculos se los colocó en fiolas de 50 mL con LB y se dejó en agitación constante durante 8 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, para posteriormente ser diluidos a una concentración de 1 millón de bacterias/pozo, considerándose que en una D.O. existen 1.2×10^9 bacterias/mL. Las lecturas de D.O fueron realizadas por espectrofotometría a 550 nm.

A continuación se procedió a colocar en cada pozo de las microplacas $160 \mu\text{L}$ de medio LB con antibiótico a diferentes concentraciones (tabla 2), agregándose posteriormente $40 \mu\text{L}$ de suspensión bacteriana a la concentración de 1×10^6 . Se incubó a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, y se realizaron las lecturas a las 24 horas y 48 horas. Cada concentración de ambos antibióticos se realizó por triplicado, existiendo un control positivo (medio más bacterias) y un control negativo (medio con antibiótico).

2.3.2. Análisis de OTC y FLO en sedimentos

2.3.2.1. Reactivos y equipos

Los reactivos utilizados para la extracción de OTC y su análisis cromatográfico, se detallan a continuación: acetonitrilo grado HPLC, nitrato de potasio y metanol grado HPLC (E. Merck, Darmstadt, Alemania); n-hexano grado reactivo (Kanto chemical Co., Inc., Japon); ácido cítrico, ácido oxálico dihidratado, ácido nítrico, ácido tricloracético y fosfato ácido disódico grado reactivo (Mallinckrodt Baker, Inc., Kentucky); EDTA disódico dihidratado grado reactivo (E. Merck, Darmstadt, Alemania); solución de amonio 29% (Kanto Chemical Co., Inc., Japón); estándar de oxitetraciclina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Para la extracción de FLO y análisis mediante HPLC se emplearon los reactivos: acetona grado HPLC (Mallinckrodt Baker, Inc., Kentucky); acetonitrilo grado HPLC (E. Merck, Darmstadt, Alemania); cloruro de potasio grado reactivo (Kanto chemical Co., Inc., Japon); estándar de florfenicol (Schering Plough).

La totalidad del agua utilizada en la preparación de soluciones provino de un purificador Milli-Q SP Waters® (agua grado HPLC).

2.3.2.2. Instrumental

La detección de OTC y FLO en sedimentos empleó un sistema de Cromatografía líquida HPLC, constituido por una bomba LC-10AT Shimadzu, inyector manual (50 μ L) Rheodyne 7725i y un detector UV/VIS SPD-6AV Shimadzu. La separación cromatográfica –fase reversa- empleó columnas Shim-Pack CLC-ODS (15 cm x 0.6 cm, d.i.) conectadas en serie

(para el caso de OTC se empleó solo una columna) y mantenidas en un horno CTO-6A Shimadzu. Los cromatogramas y su respectivo análisis cuantitativo se realizaron en un integrador/registrador Shimadzu C-R4A.

2.3.2.3. Soluciones estándares y curva de calibración

Se prepararon soluciones stock de concentración similar ($1 \mu\text{g/mL}$) para los antibióticos OTC y FLO. Para el caso se pesaron 10 mg de antibiótico en balanza analítica llevándose a un volumen de 10 mL con la respectiva fase móvil. A partir de esta solución se preparó el stock mediante dilución de $10 \mu\text{L}$ de la misma en 10 mL de fase móvil. El stock obtenido se usó para preparar las diluciones estándares que sirvieron para elaborar la respectiva curva de calibración. La evaluación de la linealidad entre la concentración de los analitos y la respuesta del detector se realizó entre los rangos de 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15 ng/mL. Cada punto fue preparado por triplicado.

Experimentos previos de HPLC estimaron los parámetros de validación de los métodos empleados para la determinación de OTC y FLO en sedimentos. Se identificó la no presencia de picos endógenos en el área del cromatograma en la cual las drogas aparecen. Las curvas de calibración referencial para OTC y FLO fueron preparadas utilizando sedimento homogeneizado (control negativo) suplementado con concentraciones conocidas de los antibióticos en el rango de 31.2 a 500 ng de antibiótico por gramo de sedimento. También se realizaron ensayos por sextuplicado para estimar los valores de recuperación de concentraciones conocidas (250 y 125 ppb) mediante el método de *spike*.

2.3.2.4. Determinación de OTC vía HPLC

El método aplicado para la estimación de OTC en sedimentos es una modificación de los métodos descritos por Samuelsen (1989) y Pouliquen *et al.* (1992).

Las muestras de sedimento mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron descongeladas a temperatura ambiente y homogeneizadas, previo a su extracción.

Se pesó aproximadamente 1 g de sedimento (peso húmedo) en tubos de centrifuga, adicionándose 100 mg de EDTA- Na_2 . La OTC fue extraída mediante 3 lavados con la solución de extracción McIlvaine (4, 4 y 2 mL). Durante los lavados el procedimiento incluyó la homogeneización de la muestra mediante agitación mecánica (30 s) y sonicación por 5 min en baño frío. La muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes se colectaron en un nuevo tubo de centrifuga, donde se realizaron 2 lavados con 5 mL de n-hexano, para extraer cualquier residuo lipídico.

Luego de centrifugar, la fase orgánica fue descartada con pipetas Pasteur y la fase inorgánica filtrada a través de un cartucho Sep-Pack C18 (pre-activado). Luego de aplicar 3 lavados con agua, la OTC retenida en los cartuchos fue recuperada mediante 2 lavados (10 mL) de metanol, rotaevaporada la muestra a sequedad y refluada con nitrógeno, siendo esta finalmente rediluida con 1 mL de fase móvil, pasada a través de un filtro de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ y colocada en un vial color ámbar rotulado. De este extracto se inyectaron $50\text{ }\mu\text{L}$ en el sistema HPLC.

El sistema de cromatografía líquida utilizó la fase móvil compuesta de acetonitrilo : agua grado HPLC (14:86, v/v), conteniendo 0.001 M EDTA- Na_2 , 0.1 M de nitrato de potasio, ajustando esta preparación a pH 3.2 mediante ácido nítrico 0.1 M. Esta fase móvil fue

filtrada ($0.45 \mu\text{m}$) y desgasificada mediante sonicación. La detección realizada a 365 nm y a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min (93 Kg/cm^2).

2.3.2.5. Determinación de florfenicol (FLO) vía HPLC

La determinación de FLO en sedimentos estimó una modificación al método desarrollado por Hormazabal *et al.* (1996). Se adaptaron condiciones operativas diferentes a las descritas por otros métodos al sistema HPLC para determinar FLO.

Las muestras fueron descongeladas y temperadas al ambiente, homogeneizadas, previas a la extracción.

Se pesaron aproximadamente 2 g de sedimento (peso húmedo) en tubos de centrifuga de 50 mL , se adiciona 1 mL de agua grado HPLC y 3 mL de acetona. Se sonicaron las muestras durante 5 min (2 veces), dejando que la acetona entre en contacto con la muestra por un tiempo de 10 min . Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se descartaron los precipitados, siendo previamente el líquido sobrenadante trasvasado a tubos limpios para centrifuga de 25 mL , se adicionaron 3 mL de Cloruro de potasio y 3 mL de Diclorometano para eliminar cualquier tipo de residuo no deseado. Las muestras fueron homogeneizadas mediante agitación mecánicamente (30 s) y colocadas en la centrifuga durante 5 min a 15000 rpm ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). La fase inorgánica fue descartada y la capa inferior colocada en balones de 50 mL , rotaevaporada y refluja con nitrógeno. Finalmente las muestras fueron rediluidas con 2 mL de fase móvil, sonicadas por 10 s , filtradas ($0.22 \mu\text{m}$) e inyectadas alícuotas de $50 \mu\text{L}$ al sistema HPLC.

Para FLO el sistema cromatográfico empleó una fase móvil compuesta por agua grado HPLC : acetonitrilo (80:20, v/v), previamente filtrada (0.45 μm) y desgasificada. La detección de este analito fue realizada a una longitud de onda de 224 nm con una velocidad de flujo de 1.3 mL/min (93-95 Kgf/cm²).

2.3. INGRESO DE DATOS

Para la tabulación de datos en los contajes bacterianos (UFC/g de suelo) se realizó transformación logarítmica con base 10. Mientras que los valores de concentración de antibiótico presente en sedimento fueron cuantificados mediante la aplicación de métodos estándares en la preparación de las muestras y en el volumen de muestra inyectada, permitiendo que valores de cuentas de área de los cromatogramas de muestras con sedimento puedan ser directamente comparados a los obtenidos de las curvas de calibración.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos durante la realización de la investigación fueron analizados mediante Análisis de varianza (ANOVA, Software Data Desk), asumiendo un nivel de confianza del 95%. La identificación de diferencias significativas entre las poblaciones bacterianas, tanto para cada una de las partes de las piscinas (OTC), así como el tratamiento con FLO *versus* control se realizó utilizando Scheffe's test. El test de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett, en su orden fueron empleados para determinar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas (Statistica 4.3).

3. RESULTADOS

3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

Establecidas las condiciones operacionales para el análisis de antibióticos, se elaboraron las respectivas curvas de calibración para OTC y FLO por dilución de estándares en fase móvil y mediante el método de “*spike*”. Las gráficas de calibración, tomadas como cuentas de área *versus* concentración del antibiótico diluido en fase móvil, mostraron una elevada respuesta lineal dentro de los rangos estudiados (0.02 - 0.50 ppm): $r^2 = 0.9994$ ($y = 4 \times 10^{-5} (x) + 0.0058$) para OTC y $r^2 = 0.9979$ ($y = 3 \times 10^{-5} (x) - 0.0099$) para FLO.

La estimación de las curvas de calibración (OTC/FLO) mediante el método de “*spike*” también demostró valores elevados de correlación lineal: $r^2_{\text{OTC}} = 0.9897$ y $r^2_{\text{FLO}} = 0.9963$. La cuantificación de OTC y FLO en los sedimentos de este estudio utilizó las ecuaciones de regresión lineal obtenidas a partir de este procedimiento de calibración ($y_{\text{OTC}} = 1 \times 10^{-4} (x) + 0.0163$; $y_{\text{FLO}} = 2 \times 10^{-5} (x) - 0.0063$).

El límite de cuantificación establecido para ambos antibióticos fue de 0.02 ppm, mientras que los límites de detección, estimados a partir de la capacidad del bucle (50 μL) que define el volumen de muestra inyectada en el HPLC, arrojaron valores de 1.6 y 0.8 ng para OTC y FLO respectivamente. Los porcentajes de recuperación obtenidos para OTC estuvieron en un promedio de $65.2 \pm 6.2\%$ (n=6) mientras que para FLO los valores fueron de $94.5 \pm 5.7\%$ (n=6).

3.2. DESARROLLO DEL CULTIVO

Los valores promedio de los parámetros abióticos obtenidos durante el ensayo *in situ* para la OTC son resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Valores promedio (\pm desviación estándar) de parámetros abióticos obtenidos en las piscinas P1 y P2 durante el experimento con OTC (n=10)

| Piscinas | Oxígeno (mg/L) | Temperatura (°C) | Salinidad (ups) | pH | Turbidez (cm) |
|----------|-------------------|---------------------|--------------------|-------------|------------------|
| P1 | 5.8 (1.4) a | 29.9 (1.1) a | 19.3 (4.8) a | 8.5 (0.1) b | 66.6 (7.2) b |
| P2 | 5.3 (1.1) a | 29.5 (0.9) a | 18.8 (3.5) a | 8.3 (0.3) a | 61.2 (3.6) a |

Letras iguales en una misma columna no son diferentes estadísticamente ($P>0.05$).

Durante los 42 días de ensayo en ambas piscinas se mantuvieron niveles similares de oxígeno, temperatura y salinidad. Las variaciones de pH y mediciones de turbidez fueron distintas en ambas piscinas. Siendo estos valores significativamente mayores en la piscina P1.

Al final del período del cultivo (111 días) la supervivencia en las piscinas de estudio fueron bajas, 21 y 24% para P1 y P2 respectivamente. Los animales tuvieron un peso promedio final de 14.5 (\pm 0.6) g. La biomasa promedio final de camarón en ambas piscinas fue de 26.5 (\pm 0.2) Kg/ha, reflejando la baja densidad que operó la camaronera. Es importante mencionar que durante el desarrollo de este experimento no se realizaron recambios de agua por disminución de oxígeno en el cultivo durante el período de muestreo.

El protocolo de desarrollo del bioensayo con FLO se mantuvo sin mayores cambios. Sin embargo debido a precipitaciones durante el ensayo se realizó un ajuste del valor de salinidad en cada uno de los tanques (reemplazo de agua), transcurridos 6 días posteriores al término del tratamiento terapéutico.

Los parámetros abióticos medidos durante los 31 días de duración del experimento con FLO, se detallan en la tabla 4. Estos parámetros no mostraron diferencias significativas entre los tanques tratamiento y control.

Tabla 4. Valores promedio (\pm desviación estándar) de los parámetros abióticos obtenidos en los tanques control y tratamiento durante el bioensayo con FLO (n=12)

| Tanques | Oxígeno (mg/L) | Temperatura (°C) | Salinidad (ups) | pH |
|-------------|-------------------|---------------------|--------------------|-------------|
| Control | 5.5 (0.7) a | 28.7 (3.1) a | 24 (4.3) a | 8.3 (0.2) a |
| Tratamiento | 5.5 (0.7) a | 28.4 (1.7) a | 25 (4.4) a | 8.3 (0.2) a |

Letras iguales en una misma columna no son diferentes estadísticamente ($P>0.05$)

El parámetro de mayor variación a lo largo del cultivo fue la salinidad (valor inicial de 35 ups), sin embargo este parámetro cambió en todos los tanques y las altas variaciones observadas se presentaron por las continuas precipitaciones durante los días de experimentación.

Los porcentajes de supervivencia obtenidos en los tanques control y tratamiento con FLO fueron altos y estadísticamente no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$). En ambos casos, la supervivencia promedio fue del 98%. Los resultados de biomasa final e incremento de biomasa mostrados en la tabla 5, tampoco revelan diferencias significativas ($P>0.05$) entre las biomásas ganadas de los camarones alimentados con dieta CENAIM 40 (control) y los animales que recibieron la dieta tratamiento medicada.

Tabla 5. Valores promedio (\pm desviación estándar) de parámetros biométricos durante el bioensayo con FLO (32 días)

| Determinaciones | Control | Tratamiento |
|---------------------------|-------------------|-------------------|
| Peso promedio inicial (g) | 3.9 \pm 0.4 | 3.9 \pm 0.3 |
| Peso promedio final (g) | 8.3 \pm 0.4 a | 8.3 \pm 0.3 a |
| Biomasa inicial (g) | 58.6 \pm 0.5 | 58.4 \pm 1.8 |
| Biomasa final (g) | 122.3 \pm 4.9 a | 122.1 \pm 4.6 a |
| Incremento de biomasa (g) | 63.7 a | 63.7 a |

Letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($P>0.05$)

3.3. RESIDUALIDAD DE ANTIBIÓTICOS

3.3.1. Oxitetraciclina

La cantidad total de droga distribuida al sistema durante los 7 días de medicación fue de 156 g/piscina. Esta cantidad de OTC mostró una distribución acumulativa, desde la entrada hacia la parte media y salida de la piscina.

En P1 (Fig. 3) donde se detectó OTC a partir del primer día de medicación, los valores estimados acumulativos de distribución por zonas de la piscina fueron: 1.03 ppm (E), 0.85 ppm (M) y 2.10 ppm (S).

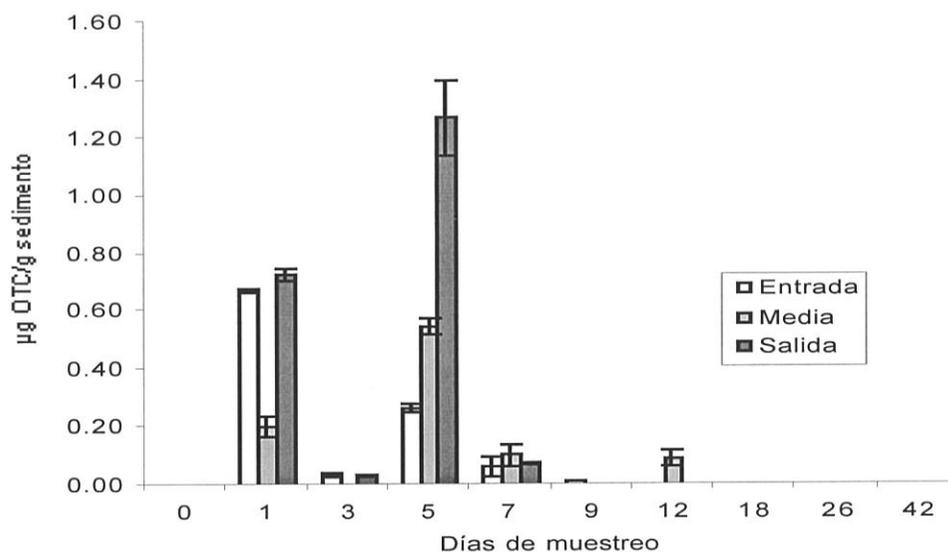


Figura 3. Acumulación y eliminación de OTC durante el período de muestreo en la piscina P1. Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=2).

Esta piscina muestra un descenso en los valores de acumulación del agente durante el tratamiento, encontrándose al tercer día cantidades trazas de OTC (0.03 ppm). Siguiendo la distribución anotada, al quinto día de medicación se presentó un incremento de OTC, detectándose en este día la concentración más elevada de la droga (1.27 ppm). Durante el último día de medicación (día 7) se cuantificaron niveles

cercanos al límite de determinación del método (0.02 ppm), reflejando una baja residualidad de la OTC en sedimento de piscinas camaroneras. Hasta el duodécimo día de muestreo se estimaron cantidades trazas en el rango de 0.03 a 0.09 ppm. Durante los días subsiguientes las concentraciones de OTC se mantuvieron por debajo del límite de detección del método (1.6 ng). Durante los días en que la OTC fue detectada en el sedimento de P1, los niveles acumulados por sectores de la piscina, fueron distintos. El primer día de medicación las concentraciones fueron mayores en la parte de salida con respecto a las áreas intermedias y de entrada. Este patrón fue observado de manera similar durante el quinto de medicación en las 3 áreas.

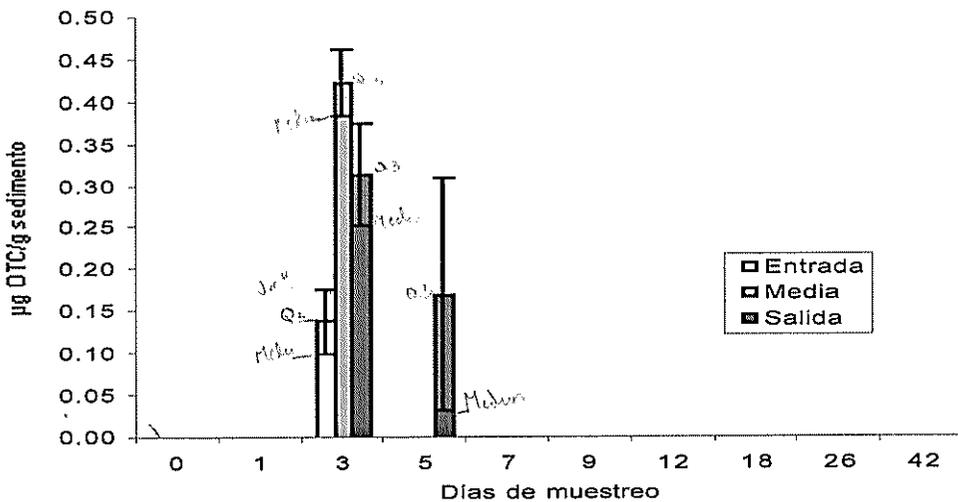


Figura 4. Acumulación y eliminación de OTC durante el período de muestreo en la piscina P2. Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=2).

A diferencia de lo encontrado en P1, la piscina P2 mostró valores menores de acumulación de la droga (Fig. 4) aunque también una rápida eliminación del fármaco, inclusive durante el tratamiento. Al tercer día de acumulación, se detectaron las concentraciones pico de OTC a lo largo del muestreo, siendo la parte media la de mayor concentración (0.42 ppm). A pesar de continuar con el tratamiento medicado, en los días posteriores los niveles de OTC decayeron a las 48 horas de tomarse la muestra en

el día 3. Niveles de 0.17 ppm se reportaron durante el quinto día, mas al séptimo día no se hallaron residuos de OTC en el sedimento. Exceptuando el día 12, los días subsiguientes mantuvieron esta característica; la OTC no fue detectada en el sedimento. Al igual que lo estimado en P1, en esta piscina el ingreso de OTC al sistema fue detectado en forma acumulativa, estimándose valores promedios de: 0.14 ppm (E), 0.42 ppm (M) y 0.49 ppm (S) y observándose diferencias en la distribución espacial del agente. En el tercer día de medicación, las áreas de la piscina P2 mostraron diferentes niveles de concentración, siendo la parte M la de mayor acumulación de la droga en este día. Durante el quinto día, la OTC se distribuyó de manera distinta entre las partes E-M y S; en este día los sectores E y M presentaron valores cercanos al límite de detección del sistema.

En general, las concentraciones de OTC halladas en los sedimentos de las piscinas de este estudio (42 días) fueron bajas y significativamente distintas ($P < 0.05$) entre sí. Siendo P1 la de mayor acumulación con un total reportado de 3.98 ppm de OTC frente a 1.05 ppm para P2. En P1 se lograron estimar concentraciones promedios de 0.03 a 0.69 ppm de OTC, mientras que en P2 valores de 0.07 a 0.29 ppm fueron detectados.

Al final del tratamiento ambas piscinas demostraron una mayor acumulación promedio del antibiótico en el sector S de la piscina. Este valor en P1 (2.10ppm) fue 4 veces superior al estimado para P2 (0.49 ppm) en el mismo sector de la piscina. Niveles de residualidad por debajo del límite de detección del método, inclusive durante el período de tratamiento, fueron hallados para ambas piscinas. En P1, estos valores se presentaron luego del duodécimo día de muestreo, mientras que en P2 existió una mayor variabilidad de las concentraciones, presentándose cantidades no detectables de OTC durante el primer y a partir del séptimo día de acumulación.

3.3.2. Florfenicol

La figura 5 muestra el comportamiento del agente terapéutico en la capa de sedimento (2 cm) durante el tiempo de experimentación. Las concentraciones de FLO durante el período de medicación promediaron (n=3) niveles de 0.02 a 0.08 ppm. El valor máximo de concentración del antibiótico en sedimento se detectó el último día de medicación (7^{mo}), correspondiente a 0.10 ppm.

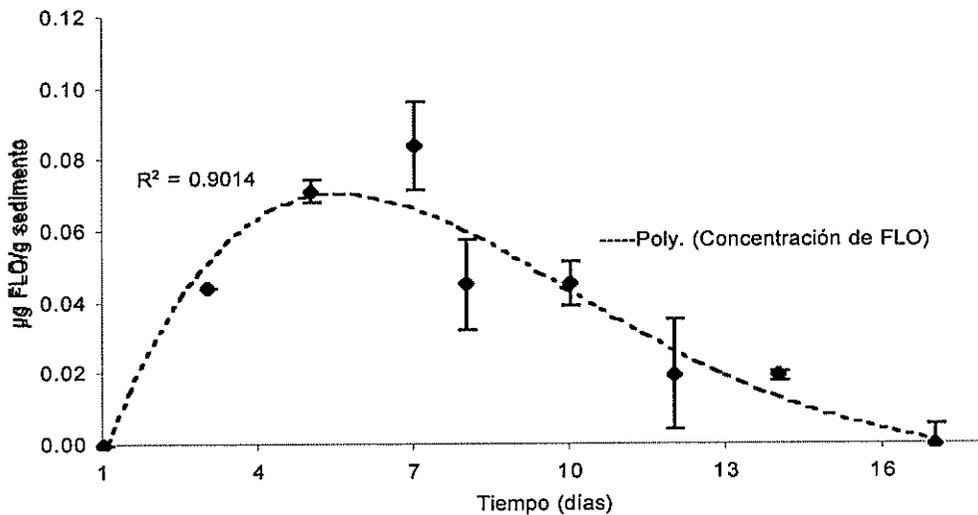


Figura 5. Persistencia de FLO en el sedimento de los tanques de tratamiento. Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=3).

Una rápida y sostenida acumulación del antibiótico se observó durante los primeros días del bioensayo. La curva polinomial (4^{to} orden) usada para explicar la persistencia de la droga, muestra al séptimo día de medicación un pico máximo de acumulación con valores promedio de 0.10 ppm.

Luego de suspender el suministro de alimento con FLO, un total de 7 días fueron necesarios para estimar niveles residuales por debajo del límite de detección (0.8 ng) del método. Al octavo día de seguimiento del agente, este se mantuvo en niveles promedio de 0.05 ppm hasta los días de muestreo duodécimo y décimo cuarto.

Adicionalmente, un tiempo de vida medio de 5 días fue determinado para el FLO (Fig. 6) a partir de las concentraciones del fármaco y los días en que este fue detectado en el sedimento (Jacobsen y Berglind 1988).

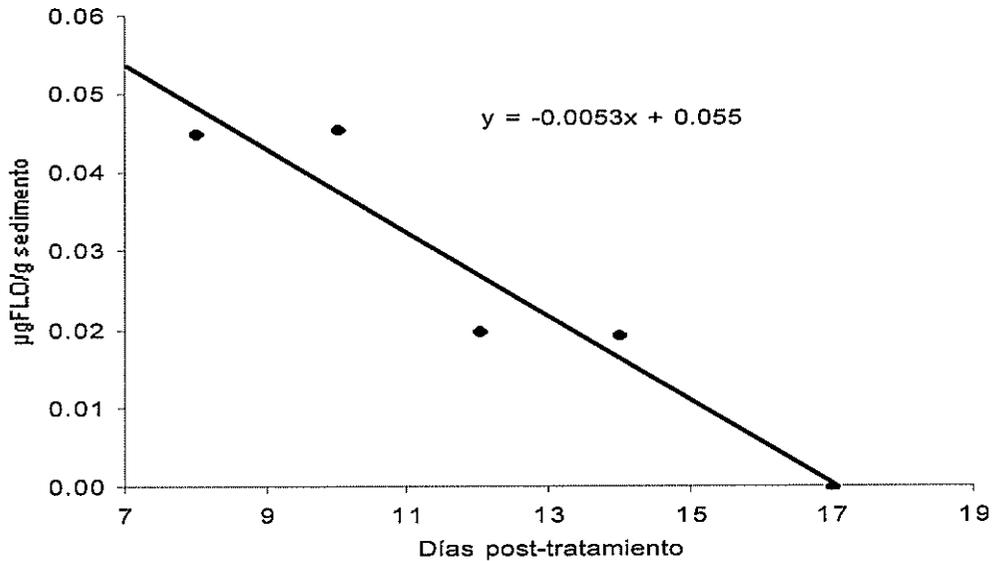


Figura 6. Concentración de FLO *versus* tiempo de permanencia en el sedimento durante el ensayo. Scatter plot y regresión lineal calculada. Tiempo medio de vida estimado: 5 días

Similar a investigaciones precedentes, el análisis cromatográfico de este estudio identificó la presencia de concentraciones elevadas de un metabolito del FLO. El FLO-amina fue cuantificado junto al FLO mostrando una concentración variable y de mayor residualidad a lo largo del período de muestreo. La incidencia de este metabolito en el sedimento se representa en la figura 7.

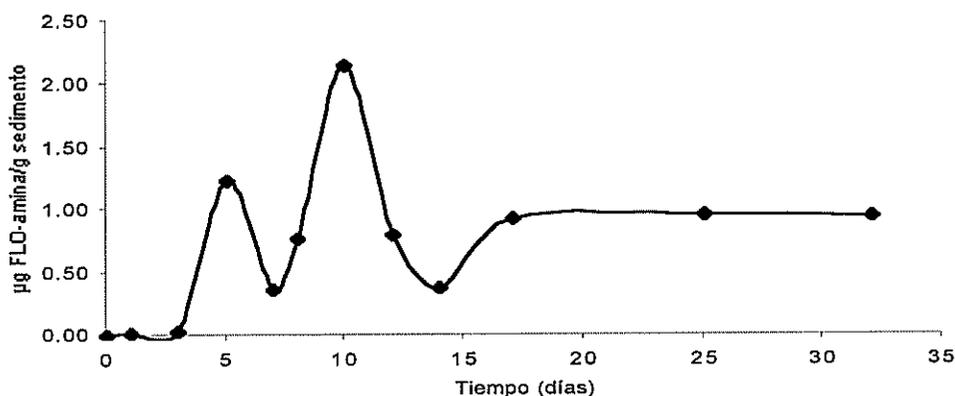


Figura 7. Persistencia de FLO-amina en sedimentos de piscinas camaroneras luego de un período de medicación con FLO.

La gráfica muestra que a partir del quinto día de medicación con FLO, se detecta un pico igual a 1.24 ppm de FLO-amina. Observándose un descenso en la acumulación del metabolito al séptimo día (0.36 ppm), alcanzando un pico máximo de concentración al décimo día de muestreo (2.16 ppm). Los días subsiguientes denotan fluctuaciones de los valores de concentración, estabilizándose hasta el final del bioensayo en valores promedios de 0.93 a 0.95 ppm.

3.4. IMPACTO SOBRE LA MICROFLORA

3.4.1. Oxitetraciclina

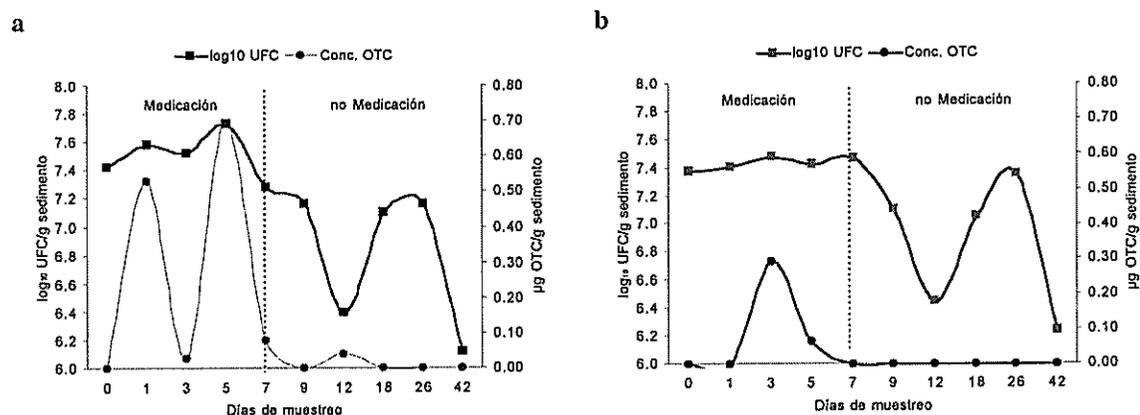


Figura 8. Relación entre los promedios de las poblaciones de bacterias totales expresadas en función de log₁₀ y la concentración de OTC en sedimento de Piscina P1 (a) y Piscina P2 (b).

La figura 8 muestra el comportamiento de las poblaciones bacterianas presentes en el sedimento de las piscinas P1 y P2 *versus* las concentraciones promedios de OTC hallada en ambas piscinas. Los contajes iniciales y finales de bacterias totales en ambas piscinas no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre sí. Los niveles promedios de las poblaciones bacterianas durante el período de medicación se mantuvieron en valores de 3.6×10^7 y 2.8×10^7 UFC/g de sedimento para P1 y P2, respectivamente.

La mayor carga bacteriana estuvo presente en la parte baja de las piscinas. No obstante, el análisis estadístico entre contaje de bacterias totales a nivel de lugar (E, M y S) y entre las piscinas (P1 y P2) no estimó diferencias significativas ($P>0.05$).

Cabe indicar que, si bien en los días posteriores a la medicación se aprecia una disminución significativa en la población bacteriana total, este efecto fue producto de la adición de formazin y de furazolidona en el día E1. En su orden este desinfectante y antibiótico fueron utilizados con el propósito de bajar la carga bacteriana del suelo, y no estaban relacionados con el objetivo de nuestro estudio. Los niveles promedios de las poblaciones bacterianas en este lapso de tiempo presentaron valores de 9.5×10^6 (P1) y de 1.1×10^7 (P2) UFC/g de sedimento. Existiendo en este período (Día 8 a 42) un descenso significativo ($P<0.05$) en las poblaciones bacterianas, sin embargo, de forma similar al período de medicación, los niveles de bacterias totales por áreas entre piscinas no presentaron diferencia estadística ($P>0.05$).

Las estimaciones de colonias de vibrios muestran resultados que estuvieron en rangos comprendidos de 1.0×10^3 a 2.2×10^5 UFC/g de sedimento y de 1.0×10^3 a 5.5×10^5 UFC/g de sedimento en P1 y en P2, respectivamente. Encontrándose diferencia significativa ($P<0.05$) entre la población inicial y final; pero no entre los lugares

muestreados entre piscinas. En la figura 9 se observa el comportamiento de ambas piscinas con respecto a la carga de vibrios.

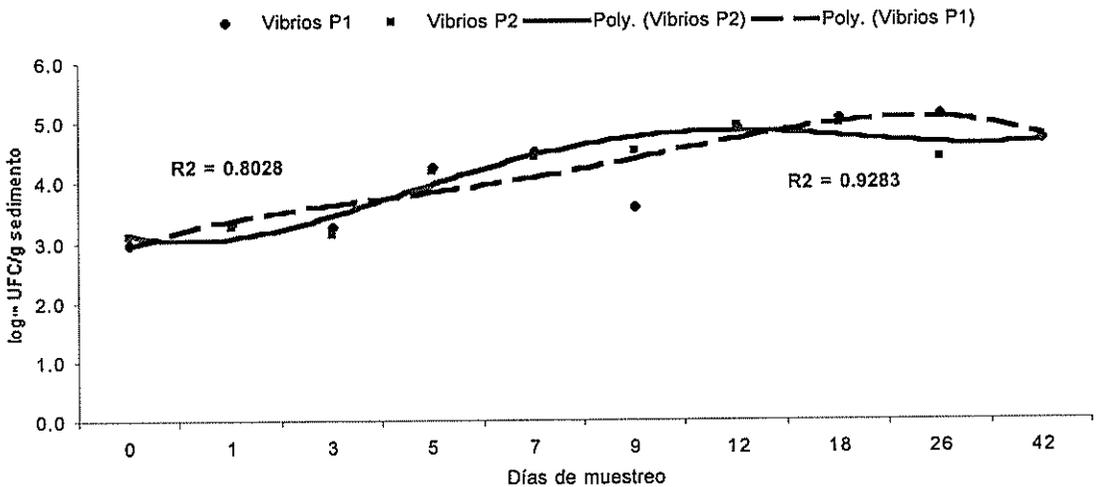


Figura 9. Promedio de vibrios totales expresados en \log_{10} hallados en el sedimento de las piscinas P1 y P2.

Las curvas de relación polinomial de ambas piscinas describen un ligero incremento en el tiempo, de la población total de vibrios. Estas poblaciones, a diferencia del contaje bacteriano total, no fueron afectados por la adición de formazina y furazolidona en ambas piscinas durante el cultivo.

En el período de investigación, un total de 39 cepas bacterianas fueron aisladas del sedimento para ambas piscinas. Seleccionándose 5 cepas por su número, frecuencia y persistencia durante la medicación, para las pruebas bioquímicas de identificación y concentración mínima inhibitoria (MIC).

Las bacterias identificadas que correspondieron al género *Vibrio* fueron clasificadas en tres especies: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, todas Gram-negativas al igual que el género *Aeromonas*, también identificado; solo una bacteria fue Gram-positiva y perteneció al género *Staphylococcus*.

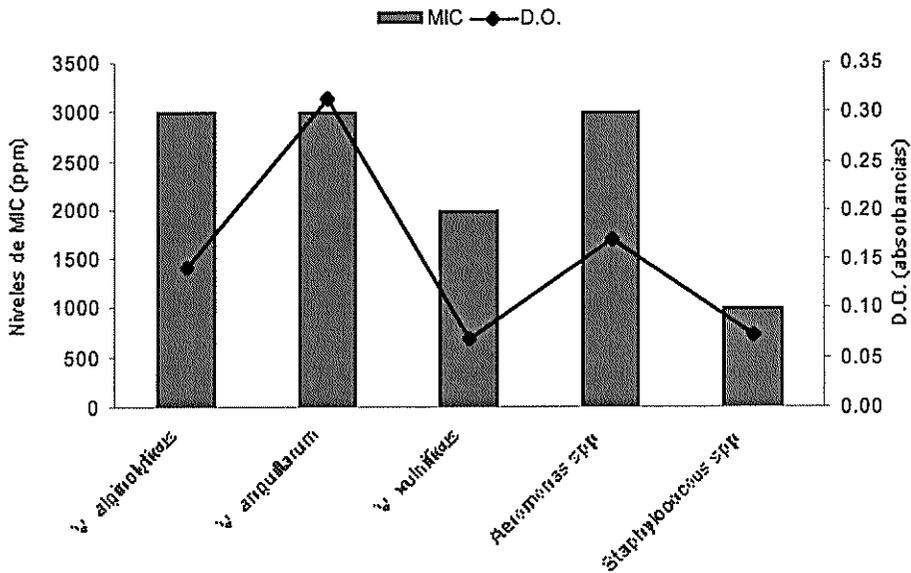


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de OTC y su relación con las densidades ópticas (D.O.) frente a las bacterias aisladas de las piscinas P1 y P2.

Las bacterias seleccionadas presentaron niveles elevados de inhibición (Fig. 10). Las especies *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* y *Aeromonas spp.*, mostraron inhibición de su crecimiento a los 3000 ppm de concentración de OTC, mientras que *Staphylococcus spp.* y *V. vulnificus* se inhibieron a niveles de 1000 y 2000 ppm, respectivamente. Por debajo de estas concentraciones, las bacterias fueron consideradas resistentes frente a la acción del antibiótico utilizado.

El criterio de densidad óptica (D.O.) se utilizó para estimar la actividad bactericida y/o bacteriostática de la droga. Valores de D.O. menores a 0.1 se consideraron como efecto bactericida, mientras que lecturas superiores a 0.1 fueron interpretadas como efecto bacteriostático (modificado de Spanggaard *et al.* 1993). Hasta las 48 horas de lectura, los valores de D.O. indicaron que la OTC fue bacteriostática para *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas spp.* (0.14, 0.32 y 0.17, respectivamente). La OTC presentó un efecto bactericida para *V. vulnificus* (0.07) y *Staphylococcus spp.* (0.08).

3.4.2. Florfenicol

La figura 11 muestra el comportamiento de las poblaciones bacterianas totales en el sedimento de los tanques medicados con FLO y control. Las poblaciones bacterianas en los tanques tratamiento variaron significativamente ($P < 0.05$) en número durante los períodos de tratamiento y residualidad de la droga con respecto a la población de los tanques control. La población de bacterias totales en los tanques control presentó rangos de $3.5 \times 10^7 - 1.1 \times 10^8$ UFC/g de sedimento comparados a los valores reportados de $2.0 \times 10^7 - 6.9 \times 10^7$ UFC/g de sedimento durante el tratamiento con FLO.

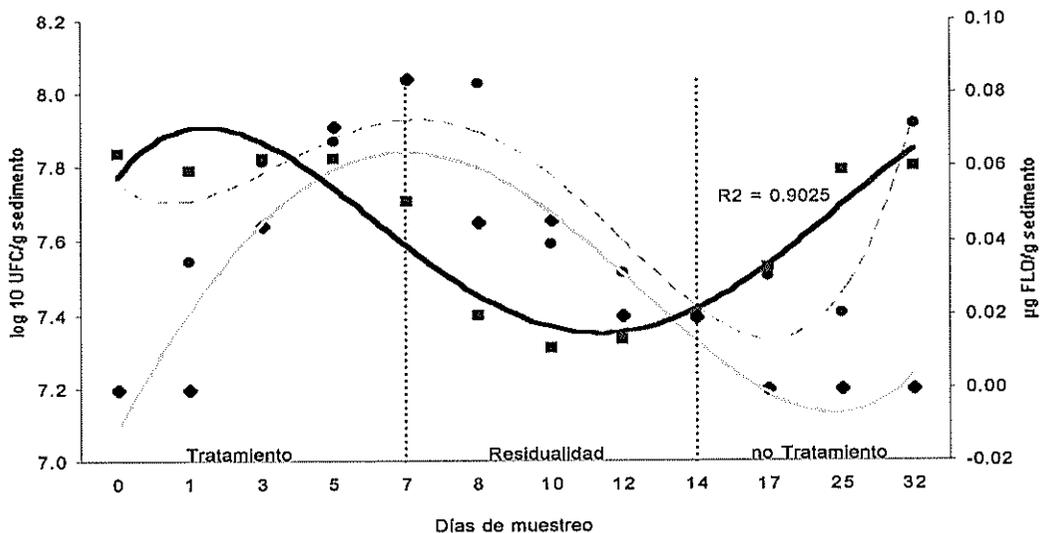


Figura 11. Comportamiento de la población bacteriana total presentes en sedimentos de tanques medicados con FLO y control. ● = Promedio de log UFC/g de sedimento (Control); ■ = Promedio de log UFC/g de sedimento (FLO); ◆ = Valores promedio de concentración de FLO en sedimento. Las líneas entrecortada, continua y punteada, en su orden representan las curvas de tendencia polinomial para cada uno de los datos anteriormente anotados.

Previo a la medicación, las poblaciones bacterianas de los tanques FLO y control no presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre sí. Al comienzo del tratamiento, durante el proceso de acumulación de la droga en el sedimento, no se observó un efecto aparente del FLO sobre la población bacteriana (Fig. 11). A partir del séptimo día de

medicación la población bacteriana decrece, cuantificando valores promedios de 5.1×10^7 UFC/g de suelo. Este efecto se mantiene durante los días de residualidad de la droga, alcanzándose al décimo día niveles promedio de 2.0×10^7 UFC/g de sedimento, valor que fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) de la población inicial (Día 0). Este comportamiento se prolonga hasta el día décimo cuarto (2.5×10^7 UFC/g de sedimento), día a partir del cual la microflora, producto de la eliminación del FLO en el sedimento, comienza nuevamente a repoblarse en el suelo. Las bacterias al final del ensayo tuvieron niveles (6.3×10^7 UFC/g de sedimento) estadísticamente no significativos ($P > 0.05$) con respecto a los valores iniciales de bacterias.

Al igual que en la población de bacterias totales, el FLO también redujo significativamente ($P < 0.05$) la población de vibrios en el sedimento durante el período de medicación. La figura 12 muestra las curvas de tendencia polinomial (4^{to} orden) y el grado de ajuste de los datos para las poblaciones de vibrios en tanques medicados y control durante el período de muestreo.

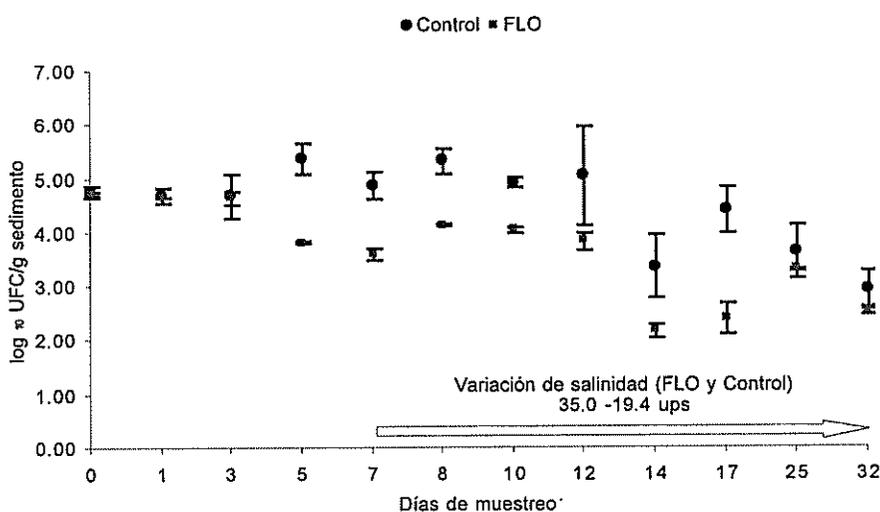


Figura 12. Comportamiento de los vibrios presentes en el tratamiento con FLO y control a lo largo del período de muestreo. Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=3).

Al comienzo del ensayo, las poblaciones de vibrios no fueron estadísticamente diferentes ($P>0.05$) en su carga bacteriana. A partir del quinto día de medicación los vibrios decrecieron significativamente ($P<0.05$) en los tanques que recibieron el tratamiento con FLO con respecto a los del control; reportándose al final de la medicación valores de 4.2×10^3 UFC/g y 7.6×10^4 UFC/g de suelo para los tanques tratamiento y control, respectivamente. La gráfica muestra un patrón paralelo de disminución que se presentó durante parte del período de tratamiento y residualidad. Cabe destacar que a partir del último día de medicación, los valores de salinidad registraron una mayor variación, como efecto de las continuas precipitaciones e incidieron de forma similar en los tanques control y tratamiento. A partir del día 25 y hasta el final del bioensayo, no existió diferencia significativa ($P>0.05$) entre la población de vibrios de los tanques tratamiento y control. Observándose en esta parte del muestreo una disminución de las colonias en forma simultánea, los contajes estimados fueron de 3.5×10^2 y 8.5×10^2 UFC/g de suelo para FLO y control, respectivamente.

Del total de 37 cepas bacterianas aisladas a lo largo del tratamiento, las pruebas bioquímicas y de MIC se aplicaron a 7 de estas cepas, seleccionadas con el mismo criterio enunciado para OTC.

Las pruebas bioquímicas identificaron 4 bacterias Gram-negativas, tres pertenecientes al género *Vibrio*: *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. pelagius*., y una cuarta identificada como del género *Aeromonas*. Las 3 bacterias restantes fueron Gram-positivas: *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp. y *Micrococcus roseus*. El aislamiento de ésta última bacteria requirió de la preparación de Agar marino enriquecido con músculo de camarón y medio LB (modificado de Calero 1996).

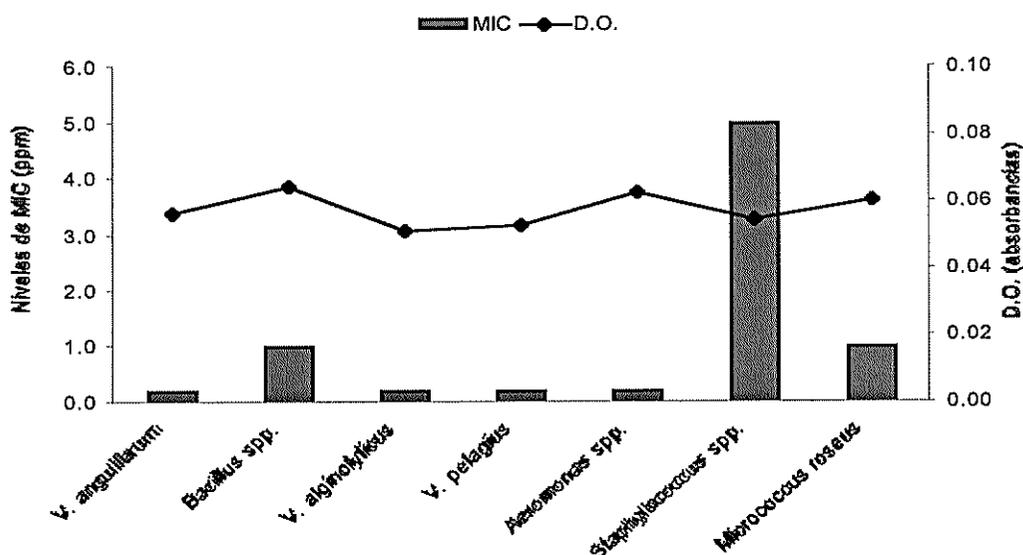


Figura 13. Concentraciones mínimas inhibitorias de las bacterias identificadas en el tratamiento con FLO.

Las bacterias seleccionadas presentaron niveles de MIC inferiores a 1 ppm (Fig. 13), exceptuando al género *Staphylococcus*, y rangos de absorbancia entre 0.05 a 0.07 para todas las bacterias. Las pruebas de MIC mostraron que las bacterias Gram-negativas inhibieron su crecimiento a valores de 0.2 ppm de FLO, mientras las bacterias Gram-positivas presentaron valores de inhibición de 1 ppm para *Bacillus spp.* y *Micrococcus roseus*, mientras que 5 ppm de FLO fueron requeridos para inhibir *Staphylococcus spp.* Los valores de D.O. menores a 0.1 obtenidos en todos los vibrios, indicaron que el antibiótico ejerció una acción bactericida sobre la totalidad de las cepas bacterianas.

4. DISCUSIÓN

Coyne *et al.* (1994) reportan la ausencia de OTC a partir de los 10 cm de capa de sedimento. Weston *et al.* (1994) en un estudio similar cuantifican una mayor concentración de OTC por debajo de los 2 cm de sedimento en jaulas de granjas piscícolas, una vez transcurrido el período de medicación. La estimación de los residuos de OTC en los primeros 5 cm de capa de sedimento de este estudio se fundamentó en los criterios anotados. Sin embargo, cabe destacar que la cuantificación vertical del agente con intervalos menores a 5 cm de profundidad, pudo significar la detección de una mayor cantidad de OTC, como lo reportan los diferentes estudios de distribución vertical de residuos de antibióticos en sedimento (Weston *et al.* 1994; Hektoen *et al.* 1995; Capone *et al.* 1996).

Durante el período de medicación con OTC, niveles acumulativos promedios de 3.98 (P1) y 1.05 ppm (P2) se cuantificaron en las piscinas medicadas. Smith (1996), en su revisión de residuos de OTC en sedimentos de granjas piscícolas, establece rangos promedios de acumulación entre valores de 0.1 a 10.9 ppm. Comparados con este reporte los promedios de acumulación aquí establecidos mantienen relación con los niveles encontrados en sedimentos de granjas piscícolas. El cálculo de los porcentajes de deposición de la droga, basados en la cantidad promedio de ingreso (0.5 Kg - 35 Kg vs 0.16 Kg piscícolas y camarones, respectivamente) y su acumulación en ambos sistemas, muestran valores de deposición inferiores al 1% para cada uno de los sistemas, demostrándose de esta forma la ausencia de diferencias en la acumulación de la droga, entre los sistemas comparados.

Los resultados del experimento “*in situ*” claramente revelan diferencias en la concentración y distribución espacial de la OTC entre piscinas. Las diferencias en los niveles de acumulación observados entre piscinas, a nuestro criterio podrían ser el reflejo de parámetros no determinados en este estudio. A saber, la composición del suelo cuya carga orgánica y/o niveles de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) actúan como factores quelantes o inactivadores de la droga (Vaughan y Smith 1996; Smith 1996); los procesos combinados de velocidad de sedimentación y lixiviación del fármaco hacia capas inferiores del sedimento (Le Bris *et al.* 1995); procesos no consideradas en el protocolo de muestreo de este estudio, podrían en mayor o menor grado explicar las diferencias en los niveles de OTC reportados entre piscinas.

Smith *et al.* (1994) y Kerry *et al.* (1996) en sus observaciones al estudio de Samuelsen *et al.* (1992) referente a su reporte de niveles de OTC ($>300 \mu\text{g}$ de OTC/g de sedimento) en sedimentos piscícolas, enuncian que un criterio básico en la estimación de estos valores, es el control de la medicación, artefacto que puede originar concentraciones anormales en este tipo de estudios. Las variaciones observadas durante los procesos de acumulación del fármaco en ambas piscinas podrían explicarse por una heterogeneidad en el protocolo de distribución del alimento. Es importante mencionar que durante el desarrollo de este experimento no hubo control directo de este proceso lo que pudo incidir en las variaciones de concentración estimadas.

Las figuras 3 y 4 muestran la distribución espacial del agente, la misma que no fue uniforme para cada una de las áreas de las piscinas, presentando diferencias entre las partes E, M y S durante los días en que la OTC fue detectada. Estudios previos han reportado una

distribución hacia las partes centrales de las piscinas por acción del viento o ligeras corrientes de agua (Coyne *et al.* 1994; Kerry *et al.* 1996), este efecto bien pudo incidir en las cantidades de OTC reportadas para los sectores de las piscinas de este estudio.

En ambas piscinas las mayores concentraciones de OTC durante el experimento se distribuyeron preferentemente en el sector S, a nuestro criterio como un posible efecto de la pendiente y su incidencia en el movimiento de partículas en la parte bentónica de las piscinas. Las variaciones observadas podrían también explicarse por la geometría propia de las piscinas. La piscina P1 presentó áreas uniformes (80 m de ancho c/u) en comparación con P2 (E = 25 m; M = 80 m y S = 50 m de ancho) cuyas áreas fueron heterogéneas una de otra. Estas variaciones, en el caso de la piscina P2 habrían originado un desplazamiento del antibiótico hacia la parte central de la piscina, área que abarcó un mayor espacio (parte media). Este efecto de desplazamiento se ajusta a lo reportado por varios autores (Coyne *et al.* 1994; Weston *et al.* 1994; Kerry *et al.* 1996; Smith y Samuelsen 1996), quienes han demostrado que la distribución horizontal de la OTC en sedimentos es fuertemente influenciada por la dirección del flujo de agua dentro de las piscinas y jaulas.

Una gran variedad de estudios coinciden en que la persistencia de la OTC en sedimentos de granjas piscícolas es elevada. Reportándose tiempos de residencia hasta de 18 meses y demostrándose además una mínima degradación (0.65 ppm a 475 ppm) del agente, luego del período de medicación (Jacobsen y Berglind 1988; Björklund *et al.* 1991; Samuelsen *et al.* 1992; Kerry *et al.* 1995; Hektoen *et al.* 1995; Kerry *et al.* 1996; Capone *et al.* 1996). En oposición a estos reportes, los resultados de las figuras 3 y 4 muestran una residualidad baja y variable de la OTC en sedimentos de piscinas camaroneras. En ambas piscinas se

cuantificaron niveles cercanos al límite de determinación del método (0.02 ppm), durante el primer día de residualidad, e incluso dentro del período de medicación la acumulación fue inestable y variable. Este comportamiento obedecería a marcadas diferencias entre las condiciones operativas y climáticas de los sistemas de cultivo usados para peces y camarones. Diferente a los estudios realizados en salmónidos, donde las temperaturas del agua oscilan entre 5 a 15 °C, con profundidades promedio superiores (12-15 m) -menor incidencia del factor luz sobre el agente (Samuelsen 1989; Lunestad *et al.* 1995)-; registrándose durante este experimento mayores temperaturas promedio (30 °C) y menor profundidad (P1 = 0.90 m; P2 = 0.84 m) de la columna de agua. Estos criterios nos permiten concluir que la temperatura y fotosensibilidad del agente (mayor penetración de luz en las piscinas) incidieron en la mayor degradación de la OTC en sedimentos de piscinas camaroneras.

Si bien, la rápida degradación de la OTC aquí reportada, no nos permitió estimar el tiempo medio de vida del antibiótico; es importante anotar que la determinación de este parámetro en la mayoría de los estudios, ha sido realizada mediante la mezcla directa del fármaco a concentraciones conocidas en sedimento libre de antibiótico. Los datos de acumulación y residualidad aquí reportados han sido establecidos bajo condiciones y cambios ambientales propios de un cultivo; por lo tanto reflejan el comportamiento real de la droga en sedimentos de piscinas camaroneras.

La carga bacteriana promedio (3.2×10^7 UFC/g de suelo) hallada en este estudio, corroboran los rangos de bacterias totales, previamente reportados para sedimentos de piscinas camaroneras (1×10^7 - 1×10^8 UFC/g de suelo, Informe interno CENAIM 1998) y

piscícolas (1.6×10^4 - 1.2×10^{10} UFC/g de suelo, Hansen *et al.* 1992; Spanggaard *et al.* 1993; Kerry *et al.* 1996; Herwig *et al.* 1997).

La ausencia de eficacia de la droga acumulada sobre los contajes de bacterias totales y vibrios, estimados durante el período de medicación de ambas piscinas, es mostrada en las figuras 8 y 9. Tendencia y de la Peña (2001), establecen que la presencia de un agente antimicrobiano en camarónicas a bajas concentraciones, conduciría al desarrollo de cepas bacterianas resistentes al agente. Los valores de MIC (Fig. 10) reportados para las bacterias aisladas en ambas piscinas –*Aeromonas spp.*, *Staphylococcus spp.* y vibrios- muestran niveles de inhibición elevados (mayores a 1000 ppm), comparados con los niveles encontrados en bacterias provenientes de sedimento en granjas de salmónidos, donde valores inferiores a 100 ppm de OTC en placas de agar han sido reportados para las mismas bacterias (Spanggaard *et al.* 1993; Pursell *et al.* 1996). Según lo menciona Pursell *et al.* (1996), el tipo de agar empleado durante la prueba es uno de los factores que influye significativamente en el reporte del MIC. En el presente estudio, se empleó un medio líquido para llevar a cabo la determinación de MIC. Este método presenta las ventajas de una mayor sensibilidad y facilidad para adaptarse a las diferentes concentraciones ensayadas (British Society for antimicrobial chemotherapy 1991 *fide* Smith *et al.* 1994); considerándose además, que este medio refleja de mejor manera el efecto inhibitorio de los cationes divalentes presentes en agua de mar sobre la OTC. La correlación de los parámetros: bajas concentraciones de OTC en el sedimento y elevados valores de inhibición, reportados para las bacterias persistentes aisladas durante el experimento,

demuestran claramente la eficacia nula de los residuos de OTC para disminuir la carga bacteriana total y de vibrios presentes en sedimentos de piscinas camaroneras.

Pese a que no se contó con un registro histórico del empleo de fármacos en las piscinas usadas para el estudio y que la metodología aplicada no evaluó porcentajes de resistencia bacteriana a lo largo del período de muestreo, el conocimiento previo del empleo de OTC, así como de otros agentes terapéuticos en la camaronera donde se llevó el experimento, los valores elevados de inhibición registrados durante las pruebas de MIC y las altas resistencias observadas en las bacterias aisladas durante el experimento, soportan la hipótesis de una resistencia adquirida a lo largo del tiempo ante la presencia de residuos de antibióticos a bajas concentraciones en el sedimento. Este criterio es compartido por Anderson y Levin (1999), al mencionar que la resistencia de las poblaciones bacterianas esta en relación directa con el volumen de antibiótico empleado. Estudios como los realizados por Angka (1997) e Inglis *et al.* (1997), quienes reportan elevada resistencia (42 al 100%) a la OTC en cepas bacterianas de vibrios y aeromonas aisladas de piscinas camaroneras, producto del uso continuado de drogas y desinfectantes; ejemplifican este planteamiento. No obstante, otros autores difieren con este criterio, mencionando que la elevada resistencia es producto de los altos niveles de nutrientes incorporados a las dietas o componentes del balanceado, considerados como portadores de factores de resistencia que al estar presentes en ambientes acuáticos de manera principal en sedimentos, aumentarían la frecuencia del proceso (McPhearson *et al.* 1991; Kapetanaki *et al.* 1995; Vaughan *et al.* 1996). A nuestro criterio, ambos factores (bajos niveles de antibióticos y altas cargas de nutrientes en el alimento) han influenciado para que a largo plazo las bacterias del suelo de

piscinas camaroneras hayan adquirido niveles elevados de inhibición frente a un agente que anteriormente era considerado de primer orden por su amplio espectro bacteriano.

Las disminuciones significativas de las poblaciones bacterianas totales registradas, luego del tratamiento con OTC (Fig. 8), se presentaron como efecto de adicionar formazina y furazolidona. La adición de estos productos redujo temporalmente el conteo de bacterias totales. En efecto, la población que realmente se vio afectada fueron las colonias de bacterias totales, compuesta en su mayor parte por *Aeromonas spp.* y *Staphylococcus spp.* no así la conformada por vibrios, como se demuestra en la figura 9. Estas últimas presentaron un incremento significativo durante el período de muestreo. Los niveles iniciales en ambas piscinas fueron de 1.0×10^3 UFC/g de sedimento hasta valores promedios finales de 3.6×10^5 UFC/g de sedimento. Este último comportamiento podría explicarse de acuerdo a los criterios enunciados por Kerry *et al.* (1995), quienes han demostrado que la carga bacteriana, así como la materia orgánica introducida a través del alimento ayudarían a incrementar la microflora en sedimentos.

La aplicación de cálculos similares a los utilizados para la estimación del porcentaje de deposición de la OTC en el sistema cerrado utilizado para el bioensayo con FLO, permitió registrar valores de deposición cercanos al 16% de la cantidad total de antibiótico que ingresó al medio. Estos niveles representan valores elevados de deposición comparados con el estimado para OTC (< 1% de deposición). El FLO de igual forma que la OTC, se empleó como recubrimiento en la dieta, disuelto en un agente protector (aceite de pescado) de uso común en el medio. Esta forma de medicación, al igual que en este estudio ha demostrado una mayor lixiviación del antibiótico al medio acuícola. Estudios recientes de lixiviación en

dietas medicadas para camarones, recubiertas con FLO, demuestran que el antibiótico lixivia a valores promedios del 60% al cabo de 4 horas (Pozo y Montoya 2001. Resultados no publicados) de exposición en agua de mar. Explicando este criterio en parte el elevado porcentaje de FLO depositado en el sedimento.

El tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) reportado para el FLO (5 días), en los primeros 2 cm de sedimento de este estudio, demuestra la rápida degradación del antibiótico en sedimentos de camaronerías (Fig. 6). Este resultado corrobora el $t_{1/2}$ enunciado por Hektoen *et al.* (1995) para el mismo antibiótico. Diferenciando el hecho de que estos últimos autores calcularon este parámetro en sedimento (granjas piscícolas) aditivado con FLO, y reportaron un $t_{1/2}$ = 4.5 días, la diferencia observada podría explicarse por la característica mostrada por el FLO a pasar hacia las capas subyacentes (5-7 cm) de sedimento, en donde $t_{1/2}$ = 7.3 días han sido reportados por los mismos autores. La relevancia de nuestro resultado, a diferencia de lo enunciado por Hektoen *et al.* (1995), se fundamenta en que las condiciones de experimentación, bajo las cuales se obtuvo el parámetro, fueron las más próximas a un sistema acuícola para camarones y/o peces, existiendo la interacción: animales-agua-antibiótico y bacterias.

Contrario a la baja y rápida acumulación-eliminación mostrada por el FLO, el análisis cromatográfico de las muestras también reveló la presencia de concentraciones elevadas y persistente de un metabolito de la droga. El FLO-amina durante el ensayo estuvo presente en concentraciones máximas de hasta 2.16 ppm (Fig. 7). Este y otros metabolitos del FLO han sido previamente reportados en estudios de peces y sedimento (Hormazabal *et al.* 1993; Horsbergh *et al.* 1994; Hektoen *et al.* 1995; Hormazabal *et al.* 1996). La concentración

reportada de FLO-amina en sedimentos de camarónicas al final de los 32 días de ensayo (0.94 ppm) mostró niveles similares a los reportados por Hektoen *et al.* (1995). Estos autores de igual manera que en el presente estudio, también registraron una alta residualidad del metabolito; anotando las diferencias en tiempo del experimento realizado por estos autores (180 días) en comparación con nuestra investigación. Apoyados en las diferencias de tiempo de experimentación anotados, al igual que estos autores, estimamos que la residualidad de este metabolito puede ser prolongada y a concentraciones relativamente estables en sedimentos marinos.

Los datos de este experimento demuestran que mientras existió una residualidad activa del FLO en el sedimento, este ejerció una acción inhibitoria significativa sobre la bacterias totales (Fig. 11) y la población de vibrios (Fig. 12). Concentraciones promedios de 0.08 μg FLO/g de sedimento redujeron significativamente la población bacteriana total (Fig. 11). De igual forma, el comportamiento observado en la población de vibrios refleja la acción inhibitoria del FLO. En ambos casos este efecto inhibitorio es corroborado, por el crecimiento exponencial en forma inversamente proporcional de la microflora frente a la ausencia del fármaco en el sedimento.

Las reducciones de bacterias marinas y específicamente de vibrios por disminución en los valores de salinidad han sido previamente reportados (Baumann y Schubert, 1980; Miyamoto y Eguchi 1997). Este efecto manifiesto, en las poblaciones bacterianas totales y de vibrios del tratamiento con FLO y control, como producto de las continuas precipitaciones a partir del día 7 y los días subsiguientes, explica el comportamiento similar en disminución de ambas poblaciones (FLO y control) en el sedimento (Fig. 11 y 12).

Los valores de inhibición (MIC) y de D.O. mostrados en la figura 13, demuestran la acción bactericida del FLO sobre las bacterias persistentes (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. pelagius*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Micrococcus roseus*) aisladas durante este bioensayo. Estimándose valores de inhibición de 1 ppm de FLO para las bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus spp.*, y *Staphylococcus spp.*, y 5 ppm para *Micrococcus roseus*, mientras que niveles de 0.2 ppm de FLO inhibieron las bacterias Gram-negativas aisladas (vibrios y aeromonas). Estos resultados son similares a los reportados para bacterias tipo *Aeromonas* y *Vibrio spp.*, provenientes de diferentes fuentes en granjas piscícolas (Inglis y Richards 1991; Fukui *et al.* 1987). Gómez-Gil y Tron (1996) también reportan valores de inhibición menores a 0.72 ppm de FLO en varias cepas de vibrios procedentes de la hemolinfa de camarones. Los valores de MIC con FLO mostrados en este trabajo se mantienen dentro de los rangos de los estudios anteriormente expuestos, mostrando el amplio espectro que tiene este agente sobre bacterias en general. No se tienen registros de bacterias aisladas de sedimentos de piscinas camaroneras en las que pruebas de este tipo hayan sido realizadas.

Asunciones del efecto antibacteriano del metabolito FLO-amina sobre la microflora presente en sedimentos, no pueden ser extrapoladas mediante los resultados de este estudio. Sin embargo, reportes previos estiman la capacidad de este metabolito para inhibir bacterias del suelo como *Bacillus*, *Clostridium* y algas verde-azules (Schering Plough 2000). Horsberg *et al.* (1994) reportan que el FLO y sus metabolitos son excretados por las vías urinarias y líquidos biliares; la existencia de mecanismos de eliminación paralelos en camarones podría resultar en la liberación de estos compuestos, los mismos que podrían

ejercer su acción en forma indirecta sobre la comunidad bacteriana presente en sedimentos acuícolas.

De todas las bacterias que fueron afectadas por la acción inhibitoria del FLO en este bioensayo, dos de las bacterias aisladas (*Bacillus spp.* y *V. alginolyticus*) han sido consideradas como probióticos que ayudan en la respuesta inmunitaria del camarón de manera competitiva con bacterias patógenas a nivel de hepatopáncreas e intestino (Gatesoupe 1999; Gullian 2001). A nuestro criterio esto sería una forma indirecta de afectar a los animales por una interacción suelo-bacterias probióticas y camarón.

En términos generales, bacterias representativas Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Vibrios* y *Aeromonas*, fueron aisladas de los sedimentos en ambos experimentos; reporte coincidente con los estudios realizados por Tendencia & de la Peña (2001) en suelo de piscinas de camaroneras tratado con antibióticos.

La acumulación en el sedimento de los antibióticos estudiados, dependió de sus características propias para degradarse o ligarse a otras partículas (arcilla, cationes divalentes, proteínas y lípidos), la columna de agua y tentativamente la fauna acompañante en el medio acuático. La forma y/o vía de administración del antibiótico al organismo objetivo, es uno de los factores que incide mayormente en la liberación de estos químicos al medio ambiente. Estudios sobre antibióticos de mayor estabilidad en el medio acuático, acompañados de la identificación de agentes de recubrimiento que eviten lixiviaciones elevadas, son parte de las opciones que debería manejar la industria acuícola, para evitar el impacto ambiental del uso de estos químicos terapéuticos.

Los resultados de residualidad demuestran una rápida degradación de los antibióticos, OTC y FLO en sedimentos de piscinas camaroneras, bajo las condiciones de cultivo detalladas. Bajas concentraciones de antibióticos en sedimentos son las que han llevado a un decremento en la sensibilidad de las bacterias a estos fármacos. Estudios sobre el grado de distribución de estos fármacos en el medio acuático, su impacto sobre organismos no-objetivo, eficacia y efectos de los diferentes metabolismos producidos son necesarios para establecer el impacto de estas drogas en el ambiente acuático.

5. CONCLUSIONES

- Se estimaron porcentajes de deposición de OTC en sedimentos de piscinas camaroneras similares a los reportados para granjas piscícolas (menores al 1%). Los valores promedios de acumulación determinados fueron de 3.98 y 1.05 ppm para P1 y P2, respectivamente.
- La OTC mostró una distribución espacial acumulativa entre las partes entrada, media y salida de las piscinas. En esta última área se reportaron las mayores concentraciones promedios (P1= 2.10 ppm; P2= 0.49 ppm) de OTC en el sedimento.
- La persistencia de la OTC fue variable e inestable en el sedimento, presentándose este comportamiento incluso durante los días de medicación. En general el fármaco muestra una rápida degradación en sedimento de piscinas camaroneras.
- La OTC manifestó una eficacia reducida frente a las poblaciones de bacterias totales y vibrios del sedimento. Resultado comprobado por los elevados valores de MIC reportados (superiores a 1000 ppm) en las bacterias aisladas. Los vibrios aislados presentaron niveles de inhibición mayores a las bacterias Gram-positivas.
- Un mayor porcentaje de deposición del FLO fue determinado en sedimentos de camaroneras (16%) con respecto a la cantidad de antibiótico que ingreso al sistema.
- El FLO fue rápidamente degradado en el sedimento, presentando un tiempo medio de vida de 5 días.

- Los niveles residuales de FLO cuantificados en sedimento muestran un efecto inhibitor del agente sobre la comunidad bacteriana total y vibrios.
- La mayor parte de bacterias aisladas mostraron valores de MIC menores a 1 ppm de FLO. Los vibrios fueron mayormente afectados que las bacterias Gram-positivas, quienes ofrecieron una menor sensibilidad al antibiótico.
- Se reportó un metabolito del FLO, FLO-amina. Este metabolito muestra concentraciones y residualidad elevados comparado con el florfenicol.
- En ambos experimentos las bacterias resistentes pertenecieron a los géneros *Aeromonas*, *Vibrios* y *Staphylococcus*.

6. RECOMENDACIONES

- Las bajas concentraciones de OTC reportadas en los 5 cm de sedimento recolectados, plantean la necesidad de realizar estudios de la distribución vertical del antibiótico hacia diferentes niveles de profundidad, así como la incidencia del tipo de suelo sobre la distribución vertical del fármaco. Este criterio también puede ser aplicado a FLO en sedimentos.
- La necesidad de revalidar la eficacia real de la OTC sobre las bacterias que específicamente afectan al camarón u otro organismo objetivo, es soportada por el reducido espectro mostrado por la droga sobre las bacterias aisladas del sedimento.
- El FLO influyó de manera significativa en la población bacteriana, no obstante su amplio espectro también disminuyó bacterias benéficas presentes en el sedimento. Se hacen necesario mayores estudios sobre el empleo adecuado del agente, estimación de dosis eficaces para la medicación en camaronicultura, de tal forma se vea reducida su incidencia sobre bacterias probióticas presentes en los animales y que a largo plazo no conlleve a una alta resistencia bacteriana como lo observado en OTC. Los resultados de FLO en el bioensayo pueden ser extrapolados a granjas camaroneras y determinar en campo el impacto de FLO sobre la microflora bacteriana.
- Se requiere de mayor información sobre el mecanismo por el cual FLO-amina es producido y su efecto sobre la comunidad bacteriana, así como su permanencia en el sedimento.

- Se debe reducir al mínimo la aplicación de agentes antibacteriales como recubrimiento en dietas medicadas, siendo preferible aditivar el medicamento a través de la formulación del balanceado y disminuir el proceso de lixiviación mediante el empleo de aglutinantes alternativos capaces de mejorar la eficiencia de los tratamientos orales, sin que influyan en la palatabilidad del alimento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderman, D. J. y T. J. Hastings. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology* 33: 139-155.
- Anderson, D. I. y B. R. Levin. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiology* 2 (5): 489-493.
- Angka, S. 1997. Antibiotic sensitivity and pathogenicity of aeromonas and vibrio isolates in Indonesia. Pages 339-347 in T. W. Flegel y I. H. MacRae (editors). *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Arango, J. I., D. Buenaventura, J. A. Ávila, R. E. Roca, A. Arias y R. Martín. 1996. Uso de Aurofac 200G (Aureomicina) en el control de bacterias intracelulares en camarones Penaeus vannamei. Roche. Primer foro Internacional Acuícola. Guayaquil, Ecuador. 3 p.
- Arcangioli, M-A., S. Leroy-Setrin., J-L. Martel y E. Chaslus-Dancla. 1999. A new chloramphenicol y florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in Salmonella typhimurium DT 104. *FEMS Microbiology Letters* 174: 327-332.
- Baumann, P. y R. Schubert. 1980. Family Vibrionaceae. Pages 516-554 in Bergey's 1994. *Manual of Systematic Bacteriology*. N. R. Krieg (editor). Williams and Wilkins, London, England.
- Bell, T.A. 1992. Drugs and chemotherapeutants for shrimp diseases: their present status in the United States, with an overview of research and approval processes. Pages 311-324 in: Fulks, W. y K.L. Main (editors). *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. Proceedings of a workshop sponsored by

the U.S.D.A. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Honolulu, Hawaii.
April 27-30, 1992.

- Björklund, H. y G. Bylund. 1990. Temperature-related absorption and excretion of Oxytetracycline in rainbow trout (Salmo gairdneri R.). *Aquaculture* 84: 363-372.
- Björklund, H. y G. Bylund. 1991. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Xenobiotica* 21: 1511-1520.
- Björklund, H. V., J. Bondestam y G. Bylund. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 86: 359-367.
- Björklund, H., C. M. I. Råbergh y G. Bylund. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97: 85-96.
- Blanchflower, J., R. McCracken, A. Haggan y G. Kennedy. 1997. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 692: 351-360.
- Bonde, G. J. 1977. Bacterial indication of water pollution. Pages 303-306 in M. R. Droop y H. W. Jannasch (editors). *Advances in Aquatic Microbiology*. Vol. 1. Academic Press, London, England.
- Brock, J. A., R. Gose, D. V. Lightner y K. W. Hasson, 1995. An overview of Taura syndrome, an important disease of farmed Penaeus vannamei. Page 94 in: C. L. Browdy y J. S. Hopkins (editors). "Swimming through troubled water". Proceeding of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

- Brock Biology of microorganisms. M. Madigan, J. Martino y J. Parker (editors).
Prentice-Hall, Inc. Upple Saddle River, New Jersey, USA.
- Calero, G. 1998. Enriquecimiento de agar Marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón Penaeus vannamei. Tesis profesional. Acuicultura, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 70 p.
- Cannon, M., S. Harford y J. Davies. 1990. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 26: 307-317.
- Capone, G., D. Weston, V. Miller y C. Shoemaker. 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* 145: 55-75.
- Carson, M., M. Ngoh y S. Hadley. 1998. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 712: 113-128.
- Chanratchacool, P., R. Roberts y C. Limsuwan. 1989. Retention of oxytetracycline in juvenile black tiger shrimp (Penaeus monodon Fabricius). National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Thailand.
- Chien, Y. y I. Chen, 1998. The distribution of oxytetracycline residues in Penaeus monodon culture system. Page 106 in: *Aquaculture '98*, World Aquaculture Society, Las Vegas, USA, 14–19 February.
- Cloekaert, A., K. Boumedine, G. Flaujac, H. Imberechts, I. D'Hooghe y E. Chaslus-Dancla. 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (5): 1359-1361.
- CENAIM. 1998. Informe interno. Departamento de monitoreo.

- CNA. (en prensa). Libro Blanco del Camarón Ecuatoriano.
- CNA. 2002. Estadísticas de la Cámara Nacional de Acuicultura.
- CNA. 2001. Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura. 41: 8-19.
- Coyne R., M. Hiney, B. O'Connor, J. Kerry, D. Cazabon y P. Smith. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture* 123 (1-2): 31-42.
- Cravedi, J., G. Choubert y G. Delous. 1987. Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture* 60: 133-141.
- Delépée, R., D. Maume, B. Le Bizec y H. Pouliquen. 2000. Preliminary assays to elucidate the structure of oxytetracyclines's degradation products in sediments. Determination of natural tetracyclines by high performance liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of chromatography B* 748:369-381.
- Elema, M., K. Hoff y H. Kristensen, 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic Salmon (Salmo salar L.) in seawater. *Aquaculture* 143: 7-14.
- EMEA/CVMP. 2000. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Evaluation of Medicines for Veterinary use. Press Release January. London, England. 9 p.
- EMEA/ CVMP. 2001. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Evaluation of Medicines for Veterinary use. Florfenicol (extension to fish) Summary report (5), 4 p.

- FDA, 1968. Antibiotic residues in milk, dairy products, and animal tissues: Methods, reports, and protocols. Pages 1-53 in: J. Kramer, C. Carter, B. Arret, J. Wilner, W. Wright y A. Kirshbaum (editors). National Center for antibiotic and insulin analysis, Washington, D.C.
- Flegel, T. 1996. A turning point sustainable aquaculture: The White Spot virus crisis in Asia shrimp culture. *Aquaculture Asia*, 29-34. *Aquaculture Asia* 18: 29-34.
- Fukui, H., Y. Fujihara y T. Kano. 1987. In vitro and in vivo antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. *Fish Pathology* 22: 201-207.
- Frelier, P.F., J. K. Loy, Lawrence, W.A. Bray, y G. W. Brumbaugh. 1994. Page 55 in: T. D. McIlwain y G. Pruder (editors). Marine Shrimp farming Program: 10th Anniversary Review: The Gulf Coast Research Laboratory Consortium Special Publication No. 1. Ocean Springs. MS.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147– 165.
- Gómez-Gil, B. y M. L. Tron. 1996. Antibiogramas y concentración mínima del florfenicol en cepas potencialmente patógenas para camarones. CIAD-Mazatlán.
- Gómez-Gil, B. 1998. Uso médico y veterinario de agentes antimicrobianos: implicaciones para la salud pública, una visión clínica de la resistencia antimicrobiana. *Noticias Epidemiológicas* Vol. 2. No. 12.
- Greenlees, K. 1997. Laboratory studies for the approval of aquaculture drugs. *The Progressive Fish Culturist* 59 141-148.
- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría. ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador, 57p.

- Hansen, P. K., B. T. Lunestad, y O. B. Samuelsen. 1992. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiology* 38: 1307-1312.
- Hasson, K. W., D. V. Lightner, B. T. Poulos, R. M. Redman, B. L. White, J. A. Brock, y J. R. Bonani. 1995. Taura syndrome in Penaeus vannamei: demonstration of the viral etiology. *Disease of Aquatic Organisms* 23 115-126.
- Hektoen, H., J. A. Berge, V. Hormazabal y M. Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.
- Herwig, R., Gray, J y D. Weston. 1997. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture* 149: 263-283.
- Hormazabal, V., I. Steffenak y M. Yndestad. 1993. Simultaneous determination of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 616: 161-165.
- Hormazabal, V., I. Steffenak y M. Yndestad. 1996. Simultaneous extraction and determination of florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 724: 364-366.
- Horsberg, T. E., B. Martinsen y K. J. Varma. 1994. The disposition of ¹⁴C-florfenicol in Atlantic salmon (Salmo salar). *Aquaculture* 122: 97-106.
- Hottlet, O. 2001. Heightened Surveillance of Chloramphenicol Residues in shrimp. *Advocate Global Aquaculture* 4 (6): 30.
- Inglis, V., R. H. Richards, K. J. Varma, I. H. Sutherland y E. S. Brokken. 1991. Florfenicol in Atlantic salmon L., parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. *Journal of Fish Diseases* 14: 343-351.

- Inglis, V. y R. H. Richards. 1991. The *in vitro* susceptibility of Aeromonas salmonicida and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents. *Journal of Fish Diseases* 14: 641-650.
- Inglis, V., S. Z. Abdullah, S. L. Angka, S. Chinabut, Md. B. R. Chowdury, E. M. Leano, I. H. MacRae, A. Sasongko, T. Somsiri y A. V. Yambot. 1997. Survey of resistance to antibacterial agents used in aquaculture in five South East Asian countries. Pages in T. W. Flegel y I. H. MacRae (editors). *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Intriago, P. 2002. El cultivo de camarón tierra adentro en Ecuador: Una de las estrategias para combatir el Virus de la Mancha blanca. *Rev. Espol Propuestas* 5 (14): 32-34.
- Jacobsen, P. y L. Berglund. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farm. *Aquaculture* 70: 365-370.
- Jacobsen, M. D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. *Journal of Fish Diseases* 12: 29-36.
- Jiménez, R. 1992. Síndrome de Taura (Resumen). *Acuicultura del Ecuador*. Revista especializada de la Cámara de Productores de Camarón. 59 p.
- Jiménez, R., R. Barniol y M. Machuca. 1995. Taura Syndrome: epizootiology and histopathology of a mortality toxicity syndrome of penaeid shrimp in Ecuador. Page 147 in: *Abstracts of world aquaculture 95*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

- Jiménez, R. 1997. Enfermedades registradas en cultivos del camarón Penaeus vannamei en el Ecuador. Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura 20: 51-53.
- Kerry, J., M. Hiney, S. Nicgabhainn, D. Gilroy, D. Cazabon y P. Smith. 1995. Fish feed as a source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish farms. Aquaculture 131: 101-113.
- Kerry, J., R. Coyne, D. Gilroy, M. Hiney y P. Smith. 1996. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. Aquaculture 145: 31-39.
- Kerry, J., I. Nicgabhainn y P. Smith. 1997. Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic salmon. Aquaculture 157: 187-195.
- Kim, E. H. y T. Aoki. 1996. Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, Pasteurella piscicida. Microbiol. Immunol. 40: 665-669.
- Klaver, L. y R. A. Matthews. 1994. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. Aquaculture 123: 237-247.
- Le Bris, H., H. Pouliquen, J. Debernardi, V. Buchet y L. Pinault. 1995. Preliminary study on the kinetics of oxytetracycline in shellfish exposed to an effluent of a land-based fish farm: experimental approach. Marine Environmental Research 40 (2): 171-180.
- Levy, S. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemothe. 36: 695-703.

- Lightner, D. V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- Lightner, D. V. 2001. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods, and Management Strategies. Pages 79-102 in C. Lim y C. Webster (editors). Nutrition and Fish Health. Food Products Press, New York, USA.
- Lobell, R.D., K.J. Varma y J.C. Johnson. 1994. Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 17: 253-258.
- Lotz, J. M. 1997. Special topic review: Viruses, biosecurity, and specific pathogen free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 405-413.
- Lunestad, B. J. y J. Goksøyr. 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms* 9:67-72.
- Lunestad, B. T., O. B. Samuelsen, S. Fjelde y A. Ervik. 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture* 134: 217-225.
- Lunestad, B. T. y O. B. Samuelsen. 2001. Effects of seawater on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture; implications for MIC testing. *Aquaculture* 196: 319-323.
- Kapetanaki, M., J. Kerry, M. Hiney, C. O'Brien, R. Coyne y P. Smith. 1995. Emergence, in oxytetracycline-free marine mesocosms, of microorganisms capable of colony formation on oxytetracycline-containing media. *Aquaculture* 134: 227-236.

- Martinsen, B., T.E. Horsberg y K.J. Varma. 1993. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (Salmo salar) in seawater at 11 °C. *Aquaculture* 112: 1-11.
- McKeller, Q.A. y K. J. Varma. 1996. Pharmacokinetics and tolerance of florfenicol in Equidae. *Equine Vet. J.* 28 (3): 209-13.
- McPhearson, R. M., A. De Paola, S. R. Zywno, M. L. Motes y A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture* 99: 203-211.
- Medina, J. 1994. Problemas en la cuantificación de residuos de antibióticos en tejidos de peces. Páginas 241-245 en: E. Castro (editor) *Aquila II Control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. Programa cooperativo gubernamental FAO-Italia.
- Micromedex. 2000. Drugs for animal use: Florfenicol Veterinary-systemic. Pages 1-5.
- Miranda, C. D y R. Zemelman. 2001. Antibiotic resistant Bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin* 42 (11): 1096-1102.
- Miyamoto, N. y M. Eguchi. 1997. Response to low osmotic stress in a fish pathogen, Vibrio anguillarum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 225-231.
- Mohney, L., R. Williams, T. Bell y D. Lightner. 1997. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, Penaeus stylirostris (Crustacea: Decapod), fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture* 149: 193-202.
- Montoya, N. y C. Molina. 1995. Optimum supplemental level of L-ascorbyl-2 phosphate-Mg to diet for white shrimp Penaeus vannamei. *Fisheries Science* 61 (6): 1045-1046.

- Montoya, N y E. Reyes. 2001. Acumulación de oxitetraciclina en el camarón blanco, Litopenaeus vannamei y su residualidad en dietas artificiales. El mundo acuícola. Boletín informativo del CENAIM 8(1): 34-37.
- Moriarty, D. 2001. Peligros del uso de antibióticos en Acuicultura. Acuabiotec LLC, 3 p.
- Nagata, T. y M. Saeki. 1992. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and chloramphenicol residues in muscles of animals and culture fish by liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography 15: 2045-2056.
- Namdari, R., S. Abedini y F. Law. 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. Aquaculture 144: 27-38.
- Norrell, S. y K. Messley. 1997. Microbiology. Laboratory manual. Principles and applications. Prentice-Hall, Inc. A Simon and Schuster/Viacom Company. New Jersey, USA.
- Nouws, J. F. M., J. L. Grondel, J. H. Boon y V. J. T. van Ginneken. 1992. Pharmacokinetics of antimicrobials in some fresh water fish species. Pages 437-447 in: C. M. Michel y D.J. Alderman (editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizooties, Paris, 1992.
- Nygaard, K., B. Lunestad, H. Hektoen, J. Berge y V. Hormazabal, 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. Aquaculture 104: 31-36.
- Otero, V. 2001. Evaluación de los β -glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco Penaeus vannamei (Boone, 1931). Tesis profesional Biología Pesquera, Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, Ecuador, 103 p.

- Peeters, M. y J. Rodríguez. 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. *El Mundo Acuícola*. 5 (1): 13.
- Pillay, T. 1997. Estado actual de la acuicultura. *Acuicultura Principios y Prácticas*. 1: 26-30.
- Plakas, S. M., R. M. McPhearson y A. M. Guarino. 1988. Disposition and bioavailability of ^3H -tetracycline in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Xenobiotica* 18 (1): 83-93.
- Podhorniak, L., S. Leake y F. Schenck. 1999. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *Journal of Food Protection* 5: 547-548.
- Pouliquen, H., H. Le Bris y L. Pinault. 1992. Experimental study of the therapeutic application of oxytetracycline, its attenuation in sediment and sea water, and implications for farm culture of benthic organisms. *Marine Ecology Progress Series* 89: 93-98.
- Pouliquen, H., H. Le Bris y L. Pinault. 1993. Experimental study on the decontamination kinetics of seawater polluted by Oxytetracycline contained in effluents released from a fish farm located in a salt-marsh. *Aquaculture* 112: 113-123.
- Pouliquen, H., H. Le Bris, V. Buchet y L. Pinault. 1996. Comparative study on the contamination and decontamination of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* and blue mussel *Mytilus edulis* by oxytetracycline and oxolinic acid. *Mar. Ecol Prog. Ser.* 133: 143-148.

- Pozo, J. y N. Montoya. 2001. Evaluación del uso de agentes protectores sobre la lixiviación y palatabilidad de dietas medicadas (Florfenicol) para camarones. CENAIM. Informe técnico, 59 p.
- Pursell, L., T. Dineen, J. Kerry, S. Vaughan y P. Smith. 1996. The biological significance of breakpoint concentrations of oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture* 145: 21-30.
- Rigos, G., M. Alexis y I. Nengas, 1999. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass Dicentrarchus labrax L. *Aquaculture Research* 30: 841 – 847.
- Rogstad, A., V. Hormazabal, O. Ellingsen y K. Rasmussen. 1991. Pharmacokinetic of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture* 96: 219-226.
- 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* 83: 7-16.
- Samuelsen, O. B. 1991. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 87-95 in: C. M. Michel y D.J. Alderman (editors). *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizooties, Paris, France.
- Samuelsen, O., V. Torsvik y A. Ervik, 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of Total Environment* 114: 25 – 36.

- Samuelsen, O. B. 1993. The use of antibacterial agents in Norwegian aquaculture. Residue analysis and environmental impacts. Ph. D. thesis, University of Bergen, Norway, 78 p.
- Samuelsen, O. B., B. T. Lunestad, A. Ervik y S. Fjelde. 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* 126: 283-290.
- Sandaa, R. A., V. L. Torsvik y J. Goksøyr. 1992. Transferable drug resistance in bacteria from fish farm sediments. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1061-1065.
- Schering-Plough. 2000. Florfenicol. Departamento Técnico (México). Nuflor Premix.
- Smith, P., M. Hiney y O. B. Samuelsen. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases* 4: 273-313.
- Smith, P. y O.B. Samuelsen. 1996. Estimates of out-washing of oxytetracycline from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture* 144: 17-26.
- Smith, P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture* 146: 157-169.
- Soback, S., M.J. Paape y R. Filep. 1995. Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *J Vet Pharmacol. Ther.* 18: 413-417.
- Spanggaard, B., F. Jørgensen, L. Gram y H. H. Huss. 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115: 195-207.

- Speer, B., N. Shoemaker y A. Salyers. 1992. Resistance to tetracycline: mechanisms and transmission. *Clin. Microbiology* 5: 387-399.
- Solís, P. A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis profesional. Acuicultura, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 70 p.
- Somsiri, T., M. Wannaprapa y S. Soontornvit. 1997. Accumulation of oxytetracycline in hybrid catfish (Clarias gariepinus x C. macrocephalus). Pages 327-329 in T. W. Flegel y I. H. MacRae (editors). *Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila.
- Subasinghe, R., U. Barg, M. Phillips y C. Lavilla-Pitogo. 1999. Chemotherapeutants in aquaculture: An Asian perspective. In: *Aquaculture '99*, World Aquaculture Society, Sydney - Australia, 737 p.
- Tendencia, E. A. y L. D. de la Peña. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195: 193-204.
- Ueno, R., K. Uno, S. Kubota y Y. Horiguchi, 1989. Determination of oxytetracycline in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (7), 1273 - 1276.
- Ueno, R., K. Sangrurungrang y M. Miyakawa. 1999. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Research International* 32 (9): 629 – 633.
- Uno, K. 1996. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (Plecoglossus altivelis). *Aquaculture* 134: 33 - 42.

- van Hulten, C. W. M., J. Witteveldt, M. Snippe y J. M. Vlak. 2001. White Spot Syndrome Virus envelope protein VP28 is involved in the systematic infection of shrimp. *Virology* 285: 228-233.
- Vargas-Albores, F., I. Higuera-Ciapara,, F. Jiménez-Vega, J. Hernández-López, T. Gollas-Galván y G. Yepiz-Placencia. 1998. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. *Avanecs en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, pp. 433-439.
- Varma, K., P. E. Adams, T. E. Powers, J. D. Powers y J. F. Lamendola. 1986. Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 9: 412-425.
- Vaughan, S., R. Coyne y P. Smith. 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture* 139: 47-54.
- Vaughan, S. y P. Smith. 1996. Estimation of the influence of a river sediment on the biological activity of oxytetracycline hydrochloride. *Aquaculture* 141: 67-76.
- Weston, D. P., D. G. Capone, R. P. Herwig y J. T. Staley. 1994. Environmental fate and effects of aquacultural antibacterials in Puget Sound; A report of the University of California pursuant to the National Oceanic and Atmospheric Administration (Award No. NA26FD0109-01). University of California, Berkeley, USA.
- Williams, R., T. Bell y D. Lightner. 1992. Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 262 – 270.
- Xu, D. y W. Rogers. 1995. Oxytetracycline residue in the muscle of Nile tilapia. *Asian Fisheries Science* 8: 113 – 120.