

Evaluación de la concentración de oxitetraciclina en tejidos de camarón suministrada a través de nauplios de *Artemia* y de un baño medicado

Evaluation of oxytetracycline concentration in shrimp postlarval tissues offered through *Artemia* nauplii and medicated bath

A. Roque^{1,2*}
C. Cuenca¹
A. Espinosa³
C. Bermúdez³
C. Bolan¹
B. Gómez-Gil¹

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
Laboratorio de Bacteriología de Crustáceos
Sabalo Cerritos, s/n
Mazatlán, Sinaloa, México

² IRTA
Carr. al Poblenou s/n Km 5.5
Sant Carles de la Ràpita, España
*E-mail: Ana.Roque@irta.es

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
Laboratorio de Residuos Tóxicos
Carr. a la Victoria, Km 0.6
Hermosillo, Sonora, México

Recido en abril del 2003; aceptado en noviembre de 2003

Resumen

En México, la oxitetraciclina es comúnmente aplicada en los sistemas de cultivo larvario de camarón para controlar problemas bacterianos. Sin embargo, no se sabe cuánta oxitetraciclina es incorporada por los camarones. El objetivo del presente estudio fue medir los niveles de oxitetraciclina incorporados por postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, ofrecida por dos rutas diferentes, bioencapsulada en nauplios de *Artemia franciscana* y aplicada directamente en agua de mar. Se hicieron cinco tratamientos: Postlarvas medicadas a través de un baño convencional (20 ppm) y alimentadas con nauplios de *Artemia* (BAÑO), postlarvas alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecida con oxitetraciclina (19 mg comida⁻¹) y Rich[®], una mezcla comercial de lípidos (R-OTC), postlarvas alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecida con oxitetraciclina (19 mg comida⁻¹) (OTC), postlarvas alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecida con Rich[®] (RICH) y postlarvas alimentadas con nauplios de *Artemia* (control). Los tratamientos se aplicaron por 7 días y diariamente se muestrearon postlarvas de todos los tratamientos para medir los niveles de oxitetraciclina incorporados usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La más alta incorporación de oxitetraciclina en los camarones fue con el tratamiento BAÑO. Los valores no variaron mucho día con día ni entre tratamientos. El Rich[®] mejoró la cantidad de oxitetraciclina incorporada por los camarones. El día 7 las concentraciones de oxitetraciclina medidas en los diferentes tratamientos fueron: OTC, $5.77 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$; R-OTC, $18.98 \pm 2.8 \mu\text{g g}^{-1}$; y BAÑO, $26.3 \pm 8.1 \mu\text{g g}^{-1}$ de extracto de camarón. Se recomienda ofrecer al menos 4 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI), para lograr concentraciones terapéuticas en los organismos a ser tratados. Los resultados del análisis cromatográfico en el cuerpo de los camarones mostraron que se alcanzaba 0.15 de la CMI ($303.98 \mu\text{g mL}^{-1}$) reportada y para el tratamiento más alto. La oxitetraciclina es hidrosoluble y posiblemente su bioencapsulación, para lograr valores terapéuticos, no sea posible. En cuanto al baño medicado, se requiere una concentración más alta para lograr valores terapéuticos en los tejidos de camarón.

Palabras clave: oxitetraciclina, camarón, *Litopenaeus vannamei*, HPLC.

Abstract

In Mexico, oxytetracycline is commonly applied to shrimp larval rearing systems to control bacterial problems; however, it is not known how much oxytetracycline is incorporated by the shrimp. The present study aimed to measure the levels of

oxytetracycline incorporated by *Litopenaeus vannamei* shrimp postlarvae offered by two different administration routes: bioencapsulated in *Artemia franciscana* nauplii and applied directly in the seawater. Five treatments were used: postlarvae medicated through conventional bath (20 ppt) and fed *Artemia* nauplii (BATH), postlarvae fed *Artemia* nauplii enriched with oxytetracycline (19 mg meal⁻¹) and Rich[®], a commercial lipid mix (R-OTC), postlarvae fed *Artemia* nauplii enriched with oxytetracycline (19 mg meal⁻¹) (OTC), postlarvae fed *Artemia* nauplii enriched with Rich[®] (RICH), and postlarvae fed with *Artemia* nauplii (control). Treatments were applied for seven days and postlarvae from each treatment were sampled daily to measure the levels of oxytetracycline incorporated through high performance liquid chromatography (HPLC). Higher incorporation of oxytetracycline in the shrimp was found in the BATH treatment. Values did not vary much among days within the treatments. Rich[®] improved the amount of oxytetracycline incorporated by the shrimp. By day 7, the mean antibiotic determinations were as follows: OTC, $5.77 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$; Rich[®] + OTC, $18.98 \pm 2.8 \mu\text{g g}^{-1}$; and BATH, $26.3 \pm 8.1 \mu\text{g g}^{-1}$ of shrimp extract. An antibiotic dose of 4 times the minimum inhibitory concentration (MIC) is recommended in order to achieve therapeutic doses in the organisms to be treated. The results from the chromatography analysis on the shrimp body showed that only 0.15 of the MIC ($303.98 \mu\text{g mL}^{-1}$) reported was in fact detected in the shrimp in the highest treatment. Oxytetracycline is water-soluble, and perhaps its bioencapsulation for treatment purposes is not feasible. As for the medicated bath, a higher concentration is required to achieve a therapeutic dose in the shrimp tissues.

Key words: oxytetracycline, shrimp, *Litopenaeus vannamei*, HPLC.

Introducción

En México, uno de los antibióticos mas usados en la industria camaronícola es la oxitetraciclina (Roque *et al.*, 2001). En larvicultura, los antibióticos son generalmente administrados en el agua; sin embargo, esta ruta de suministro conlleva pérdidas de antibiótico y posiblemente el desarrollo de resistencia en ambas bacterias, blanco y no blanco. En América Latina los camaricultores usan principalmente el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (FAO, 2002).

Una ruta alternativa de suministro de antibiótico a organismos acuáticos puede ser a través del alimento. Los antibióticos se pueden suministrar encapsulados en alimento vivo (bioencapsulación), aumentando así la eficacia de suministro (Chair *et al.*, 1991). La factibilidad de esta técnica se ha investigado en peces (Cherel y Nin, 1991) y camarones (Mohnhey *et al.*, 1990). Gómez-Gil *et al.* (2001) sugieren cuánto antibiótico debe ser ofrecido a los nauplios de *Artemia* durante 4 h, periodo de tiempo que se estableció como adecuado en el mismo estudio.

Sin embargo, a la fecha, no se sabe si las postlarvas de camarón logran realmente incorporar los antibióticos y, en caso de hacerlo, si la cantidad incorporada es terapéutica ya sea cuando el antibiótico es ofrecido en el alimento o aplicado directamente en el agua (Roque y Gómez-Gil, 2003).

El objetivo de este estudio fue comparar dos rutas de suministro de oxitetraciclina a postlarvas de camarón blanco *L. vannamei*: bioencapsulación, utilizando nauplios de *Artemia* como vehículo, y un baño medicado. También se evaluó si los niveles incorporados en las postlarvas tenían valor terapéutico.

Materiales y métodos

Organismos experimentales

Se descapsularon quistes de *Artemia franciscana*, Kellog 1906 (INVE, Bélgica) (3.2 g día^{-1}) de acuerdo con el protocolo propuesto por Sorgeloos *et al.* (1977). Los huevos se incubaron en 1.8 L de agua de mar, aireándose fuertemente y con intensa

Introduction

In Mexico, one of the most used antibiotics by the shrimp culture industry is oxytetracycline (Roque *et al.*, 2001). In larviculture, antibiotics are generally administered in the water; however, this delivery route leads to loss of antibiotic and possibly to the induction of resistance in both target and non-target bacteria. In Latin America, shrimp farmers mainly use the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (FAO, 2002).

An alternative antibiotic delivery route to aquatic organisms can be through the feed. Antibiotics can be delivered encapsulated in live feed (bioencapsulation), increasing the efficacy of the delivery (Chair *et al.*, 1991). The value of this technique has been investigated for both fish (Cherel and Nin, 1991) and shrimp (Mohnhey *et al.*, 1990). Gómez-Gil *et al.* (2001) provided guidelines on how much antibiotic should be offered to *Artemia* nauplii for 4 h, and this period of time was also established to be suitable in the same study.

However, to date, it is not known whether shrimp postlarvae can actually incorporate antibiotics and if they do, whether they incorporate it in therapeutic doses, both when the antibiotic is administered directly in the water or delivered in the food (Roque and Gómez-Gil, 2003).

The aim of this study was to compare two delivery routes of oxytetracycline to postlarvae of white shrimp *L. vannamei*: bioencapsulation, using *Artemia* nauplii as the vehicle, and in a medicated bath. Also, to evaluate whether the levels reached in the postlarval bodies were of therapeutic value.

Materials and methods

Experimental organisms

Artemia franciscana, Kellog 1906 cysts (INVE, Belgium) (3.2 g day^{-1}) were decapsulated following the methodology proposed by Sorgeloos *et al.* (1977). The eggs were then incubated in 1.8 L of full strength seawater, strongly aerated, and under strong artificial light. After 24 h, the nauplii were

luz artificial. Los nauplios se cosecharon a las 24 h, y se dividieron en cuatro grupos: uno se enriqueció con Rich® (1.28 g), una emulsión lipídica comercial mezclada en 800 mL de agua de mar, y otro grupo se enriqueció con Rich® (1.28 g) y oxitetraciclina (Sigma Chemical Co., EUA) (1.024 g), mezclados en 800 mL de agua de mar con una concentración final de 1.28 mg mL⁻¹; otro grupo se enriqueció con oxitetraciclina mezclada en 800 mL de agua de mar dando una concentración final de 1.28 mg mL⁻¹; y el último grupo se dejó en 800 mL de agua de mar limpia. Los cuatro grupos se incubaron 4 h más antes de ser ofrecidos a las postlarvas de camarón.

Se adquirieron postlarvas 6 de *L. vannamei* de un laboratorio de producción de postlarvas en Sinaloa, México, se aclimataron a un sistema de recirculación de 400 L de capacidad y se alimentaron con nauplios de *Artemia* no medicados. Cuando las postlarvas alcanzaron un peso aproximado de 0.046 g se usaron en el experimento.

El número de nauplios consumido por postlarva se estimó, alimentando *ad libitum* tres postlarvas, colocadas individualmente en recipientes de 0.5 L con un número conocido de nauplios de *Artemia* por 24 h. Después de este periodo se contaron los nauplios de *Artemia* sobrevivientes. Los nauplios de *Artemia* se contaron cosechándolos de cada frasco, individualmente en 10 mL de agua de mar limpia, y fijándolos con 5 mL de alcohol etílico (96×). Los nauplios se tomaban del fondo del recipiente donde estaban fijados y sedimentados, en pequeñas gotas con una pipeta Pasteur, y se colocaban sobre un porta objetos. Todos los nauplios se colocaron sobre el porta objetos, se contaron y, al final, su número se sumó para tener un conteo total por frasco.

Análisis de oxitetraciclina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)

Las postlarvas se recolectaron de los acuarios, se enjuagaron con agua destilada, se envolvieron en aluminio y se almacenaron a -80°C, hasta su análisis.

Los análisis cromatográficos siguieron la metodología de Bermúdez-Almada *et al.* (1999), adaptada de Long *et al.* (1990) con modificaciones mínimas. Las muestras (0.5 g) se pasaron a un mortero de vidrio. Se les añadió sílica C₁₈ (2 g; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) con tamaño de partícula de 15 a 40 µm, 0.05 g de EDTA (etiléndiaminotetraacetato) y 0.05 g de ácido oxálico. La mezcla fue homogeneizada con la mano del mortero. La pasta formada se pasó por una jeringa con papel filtro en el extremo inferior para formar una columna. La matriz de la columna fue comprimida a 4.5 mL y se pasaron dos volúmenes de 8 mL de hexano. La oxitetraciclina fue extraída con dos porciones de 8 mL de acetonitrilo-metanol (1:1 v/v) conteniendo 0.06% de BHA (butil-hidroxi-anisol, Sigma) y BTH (butil-hidroxi-tolueno, Sigma). El extracto se evaporó hasta que se secó en un baño maría a 40°C, bajo flujo de aire. El residuo fue diluido en 1 mL de fase móvil y sonicado (Cole Parmer 8892) 45 min hasta suspensión. La solución fue centrifugada 10 min a 17000 × g. El

harvested and divided into four groups: the first was enriched with Rich® (1.28 g), a commercial lipid emulsion, mixed in 800 mL of full strength seawater; the second was enriched with Rich® (1.28 g) and oxytetracycline (Sigma Chemical Co., USA) (1.024 g) mixed in 800 mL of full strength seawater, giving a final oxytetracycline concentration of 1.28 mg mL⁻¹; the third was enriched with oxytetracycline (1.024 g) mixed in 800 mL of seawater, giving a final concentration of 1.28 mg mL⁻¹; and the fourth was left in 800 mL of clean seawater. The four groups were incubated a further 4 h before being fed to the shrimp postlarvae.

Litopenaeus vannamei postlarvae 6 were acquired at a commercial hatchery in southern Sinaloa and were acclimated to a 400-L recirculation system and fed live unmedicated *Artemia* nauplii. When they reached an average weight of 0.046 g, they were used for the experiment.

The number of nauplii consumed per postlarva was estimated by feeding *ad libitum* three postlarvae, placed individually in 0.5-L recipients, with a known number of *Artemia* nauplii for 24 h. After this period, the number of surviving nauplii was again counted. *Artemia* nauplii were counted, collecting all the live nauplii in each flask in 10 mL of clean seawater and then fixing them with 5 mL of ethilic alcohol (96×). The nauplii were then removed in small drops with a glass Pasteur pipette from the bottom of the recipient where they had sedimented, placed on a glass slide, and the nauplii in all the drops were counted and added to have a final number per flask.

Oxytetracycline analysis through high performance liquid chromatography (HPLC)

The postlarvae were collected from the aquaria, rinsed with distilled water, wrapped in foil paper, and stored at -80°C until further analysis.

The chromatographic analysis followed the methodology of Bermúdez-Almada *et al.* (1999), adapted from Long *et al.* (1990) with minimal modifications. The samples (0.5 g) were weighed onto a glass mortar. Silica C₁₈ (2 g; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) with a particle size of 15 to 40 µm, 0.05 EDTA (ethylenediaminetetraacetate), and 0.05 g of oxalic acid were added. The mix was homogenized with the pestle. The paste formed was passed through a syringe with filter paper in the extremity to form a column. The matrix of the column was compressed to 4.5 mL and two volumes of 8 mL of hexane were passed. The oxytetracycline was eluted with two portions of 8 mL of acetonitrile-methanol (1:1 v/v) containing 0.06% of BHA (butylated hydroxyanisole, Sigma) and BTH (butylated hydroxytoluene, Sigma). The extract was evaporated until it dried in a water bath at 40°C, under an air flow. The residue was diluted in 1 mL of mobile phase and sonicated (Cole Parmer 8892) 45 min until suspension. The solution was centrifuged for 10 min at 17,000 × g. The supernatant was filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter. The analysis were performed in a liquid chromatograph (Varian 9010,

sobrenadante se pasó por un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm . Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos (Varian 9010, Sunnyvale, CA) equipado con un detector ultravioleta-visible (Varian 9050) a 365 nm. La muestra inyectada se extrajo con un flujo isocrático de ácido oxálico:acetonitrilo:metanol (70:27:3 v/v/v) a 1 mL min⁻¹ en un columna de fase reversa con C₁₈ (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm, Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL). La oxitetraciclina en las muestras se identificó por comparación del tiempo de retención con el del estándar. Todas las muestras se corrieron por duplicado.

Protocolo experimental

El sistema experimental usado consistió en 20 acuarios de vidrio con capacidad de 5 L y llenos con 3.5 L de agua de mar (temperatura 31 $\pm$ 1°C; salinidad 29 $\pm$ 2‰), filtrada por luz UV y con aireación individual a través de mangueras de aire conectadas a un aireador de 2.5 HP (Siemens, Alemania). El sistema fue estático. En cada acuario se colocaron 60 postlarvas. Los tratamientos se asignaron al azar con cuatro acuarios por tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

- R-OTC, postlarvas alimentadas *ad libitum* durante 4 h, con nauplios de *Artemia* conteniendo oxitetraciclina y Rich[®].
- RICH, postlarvas alimentadas *ad libitum* durante 4 h, con nauplios de *Artemia* conteniendo Rich[®].
- OTC, postlarvas alimentadas *ad libitum* durante 4 h, con nauplios de *Artemia* conteniendo oxitetraciclina.
- BAÑO, postlarvas alimentadas *ad libitum* durante 4 h, con nauplios de *Artemia* conteniendo Rich[®] y medicadas en un baño de oxitetraciclina con 20 mg de oxitetraciclina por litro de agua de mar.
- CTRL, postlarvas alimentadas *ad libitum* durante 4 h, con nauplios de *Artemia* no enriquecidos.

Transcurridas las 4 h del periodo de alimentación, se muestrearon ocho postlarvas diariamente de cada acuario y se congelaron a -80°C hasta su análisis por HPLC. Diariamente se realizaron recambios totales de agua en cada acuario retirando la *Artemia* y los antibióticos no consumidos. El experimento duró siete días y se llevó a cabo dos veces.

Análisis estadísticos

Los promedios de los resultados de cada acuario fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis después de verificar que no estaban distribuidos normalmente. En los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis indicó que había diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Zar, 1999).

Resultados

Se estimó que las postlarvas consumieron un promedio de 1334 nauplios por día (máximo = 1344, mínimo = 1321).

Sunnyvale, CA) equipped with an ultraviolet-visible detector (Varian 9050) at 365 nm. The injected sample was eluted with an isocratic flux of oxalic acid:acetonitrile:methanol (70:27:3 v/v/v) at 1 mL min⁻¹ in a reverse phase column with C₁₈ (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm, Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL). The oxytetracycline was identified by comparing its retention time with the standard. All samples were run in duplicate.

Experimental procedure

The experimental system used consisted of twenty 5-L glass aquaria with 3.5 L of seawater (temperature 31 $\pm$ 1°C; salinity 29 $\pm$ 2‰), filtered through UV light and aerated individually through airlines connected to a 2.5HP airblower (Siemens, Germany). The system was static. Sixty postlarvae were placed in each aquarium. Treatments were randomly assigned and four aquaria were allocated to each treatment. The treatments were the following:

- R-OTC, postlarvae fed *ad libitum* for 4 h with *Artemia* nauplii containing oxytetracycline and Rich[®].
- RICH, postlarvae fed *ad libitum* for 4 h with *Artemia* nauplii containing Rich[®].
- OTC, postlarvae fed *ad libitum* for 4 h with *Artemia* nauplii containing oxytetracycline.
- BATH, postlarvae fed *ad libitum* for 4 h with *Artemia* nauplii containing Rich[®] and medicated in a bath containing 20 mg of oxytetracycline per litre of seawater.
- CTRL, Postlarvae fed *ad libitum* for 4 h with un-enriched *Artemia* nauplii.

After the 4-h feeding period, eight postlarvae were sampled daily from each aquarium and frozen at -80°C until further analysis by HPLC. Daily total water changes were performed in every aquarium, removing the *Artemia* and antibiotics left-over. The experiment lasted seven days and was carried out twice.

Statistical analysis

The means of the results obtained from each aquarium were analyzed with a Kruskal-Wallis test, after it was verified that they were not normally distributed. When the Kruskal-Wallis test indicated significant differences among treatments, Dunn's multiple comparison test was used (Zar, 1999).

Results

Postlarvae were found to consume an average of 1334 nauplii per day (maximum = 1344, minimum = 1321).

No oxytetracycline was detected in any CTRL or RICH treatment.

No se detectó oxitetraciclina en ninguno de los tratamientos CTRL o RICH.

En la primera repetición del experimento, el promedio de oxitetraciclina medida en los tejidos de camarón en el tratamiento OTC fue $8.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un máximo de $19.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un mínimo de $5.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 1 y 4, respectivamente). La concentración media de oxitetraciclina en el tratamiento R-OTC fue $15.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las concentraciones máxima y mínima fueron 22.61 y $9.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 3 y 1, respectivamente). Para el tratamiento BAÑO, la concentración media fue de $25.64 \mu\text{g mL}^{-1}$, el máximo y mínimo fueron de 33.67 y $17.66 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 3 y 1, respectivamente). La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados ($H = 28.965$; $P < 0.001$). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn indicó que los tratamientos donde se aplicó oxitetraciclina eran significativamente diferentes de los tratamientos donde ésta no se aplicó. Sin embargo, el tratamiento OTC no fue significativamente diferente de ninguno de los otros tratamientos aplicados.

En la segunda repetición del experimento, el promedio de oxitetraciclina medido en el camarón para el tratamiento OTC fue $8.43 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un máximo de 14.96 y un mínimo de $3.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 3 y 2, respectivamente). La concentración media de oxitetraciclina en el tratamiento R-OTC fue $21.18 \mu\text{g mL}^{-1}$, y las concentraciones máxima y mínima fueron 28.31 y $10.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 3 y 6, respectivamente). Para el tratamiento BAÑO, la concentración media fue de $39.73 \mu\text{g mL}^{-1}$, el máximo y mínimo fueron de 43.08 y $14.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ (días 3 y 5 respectivamente). La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados ($H = 31.015$; $P < 0.001$). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn indicó que los tratamientos donde se aplicó oxitetraciclina eran significativamente diferentes de los tratamientos donde ésta no se aplicó. Sin embargo, el tratamiento OTC no fue significativamente diferente de ninguno de los otros tratamientos aplicados.

En la tabla 1 se presenta un resumen de las concentraciones de oxitetraciclina medidas en el tejido de camarón para todos los tratamientos en los dos experimentos.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la oxitetraciclina suministrada a las postlarvas de *L. vannamei* por siete días tiene poco valor terapéutico, dado que no fue posible lograr la concentración mínima inhibitoria (CMI) para aislados bacterianos frecuentemente asociados con enfermedades bacterianas en camarón, $304.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SD = 464.8) (Roque *et al.*, 2001). Con el tratamiento BAÑO se logró un máximo de $38.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ y, aunque los resultados del baño medicado tradicional (BAÑO) fueron mejores debido a la más alta incorporación de oxitetraciclina en los tejidos del camarón, no se lograron los valores propuestos ni la incorporación fue significativamente mas alta para esta ruta. La CMI reportada por Roque *et al.* (2001) para bacterias del género *Vibrio* aisladas a partir de

For the first repetition of the experiment, the average concentration of oxytetracycline measured in the shrimp in the OTC treatment was $8.23 \mu\text{g mL}^{-1}$, with a maximum of $19.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ and a minimum of $5.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (days 1 and 4, respectively). The average concentration of oxytetracycline in the R-OTC treatment was $15.24 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the maximum and minimum concentrations were 22.61 and $9.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (days 3 and 1, respectively). For the BATH treatment, the average concentration of oxytetracycline was $25.64 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the maximum and minimum were 33.67 and $17.66 \mu\text{g mL}^{-1}$ (days 3 and 1, respectively). The Kruskal-Wallis test indicated that there were significant differences among the treatments applied ($H = 28.965$, $P < 0.001$). Dunn's test indicated that the treatments in which oxytetracycline was applied were significantly different from the treatments in which no oxytetracycline was applied. However, the OTC treatment was not significantly different from any of the other treatments applied.

For the second repetition of the experiment, the average concentration of oxytetracycline measured in the shrimp in the OTC treatment was $8.43 \mu\text{g mL}^{-1}$, with a maximum of $14.96 \mu\text{g mL}^{-1}$ and a minimum of $3.18 \mu\text{g mL}^{-1}$ (days 3 and 2, respectively). The average concentration of oxytetracycline in the R-OTC treatment was $21.18 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the maximum and minimum concentrations were 28.31 and $10.31 \mu\text{g mL}^{-1}$, (days 3 and 6, respectively). For the BATH treatment, the average concentration of oxytetracycline was $39.73 \mu\text{g mL}^{-1}$, with a maximum and minimum of 43.08 and $14.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ (days 3 and 5, respectively). The Kruskal-Wallis test indicated that there were significant differences among the treatments applied ($H = 31.015$, $P < 0.001$). Dunn's test indicated that the treatments in which oxytetracycline was applied were significantly different from the treatments in which no oxytetracycline was applied. However, the OTC treatment was not significantly different from any of the other treatments applied.

A summary of the oxytetracycline concentrations measured in the shrimp tissues for all the treatments in both experiments is presented in table 1.

Discussion

The results obtained in this study indicate that the oxytetracycline offered to *L. vannamei* postlarvae for seven days is of little therapeutic value, since it was not possible to achieve the minimum inhibitory concentration (MIC) for bacterial isolates frequently associated with shrimp bacterial diseases: $304.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SD = 464.8) (Roque *et al.*, 2001). A maximum of $38.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ was achieved for the BATH treatment. Although the results for the medicated bath (BATH) were better because of the higher incorporation of oxytetracycline in the shrimp tissues, the proposed concentrations were not achieved nor was the incorporation significantly higher through this route. The MIC reported by Roque *et al.* (2001) for vibrios isolated from cultured shrimp (*L. vannamei* and *L. stylirostris*) is $304.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, and Stamm (1989) proposes

camarón de cultivo (*L. vannamei* y *L. stylirostris*) es $304.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ y Stamm (1989) propone que la dosis terapéutica a ser usada en acuicultura debe ser cuatro veces la CMI. El valor más alto detectado en este estudio ($38.38 \mu\text{g mL}^{-1}$) corresponde a aproximadamente un 4% del valor requerido.

Los resultados encontrados en este estudio contradicen los resultados de un estudio de Roque *et al.* (1998) en el que se muestra que es posible suministrar oxitetraciclina a *Penaeus monodon* usando a *Artemia* como bioacarreador. Esto probablemente se deba a que, en esa investigación las concentraciones de oxitetraciclina se estimaron por un bioensayo de difusión radial. Esa técnica se basa en la inhibición del crecimiento de una bacteria que funge como indicador de la presencia del antibiótico, no es una técnica específica y cualquier compuesto que contribuya a la inhibición del crecimiento bacteriano lo cuantifica como antibiótico, en este caso específico como oxitetraciclina, lo que pudiera provocar una sobreestimación (Barry y Thornsberry, 1991).

La aparentemente baja incorporación de oxitetraciclina en *Artemia* puede ser explicada por las condiciones de aireación (Leger *et al.*, 1987). La metabolización del antibiótico no se tomó en cuenta dado que la *Artemia* sólo estuvo en el sistema de enriquecimiento durante 4 h, y luego fue ofrecida a las postlarvas. La pérdida de antibiótico en los acuarios puede haber contribuido a los bajos niveles encontrados en camarón porque, después de 4 h en agua de mar limpia, la *Artemia* pierde cerca del 75% de la oxitetraciclina total incorporada (Gómez-Gil *et al.*, 2001) y, así, parte de la *Artemia* ingerida por las postlarvas hacia el final de las 4 h debe haber tenido muy poco valor terapéutico. Además, la oxitetraciclina es inestable en soluciones acuosas a pH entre 7 y 8.5 (Aiello y Mays, 1998), lo que cubre el pH del agua de mar (aproximadamente 7.9 a 8.2).

Se sabe que los laboratorios mexicanos de producción de postlarvas continúan aplicando oxitetraciclina directamente en el agua (Gómez-Gil *et al.*, 2001), sin embargo, este compuesto es muy soluble en el agua, y en el agua de mar forma sales con los cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Varios estudios sugieren que tan sólo el 0.4% de la oxitetraciclina es la proporción biodisponible para los peces (Nouws *et al.*, 1992). Otros estudios reportan proporciones biodisponibles más altas: 5% (Lunestad y Goksoyr, 1990), 1.25% (Nouws *et al.*, 1992) y 7–9% (Cravedi *et al.*, 1987). Por otro lado, en el suministro a través de alimento medicado se presenta el mismo problema porque la oxitetraciclina se liga al calcio de la dieta (Cravedi *et al.*, 1987) haciendo imposible la absorción de ésta a través de la membrana intestinal, debido a que los complejos de calcio y magnesio no cruzan membranas lipídicas tan eficazmente como la oxitetraciclina libre.

Los resultados de este estudio demuestran principalmente que las dosis de oxitetraciclina usadas en México en la larvicultura de camarón son inadecuadas y que, aunque el protocolo de bioencapsulación usado para la *Artemia* siguió las recomendaciones de Gómez-Gil *et al.* (2001), este antibiótico probablemente no contribuye a tratar enfermedades bacterianas

that the therapeutic dose to be used in aquaculture be four times the MIC. The highest concentration measured in this study ($38.38 \mu\text{g mL}^{-1}$) is approximately 4% of the required concentration.

The results found in this study contradict a study by Roque *et al.* (1998) where it was shown that it is possible to deliver oxytetracycline to *Penaeus monodon* using *Artemia* as a bio-carrier, probably because the oxytetracycline measurements were estimated using radial diffusion bioassay. This technique is based on growth inhibition of a bacterium functioning as an indicator of the presence of the antibiotic; however, it is not specific and any compound contributing to bacterial growth inhibition will be counted as the antibiotic in the study, in this case as oxytetracycline, which would cause an overestimation (Barry and Thornsberry, 1991).

The apparently low incorporation of oxytetracycline in the *Artemia* can be explained by the aeration conditions (Leger *et al.*, 1987). Metabolization of the antibiotic is not being taken into account, since *Artemia* were in the enrichment system for only 4 h and then offered to the postlarvae. Loss of antibiotic whilst in the shrimp aquaria may have contributed to the low levels found in shrimp because, after 4 h in clean seawater, *Artemia* loses around 75% of the total oxytetracycline incorporated (Gómez-Gil *et al.*, 2001), and therefore some of the *Artemia* ingested by the shrimp towards the end of the feeding time may have been of very little therapeutic value. Moreover, oxytetracycline is also known to be unstable in aqueous solutions at pH between 7 and 8.5 (Aiello and Mays, 1998), which covers the pH of seawater (around 7.9 to 8.2).

It is a known fact that Mexican shrimp-hatchery farmers still use oxytetracycline directly in seawater (Gómez-Gil *et al.*, 2001). However, this compound is highly water soluble and in seawater forms insoluble salts with divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} . Several studies suggest that as little as 0.4% of this compound is bioavailable for fish (Nouws *et al.*, 1992). Other studies have reported higher proportions of bioavailability: 5% (Lunestad and Goksoyr, 1990), 1.25% (Nouws *et al.*, 1992), and 7–9% (Cravedi *et al.*, 1987). On the other hand, if the application is made through medicated feed, the same problem arises and oxytetracycline binds to the calcium in the diet (Cravedi *et al.*, 1987), making its absorption impossible through fish intestine since both calcium and magnesium complexes do not cross lipid-rich membranes as efficiently as free oxytetracycline.

The results of this study show that the doses of oxytetracycline used in Mexico for shrimp larviculture are inadequate and that even though the protocol used for the *Artemia* bioencapsulation followed the proportions suggested by Gómez-Gil *et al.* (2001), this antibiotic probably does not contribute to treat bacterial diseases in shrimp. During an outbreak of bacterial disease, its use could have two effects: (a) it decreases the total number of bacteria in the water column, so less shrimp will be affected by them; and (b) it decreases the total number of

Tabla 1. Concentración de oxitetraciclina medida en tejidos de camarón para cada día y cada tratamiento. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones (repetición 1 y 2). Nd = no detectado; 1 mL de extracto = 0.5 g de tejido de camarón.**Table 1.** Concentration of oxytetracycline measured in shrimp tissue for every day in each treatment. Results are an average of all the measurements pooled together (repetitions 1 and 2). Nd = not detected; 1 mL of extract = 0.5 g of shrimp tissue.

Día	CTRL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RICH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	OTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R-OTC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BAÑO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	Nd	Nd	12.18 $\pm$ 9.7	16.60 $\pm$ 10.6	30.22 $\pm$ 17.8
2	Nd	Nd	5.54 $\pm$ 3.3	16.00 $\pm$ 8.8	25.92 $\pm$ 2.7
3	Nd	Nd	11.56 $\pm$ 4.8	25.46 $\pm$ 4	38.38 $\pm$ 6.7
4	Nd	Nd	9.42 $\pm$ 5.4	16.32 $\pm$ 6.9	29.61 $\pm$ 8.8
5	Nd	Nd	7.65 $\pm$ 2.5	21.34 $\pm$ 0.28	16.88 $\pm$ 3.4
6	Nd	Nd	7.14	10.31	23.54
7	Nd	Nd	5.77 $\pm$ 0.6	18.98 $\pm$ 8.1	26.30 $\pm$ 8.1

del camarón. Dos efectos podrían estar resultando de su uso: (a) durante un brote de enfermedad bacteriana podría estar reduciendo el número total de bacterias presentes en la columna de agua, e indirectamente contribuir a que menos camarones sean afectados por ellas; (b) durante un brote de enfermedad bacteriana podría estar reduciendo el número total de bacterias presentes en la columna de agua y contribuir así a seleccionar bacterias resistentes.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto SIMAC No. 98016073 y por Maricultura del Pacífico, SA de CV. El segundo autor fue becado por CONACYT y CECYT para la realización de este trabajo.

Referencias

- Aiello, S.E. and Mays, A. (1998). The Merck Veterinary Manual. 8th ed. Merck and Co., Whitehouse Station, NJ, USA, 2305 pp.
- Barry, A.L. and Thornsberry, C. (1991) Susceptibility tests: Diffusion test procedures. In: A. Balows, W.J. Hausler Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg and H.J. Shadomy (eds.), Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Chapter 111, pp. 1117–1125.
- Bermúdez-Almada, M.C., Pérez-Tello, M.G., Valenzuela-Quintanar, A.I. and Vázquez-Moreno, L. (1999). Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. *J. Food Sci.*, 64: 638–640.
- Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A.P. and Sogerloos, P. (1991). Live food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. II. A case study with European seabass. In: Larvi'91. EAS Spec. Publ. No. 15.
- Cherel, P. and Nin, F. (1991). Antibiotherapy using biocarriers (*Artemia salina*) in hatcheries. In: C. Michel and D.J. Alderman (eds.), Chemotherapy in Aquaculture, from Theory to Reality. OIE Paris, pp. 389–391.
- Cravedi, J.P., Choubert, G. and Delous, G. (1987). Digestibility of chloramphenicol, oxalinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*, 60: 133–141.

bacteria in the water column, contributing to select resistant bacteria.

Acknowledgements

This study was funded by SIMAC grant No. 98016073 and Maricultura del Pacífico, SA de CV. The second author was funded by CONACYT and CECYT scholarships.

English translation by the authors.

- FAO (2002). FAO Fisheries Department, Fishery information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Vers. 2.3 (2000). Datasets: Aquaculture production: quantities 1970–2000, Aquaculture production: values 1984–2000, Capture production 1970–2000.
- Gómez-Gil, B., Cabanillas Ramos, J., Paez Brambila, S. and Roque, A. (2001). Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. *Aquaculture*, 196: 1–12.
- Leger, P., Naeseens-Foucquaert, E. and Sogerloos, P. (1987). International study on *Artemia* XXXV: Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia nauplii*, and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysodopsis bahia* (M.). In: P. Sorgerloos, D.A. Bengton, W. Decleir and E. Jaspers (eds.), *Artemia* Research and its Applications, 3: Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, pp. 411–424.
- Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R. and Barker, S.A. (1990). Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73: 864–682.
- Lunestad, B.T. and Goyksor, J. (1990). Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in seawater by complex formation with magnesium and calcium. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 67–72.
- Mohney, L.L., Lightner, D.V., Williams, R.R. and Bauerlein, M. (1990). Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of brine shrimp *Artemia* and in the nematode *Panagrellus redivivus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 21: 186–191.

- Nouws, J.F.M., Grondel, J.L., Boon, J.H., Van Ginneken, V.J.T. (1992). Pharmacokinetics of antimicrobials in some freshwater fish species. In: C. Michel and D.J. Alderman (eds.), Chemotherapy in Aquaculture, from Theory to Reality. OIE Paris, pp. 437–447.
- Roque, A. y Gómez-Gil, B. (2003). Therapeutic effects of enrofloxacin in an experimental infection with a luminescent *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* Kellogg 1906. Aquaculture, 220: 37–42.
- Roque, A., Turnbull, J.F. and Gómez-Gil, B. (1998). Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to the marine shrimp *Penaeus monodon*. J. World Aquacult. Soc., 29: 249–251.
- Roque, A., Molina-Aja, A., Bolan-Mejía, C. and Gómez-Gil, B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimp in northwestern Mexico. Int. J. Antimicrob. Agents, 17: 383–387.
- Sogerloos, P., Bossuyt, E., Laviña, E., Baeza-Meza, M. and Persoone, G. (1977). Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture, 12: 311–315.
- Stamm, J.M. (1989). *In vitro* resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (8a-56620). J. Aquat. Anim. Health, 1: 135–141.
- Zar, J.H. (1999). Biostatistical Analysis. 4th ed. Prentice Hall.