

Oxytetracycline water bath treatment of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) affected by the withering syndrome

Tratamiento con baños de oxitetraciclina a jóvenes de abulón azul *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) afectados por el síndrome de deshidratación

Z García-Esquivel^{1*}, J Cáceres-Martínez², S Montes-Magallón¹

¹ Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada 22870, Baja California, México.

² Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada-Tijuana # 3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California, México.

*Corresponding author. E-mail: sgarcia@uabc.edu.mx

ABSTRACT. The fatal abalone disease named withering syndrome (WS), caused by a Rickettsiales-like prokaryote classified as *Xenohaliotis californiensis*, has been treated by injections and oral administration of oxytetracycline (OTC) with relatively successful results. These therapeutic treatments have practical limitations for their application in aquacultural and experimental facilities due to the inability to eat of severely ill organisms, and the need to incorporate the antibiotic in pelletized food, increasing production costs. During an experiment to determine the effect of photoperiod and temperature on the growth of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens*, some animals showed overt symptoms of WS. Oxytetracycline baths at 400 mg L⁻¹ were used for one hour daily during seven days to treat diseased animals. The metabolic rate of one group of these organisms was also assessed. Recovery time (time for an organism to regain the upright position) and size were assessed on days 0, 14, and 29. By the third day of treatment, most treated animals regained a limited adhesion capacity, and began to ingest food and to produce feces. After one week, more than 50% of the treated abalone were capable of regaining the upright position within the first 10 min of being turned upside down. After 30 days all organisms showed strong adhesion to the substrate. Metabolic rate declined from 380 (initially) to 280 $\mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ after two weeks of treatment. This study opens the door for further research on the use of OTC baths for practical use in abalone culture and management.

Key words: blue abalone, *Haliotis fulgens*, withering syndrome, oxytetracycline.

RESUMEN. La enfermedad mortal conocida como síndrome de deshidratación (SD), causada por un organismo procariota del tipo Rickettsiales clasificado como *Xenohaliotis californiensis*, ha sido tratada con éxito relativo mediante inyecciones y la administración oral de oxitetraciclina (OTC). Estos tratamientos terapéuticos tienen limitaciones prácticas para su aplicación en instalaciones acuiculturales y experimentales debido a la incapacidad de los organismos severamente enfermos para alimentarse y a la necesidad de incorporar el antibiótico en alimento peletizado, aumentando así los costos de producción. Durante un experimento para determinar el efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre el crecimiento de jóvenes del abulón azul *Haliotis fulgens*, algunos animales mostraron síntomas del SD. Para el tratamiento de los animales enfermos se utilizaron baños de OTC a 400 mg L⁻¹ durante una hora diaria por siete días. También se cuantificó la tasa metabólica de un grupo de estos organismos. El tiempo de recuperación (tiempo para que un organismo volteado recupere su posición correcta) y la talla fueron evaluados a los 0, 14 y 29 días. Al tercer día del tratamiento la mayoría de los animales recuperaron una capacidad limitada de adhesión, y comenzaron a ingerir alimento y a producir heces. Después de una semana, más del 50% de los abulones tratados recuperaron su posición normal en los primeros 10 min después de haber sido volteados. Después de 30 días, todos los organismos mostraron una capacidad fuerte de adhesión. La tasa metabólica disminuyó de 380 (inicial) a 280 $\mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ después de dos semanas de tratamiento. El presente estudio abre la puerta para realizar investigaciones posteriores sobre el uso y manejo práctico de baños de OTC en el cultivo de abulón.

Palabras clave: abulón azul, *Haliotis fulgens*, síndrome de deshidratación, oxitetraciclina.

INTRODUCTION

During the course of an experiment to determine the effect of photoperiod and temperature on the growth of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens* (see García-Esquivel *et al.* 2007), some animals exhibited overt signs of withering syndrome (WS), an infectious fatal disease of abalone species from the Pacific coast of North America (Friedman

INTRODUCCIÓN

En el transcurso de un experimento para determinar el efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre el crecimiento de jóvenes del abulón azul *Haliotis fulgens* (ver García-Esquivel *et al.* 2007), algunos animales mostraron síntomas del síndrome de deshidratación (SD), una enfermedad infecciosa mortal de las especies de abulón de la costa Pacífica de

and Finley 2003, Cáceres-Martínez and Tinoco-Orta 2001, Alvarez *et al.* 2002). The clinical signs of WS are weakness, lethargy, shrinking of foot muscle, mantle retraction, poor gonad development, the inability to tightly adhere to the substrate, and death (Haaker *et al.* 1992, VanBlaricom *et al.* 1993). Gardner *et al.* (1995) suggested a strong pathogen-disease association. The pathogen was described as an intracellular Rickettsiales-like prokaryote (RLP) that infects the epithelial cells lining the gut and enzyme-secreting cells of the digestive diverticula. The association of these intracellular bacteria and WS was accepted based on indirect studies using injection of antibiotics in diseased abalone and their further recovery (Friedman *et al.* 2003, Moore *et al.* 2000). Friedman *et al.* (2000), through antigenic, physiological and life history characteristics, and sequence of the 16s rRNA gene, identified the bacteria as *Xenohalotis californiensis*. Studies for the treatment of diseased abalone showed that these bacteria could be treated with injections of oxytetracycline (OTC) into the foot muscle (Friedman *et al.* 2003). Oral administration of this antibiotic has also been relatively successful against RLPs in both pilot- and production-scale applications (Friedman *et al.* 2003, 2007). Oxytetracycline baths have not been previously used to control this disease in abalone, but they have been used at the experimental level for the treatment of infections in fish, with rather poor results when compared to injected or medicated feeding (Marking *et al.* 1988). The main reason for this is the high antibiotic concentrations needed to obtain a significant inhibitory response (O'Grady *et al.* 1988). Poor results of bath-administered OTC have also been reported in the treatment of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae affected with bacillary necrosis (Matsubara *et al.* 2002) or scallop *Pecten maximus* larvae (Torkildsen *et al.* 2002); however, no discrimination was made between the effects of the antibiotic and manipulation on the overall mortality of these stages. Despite these results, the use of medicated water baths could still represent a potentially important tool in mollusks, since this group readily absorbs dissolved organic matter (Manahan 1990, Wright and Ahearn 1997) and contains peripheral receptors for some drugs (Betti *et al.* 2003). Additionally, their use could be of practical advantage under culture conditions because it is not necessary to mix the drug with the food and it may still act on individuals afflicted enough by the WS that they are unable to handle medicated feeding. Finally, it is easy to dispose of any unused OTC from the treatment tanks so that the antibiotic or its residues are not carried into the culture facility. In this study we document the response to OTC water baths of WS in juvenile blue abalone *H. fulgens*.

METHODS

Abalone

During an experiment to determine the effect of temperature and photoperiod on the growth and feeding physiology

Norte América (Friedman y Finley 2003, Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta 2001, Alvarez *et al.* 2002). Los síntomas clínicos del SD son debilidad, letargo, reducción del músculo del pie, retracción del manto, desarrollo gonadal pobre, incapacidad de adherirse firmemente al sustrato y muerte (Haaker *et al.* 1992, VanBlaricom *et al.* 1993). Gardner *et al.* (1995) sugirieron una fuerte relación entre patógeno y enfermedad. Se describió el patógeno como un organismo procariota del tipo Rickettsiales (RLP, por sus siglas en inglés) que infecta las células epiteliales que recubren el intestino y las células secretoras de enzimas del divertículo digestivo. La asociación entre estas bacterias intracelulares y el SD se determinó a partir de estudios indirectos en los cuales se administraron inyecciones de antibióticos a abulones infectados y su posterior recuperación (Friedman *et al.* 2003, Moore *et al.* 2000). Friedman *et al.* (2000), mediante características antigénicas, fisiológicas y de historia de vida, así como la secuencia del gen 16s rRNA, identificaron la bacteria como *Xenohalotis californiensis*. Experimentos para el tratamiento de abulones infectados han mostrado que estas bacterias pueden ser tratadas con inyecciones de oxitetraciclina (OTC) en el músculo del pie (Friedman *et al.* 2003). La administración oral de este antibiótico también ha resultado relativamente exitoso contra los RLP en aplicaciones a escala tanto piloto como de producción (Friedman *et al.* 2003, 2007). Los baños de OTC no han sido utilizados previamente para controlar esta enfermedad en abulones, pero sí se han utilizado a nivel experimental para el tratamiento de infecciones en peces, con resultados algo pobres en comparación con la administración oral o inyectada (Marking *et al.* 1988). Esto se debe principalmente a las altas concentraciones de antibiótico que se requieren para obtener una respuesta inhibitoria significativa (O'Grady *et al.* 1988). También se han documentado resultados pobres para los tratamientos con baños de OTC de larvas triploides del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* afectadas con necrosis bacilar (Matsubara *et al.* 2002) o de larvas de la vieira *Pecten maximus* (Torkildsen *et al.* 2002); sin embargo, no se realizó una discriminación entre los efectos del antibiótico y la manipulación en la mortalidad total de estas etapas. A pesar de estos resultados, el uso de baños de agua medicados podría representar una herramienta potencialmente importante en el caso de los moluscos, ya que éstos absorben materia orgánica disuelta con facilidad (Manahan 1990, Wright y Ahearn 1997) y tienen receptores periféricos para captar algunos medicamentos (Betti *et al.* 2003). Además, su uso podría ser de ventaja práctica en condiciones de cultivo, ya que no es necesario mezclar el medicamento con el alimento, y podría actuar en individuos lo suficientemente afectados con el SD que no pueden consumir alimento medicado. Finalmente, es fácil deshacerse de cualquier OTC no utilizado de los tanques de tratamiento para evitar que el antibiótico o sus residuos sean introducidos en el sistema de cultivo. En el presente trabajo se documenta la respuesta a los baños de OTC del SD en individuos jóvenes del abulón azul *H. fulgens*.

of juvenile *H. fulgens* over a period of six months (García-Esquivel *et al.* 2007), abalone maintained at 25 °C began to develop mild signs of WS as indicated by their relatively easy detachment from the walls of the containers. Thirty abalone (35.4 ± 0.7 mm, 6.6 ± 0.4 g live weight) were randomly sampled and sacrificed, and their muscle and visceral mass were fixed whole in Davidson's fixative (Shaw and Battle 1957) for 24 h. Sections containing portions of the digestive tract (posterior esophagus included), kidney, muscle, epipodium, gonads, and gills were processed for histology. Sections of 5 μ m were stained with iron hematoxyline and eosin. The RLP infection intensity was estimated considering the number of bacterial foci in each histological preparation at 200 $\times$ magnification (sum of all foci on the slide), which were enumerated using a modification of the scale proposed by Friedman *et al.* (1997): (0) no RLPs, (1) 1 to 10 RLPs, (2) 11 to 100 RLPs, (3) 101 to 1000 RLPs, and (4) >1000 RLPs.

The general condition of organisms worsened and mortality increased in the following four months. For this reason, in September 2002, a total of 20 abalone with severe symptoms of WS (unable to eat pelleted food, additional loss of muscle mass, lack of adhesion to the side walls of the container, turned upside down most of the time) were treated as described below.

Antibiotic treatment and recovery assessment

Two abalone groups (group A, 41.8 ± 1.6 mm, 10.7 ± 1.1 g total wet weight; group B, 45.4 ± 2.2 mm, 13.7 ± 2.0 g), each consisting of 10 severely diseased organisms, were simultaneously used for the experimental treatment with OTC baths (Terramycin capsules [oxytetracycline hydrochloride], Pfizer Inc.). The solution was prepared in advance by diluting OTC with filtered seawater in a 2-L plastic beaker until a final concentration of 400 mg OTC L⁻¹ (ca. 3.2 g of powdered Terramycin capsules per liter) was reached. Treatment started on day 0 (group A) or day 14 (group B). Diseased organisms from each group were transferred from the flow-through seawater system (20 °C) to the water bath. Organisms remained in the water bath for one hour with aeration but no flow. At the end of the treatment, abalone were rinsed with seawater and transferred back to the flow-through system. The bath treatment was repeated daily for seven consecutive days, and visual, qualitative observations of the strength of attachment to the rearing containers were carried out during this period.

The recovery capacity, defined here, according to Aquilina and Roberts (2000), as "the time for an organism to regain the upright position when turned upside down", was assessed in parallel in both groups on days 0, 14, and 29. Abalone were transferred to the bottom of a plastic tray with seawater and placed in an upside down position. The recovery capacity was recorded for each individual during a total period of 20 min. At the end of each trial the cumulative percent of recovered organisms was scored and plotted.

MÉTODOS

Abulón

Durante un experimento para determinar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre el crecimiento y la fisiología alimenticia de jóvenes de *H. fulgens* en un periodo de seis meses (García-Esquivel *et al.* 2007), los abulones mantenidos a 25 °C empezaron a mostrar síntomas leves del SD al desprenderse con relativa facilidad de las paredes de los recipientes. Treinta abulones (35.4 ± 0.7 mm, 6.6 ± 0.4 g de peso vivo) fueron seleccionados aleatoriamente y sacrificados, y su músculo y masa visceral se fijaron en el fijador de Davidson (Shaw y Battle 1957) por 24 h. Se procesaron secciones con porciones del tracto digestivo (incluyendo el esófago posterior), riñón, músculo, epipodio, gónadas y branquias para su estudio histológico. Se tiñeron secciones de 5 μ m con hematoxilina de hierro y eosina. La intensidad de la infección de RLP se estimó considerando el número de inclusiones de bacterias en cada preparación histológica a una magnificación de 200 $\times$ (suma de todos los focos sobre el portaobjeto), los cuales se enumeraron usando una modificación de la escala propuesta por Friedman *et al.* (1997): (0) cero RLP, (1) de 1 a 10 RLP, (2) de 11 a 100 RLP, (3) de 101 a 1000 RLP y (4) >1000 RLP.

La condición general de los organismos empeoró, incrementando la mortalidad en los siguientes cuatro meses. Por tal razón, en septiembre de 2002 se trataron un total de 20 abulones con síntomas severos del SD (incapacidad de ingerir alimento peletizado, pérdida adicional de masa muscular, incapacidad de adherirse a las paredes laterales del recipiente, volteados al revés la mayor parte del tiempo) como se describe a continuación.

Tratamiento antibiótico y evaluación de la recuperación

Se utilizaron de forma simultánea dos grupos de abulones (grupo A, 41.8 ± 1.6 mm, 10.7 ± 1.1 g de peso húmedo total; grupo B, 45.4 ± 2.2 mm, 13.7 ± 2.0 g), cada uno con 10 individuos infectados severamente, para el tratamiento experimental con baños de OTC (Terramicina [clorhidrato de oxitetraciclina], Pfizer Inc.). La solución se preparó de antemano diluyendo la OTC con agua de mar filtrada en un recipiente de plástico de 2 L hasta una concentración final de 400 mg OTC L⁻¹ (ca. 3.2 g de cápsulas de Terramicina pulverizadas por litro). El tratamiento inició el día 0 (grupo A) o el día 14 (grupo B). Los organismos enfermos de cada grupo fueron transferidos de un sistema abierto con flujo de agua de mar (20 °C) al baño de OTC, donde permanecieron durante una hora con aireación, pero sin flujo. Al finalizar el tratamiento, los abulones fueron enjuagados con agua de mar antes de ser regresados al sistema de flujo abierto. El tratamiento se repitió diariamente por siete días consecutivos, realizándose observaciones visuales y cualitativas de la fuerza de adhesión a los recipientes durante este periodo.

Metabolic rate

Metabolic rate (rate of oxygen consumption, VO_2) was measured in group B organisms just before the OTC treatment (day 14) and two weeks later (day 29) by closed-cell respirometry. Previous work carried out on juvenile *H. fulgens* abalone has shown that metabolic rate is a sensitive variable that readily reflects the instantaneous physiological state of abalone and any stress response produced by drugs such as anesthetics (Chacón *et al.* 2003). Briefly, five metabolic chambers (ca. 1.8 L capacity) containing two abalone each and three blank chambers (without abalone) were run in parallel to measure the change in oxygen concentration. Continuous readings were performed over a period of one hour with polarographic oxygen sensors attached to two multi-channel oxygen meters (Strathkelvin Instruments). Two or three incubations were performed between 11:00 a.m. and 4:00 p.m., and the mean of all incubations carried out on each date was used to estimate the diurnal metabolic rates, following the methods of Chacón *et al.* (2003).

RESULTS

Histopathological analysis

The RLPs were found in all WS symptomatic abalone (100% prevalence) with an intensity ranging from 1 to 4; the average value of mean intensity was 3.75. These bacteria infected the epithelial cells of the digestive tract, including the posterior esophagus, stomach, digestive diverticula, and intestine (fig. 1a, b). The RLPs formed colonies inside a large vacuole in the cytoplasm of the infected cells. These colonies varied in shape from round to elongated and their size ranged from 16.3×9.6 to $23 \times 11 \mu\text{m}$ (fig. 1c). The host cell nucleus was displaced to the limit of the cytoplasm; the host cell became hypertrophied (fig. 1d) and when the digestive gland was heavily infected, there was metaplasia of the epithelium (fig. 1e). Several infected cells were observed disrupted and bacterial colonies were expelled into the lumen of the digestive tract (fig. 1f).

Recovery trials

Sick organisms were unresponsive the first day during the 1-h treatment with OTC. Nevertheless, OTC baths produced a rapid and consistent therapeutic effect on both abalone groups, such that on the third day of treatment they showed mild signs of adhesion to the rearing containers and began to ingest food and produce feces. Short-term assessment of the therapeutic effect of OTC was also evident from the recovery trials, since 70% of untreated organisms from both groups took longer than 20 min to regain the upright position at the beginning of the experiment, but two weeks after the treatment, 100% of the organisms from group A and 90% from group B were able to recover the upright position within the

La capacidad de recuperación, definida aquí, según Aquilina y Roberts (2000), como “el tiempo para que un organismo en posición invertida recupere su posición correcta”, se evaluó simultáneamente en ambos grupos los días 0, 14 y 29. Los organismos fueron colocados en el fondo de una bandeja de plástico con agua de mar y volteados. La capacidad de recuperación se registró para cada individuo durante un periodo total de 20 min. Al final de cada ensayo se determinó y graficó el porcentaje acumulativo de los organismos que recuperaron su posición normal.

Tasa metabólica

La tasa metabólica (tasa de consumo de oxígeno, VO_2) se midió en los organismos del grupo B justo antes de iniciar el tratamiento con OTC (día 14) y dos semanas después (día 29) mediante respirometría en cámaras cerradas. Estudios anteriores realizados en jóvenes de *H. fulgens* han mostrado que la tasa metabólica es una variable sensible que refleja la condición fisiológica instantánea de los abulones y cualquier respuesta de estrés producida por medicamentos como los anestésicos (Chacón *et al.* 2003). Brevemente, se corrieron en paralelo cinco cámaras metabólicas (ca. 1.8 L de capacidad) con dos abulones cada una y tres cámaras vacías (sin abulones) para medir el cambio en la concentración de oxígeno, realizándose lecturas continuas durante un periodo de una hora con sensores polarográficos de oxígeno conectados a dos oxímetros (Strathkelvin Instruments). Se realizaron de dos a tres incubaciones entre 11:00 a.m. y 4:00 p.m., y se utilizó el promedio de todas las incubaciones realizadas en cada fecha para estimar las tasas metabólicas diarias siguiendo el método propuesto por Chacón *et al.* (2003).

RESULTADOS

Análisis histopatológico

Los RLP se encontraron en todos los abulones con síntomas del SD (prevalencia de 100%) con una intensidad de 1 a 4; el valor promedio de la intensidad media fue de 3.75. Estas bacterias infectaron las células epiteliales del tracto digestivo, incluyendo el esófago posterior, estómago, divertícula digestiva e intestino (fig. 1a, b). Los RLP formaron colonias dentro de una vacuola grande en el citoplasma de las células infectadas. Estas colonias variaron en forma desde redondas hasta elongadas y su tamaño varió de 16.3×9.6 a $23 \times 11 \mu\text{m}$ (fig. 1c). El núcleo de la célula huésped fue desplazado al límite del citoplasma; la célula huésped se hipertrofió (fig. 1d) y cuando la glándula digestiva resultó severamente infectada se observó metaplasia epitelial (fig. 1e). Varias células infectadas se observaron rotas y las colonias bacterianas fueron expulsadas hacia el lumen del tracto digestivo (fig. 1f).

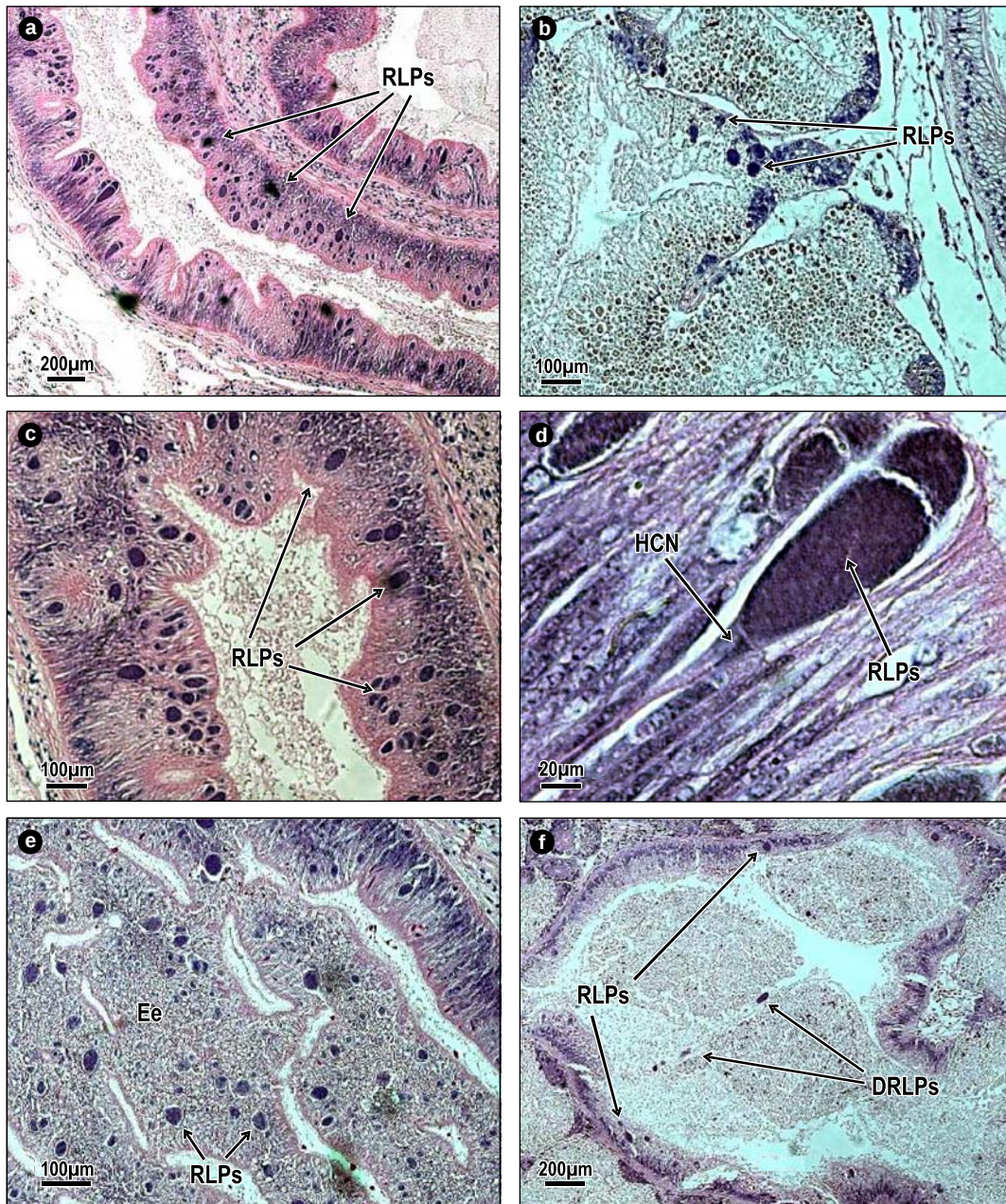


Figure 1. (a) Post-esophagus of blue abalone heavily infected (4+) by Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs). (b) Digestive diverticula infected (1+) by RLPs. (c) Post-esophagus of heavily infected abalone showing different shapes and sizes of RLPs. (d) Epithelial cell infected by RLPs, where the nucleus of the host cell (HCN) is comprised and the host cell is hypertrophied. (e) Enlarged epithelia (Ee) of heavily infected abalone. (f) Detached bacterial colonies (DRLPs) in the lumina of the intestine.

Figura 1. (a) Esófago posterior de abulón azul severamente infectado (4+) por organismos procariotas del tipo Rickettsiales (RLPs). (b) Divertículos digestivos infectados (1+) por RLPs. (c) Esófago posterior de abulón severamente infectado mostrando diferentes formas y tamaños de RLPs. (d) Célula epitelial infectada por RLPs; se muestra el núcleo de la célula huésped (HCN) la cual se encuentra hipertrofiada. (e) Epitelios ensanchados (Ee) de abulón severamente infectado. (f) Colonias bacterianas desprendidas (DRLPs) en el lumen del intestino.

first 15 min (table 1). By the end of the month all organisms had to be dislodged with a spatula due to their strong adhesion to the walls of the containers. None of the organisms from group A died during or after the OTC treatment; however, one organism from group B died four days after initiating the OTC treatment.

Metabolic rate measured in group B organisms tended to decrease, although non-significantly, after the OTC treatment. It declined from $382 \pm 52 \mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (diseased, untreated organisms) to $283 \pm 20 \mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ after two weeks from the beginning of the treatment (fig. 2).

DISCUSSION

It has been documented that some forms of OTC have rather limited bioavailability because they chelate or form complexes with polyvalent cations such as Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{+++} , and Mg^{++} (Riviere and Spoo 1995), yet the form of OTC used in the present study (OTC hydrochloride) is readily soluble in water, and the solution becomes turbid due to the release of the OTC base into the water (FDA 2006). Therefore, it would be expected that as long as the compound remains in the solution it will be available for the abalone to take up through the gills or adsorb throughout the body surface. The preliminary results of the present study showed that 1 h of OTC water baths rapidly induced the recovery of severely ill abalone, as reflected by: (a) the ability of treated abalone to re-attach to the sides of the container's wall as early as three days from the beginning of its application, (b) their ability to shorten the time to regain an upright position, and (c) the decrease in metabolic rate. The ability of abalone to regain the ventral position has already been used as practical criteria for assessing the degree of recovery in post-anesthetized organisms (Aquilina and Roberts 2000, Chacón *et al.* 2003). The recovery data obtained from both groups A and B two weeks after the treatment are comparable to values previously reported

Ensayos de recuperación

Los organismos enfermos no respondieron el primer día al tratamiento de 1 h con OTC. No obstante, los baños de OTC tuvieron un efecto terapéutico rápido y consistente en ambos grupos de abulones, y al tercer día del tratamiento los animales recuperaron una capacidad limitada de adhesión a las paredes de los recipientes y comenzaron a ingerir alimento y a producir heces. El efecto terapéutico a corto plazo también fue evidente en los ensayos de recuperación, ya que el 70% de los organismos no tratados de ambos grupos requirieron más de 20 min para voltearse al inicio del experimento, pero dos semanas después del tratamiento, el 100% de los organismos del grupo A y el 90% del grupo B pudieron recuperar su posición normal dentro de los primeros 15 min (tabla 1). Después de 30 días, fue necesario desprender todos los organismos con una espátula debido a su fuerte adhesión a las paredes de los recipientes. Ningún organismo del grupo A murió durante o después del tratamiento con OTC; sin embargo, un organismo del grupo B murió cuatro días después de iniciar el tratamiento.

La tasa metabólica medida en los organismos del grupo B presentó una tendencia a disminuir, aunque no significativamente, después del tratamiento con OTC. Esta tasa decreció de $382 \pm 52 \mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (organismos infectados, no tratados) a $283 \pm 20 \mu\text{L O}_2 \text{ ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ después de dos semanas de iniciar el tratamiento (fig. 2).

DISCUSIÓN

Se ha documentado que algunas formas de OTC tienen una biodisponibilidad limitada debido a sus propiedades quelantes o porque forman complejos con cationes polivalentes como Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{+++} y Mg^{++} (Riviere y Spoo 1995); sin embargo, la forma de OTC empleada en el presente trabajo (clorhidrato de OTC) es fácilmente soluble en agua, y la

Table 1. Percent of juvenile *Haliotis fulgens* that recovered, in the time frame indicated, the upright position after being turned upside down. Organisms showing overt signs of withering syndrome were treated with oxytetracycline water baths, applied for one hour during the first seven days only, starting on day 0 (group A) or day 14 (group B). Recordings were based on 10 individuals per group, except on day 29 (group B, 9 individuals).

Tabla 1. Porcentaje de jóvenes de *Haliotis fulgens* que recuperaron, en el periodo de tiempo indicado, la posición correcta después de haber sido volteados. Aquellos organismos con signos evidentes del síndrome de deshidratación fueron sometidos a un tratamiento con baños de oxitetraciclina, aplicados por una hora durante los primeros siete días a partir del día 0 (grupo A) o el día 14 (grupo B). Los registros se basaron en 10 individuos por grupo, con excepción del día 29 (grupo B, 9 individuos).

Recovery period	Day 10		Day 14		Day 29	
	Group A (bath)	Group B	Group A	Group B (bath)	Group A	Group B
1 to 5 min	20	0	30	0	30	33
6 to 10 min	0	0	30	10	60	22
11 to 15 min	0	30	40	20	10	33
16 to 20 min	10	10	0	0	0	11
>20 min	60	0	0	70	0	0

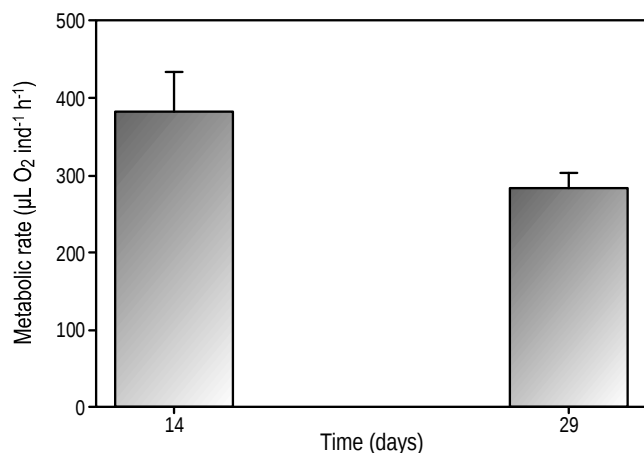


Figure 2. Metabolic rate ($\pm$ standard error) shown by juvenile *Haliotis fulgens* before (day 14) and after (day 29) the use of oxytetracycline bath treatments.

Figura 2. Tasa metabólica ($\pm$ error estándar) de jóvenes de *Haliotis fulgens* medida antes (día 14) y después (día 29) del tratamiento con baños de oxitetraciclina.

for healthy juvenile *H. fulgens* (ca. 80% recovery within 20 min) of similar size (25–35 mm, Chacón *et al.* 2003), thus suggesting that organisms treated with OTC baths (this study) readily recovered their motor activity.

Metabolic rate has proven to be a sensitive tool for assessing the degree of post-anesthesia physiological recovery (Chacón *et al.* 2003). It would be expected that any number of factors could contribute to a change in metabolic rate over a period of two weeks; however, VO_2 data from the present study were obtained with the same organisms evaluated twice (before and after the OTC treatment) under the same experimental conditions, and the only conspicuous variable that changed over the two-week period was the healthiness of the organisms. We believe that the VO_2 values shown in figure 2 readily reflected the metabolism of experimental abalone, measured before and after the OTC treatment. This is supported by the fact that the error bars of our data are relatively narrow, which is indicative of a consistent response in the five replicated chambers used to measure metabolism. In addition, our data, when expressed on a weight-specific basis, are comparable to those previously published for juvenile *H. fulgens* (Chacón *et al.* 2003). As sick abalone were unable to eat prior to the OTC treatment, it can be assumed that the high metabolic rate observed at the beginning of the treatment corresponded to maintenance costs plus the stress condition of the organisms. Therefore, the reduction of metabolic rate after the OTC treatment may have resulted from a net recovery of sick organisms and the consequent reduction of stress and energy cost. It is known that heavily sedated or medically-paralyzed injured humans exhibit high basal metabolism (Frankenfield *et al.* 1994). Increased maintenance costs have also been observed in chronically stressed sturgeon, *Acipenser medirostris* (Lankford *et al.* 2003),

solución se torna turbia por la liberación de la base de OTC en el agua (FDA 2006). Por lo tanto, es de esperarse que mientras el compuesto permanezca en la solución, éste estará disponible para que los animales lo capten por las branquias o lo absorban a través de la superficie corporal. Los resultados preliminares del presente estudio muestran que 1 h de baños de agua con OTC indujo la recuperación de abulones muy enfermos, según lo demuestran: (a) la capacidad de los abulones tratados de readherirse a las paredes de los recipientes tan solo tres días después de su aplicación, (b) la capacidad de reducir el tiempo necesario para voltearse y recuperar su posición normal, y (c) la disminución de la tasa metabólica. Esta capacidad de los abulones para recuperar su posición correcta ya ha sido utilizada como criterio práctico para evaluar el grado de recuperación en organismos postanestesiados (Aquilina y Roberts 2000, Chacón *et al.* 2003). Los datos obtenidos para ambos grupos A y B dos semanas después del tratamiento son similares a los valores documentados previamente para jóvenes sanos de *H. fulgens* (ca. 80% de recuperación en 20 min) de tamaño similar (25–35 mm, Chacón *et al.* 2003), lo que sugiere que los organismos tratados con OTC (este estudio) recuperaron rápidamente su actividad motriz.

La tasa metabólica ha demostrado ser una herramienta sensible para evaluar el grado de recuperación fisiológica postanestesia (Chacón *et al.* 2003). Se esperaría que cualquier factor pudiese contribuir al cambio en la tasa metabólica a lo largo de dos semanas; sin embargo, nuestros datos de VO_2 se obtuvieron con los mismos organismos evaluados dos veces (antes y después del tratamiento con OTC) en las mismas condiciones experimentales, y la única variable conspicua que cambió durante el periodo de dos semanas fue la salud de los organismos. Se piensa que los valores de VO_2 que se presentan en la figura 2 reflejaron rápidamente el metabolismo de los abulones, medido antes y después del tratamiento con OTC. Esto se sustenta por el hecho de que las barras de error de nuestros datos son relativamente pequeños, lo cual es indicativo de una respuesta consistente en las cinco cámaras usadas para medir el metabolismo. Asimismo, nuestros datos, cuando se expresan en función del peso, son comparables con los publicados previamente para jóvenes de *H. fulgens* (Chacón *et al.* 2003). Si se considera que los abulones enfermos no podían comer antes del tratamiento con OTC, es factible suponer que la alta tasa metabólica observada al principio del tratamiento correspondió a los costos de mantenimiento junto con la condición de estrés de los organismos. Por lo tanto, la disminución de la tasa metabólica después del tratamiento puede ser resultado de la recuperación neta de los organismos enfermos y la consecuente reducción de costo energético y estrés. Se sabe que los humanos fuertemente sedados o paralizados médicamente presentan un metabolismo basal elevado (Frankenfield *et al.* 1994). También se ha observado un incremento en los costos de mantenimiento en individuos crónicamente estresados del esturión *Acipenser medirostris* (Lankford *et al.* 2003), y se ha documentado que el costo de mantenimiento contribuye a una mayor

and it has been documented that the cost of maintenance contributes to a higher proportion of the total metabolic cost in starved molluscan bivalves (Widdows and Hawkins 1989, García-Esquivel *et al.* 2002). Although not thorough, the combined results of metabolism and motor activity of this study indicate that OTC water baths may be effective therapeutic tools for treating severely ill abalone with symptoms of WS.

Recent studies dealing with the use of OTC for prophylactic and therapeutic purposes have emphasized the use of medicated feeding, presently approved by the US, in the form of Terramycin for fish, to control several diseases in salmonids and gaffkemia in lobsters (National Aquaculture Association 2003). The most recent studies carried out in abalone (Friedman *et al.* 2003, 2007) indicate that feeding containing 4.2% OTC reduced bacterial infections and mortality of the red abalone *Haliotis rufescens* when administered during 14 days, and that the white abalone *Haliotis sorenseni* was successfully treated with a medicated diet containing 9% Terramycin (TM-100 Pfizer) (1.625% OTC) at a rate of 90.82 mg OTC kg⁻¹ of abalone body weight daily during 20 days; however, no attempt was made to use water baths as alternative treatment method. The concentration of OTC used in the present study (400 mg L⁻¹ seawater) cannot be directly compared to the concentration used by Friedman *et al.* (2003, 2007), since in the present study a 2-L bath was used to treat 10 organisms at once. The same amount of medicated water (2 L, 400 mg OTC L⁻¹ seawater) was used to sequentially treat up to 75 organisms with the same success (visually assessed, not a formal experiment). Based on this, it can be shown that a ratio of 800 mg OTC per 800 g live abalone weight can be used as starting point for optimizing the use of OTC in water baths. This quantity is lower than the 14.5 g OTC kg⁻¹ abalone proposed by Friedman *et al.* (2003) through medicated feeding. It must be pointed out, however, that the method used by Friedman *et al.* (2003) and the present study are completely different and need further side by side comparison in order to come up with reliable comparisons. The use of OTC by injection has proven to be ineffective once the clinical signs of WS are evident in the abalone and tissue damage is in an advanced stage (Friedman *et al.* 2003). Animals from the present study were severely ill and showed intense signs of WS. Their high recovering capacity after treatment with OTC baths may be at least partially explained by the size of the animals (high metabolism), their ability to absorb dissolved organic matter (Manahan 1990, Wright and Ahearn 1997), and the existence of peripheral receptors for some drugs (Betti *et al.* 2003). In spite of the positive results from the present study, medium- and long-term experiments are recommended in order to discard the possibility of antibiotic resistance when using OTC water baths. Such studies must also include histological testing for the presence of RLPs at the end of the experiment. In this regard, it is possible that the continuous use of antibiotics with prophylactic and/or therapeutic purposes may lead to

proporción del costo metabólico total de moluscos bivalvos en condiciones de inanición (Widdows y Hawkins 1989, García-Esquivel *et al.* 2002). Aunque no exhaustivos, los resultados combinados del metabolismo y la actividad motriz del presente estudio indican que los baños de agua con OTC pueden ser herramientas terapéuticas efectivas para tratar abulones con síntomas severos del SD.

Estudios recientes sobre el empleo de OTC con fines profilácticos y terapéuticos han enfatizado el uso de alimentos medicados, actualmente aprobado en los Estados Unidos, en forma de Terramicina para peces, para el control de varias enfermedades en salmónidos y de *gafkemia* en langostas (National Aquaculture Association 2003). Los estudios más recientes en abulones (Friedman *et al.* 2003, 2007) muestran que una dieta que contiene 4.2% de OTC reduce las infecciones bacterianas y la mortalidad del abulón rojo *Haliotis rufescens* cuando se administra durante 14 días, y que el abulón blanco *Haliotis sorenseni* fue tratado exitosamente con una dieta medicada con 9% de Terramicina (TM-100 Pfizer) (1.625% de OTC), suministrada a una tasa diaria de 90.82 mg OTC kg⁻¹ de peso corporal durante 20 días; sin embargo, no se intentó utilizar baños de agua como un método alternativo de tratamiento. La concentración de OTC empleada en el presente estudio (400 mg L⁻¹ de agua de mar) no puede ser comparada directamente con la concentración usada por Friedman *et al.* (2003, 2007), ya que nosotros usamos un baño de 2 L para tratar 10 organismos al mismo tiempo. Se utilizó la misma cantidad de agua medicada (2 L, 400 mg OTC L⁻¹ de agua de mar) para tratar secuencialmente hasta 75 organismos con el mismo éxito (evaluación visual, no un experimento formal). Con base en esto, es factible usar una razón de 800 mg OTC por 800 g de peso vivo como punto de partida para optimizar el empleo de OTC en baños de agua. Esta cantidad es menor que la de 14.5 g OTC kg⁻¹ de abulón propuesta por Friedman *et al.* (2003) por medio de alimento medicado. Es importante mencionar, sin embargo, que el método empleado por Friedman *et al.* (2003) y el usado en el presente trabajo son completamente diferentes y es necesario realizar una comparación paralela para obtener una evaluación más confiable. La administración de OTC por inyección ha demostrado ser ineficaz una vez que los síntomas clínicos del SD son evidentes en el abulón y el daño a los tejidos se encuentra en una fase avanzada (Friedman *et al.* 2003). Los animales usados en el presente estudio estaban muy enfermos y mostraban síntomas del SD. Su elevada capacidad de recuperación después del tratamiento con baños de OTC puede ser por lo menos parcialmente explicada por el tamaño de los animales (metabolismo alto), su capacidad de absorber materia orgánica disuelta (Manahan 1990, Wright y Ahearn 1997), y la existencia de receptores periféricos para captar algunos medicamentos (Betti *et al.* 2003). A pesar de los resultados positivos del presente estudio, sería recomendable realizar experimentos a mediano y largo plazo a fin de descartar la posibilidad de resistencia antibiótica al utilizar baños de agua con OTC. Tales estudios también deberían

the development of resistance in commercial aquaculture hatcheries (Hameed *et al.* 2003). On the other hand, it is important to use and dispose the treated water appropriately to avoid dispersion of the residual antibiotic to the environment (Hernández 2005). This is a sensitive area where more studies need to be done.

It must be pointed out that only one antibiotic dose was used in the present study to test the use of OTC water baths. Preliminary trials showed that abalone were unable to recover when OTC was used at concentrations below 1 mg L⁻¹, even after 10 consecutive days of treatment (visual observations). Previous studies also showed that OTC baths were ineffective for the treatment of bacterial diseases of *P. maximus* (Torkildsen *et al.* 2002) or bacillary necrosis in *C. gigas* (Matsubara *et al.* 2002) when used at low concentrations. Therefore, the results obtained in the present study open the door for future research addressing stage-specific, concentration-response curves in abalone, as well as residual OTC concentrations in different tissues and their possible effect on marketing.

Friedman *et al.* (1997) found that elevated temperature alone was not a direct cause of WS, yet it accelerated the mortality of infected animals. These authors found that mortality was greater and more rapid in black abalone *Haliotis cracherodii* kept at 20 °C relative to those maintained at 13 °C. In this study, *H. fulgens* at 20 and 25 °C showed the same prevalence of infection, even though the intensity was slightly greater in those kept at 25 °C. Temperature-specific differences in responses to WS between *H. cracherodii* and *H. fulgens* are likely related to the species-specific differences in temperature preference; however, the exact role of temperature on the development of WS remains unknown.

ACKNOWLEDGEMENTS

The critical review of two anonymous referees is greatly appreciated since it significantly improved the original version of the manuscript.

REFERENCES

- Alvarez TMC, Cáceres-Martínez J, González, AJG. 2002. Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 21: 825–830.
- Aquilina B, Roberts R. 2000. A method for inducing muscle relaxation in the abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture* 190: 403–408.
- Betti L, Giannaccini G, Nigro M, Dianda S, Gremigni V, Lucacchini A. 2003. Studies of peripheral benzodiazepine receptors in mussels: Comparison between a polluted and a nonpolluted site. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 36–42.
- Cáceres-Martínez J, Tinoco-Orta G. 2001. Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 20: 875–881.
- Chacón O, Viana MT, Farías A, Vazquez AC, García-Esquivel Z. 2003. Circadian metabolic rate and short-term response of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi) to three anesthetics. *J. Shellfish Res.* 22: 415–421.
- incluir pruebas histológicas para la presencia de RLP al final del experimento. Es posible que el uso continuo de antibióticos con fines profilácticos y/o terapéuticos podría resultar en el desarrollo de resistencia en instalaciones comerciales de acuicultura (Hameed *et al.* 2003). Por otro lado, es importante utilizar y disponer del agua tratada adecuadamente para evitar la dispersión de los residuos de antibióticos en el medio ambiente (Hernández 2005). Ésta es un área sensible que requiere mayores estudios.
- Es importante mencionar que se utilizó una sola dosis de antibiótico en el presente estudio para evaluar el uso de baños con OTC. Ensayos preliminares mostraron la incapacidad de los abulones para recuperarse cuando se usaron concentraciones de OTC por debajo de 1 mg L⁻¹, aun después de 10 días consecutivos de tratamiento (observaciones visuales). Estudios previos también han demostrado la ineficacia de los baños con bajas concentraciones de OTC en el tratamiento de enfermedades bacterianas en larvas de *P. maximus* (Torkildsen *et al.* 2002) o necrosis bacilar en larvas de *C. gigas* (Matsubara *et al.* 2002). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo abren la puerta para realizar estudios adicionales sobre curvas de concentración-respuesta específicas en abulón, así como de las concentraciones residuales de OTC en distintos tejidos y su posible efecto en la comercialización.
- Según Friedman *et al.* (1997), las altas temperaturas por si solas no son una causa directa del SD, pero sí aceleran la mortalidad de los animales infectados. Estos autores encontraron que la mortalidad fue mayor y más rápida en el abulón negro *Haliotis cracherodii* mantenido a 20 °C que a 13 °C. En el presente estudio, Los ejemplares de *H. fulgens* mantenidos a 20 y 25 °C mostraron la misma prevalencia de infección, pero la intensidad fue ligeramente mayor en los mantenidos a 25 °C. Las diferencias en la respuesta al SD de *H. cracherodii* y *H. fulgens* probablemente se relacionan con las diferencias en la preferencia de temperatura específica de cada especie; sin embargo, aún se desconoce el papel exacto de la temperatura en el desarrollo del SD.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la revisión crítica de dos revisores anónimos que ayudó a mejorar significativamente la versión original del manuscrito.

Traducido al español por Christine Harris.

FDA, Food and Drug Administration. 2006. Freedom of Information Summary, Oxytetracycline Hydrochloride. File number ANADA 200–305, Vétoquinol N.-A., Inc., Lavaltrie (PQ), Canada, 6 pp (<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm061757.pdf>).

Frankenfield DC, Wiles CE, Bagley S, Siegel JH. 1994. Relationships between resting and total energy expenditure in injured and septic patients. *Crit. Care Med.* 22: 1796–1804.

- Friedman CS, Finley CA. 2003. Anthropogenic introduction of the etiological agent of withering syndrome into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60: 1424–1431.
- Friedman CS, Thompson M, Chun C, Haaker PL, Hedrick RP. 1997. Withering syndrome of the back abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.* 16: 403–411.
- Friedman CS, Andree KB, Beauchamp K, Moore JD, Robbins TT, Shields JD, Hedrick RP. 2000. “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 847–855.
- Friedman CS, Trevelyan G, Robbins TT, Mulder EP, Fields R. 2003. Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens* Aquaculture 224: 1–23.
- Friedman, CS, Scott BB, Estes RS, Vadopalas B, McCormick TB. 2007. Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, caused by withering syndrome. *J. Shellfish Res.* 26: 877–885.
- García-Esquivel Z, Bricelj VM, Felbeck H. 2002. Metabolic depression and whole-body response to enforced starvation by *Crassostrea gigas* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integra. Physiol.* 133A: 63–77.
- García-Esquivel Z, Montes-Magallón S, González-Gómez MA. 2007. Effect of temperature and photoperiod on the growth, feed consumption, and biochemical content of juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *Aquaculture* 262: 129–141.
- Gardner GR, Harshbarger JC, Lake JL, Sawyer TK, Price KL, Stephenson MD, Haaker PL, Togstad HA. 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 111–120.
- Haaker PL, Parker DO, Togstad H, Richards DV, Davis GE, Friedman CS. 1992. Mass mortality and withering foot syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*, in California. In: Shepard SA, Tegner MJ, Guzmán del Próo SA (eds.), *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Proc. 1st International Symposium on Abalone. Fishing News Books, Cambridge, pp. 214–224.
- Hameed ASS, Raham KH, Alagan A, Yoganandhan K. 2003. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 217: 39–48.
- Hernández, SP. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Pap.* 149: 97 pp.
- Lankford SE, Cech JJ, Adams TE. 2003. Swimming performance, standard metabolic rate, and metabolic scope for activity as measures of chronic stress in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *FASEB J.* 17, Abstract No. 313.13.
- Manahan DT. 1990. Adaptation by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. *Am. Zool.* 30: 147–160.
- Marking LL, Howe GE, Crowther JR. 1988. Toxicity of erythromycin oxytetracycline and tetracycline administered to lake trout in water baths by injection or by feeding. *Prog. Fish. Cult.* 50: 197–201.
- Matsubara D, Tanaka M, Soumyou Y, Hirakawa K, Doi R, Nakai T. 2002. Therapeutic effects of antimicrobial compounds against bacillary necrosis of larval Pacific oyster. *Fish Pathol.* 37: 183–188.
- Moore JD, Robbins TT, Friedman CS. 2000. Withering syndrome in farmed red abalone, *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsiales-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health* 12: 26–34.
- National Aquaculture Association. 2003. *Judicious Antimicrobial Use in US Aquaculture: Principles and Practices*. 5 pp. Manuscript available at www.thenaa.net/downloads/Judicious_Antimicrobial_Use.pdf
- O’Grady P, Moloney M, Smith PR. 1988. Bath administration of the quinoline antibiotic flumequine to brown trout *Salmo trutta* and Atlantic salmon *S. salar*. *Dis. Aquat. Org.* 4: 27–33.
- Riviere JE, Spoo JW. 1995. Tetracycline antibiotics. In: Booth NE, McDonald LE (eds.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State Univ. Press, Ames, pp. 784–796.
- Shaw BL, Battle HI. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive gland of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35: 325–346.
- Torkildsen L, Coyne R, Samuelsen OB, Magnesen T, Bergh O. 2002. Treatment of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents; searching for an alternative to chloramphenicol. *Aquacult. Int.* 10: 399–409.
- VanBlaricom GR, Ruediger JL, Friedman CS, Woodard DD, Hedrick RP. 1993. Discovery of withering syndrome among black abalone *Haliotis cracherodii* Leach, 1814, populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.* 12: 185–188.
- Widdows J, Hawkins AJ. 1989. Partitioning of rate of heat dissipation by *Mytilus edulis* into maintenance, feeding and growth components. *Physiol. Zool.* 62: 764–784.
- Wright SH, Ahearn GA. 1997. Nutrient absorption in invertebrates. In: Dantzler WH (Ed.), *Comparative Physiology Vol. II*. Oxford University Press, pp. 1137–1205.

Received June 2010;
accepted February 2011.