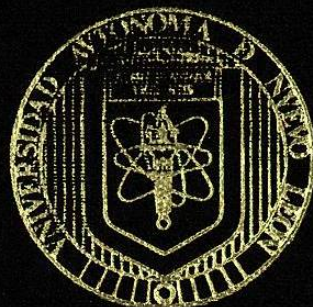


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DEL USO DE VIRGINIAMICINA
COMO ADITIVO PROMOTOR DE CRECIMIENTO
EN EL CAMARON BLANCO (*Pencaeus vannamei*).

Por:

Laura Mónica Treviño Carrillo

Hidrobiólogo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

1989

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Ecología Acuática y Pesca.

Marzo, 1994.

TM

Z5320

FCB

1994

T7



1020091548

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DEL USO DE VIRGINIAMICINA
COMO ADITIVO PROMOTOR DE CRECIMIENTO
EN EL CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*).

Por:

Laura Mónica Treviño Carrillo

Hidrobiólogo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

1989

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Ecología-Acuática y Pesca.

Marzo, 1994.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EVALUACION DEL USO DE VIRGINIAMICINA COMO
ADITIVO PROMOTOR DE CRECIMIENTO EN EL CAMARON
BLANCO (Penaeus vannamei).

Por

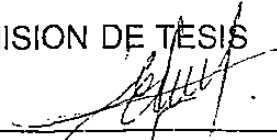
LAURA MONICA TREVIÑO CARRILLO

Hidrobiologo
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
1989

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Ecología Acuática y Pesca.
Marzo, 1994.

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:


DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ.

SECRETARIO:

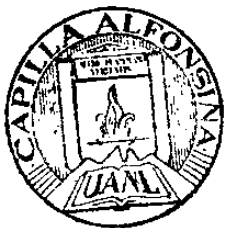

DR. DENIS RICQUE MARIE.

VOCAL:


DR. LUIS GALAN WONG.

MONTERREY, N.L.

MARZO 1994.



FONDO TESIS

33072

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EVALUACION DEL USO DE VIRGINIAMICINA COMO
ADITIVO PROMOTOR DE CRECIMIENTO EN EL CAMARON
BLANCO (Penaeus vannamei).

Por

LAURA MONICA TREVIÑO CARRILLO

Hidrobiologo

Universidad Autónoma Metropolitana

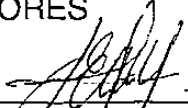
Unidad Iztapalapa

1989

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Ecología Acuática y Pesca.
Marzo, 1994.

ASESORES

DIRECTOR:


DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ.


CO-DIRECTOR:


DR. DENIS RICQUE MARIE.

ASESOR INTERNO:


DR. LUIS GALAN WONG.

ASESOR EXTERNO:


DR. INOCENCIO HIGUERA CIAPARA

ASESOR EXTERNO:


DR. ROQUE RAMIREZ LOZANO.

MONTERREY, N.L.

MARZO DE 1994.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en especial consideración a la Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez y al Dr. Denis Ricque Marie por su amistad y sobretodo su apoyo y dirección en la realización del presente trabajo así como también quiero agradecer a los Doctores Warren Dominy, Roberto Mendoza y Luis Galán Wong por sus comentarios que me fueron de mucha utilidad.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Maricultura en donde pasamos grandes vivencias personales y profesionales.

El presente trabajo fué apoyado en parte por los Laboratorios de SmithKline & Beecham, México, D.F. proporcionandonos el STAFAC 25, la cepa utilizada y apoyando económicamente este trabajo mi especial reconocimiento al M.V.Z. Jaime Muñoz; al personal de Nutrimentos Pecuarios del Pacífico, S.A. de C.V. (Nutripac), Culiacán, Sinaloa por su colaboración en la elaboración de los alimentos experimentales; al Dr. Inocencio Higuera-Ciápara por su asesoría y a la Quim. en Alimentos Lorena Noriega Orozco quienes me brindaron su amistad y el apoyo material y logístico para los análisis microbiológicos realizados en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora y al el Ing. Enrique Díaz quien muy amablemente nos facilitó sus instalaciones de la granja "Las Lomitas" en Escuinapa, Sinaloa; en donde se llevó a cabo el bioensayo nutricional. A todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

DEDICATORIA

A Beto

Por tu amor y por tu absoluta e incondicional comprensión
y sobre todo, paciencia que me has dedicado,
por tu apoyo en los momentos de desesperación
y por que sin ti no hubiera sido posible mi superación
pérsonal y profesional.
Te amo.

LISTA DE ABREVIATURAS

HCl	Acido clorhídrico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
a.m.	Antes meridiano
com.pers.	Comunicación personal
cm	Centímetro
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
col.	Colaboradores
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DE	Desviación estandar (siglas en inglés SD)
<u>i.e.</u>	Es decir (abreviatura en latín)
E.U.A.	Estados Unidos de Norteamérica
etc.	Etcétera
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
M ₁	Factor M ₁ de la virginiamicina
S ₁	Factor S ₁ de la virginiamicina
FDA	Food and Drug Administration
°C	Grados Celcius
g	Gramos
HPLC	High performance liquid chromatography
hr	Hora
=	Igual
Kg	Kilogramo
lb/in ²	Libra por pulgada cuadrada
MR	Marca Registrada
>	Mayor que
<	Menor que
m	Metro
m ²	Metro cuadrado
m ³	Metro cúbico
µg/Kg	Microgramo por Kilogramo
µg/ml	Microgramo por mililitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molaridad
x	Multiplicación
NRC	National Research Council
NO ₃	Nitratos
NO ₂	Nitritos
ND	No determinado
N	Normalidad
No.	Número
NUTRIPAC	Nutrientos Pecuarios del Pacífico
O ₂ dis	Oxígeno disuelto

µpt	Partes por mil (siglas en inglés)
µpm	Partes por millón (siglas en inglés)
µ.m.	Pasado meridiano
PC	Personal computer
%	Por ciento
pH	Potencial Hidrógeno
P	Probabilidad estadística
seg	Segundos
s/año	Sin año
sp	Sin especie
S.A.	Sociedad Anónima
SCPA	Sociedad Cooperativa de Producción Acuícola
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
+	Suma
-	Sustracción
TCA	Tasa de Conversión Alimenticia
TC	Tasa de Crecimiento
TM	Tasa de Mortalidad
TS	Tasa de Supervivencia
ton	Tonelada
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
&	Y
<u>et al</u>	Y Asociados (abreviación en Latin)
VM	Virginiamicina

RESUMEN

El antibiótico virginiamicina es un promotor de crecimiento usado en especies bovina, porcina y aviaria con excelentes resultados y recientemente utilizada en especie acuícola. Se determinaron sus efectos como promotor de crecimiento al suministrarla en dietas para camarón (*Penaeus vannamei*) estimando las tasas de conversión alimenticia, crecimiento y sobrevivencia por medio de un bioensayo alimenticio. La virginiamicina fue añadida en niveles de 50, 80, 100 y 200 ppm en una dieta comercial con 35% de proteína, mientras que una dieta sin virginiamicina sirvió como control. En el bioensayo se utilizaron camarones de origen silvestre con un peso promedio inicial de 1.64 g (DE = 0.03) a una densidad de 22 organismos/m². Cada dieta fue evaluada por cuadruplicado, (excepto la dieta control por 6 replicados y la dieta 200 ppm por duplicado) en jaulas de 1 m³ en una granja de producción comercial en Escuinapa, Sinaloa, México. Después de 6 semanas de experimentación, los camarones alimentados con las dosis 80, 100 y 200 ppm de virginiamicina tuvieron una mejor tasa de crecimiento (325, 322 y 323% respectivamente) que aquellos alimentados con la dieta control y la dieta de 50 ppm (306 y 300% respectivamente); sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P = 0.54$). Las tasas de mortalidad semanal promedio así como las tasas de conversión alimenticia variaron entre 5.6 y 6.6% y entre 2.6 y 2.8 respectivamente, no encontrándose diferencias significativas en ambos casos. Se examinaron muestras de tejido abdominal de los camarones a los 28 y 42 días. No se detectaron residuos de virginiamicina superiores a 0.4 ppm (límite de sensibilidad del método). La determinación de actividad residual de virginiamicina fue realizada por medio del Método Microbiológico de Smith & Kline. También se evaluó la actividad de virginiamicina en las dietas experimentales después del peletizado, almacenamiento y lixiviación por medio del mismo método. Los resultados muestran gran variabilidad entre los replicados de las muestras de pellets analizadas, causada por una extracción deficiente de la virginiamicina de las dietas, debido entre otros factores al método de extracción, al alto porcentaje de grasa animal contenida en las dietas y posiblemente al aglutinante utilizado. Los resultados anteriores muestran que el uso de aditivos antibacterianos en alimentos balanceados para especies acuícolas, debe adaptarse para franquear barreras como son: el proceso de mezclado, el peletizado o extruido: el pH, la salinidad, la solubilidad del aditivo en el agua, el almacenamiento y el efecto de los otros ingredientes de la dieta sobre los mismos antes de usarse comercialmente. Por los resultados obtenidos, el uso de virginiamicina a nivel comercial no puede ser recomendado para el cultivo de camarón.

ABSTRACT

Virginiamycin is an antibiotic used as a growth factor used with excellent results on cattle, pigs, poultry and recently on aquatic species. Effects of diets, containing virginiamycin, fed to Penaeus vannamei, were determined by a feeding trial. Growth, survival and feed conversion ratio were estimated. Virginiamycin was added at levels of 50, 80, 100 and 200 ppm in a commercial diet with a 35% protein content. A diet with no virginiamycin was used as control. The initial body weight was 1.64 g (SD = 0.03). Wild shrimp juveniles were stocked at a 22-shrimp/m² density. Each diet was evaluated by four replicates, except the control diet by six replicates and 200 ppm virginiamycin diet by two replicates. The assay was carried out in 1 m³ cages in a commercial farm at Escuinapa, Sinaloa, Mexico. After six weeks of experiment, shrimps fed 80, 100 and 200 ppm virginiamycin diets had slightly better growth ratio (325, 322, and 323% respectively) than those fed with the control and 50 ppm virginiamycin diets (306 and 300% respectively). However there were no significant differences between treatments ($P = 0.54$). Mean weekly mortality ratios were 50 ppm VM diet = 5.7%, 80 ppm VM diet = 6.6%, 100 ppm VM diet = 5.7%, 200 ppm VM diet = 5.7%, and control diet = 5.7%. There were no significant differences found either ($P = 0.57$). Feed Conversion ranged from 2.6 to 2.8 with no significant differences between treatments ($P = 0.94$). Shrimp abdominal muscle samples, were examined on 28 and 42 days of the experiment. No virginiamycin residues over 0.4 ppm were found (method lowest limit sensibility). Residual virginiamycin activity was determined by Smith & Kline Microbiological Method. Virginiamycin activity was also evaluated in the experimental diets after the pelleting process, storage and leaching by the same method. Results show lack of homogeneity between samples replicates, related to the inefficient virginiamycin extraction from the diets, due to the extraction method, the high lipid content and the binder added at the feed formula. Previous results show that before adding any additive to aquatic species feeds, many obstacles should be exceeded like: diet formulation, mixing process, pelletizing or extrusion process, solubility in water, diet storage and leaching process. Due to the previous results, we cannot recommend virginiamycin use in commercial shrimp feeds.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
HIPOTESIS	5
ANTECEDENTES	6
VIRGINIAMICINA	11
AREA DE TRABAJO	14
METODOLOGIA	15
FORMULACION Y FABRICACION DE DIETAS EXPERIMENTALES	15
ANALISIS PROXIMAL	17
ANALISIS DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN PELLETS Y CAMARON	18
PREPARACION DEL MICROORGANISMO	19
PREPARACION DE LAS PLACAS	19
PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR	20
PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PELLETS Y CAMARON	21
INCUBACION Y LECTURA DE LAS PLACAS	22
CALCULOS	24
LIXIVIACION	25
EVALUACION BIOLOGICA EN GRANJA	26
DISTRIBUCION Y ROTACION DE LAS JAULAS DE EXPERIMENTACION EN EL ESTANQUE	28
DISTRIBUCION DE LOS ORGANISMOS Y DE LOS TRATAMIENTOS	30
PARAMETROS DE LA EVALUACION BIOLOGICA	32
TASA DE CRECIMIENTO	32
TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA APARENTE	32
TASA DE SOBREVIVENCIA	32

TASA DE MORTALIDAD	32
ANALISIS ESTADISTICO	33
PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DEL AGUA DEL ESTANQUE	34
RESULTADOS	35
FORMULACION Y FABRICACION DE DIETAS EXPERIMENTALES	35
ANALISIS PROXIMAL	35
ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN PELLETS Y CAMARON	35
LIXIVIACION	40
EVALUACION BIOLOGICA EN GRANJA	41
PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL ESTANQUE EN EXPERIMENTACION	49
DISCUSION	53
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
LITERATURA CITADA	63
APENDICE I	70
APENDICE II	71
APENDICE III	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

1	Estructura química de los factores M ₁ y S ₁ de la virginiamicina	11
2	Espectro antibacteriano de la virginiamicina	13
3	Jaulas de experimentación utilizadas en el bioensayo	26
4	Charola de alimentación utilizada en el bioensayo	27
5	Distribución de las jaulas de experimentación en el estanque (del 31/ago/ al 16/sept/92)	28
6	Distribución de las jaulas de experimentación en el estanque (del 16/sept/92 hasta terminar el bioensayo)	29

LISTA DE GRAFICAS

GRAFICA

1	Curva Estandar virginiamicina utilizando <u>M. luteus</u> (ATTC 9341)	37
2	Análisis de la actividad antibiótica en pellets	39
3	Porcentaje de pérdida de materia seca de los pellets lixiviados	40
4	Porcentaje de crecimiento global de <u>P. vannamei</u> con diferentes dosis de virginiamicina	42
5	Curva dosis-respuesta (% de crecimiento vs. dosis virginiamicina) . .	43
6	Incremento en peso de <u>P. vannamei</u> por semana de experimentación	44
7	Curva de crecimiento de <u>P. vannamei</u> durante el bioensayo	45
8	Oxígeno disuelto en el agua del estanque	49
9	Amonio ionizado y pH registrados en el agua del estanque	50
10	Ión nitrato registrado en el agua del estanque	51
11	Turbidez del agua del estanque registrada por medio del Disco de Secchi	51
12	Salinidad del agua del estanque registrada durante el bioensayo . . .	52
13	Temperatura del agua del estanque registrada durante el bioensayo	52

LISTA DE TABLAS

TABLA	
1	Componentes constantes de las dietas experimentales 15
2	Componentes variables de las dietas experimentales 16
3	Muestras analizadas para cada una de las dietas experimentales 21
4	Tasa de alimentación suministrada para cada una de las semanas de experimentación 31
5	Análisis proximal de las dietas en base húmeda (%) 35
6	Valores de diámetros de inhibición para la curva estándar de virginiamicina (STAFAC 25 MR) 36
7	Puntos de la Curva Estándar 37
8	Resultados obtenidos para cada una de las muestras de tejido abdominal de camarón y de las dietas experimentales 38
9	Porcentaje de pérdida de materia seca de cada una de las dietas experimentales 40
10	Resumen de resultados zootécnicos obtenidos del bioensayo nutricional 41
11	Peso promedio y desviación estándar por tratamiento para cada semana 45
12	Consumo de alimento por semana de cada tratamiento (g) 46
13	Tasa de conversión alimenticia aparente por tratamiento en cada semana 47
14	Mortalidad promedio de <u>P. vannamei</u> registrada por tratamiento en cada semana (%) 48

INTRODUCCION

El acelerado desarrollo de la camaronicultura a nivel mundial y en particular en México, ha provocado que diversas fuentes de inversión empleen sus recursos económicos para el desarrollo de empresas acuícolas, ya que éstas cuentan con un mercado potencial abierto en los tres principales mercados mundiales: Japón, Europa Occidental y los Estados Unidos de Norteamérica (Arredondo, 1986 visto en Zendejas 1989 a).

Según Lovell (1991) el abasto, precio y calidad de la pesquería marina fluctúa considerablemente debido a que el océano es un recurso no manejable, cuyas producciones son difíciles de predecir. Pero cuando las especies son cultivadas, el abasto y precio pueden ser controlados más eficientemente. La alta calidad de los productos puede mantenerse debido a que las condiciones de producción y cosecha son controladas y a que los organismos cultivados generalmente van a las plantas procesadoras en el transcurso de las 24 hr siguientes a su cosecha.

El cultivo del camarón es el cultivo con más potencial de desarrollo y de más rápido crecimiento de la acuicultura, con un crecimiento promedio anual mundial de 6.5% (Higuera, 1992). Debido al alto valor del producto en el mercado, a la viabilidad de su tecnología de cultivo y a los recursos favorables para su crecimiento en las áreas tropicales del mundo.

En México contamos con 5 Compañías que se dedican a fabricar alimentos balanceados para camarón; éstas compañías son: Purina, Anderson Clayton, El Barrio, Nutripac, y Pyasa; y dos alimentos importados: Rangen y Charoen Pokhand (Cruz, 1994 com.pers.).

Considerando que la producción de camarón mexicana reportada en 1992 fue de 10,000 ton y que con los alimentos comerciales en promedio se está obteniendo una tasa de conversión alimenticia de 1.8 a 2.5, en 1992 se debieron haber consumido de 18,000 a 25,000 ton de alimento balanceado, dos veces más que el año anterior y se prevé un incremento anual en la producción de al menos un 40% durante los próximos años, lo que indica el potencial de crecimiento de esta industria en México.

En acuicultura, así como en otras empresas pecuarias, el alimento es uno de los principales insumos en los sistemas de producción, que en algunas ocasiones representa entre el 60 y 80% de los gastos de operación de dichas empresas. Debido a que el acuicultor busca hacer más eficiente su granja para poder obtener más beneficios económicos de ella, cualquier mejora en los alimentos balanceados permitirá maximizar éstos beneficios.

El alimento suministrado va a determinar en gran medida el crecimiento y hasta cierto punto las características nutritivas e inclusive el sabor del producto; esto pone de manifiesto la necesidad de fabricar alimentos balanceados que permitan un crecimiento homogéneo en toda la producción (Martínez-Vega, 1991), así como también una mejor calidad de la misma.

La producción eficiente y económica del camarón requiere del uso de alimentos balanceados que cubran los requerimientos nutricionales de la especie y del empleo de una técnica adecuada de alimentación (Zendejas, 1989 b).

Por lo anterior, en las prácticas de alimentación se deben de considerar los siguientes factores: La especie a cultivar, el estadio de desarrollo (postlarva, juvenil ó reproductor), el sistema de cultivo empleado (Intensivo ó Semi-intensivo), las técnicas de alimentación, el uso de aditivos en la formulación de alimentos, la frecuencia y la tasa de alimentación a suministrar y por último aquellos factores ambientales que afectan el consumo del alimento, como son la calidad del agua y el estado del suelo.

Con el afán de maximizar los beneficios económicos producto de las unidades de producción, desde hace aproximadamente tres décadas se han estado utilizando aditivos en la formulación para la alimentación animal debido a que han probado su acción promotora de crecimiento en los animales. Entre estos aditivos se encuentran los antibióticos, hormonas y otras sustancias químicas (Cuarón, 1990).

Los antibióticos son medicamentos, no nutrientes y sus efectos sobre la nutrición de los animales representan características de tipo secundario (Maynard, et al, 1983) por sus efectos sobre la flora gram positiva del segmento proximal del sistema gastro intestinal. Los antibióticos son añadidos en dosis terapéuticas a los alimentos para prevenir o controlar enfermedades, en dosis subterapéuticas para estimular el crecimiento y para mejorar la eficiencia alimenticia; los antibióticos usados como aditivos tienen la característica común de poseer una acción antimicrobiana contra bacterias gram positivas. Lukey (1952) y Forbes y Park (1959) encontraron que los antibióticos no estimulan el crecimiento en animales libres de gérmenes (Eyssen et al, 1962).

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo de la acción promotora del crecimiento de los antibióticos:

- 1) Los antibióticos producen un efecto ahorrador de nutrientes reduciendo la destrucción bacteriana de las vitaminas y los aminoácidos, al favorecer la proliferación de bacterias que sintetizan nutrientes esenciales o disminuyendo la competencia entre la microflora intestinal del animal.

- 2) Los antibióticos inhiben a las bacterias nocivas del tracto intestinal que producen toxinas y provocan engrosamiento de la pared intestinal.
- 3) Los antibióticos evitan el engrosamiento de la pared intestinal mejorando así la absorción de nutrientes (Eyssen et al, 1962; Maynard et al, 1983; Visek, 1978).

La presencia de aditivos en el alimento debe obedecer estrictamente a razones económicas de retorno de la inversión, partiendo de la premisa de que la adición de estos productos mejora los índices de eficiencia originales y es redituable su uso, puesto que proporciona utilidad expresada en varias veces su costo original en el alimento. Aunque no se cuenta con estimaciones publicadas de los beneficios económicos de los aditivos en los alimentos balanceados en países de América Latina, es claro que su uso está generalizado y su empleo obedece también a razones económicas (Avila, et al 1990).

Para que un aditivo entre en el mercado, éste debe cumplir con ciertas restricciones de orden legal. Su uso está regulado por instituciones gubernamentales con el fin de proteger la salud humana, antes de aceptar su uso generalizado se debe demostrar la ausencia de residuos en la carne que puedan perjudicar la salud del hombre (Cruz, 1994, com. pers.)

Cabe hacer notar, que los estudios del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal han estado enfocados a animales terrestres, es decir, vacas, cerdos, aves y muy recientemente a animales de producción acuícola: trucha, bagre, camarón, debido al auge que han tenido las empresas acuícolas en los últimos años. Considerando el ritmo creciente de la producción de camarón en México, Centro y Sudamérica, se puede definir como un mercado atractivo para productos aditivos alimenticios, como la virginiamicina, si se puede demostrar que estos productos son capaces de aumentar la producción comercial de camarón afectando positivamente el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia y la sobrevivencia de los camarones cultivados en las condiciones propias de cada país.

No obstante que el empleo de los aditivos en los alimentos es una práctica económicamente redituable para el productor pecuario, e importante para la industria de alimentos balanceados para mantener sus niveles de competencia, es necesario dejar establecido la intervención decisiva de los investigadores en la determinación de la efectividad de los aditivos bajo diferentes condiciones y en la explicación de los medios de acción, terreno casi exclusivo de los ámbitos académicos.

Se espera que los datos que se obtuvieron de este trabajo sean de utilidad para la elaboración de dietas más eficientes que aporten un mejor margen de utilidad para el productor comercial de camarón tanto en México como en América Latina; para las compañías que fabrican alimento balanceado y para los laboratorios farmacéuticos que elaboran promotores de crecimiento.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto que tiene la inclusión del antibiótico virginiamicina en la formulación de dietas comerciales para camarón Penaeus vannamei en una granja de producción comercial en Sinaloa, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la merma de actividad del antibiótico en el alimento antes de que éste sea ingerido por el camarón debido a:
 - a) Pelletizado
 - b) Almacenamiento
 - c) Lixiviación.
- 2.- Evaluar el efecto promotor de crecimiento en camarón (Penaeus vannamei) de la inclusión de virginiamicina en la formulación de alimentos balanceados en 4 niveles: 50, 80, 100 y 200 ppm.
- 3.- Determinar los residuos de éste producto en el tejido muscular abdominal del camarón.

HIPOTESIS

La inclusión de virginiamicina en la formulación de dietas para Penaeus vannamei permite obtener mayores tasas de crecimiento y mejores tasas de conversión alimenticia sin dejar residuos en el músculo abdominal del camarón.

ANTECEDENTES

"Desde el hallazgo de las sulfas y la penicilina, se han aislado, cristalizado, identificado e introducido para su uso comercial un sin número de antibióticos: bacitracina (1943), estreptomina (1944), polimixina B y cloranfenicol (1947), clortetraciclina (1948), neomicina (1949), oxitetraciclina (1950), eritromicina (1952), vancomicina (1956), gentamicina (1963), ampicilina (1964), lincomicina (1965), las cefalosporinas (1968), rifampicina (1971), etc.; se ha generado un nuevo antibiótico a nivel comercial a una tasa aproximada de uno por año" (Cuarón, 1990 visto en Avila, 1990).

"A pesar de lo anterior, en la industria alimenticia animal no se usan más de 20 principios activos antimicrobianos que incluyen: bacitracinas, clortetraciclinas, bambemicinas, eritromicina, neomicina, avilamicina, virginiamicina, oxitetraciclina, oleandomicina, penicilina, estreptomina, tilosina, sulfas, arsenicales, nitrofuranos y sulfato de cobre. De los actualmente empleados, algunos son más efectivos como promotores de crecimiento, otros, no mencionados, muestran potencial y otros más no se emplean como aditivos; pero sí con fines terapéuticos. Aunque la lista es considerable, se han mencionado más de 300 antimicrobianos que de una forma u otra se han empleado como promotores del crecimiento; por lo tanto, sólo un pequeño porcentaje han resultado en aplicaciones prácticas, siendo la mayoría no aptos dada su baja actividad ó por su toxicidad para el animal o debido a la generación de residuos en los tejidos o productos de origen animal" para consumo humano (Cuarón, 1990 visto en Avila, 1990).

Desde hace aproximadamente tres décadas se usan aditivos en la alimentación animal bajo el concepto generalmente aceptado de su acción promotora del crecimiento, mismo que ha sido revisado por un gran número de investigadores.

Se han comparado los efectos promotores del crecimiento de diversos antibióticos: clortetraciclina, oxitetraciclina, oleandomicina, bacitracina zinc, tilosina, eritromicina (Jukes, 1955; Combs y Bossard, 1963), virginiamicina (Miles *et al.*, 1984 y 1987; Cupo y Rogers, s/año), lincomicina (Buresh *et al.*, 1986), bambemicinas (Waldroup *et al.*, 1985), roxarsone (Stokstad y Jukes visto en Khajareem *et al.*, 1983) sólo o en combinación con algunos coccidiostatos (Keshavarz y McDougald, 1982; Ofori, 1988).

Existen diversas publicaciones en donde se mencionan los efectos positivos de la suplementación de antibióticos en el alimento provocando un aumento en el crecimiento, así como en conversión alimenticia en pollos (Morehouse y Mayfield, 1946 y Stockstad y Jukes 1950a visto en Khajareem, *et al.*, 1983; Waibel *et al.*, 1954; McGinnis *et al.* 1958; Wieggers y Sullivan, 1959; Yates y Schaible, 1962;

Combs y Bossard, 1963; Nelson *et al* 1963; Mameesh *et al*, 1959; March *et al*, 1978; Waldroup *et al*, 1986; Ofori, 1988; Stutz y Lawton, 1984), en pavos (Waldroup, 1985; Salmon y Stevens, 1990a), en becerros, corderos y cerdos (Knot y Lassiter visto en Jukes, 1955; Decuyper *et al*, 1991).

Un gran número de investigaciones han demostrado que de forma general los antibióticos producen una mayor respuesta durante la primera parte del período de crecimiento en los animales a los que se les administra (animales jóvenes) (Visek, 1978; Waldroup, 1985; Salmon y Stevens, 1990b; Green, 1993; Buresh *et al*, s/año).

Tratando de explicar el mecanismo de acción promotor de crecimiento de los antibióticos, se han realizado diversas investigaciones en donde de manera general se reporta la reducción del peso del intestino con la suplementación de antibióticos en el alimento (Jukes *et al*, 1956; Nelson *et al*, 1963; Stutz y Lawton, 1984; Dafwang *et al*, 1985; Henry *et al*, 1987; Izat *et al*, 1989), mejorando así la utilización de las xantófilas en pollos de engorda cuando las dietas son suplementadas con antibióticos como la virginiamicina (Miles, 1984), así como un incremento en la absorción de minerales, específicamente Mn (Nelson *et al*, 1963; Henry, 1987) y de energía metabolizable (March *et al*, 1978).

Otras investigaciones, por el contrario, no han obtenido resultados significativos en crecimiento ó en conversión alimenticia con la adición de antibióticos a las dietas (Henry *et al*, 1987; Miles *et al*, 1987). Las bases científicas para el efecto promotor de crecimiento aún no han sido bien esclarecidas (Franco y col., 1990 visto en Higuera, 1992), pero el uso de antibióticos con este propósito se ha extendido prácticamente a todas las industrias de producción animal (Higuera, 1992).

Debido a que la adición de antibióticos se aplica a animales destinados al consumo humano, se han realizado diversas investigaciones para determinar los residuos y/ó los límites de tolerancia de los productos utilizados en los animales o en el ambiente de producción (Gottschall *et al*, 1987; Moats y Leskinen, 1988; Cravedí *et al*, 1991). En E.U.A. se ha empezado a monitorear niveles de cloranfenicol, droga particularmente nociva para el hombre por producir anemia aplásica y leucemia a dosis muy bajas (Lightner, 1985 visto en Higuera, 1992; Williams *et al*, 1992) en productos de acuicultura.

Al igual que en la industria avícola y de engorda de ganado bovino y porcino, la acuicultura ha tenido que depender de la disponibilidad de agentes quimioterapéuticos conocidos tanto para uso terapéutico (Higuera, 1992), como para promotores de crecimiento. A medida que las operaciones se intensifican, aumenta el uso de éstos productos, así como también crece la preocupación por residuos y/o acumulación de estas sustancias en los animales o en el ambiente.

encontrar diferencias significativas en cuanto al crecimiento con el uso de este antibiótico.

Cravedi *et al.*, (1991) realizaron otro experimento de la digestibilidad aparente de la virginiamicina [14 C] en trucha Arcoiris en donde mencionan que la digestibilidad aparente para el Factor M fue de 98% y para el Factor S de 75-90%. No encontró evidencia de la acumulación de virginiamicina, factor M o factor S o metabolitos en tejidos, carcas o vísceras de los peces medicados, Las concentraciones de residuos más altas se encontraron en la vejiga natatoria y en las vísceras. Después de 15 días de tratamiento se detectaron menos de 10 ng de virginiamicina por gramo de músculo.

Castro (s/año), utilizando flavofosfolipol en salmónidos, encontró mayores incrementos de peso por un 10% con respecto al control y mejor eficiencia alimenticia (15%). Con este mismo producto; flavofosfolipol, la Compañía Química Hoechst ha realizado investigaciones en camarones peneidos en Ecuador reportando incrementos significativos en sobrevivencia y mejores tasas de conversión alimenticia por un 15% respecto al control.

Higuera *et al.*, (1991), no obtuvieron diferencias significativas en ganancia de peso al tratar a postlarvas y organismos adultos de *P. monodon* sometidos a un gran estrés debido a una infección con *Vibrios sp* tratados con oxitetraciclina y sulfametazina. Pero la sobrevivencia de las postlarvas fue considerablemente mayor que la de los adultos con los antibióticos utilizados. Los mismos autores en 1992 mencionan la determinación de residuos de estas sustancias por Charm-7000 (el sistema Charm utiliza antibióticos marcados radioactivamente) donde obtuvo residuos de oxitetraciclina al final del tratamiento de 150-200 μ g/Kg y de sulfametazina de 200-250 μ g/Kg en los camarones adultos. Ese mismo año, en otra investigación Brown e Higuera por el mismo método (Charm-7000) determinaron residuos de tetraciclinas en camarones provenientes de Ecuador y de Tailandia.

Existe una necesidad urgente de generar más información en varios aspectos del uso de antibióticos en el cultivo de camarón *i.e.* acumulación de residuos bajo condiciones de estrés y el efecto de tratamientos terapéuticos y subterapéuticos sobre todo el ciclo del cultivo. Existe muy poca investigación referente a los períodos de retiro y a la efectividad de los antimicrobianos de uso común. (Corliss *et al.*, 1977, Corliss, 1979 y Takahashi, 1985 visto en Higuera, 1991).

"Algunos antibióticos son totalmente inactivos en agua salada o bien tienen baja solubilidad, lo que puede limitar muy seriamente las aplicaciones prácticas de estos compuestos. A pesar de la amplia información disponible que señala que la actividad microbiana es altamente dependiente de la capacidad de las

moléculas de los antibióticos por competir por un sitio de unión específico de los componentes celulares y que debido a una gran variedad de factores (vía de administración, pH, salinidad, temperatura, dosis, efecto de la formulación de la dieta) puedan determinar su efectividad, las recomendaciones generales para su uso se han hecho bajo lineamientos muy generales y con pocas bases científicas en el caso del camarón" (Higuera, 1992).

Para incrementar la información existente con respecto al uso de antibióticos en camarón, el presente trabajo se propuso para evaluar el uso del antibiótico virginiamicina en la formulación de dietas para camarón Penaeus vannamei como promotor de crecimiento, así como mejorador de la conversión alimenticia y sobrevivencia.

VIRGINIAMICINA

El incremento en la absorción de los nutrientes, en la pigmentación, la acción promotora de crecimiento, mejoradora de la conversión alimenticia y la disminución de la mortalidad atribuibles a la virginiamicina han sido reportados por diversos investigadores (Yates y Schaible, 1962; Eyssen *et al.*, 1962; Combs y Bossard, 1963; Nelson *et al.*, 1963; March *et al.*, 1978; George *et al.*, 1982; Miles *et al.*, 1984; Stutz y Lawton, 1984; Buresh *et al.*, 1986; Buresh, s/año; Gottschall *et al.*, 1987; Henry *et al.*, 1987; Miles *et al.*, 1987; Moats y Leskinen, 1988; Salmon y Stevens, 1990 a y b; Decuyper *et al.*, 1991; Cravedi *et al.*, 1991; Cupo y Rogers, s/año; Waibel *et al.*, 1991).

La virginiamicina es un compuesto natural formado de 2 péptidos llamados Factor M₁ y Factor S₁, que poseen un efecto sinérgico y su mayor actividad se presenta en una relación 4:1; ambos factores son secretados por el mismo microorganismo *Streptomyces virginiae* y algunas otras especies de *Streptomyces* aislado por De Somer y Van Dijck en 1955. El Factor M es una lactona macrocíclica con dobles ligaduras muy activa frente a *Micrococcus aureus*. El Factor S presenta una estructura cíclica polipeptídica pero también lactónica, muy activa frente a *Bacillus subtilis* (Norden, 1991b).

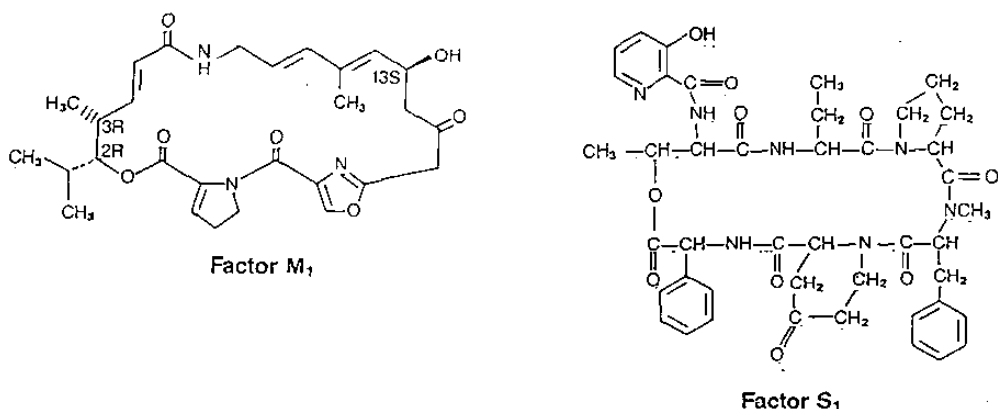


Figura 1.- Estructura química de los factores M₁ y S₁ de la virginiamicina.
(Tomado de Gottschall, *et al.*, 1987).

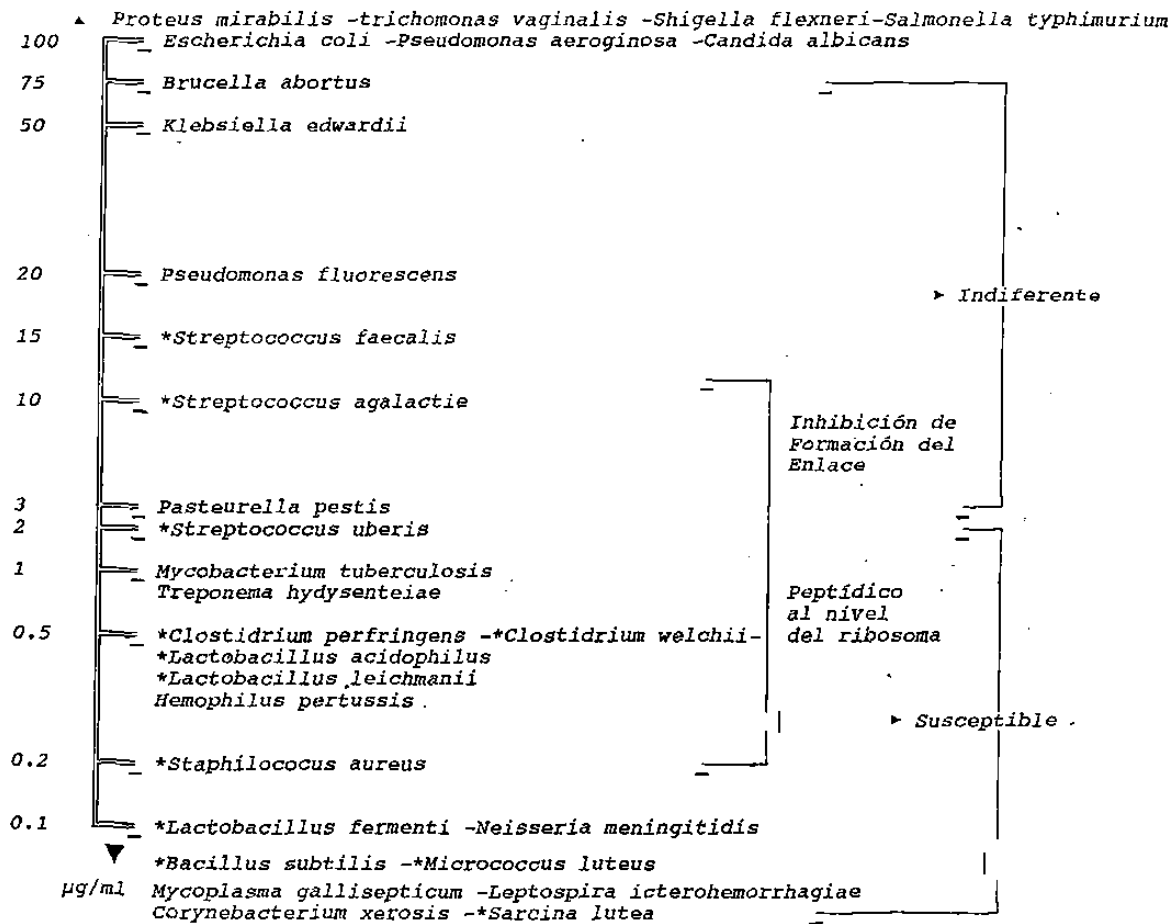
La actividad antibacteriana del Factor M₁ es semejante a la de los macrólidos: inhibición de la síntesis protéica a nivel de ribosoma 50S. Esta acción bacteriostática es potencializada convirtiéndose en bactericida por la acción del Factor S que es igual a la de polimixinas: perturbación de funciones de membrana por tensoactividad.

Debido a que la virginiamicina principalmente es activa en contra de bacterias gram-positivas, no existe riesgo de transferencia de resistencia. La virginiamicina no es activa en contra de Enterobacteriaceae. El sinergismo de los Factores S₁ y M₁ ha sido de un considerable interés bioquímico y ha sido sujeto de extensas investigaciones. Los antibióticos de virginiamicina son ampliamente utilizados en la producción animal, tanto como promotores de crecimiento como para el tratamiento de ciertas infecciones específicas, especialmente en la disentería porcina (Milhaud, 1977; Molinero et al., 1989).

Desde hace algunos años la Compañía Smithkline & French, S.A. en colaboración con diversas Universidades ha realizado investigaciones en algunas especies de explotación acuícola con el uso de **virginiamicina** reportando significativos incrementos con respecto a sobrevivencia y mejores tasas de conversión alimenticia. (Norden, 1991a).

En la figura se muestra el espectro antibacteriano de la virginiamicina (*Organismos gram-positivos). El máximo sinergismo se logra en la proporción 80 Factor M/ 20 Factor S (4:1) (Norden, 1991b).

Figura 2. Espectro antibacteriano de la virginiamicina.



(Norden, 1991b).

AREA DE TRABAJO

Los lugares en donde se realizaron cada una de las diferentes fases de este trabajo son:

- 1.- El diseño experimental y la formulación de las dietas se realizaron en el Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 2.- La fabricación de las dietas se llevó a cabo en la compañía de alimentos balanceados Nutripac, Culiacán, Sinaloa, para conocer los efectos del procesamiento comercial.
- 3.- El análisis proximal de las dietas elaboradas se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León..
- 4.- La actividad del antibiótico después del procesamiento del alimento, y residuos de antibiótico en tejidos, se determinó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora.
- 5.- La evaluación biológica de las dietas experimentales y las pruebas de lixiviación de las mismas se llevó a cabo en la granja de producción comercial semi-intensiva S.C.P.A. "Las Lomitas" localizada en Escuinapa, Sinaloa. México.
- 6.- El análisis estadístico y el reporte de los datos se llevaron a cabo en el Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

METODOLOGIA

FORMULACION Y FABRICACION DE DIETAS EXPERIMENTALES

La formulación de las dietas experimentales se realizó por medio del programa MIXIT 2 + (1992), de acuerdo a los requerimientos nutricionales de camarones juveniles (Tacon, 1987a y b; Akiyama, 1991) (Tabla 1). Se utilizó una misma fórmula para todas las dietas y sólo se varió la cantidad del STAFAC 25 y la harina de trigo (Tabla 2).

Se fabricaron 5 dietas experimentales de tipo comercial (500 Kg de cada una), con niveles crecientes de virginiamicina: 50, 80, 100 y 200 ppm, así como una dieta control sin virginiamicina, en la Planta Nutrimientos Pecuarios del Pacífico "NUTRIPAC", usando la tecnología de rutina para fabricar alimento de camarón.

Tabla 1.- Componentes constantes de las dietas experimentales.

INGREDIENTES CONSTANTES	%	CANTIDAD PARA 500 Kg
HARINA DE PESCADO (64.20)	26.2	131.00
HARINA DE SOYA (43.76)	25	125.00
GLUTEN DE MAIZ (40.20)	6	30.00
ACEITE DE PESCADO	2.03	10.14
LECITINA DE SOYA	2	10.00
MEZCLA VITAMINICA	0.5	2.5
VITAMINA C	0.05	0.25
AGLUTINANTE	0.8	4.0
FOSFATO MONOSODICO	4.36	21.8
METIONINA	0.02	0.10
HARINA DE CAMARON (32.79)	0.8	4.0

Los valores entre paréntesis son los porcentajes de proteína de los ingredientes.

Tabla 2.- Componentes variables de la dietas experimentales (cantidad para 500 Kg).

INGREDIENTES VARIABLES	%	DIETA CONTROL	DIETA 50 ppm	DIETA 80 ppm	DIETA 100 ppm	DIETA 200 ppm
HARINA DE TRIGO	32.24	161.20	160.2	159.6	159.2	157.2
STAFAC 25 MR	-----	-----	1.0 Kg	1.6 Kg	2.0 Kg	4.0 Kg

El STAFAC 25 MR, (lote No. 41CO2, Laboratorio SmithKline & Beecham con fecha de caducidad Abril de 1995, 25g de virginiamicina por Kg de producto con harina de trigo como vehículo) presentación comercial de virginiamicina se adicionó en sustitución de la harina de trigo en cada dieta de la siguiente manera:

- 1) Dieta base sin antibiótico (Dieta control).
- 2) Dieta base 499 Kg + 1 Kg STAFAC 25 (Dieta 50 ppm de virginiamicina).
- 3) Dieta base 498.4 Kg + 1.6 Kg STAFAC 25 (Dieta 80 ppm de virginiamicina).
- 4) Dieta base 498 Kg + 2.0 Kg STAFAC 25 (Dieta 100 ppm de virginiamicina).
- 5) Dieta base 496 Kg + 4.0 Kg STAFAC 25 (Dieta 200 ppm de virginiamicina).

Para facilitar la lectura de este manuscrito cuando nos referimos a virginiamicina, estamos hablando del producto comercial STAFAC 25 MR. La virginiamicina se mezcló con los ingredientes menores (vitaminas, aglutinante, metionina y fosfato monosódico) en un costal y se agregó a la tolva de la báscula. La capacidad mínima reportada de la mezcladora es de 500 Kg, siendo una mezcladora de tipo horizontal de listones y de capacidad máxima de 3 ton.

Para todos los alimentos, los ingredientes secos se mezclaron durante 2 minutos y 4 minutos adicionales con los ingredientes líquidos, que para estas dietas fueron aceite de pescado y lecitina de soya. La temperatura en el acondicionador fue de 70 a 90 °C. El alimento tardó 12 seg en atravesar la peletizadora. Se utilizó un dado de 3 mm para el peletizado, la temperatura del alimento después de pasar por el dado fue de 82°C. La peletizadora cuenta con inyección de vapor, lo que permitió al alimento recibir humedad y calor por lo menos 12 seg antes de pasar por el dado. Todas las anteriores dietas fueron evaluadas en bioensayos con Penaeus vannamei por cuadruplicado, excepto la dieta de 200 ppm que fue evaluada por duplicado y la dieta control por 6 replicados.

ANALISIS PROXIMAL

El análisis proximal de las dietas experimentales se realizó en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para cada una de las dietas ya elaboradas. Se contemplaron los siguientes parámetros (según los Métodos de la A.O.A.C., 1990): humedad, materia seca, extracto etéreo, fibra cruda, proteína, ceniza, extracto libre de Nitrógeno.

ANALISIS DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN PELLETS Y CAMARON

Se escogieron muestras del costal No. 8 de cada una de las dietas experimentales recién peletizadas y enfriadas. Además, para conocer el efecto del almacenamiento en el alimento en condiciones propias de la granja se muestreo cada uno de los alimentos al final del experimento zootécnico.

Para la valoración de virginiamicina en dietas y músculo abdominal de camarón, se utilizó el Método Microbiológico propuesto por SmithKline & Beecham, México (Norden 1982).

Este método consiste en extraer la virginiamicina de la muestra utilizando ácido cítrico y acetona para la extracción, tomando una alícuota y aforando con buffer fosfatado para después depositar el extracto en discos de papel filtro colocados en agar inoculado con una cepa bacteriana conocida. El diámetro de inhibición obtenido para cada muestra es reportado sobre una curva estándar establecida usando el STAFAC 25.

EQUIPO:

- 1) Cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro y 15 mm de altura, con base plana.
- 2) Discos de papel filtro Schleicher & Schuell del No. 740-E o similar.
- 3) Papel filtro Whatman No. 4.
- 4) Aparato de lectura de zonas de inhibición.
- 5) Contador de colonias (Colony Counter Darkfield, Quebec, American Optical).
- 6) Placas de agitación (Corning Hot Plate Stimer PC351).
- 7) Vortex (VWR Vortexer 2).
- 8) Incubadora o estufa (VWR Scientific Inc. Subsidiary of Univar).
- 9) Autoclave (Market Sterilmatic hasta 148°C y 30 lb/in²).
- 10) Baño ultrasónico (Branson 3200).
- 11) Espectrofotómetro.
- 12) Balanza Analítica.

MEDIOS DE CULTIVO:

- 1) Mantenimiento agar antibiótico No. 1
- 2) Inoculación agar antibiótico No. 11
- 3) Preparación del inóculo caldo antibiótico No. 3

REACTIVOS:

- 1) Acido cítrico 0.1 M.
- 2) Acetona pura (grado reactivo).
- 3) Etanol (solución estándar puro).
- 4) Buffer fosfatado pH 6.

PREPARACION DEL MICROORGANISMO

Micrococcus luteus (Cepa ATTC 9341, otorgada por SmithKline & Beecham, México). Se pasó el microorganismo cada 15 días en tubos con agar antibiótico No. 1 inclinado, se incubó 18 hr y se guardó a 4°C. De 2 tubos de 18 hr de incubación se sembraron 2 tubos con medio fresco, el día anterior a la prueba y se incubaron 18 hr a 36°C.

Se agregó a cada tubo de cultivo 1 ml de medio antibiótico No.3 y con un hisopo estéril se removió el microorganismo a un tubo estéril vacío y se agitó en un vortex por 10 segundos para homogeneizar la suspensión, se leyó en un espectrofotómetro hasta obtener una lectura de 41.68 de transmitancia.

NOTA 1: Si la lectura obtenida es mayor a 190 Unidades Klett (190 Unidades Klett corresponden a 41.68 transmitancia), agregar medio antibiótico No. 3, hasta obtener la lectura deseada; si la lectura es menor a 190 U Klett agregar más microorganismo.

PREPARACION DE LAS PLACAS

Se fundió el agar antibiótico No. 11 y se dejó enfriar a 47°C aproximadamente, se checó que el pH fuera de 8, y agregó la cantidad de inóculo necesaria para preparar una suspensión al 1%.

Se homogeneizó perfectamente la suspensión y vació 7 ml de esta en cada caja, se rotaron las cajas para esparcir bien el medio y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. (Se recomienda guardar las placas ya solidificadas en refrigeración, mientras se preparan las diluciones, no guardarlas durante una noche).

PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR

Para establecer la curva estándar se extrajo la virginiamicina de cantidades crecientes de STAFAC 25.

La metodología utilizada para la extracción fue la siguiente:

Se pesó una cantidad determinada de STAFAC 25 y se colocó en un matraz (2 replicados); se le agregó 125 ml de ácido cítrico a cada matraz y agitó ultrasónicamente por 10 minutos. A cada matraz se le agregó 125 ml de acetona y agitó mecánicamente por 90 minutos.

NOTA 2: Mantener el pH entre 4 y 5 con ácido clorhídrico 1 N o hidróxido de sodio 1 N.

La técnica marca que hay que centrifugar la solución pero no precisa a que revoluciones por minuto, a que temperatura, ni por cuanto tiempo. Por lo que se dejó reposar hasta sedimentar y se pasó el sobrenadante en un filtro Whatman No.4. Se tomaron 2 ml de este extracto y se aforo a 100 ml con buffer fosfatado pH 6. Este extracto se usó para empapar los discos para después depositarlos sobre el agar.

NOTA 3: La prueba debe hacerse dentro de las 24 hr posteriores a la preparación de las diluciones.

Suponiendo un rendimiento de extracción del 100%, se pesaron las siguientes cantidades para obtener las concentraciones deseadas en los extractos:

Concentración en el extracto ppm	Cantidad pesada de STAFAC 25 g
0.4	0.20
0.6	0.30
0.8	0.40
1.0	0.50
1.3	0.65
2.0	1.00

Se escogieron estas concentraciones debido a que la virginiamicina contenida en el STAFAC 25 utiliza harina de trigo como vehículo y suponíamos que las concentraciones de virginiamicina que encontraríamos en el músculo del camarón estaría entre éstos valores si no es que inferiores a ellos.

Para cada punto de la curva estándar se hicieron 4 cajas. En cada caja se humedecieron 3 discos con el extracto correspondiente a 1 ppm (estándar interno) y 3 discos de la solución correspondiente a los puntos de la curva estándar. Los discos se escurrieron perfectamente y se colocaron sobre el agar presionandolos ligeramente para tener la seguridad de que estuvieran en contacto con el medio.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PELLETS Y CAMARON

Se analizaron muestras de pellets recién fabricados. El bioensayo tuvo una duración de 42 días; a los 28 días de experimentación se extrajo una muestra representativa de camarones de cada dieta para determinar la actividad residual del antibiótico. A los 42 días finalizó el bioensayo y se volvieron a extraer muestras representativas de camarones así como de pellets almacenados y también de pellets almacenados y lixiviados.

En la siguiente tabla podemos observar el tipo de muestra y el tiempo en el que fué analizada.

Tabla 3.- Muestras analizadas para cada una de las dietas experimentales.

MUESTRA	RECIEN ELABORADAS	A LOS 28 DIAS	A LOS 42 DIAS
PELETIZADOS	*		
ALMACENADOS			*
ALMACENADOS Y LIXIVIADOS			*
TEJIDO ABDOMINAL DE CAMARON		*	*

Los camarones utilizados para la determinación de residuos de virginiamicina, fueron transportados vivos en bolsas dentro de una hielera vía aérea al CIAD en donde se llevó a cabo este análisis. Estos mismos fueron descabezados, pelados y cortados en pequeños fragmentos, ya que se trataba de determinar si es que en el tejido abdominal del mismo se encontraban residuos del antibiótico.

Cada muestra se colocó en un matraz (2 replicados); se le agregó 125 ml de ácido cítrico a cada matraz y agitó ultrasónicamente por 10 minutos. A cada matraz se le agregó 125 ml de acetona pura y agitó mecánicamente por 90 minutos.

Se verificó que el pH estuviera entre 4 y 5 y se dejó sedimentar, posteriormente se tomó una alícuota de 50 ml y se aforó a 100 ml con buffer fosfatado pH 6.

Suponiendo un rendimiento de extracción del 100% del alimento recién peletizado de cada una de las dietas, se pesaron las siguientes cantidades para obtener los extractos cuyas concentraciones pudieran ser ubicadas en el rango abarcado por la curva estándar:

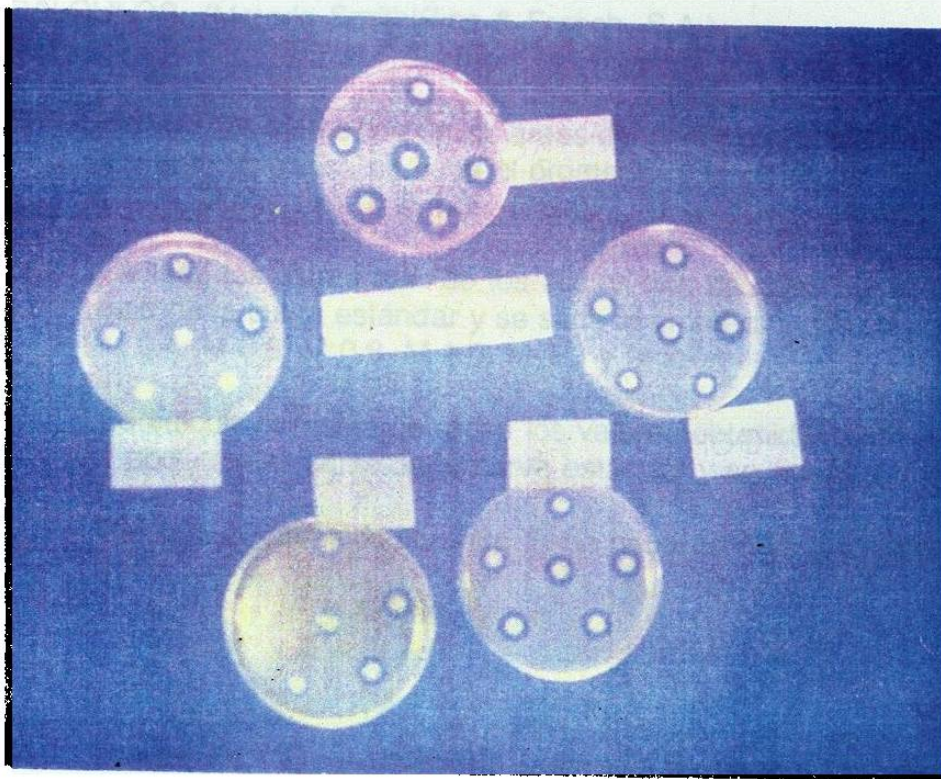
DIETA	GRAMOS
50 ppm =	10 g
80 ppm =	7 g
100 ppm =	6 g
200 ppm =	10 g

Para cada dieta se realizaron 1, 2 ó 3 diferentes extracciones; se utilizaron 3 cajas a las que se les colocaron 3 discos humedecidos con el extracto de cada una de las dietas y 3 discos el estándar interno (1 ppm).

NOTA 4: Pesar 10 g de la dieta 200 ppm es un error, ya que la cantidad necesaria para obtener un extracto de concentración cercana a 1 ppm debe ser 2.5 g.

INCUBACION Y LECTURA DE LAS PLACAS

Una vez depositados los discos se invirtieron las cajas y se incubaron a 36°C por 18 hr. Finalmente se leyeron los diámetros de inhibición de cada dilución empleada y se hicieron los cálculos correspondientes.



En la anterior fotografía se muestran las zonas de inhibición provocadas por la actividad del antibiótico (antibiograma). Cada caja contenía 6 discos, 3 discos empapados en la solución estándar y 3 empapados en la solución ya sea de pellets o de camarón. Lo anterior se hizo para cada una de las dosis de virginiamicina y para el control, tanto en pellets como en músculo abdominal de camarón.

En este caso se muestran las zonas de inhibición en pellets, lo que nos indica que sí hay actividad de la virginiamicina sobre el microorganismo Micrococcus luteus.

Las zonas de inhibición de menor diámetro corresponden al estándar interno i.e. 1 ppm, los otros diámetros de inhibición mostrados corresponden a las diferentes dosis de virginiamicina empleadas.

CALCULOS (Metodo SmithKline & French, S.A.)

- 1) Se leen los diámetros de las áreas de inhibición de las diluciones de la curva estándar, se saca el promedio y se designan como D 0.4, D 0.6, D 0.8, D 1.0, D 1.3 y D 2.0.
- 2) Se leen los diámetros de los discos con dilución 1 ppm de cada caja de la curva estándar y se saca el promedio. Se designa como M 0.4, M 0.6, M 0.8, M 1.0, M 1.3 y M 2.0.
- 3) Se calcula la media de todos los valores obtenidos para la dilución 1 ppm, de las cajas de la curva estándar y se designa como M.
- 4) Calcular el diámetro correcto E, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E_i = D - M_i$$

$$E = E_i + M$$

Donde:

- D = diámetro promedio de cada punto de la curva estándar.
- M_i = diámetro promedio de la dilución de 1 ppm de cada punto de la curva estándar.
- M = promedio de los diámetros de la dilución de 1 ppm en todos los puntos de la curva estándar.
- E_i = diferencia entre el diámetro de cada punto de la curva estándar y el de 1 ppm.
- E = para cada punto de la curva se va a obtener el diámetro corregido que se va a designar como E 0.4, E 0.6, E 0.8, E 1.0, E 1.3 y E 2.0.

- 5) Para cada dilución de la muestra: calcular el diámetro del punto central (ME) y el correspondiente a la muestra (DE).

$$E_i = DE - ME$$

$$E = E_i + M$$

- 6) Ya que se obtuvieron los puntos alineados, se colocan en la ecuación de la recta de regresión de la concentración del extracto en función del diámetro de inhibición. Se utilizó esta prueba para determinar la actividad de virginiamicina a partir de los diámetros corregidos de cada muestra.

También se realizaron análisis de de determinación de virginiamicina para cada una de las dietas experimentales por el método de cromatografía de capa delgada en el laboratorio de control analítico auxiliar de la industria químico farmacéutica Alfredo Rodríguez G., S.A. de C.V. en la Ciudad de México, fechados el 3 de enero de 1993.

LIXIVIACION

Las dietas desarrolladas para camarones requieren una buena estabilidad para evitar la desintegración derivada de la exposición al agua y del proceso de manipulación del alimento por el animal durante la ingestión (Meyers y Zein, s/año). Minimizar el tiempo de búsqueda por el animal es un factor principal para lograr maximizar la eficiencia alimenticia. La excesiva lixiviación de los nutrientes esenciales de las raciones pobremente ligadas con un aglutinante afecta la disponibilidad del alimento al animal así como modifica las existentes características microbiológicas del ambiente.

Los alimentos balanceados que se fabrican para camarón contienen ingredientes atractantes como harina de pescado, harina de camarón y aceite de pescado y un aglutinante sintético a base de urea formaldehído tipo Basfin, que polimeriza por acción de calor, humedad, metales y cierto pH.

Las pruebas de lixiviación se utilizan para determinar la estabilidad y la pérdida de materia seca de las dietas en el agua.

Se colocaron 15 g de cada dieta en bolsas de tela mosquitero. Estas bolsas fueron expuestas al agua del estanque durante 2 hr a 37°C y 48 ppt de salinidad y posteriormente secadas al sol y trasladadas al CIAD para su posterior análisis microbiológico así como para determinar la pérdida de materia seca de cada una de ellas.

EVALUACION BIOLOGICA EN GRANJA

La evaluación biológica de las dietas experimentales se llevó a cabo en la granja de producción comercial semi-intensiva "Las Lomitas" ubicada en Escuinapa, Sinaloa, México; por medio de un bioensayo nutricional con una duración de 42 días utilizando como material biológico juveniles de Penaeus vannamei.

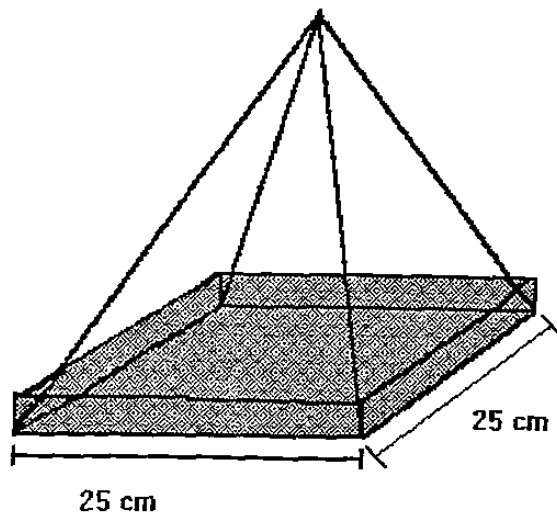
Se construyeron 20 jaulas experimentales de 1m^3 con un amazon de varilla para construcción de 1/2 de pulgada y forradas con malla de polietileno de alta resistencia con una luz de malla de 1/8 de pulgada. Así como también se construyeron charolas alimentadoras de alambión y tela mosquitera (0.25 m x 0.25 m).

Se probaron las 5 dietas, una sin ingrediente activo (control), otras con el ingrediente activo virginiamicina (cuatro dosis, 50, 80, 100 y 200 ppm). Cada dieta se evaluó por cuadruplicado, excepto la dieta de 200 ppm que fue por duplicado y la dieta control por 6 replicados.

Figura 3.- Jaulas de experimentación utilizadas en el bioensayo.



Figura 4.- Charola de alimentación utilizada en el bioensayo.



MATERIAL BIOLÓGICO:

- CAMARONES JUVENILES (Penaeus vannamei)

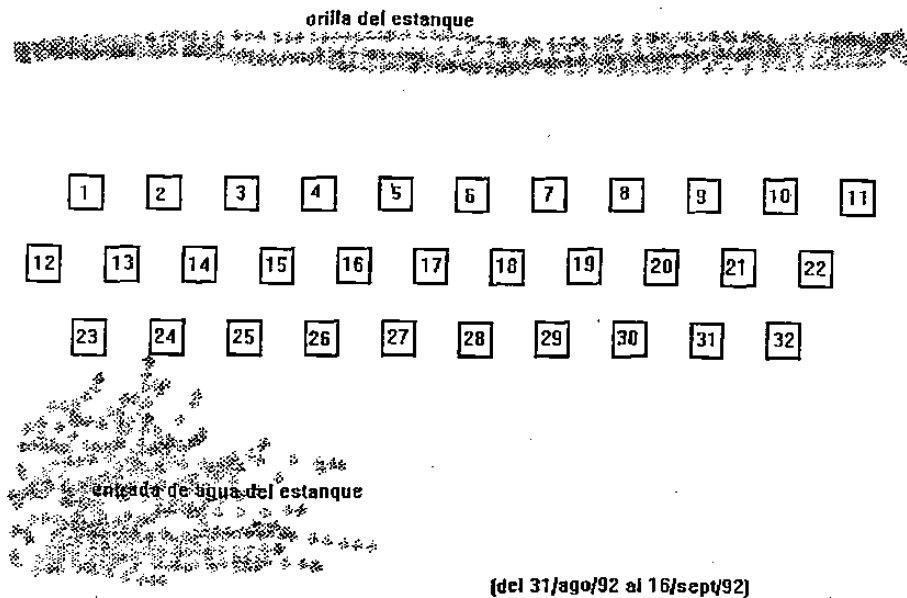
Se seleccionaron animales de 1.6 a 2.5 g de peso, de procedencia silvestre (postlarvas colectadas en el Centro de acopio de Cospita, Sinaloa), que habían sido sembrados en el estanque a una densidad de 20 organismos/m² (siembra directa), un mes antes.

DISTRIBUCION Y ROTACION DE LAS JAULAS DE EXPERIMENTACION EN EL ESTANQUE

El estanque que se escogió para colocar las jaulas de experimentación fue el estanque # 9 de un total de 20 estanques en producción en la granja "Las Lomitas", ya que era el único estanque con organismos de la talla adecuada para el experimento y también a que su profundidad era la necesaria para colocar las jaulas de experimentación. Este estanque es de forma rectangular, cuenta con 8 hectáreas de superficie, con un nivel medio de agua de 1.20 m.

Las jaulas de experimentación fueron colocadas próximas a una de las orillas del estanque de producción comercial, la distribución de los tratamientos se hizo al azar.

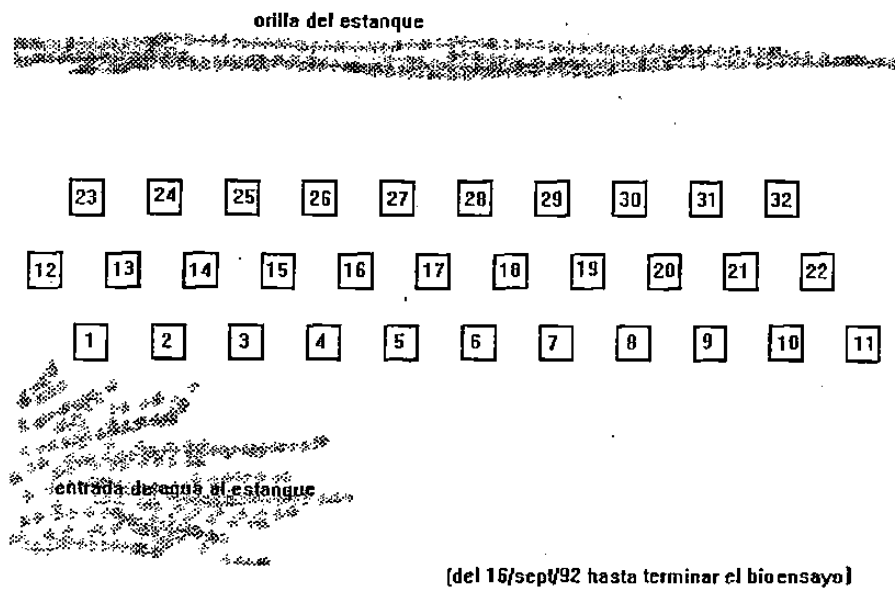
Figura 5.- Distribución de las jaulas de experimentación en el estanque (del 31/ago/ al 16/sept/92).



Este experimento se corrió a la vez con otra investigación, por lo que las jaulas no especificadas corresponden al otro experimento.

DIETA	JAULA
Control	1,2,12,15,18,27
50 ppm	6,13,22,28
80 ppm	4,11,26,31
100 ppm	3,10,20,25
200 ppm	8,32

Figura 6.- Distribución de las jaulas de experimentación en el estanque (del 16/sept/92 hasta terminar el bioensayo).



Se rotaron las jaulas debido a que se sospechaba que las jaulas de la orilla tenían menor columna de agua y podía alterar el consumo, haciendo un análisis estadístico por fila de jaulas según su consumo, no se encontraron diferencias significativas del consumo entre las filas.

DISTRIBUCION DE LOS ORGANISMOS Y DE LOS TRATAMIENTOS

Cada individuo fue secado en un trapo húmedo (para quitarle el exceso de agua) y pesado en una balanza digital (Ohaus E400D Modelo C305-P, capacidad 300 x .1 g). Los organismos pesados se distribuyeron a una densidad de 22 organismos por jaula (22orgs/m²). Al día siguiente de la selección, se reemplazaron los individuos que murieron a causa del estrés de manejo y se empezó a alimentar a los animales con las dietas experimentales.

Los camarones fueron alimentados de forma racionada 2 veces al día, mañana y tarde (40 y 60% de la ración respectivamente) por medio de charolas alimentadoras para tener un mejor control sobre el consumo y para poder calcular la Tasa de Conversión Alimenticia aparente. Se usa el término aparente debido a que no se tomó en cuenta el aporte de alimento por la producción natural del estanque.

El alimento no consumido, las mudas y los camarones muertos encontrados en la charola de alimentación se eliminaron diariamente y se llevó un registro de estas observaciones.

Los camarones fueron pesados al inicio, a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días del experimento, sustituyendo a los camarones muertos o faltantes por camarones vivos del estanque con el mismo peso promedio de cada jaula en cada semana.

Los días 28 y 42 se extrajeron muestras de camarones representativas de cada tratamiento para determinar si existían residuos de virginiamicina en el tejido abdominal de los ejemplares. Los camarones de estas muestras fueron guardados vivos en bolsas de plástico (una para cada tratamiento) dentro de hieleras de polietileno y transportados vía aérea al Centro de Alimentación y Desarrollo en Hermosillo, Son., para el posterior análisis de actividad antibiótica de la virginiamicina.

La tasa de alimentación se determinó en base a la biomasa total por jaula. Las raciones por día que fueron administradas:

- 40% de la ración en la mañana
- 60% de la ración en la tarde

El disminuir la tasa de alimentación conforme aumenta la talla del camarón ha sido revisado por un gran número de investigadores.

Tabla 4.- Tasa de alimentación suministrada para cada una de las semanas de experimentación.

SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
11%	10%	10%	8%	6%	7%

Cada semana se pesó individualmente a los camarones de cada jaula, de cada tratamiento reemplazándose a los organismos faltantes por el mismo peso promedio, para evitar efectos de interferencia por la diferencia de densidad entre los tratamientos.

PARAMETROS DE LA EVALUACION BIOLOGICA

La evaluación biológica consistió en comparar la tasa de crecimiento, conversión alimenticia y sobrevivencia obtenida por las diferentes dietas en condiciones ambientales y de manejo similares.

Estas determinaciones se obtuvieron mediante las siguientes fórmulas:

- 1) Tasa de Crecimiento (TC) = incremento en peso en porcentaje del peso inicial.

$$TC = \frac{\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}}{\text{peso inicial (g)}} \times 100$$

- 2) Tasa de Conversión Alimenticia aparente (TCA) = g de alimento consumido por g de peso corporal ganado.

$$TCA = \frac{\text{alimento consumido (g)}}{\text{peso ganado (g)}}$$

Se considera Tasa de Conversión Alimenticia aparente ya que no se tomó en cuenta el aporte de alimento por producción natural (es decir, lo que aporta el fitoplancton y bentos).

- 3) Tasa de Sobrevivencia = sobrevivencia promedio en porcentaje del número inicial de animales cada semana.

$$TS = \frac{\text{No. final de animales}}{\text{No. inicial de animales}} \times 100 \text{ en 7 días}$$

- 4) Tasa de Mortalidad (TM) = mortalidad promedio en porcentaje en base al número final de animales por semana.

$$TM = 100 - TS \text{ semanal}$$

ANALISIS ESTADISTICO

A los pesos individuales y finales se les aplicó una prueba de homogeneidad de varianza seguido de un análisis de varianza y de una prueba de comparación múltiple de medias por el método de Duncan para determinar diferencias significativas por medio de una computadora PC con el programa SPSS PC+ (1986).

Para la tasa de crecimiento, sobrevivencia, consumo y TCA se les aplicó el mismo análisis estadístico a los valores promedio de los replicados por dieta, por lo que se contó con 4 datos para las dietas 50, 80 y 100, 2 datos para la dieta 200 ppm y 6 para la dieta control.

Así mismo se aplicó un análisis de varianza sobre los pesos individuales cada semana en los diferentes replicados de una misma dieta con el fin de comprobar la homogeneidad de replicados de cada dieta.

PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DEL AGUA DEL ESTANQUE

El factor más crítico que gobierna el crecimiento óptimo y la sobrevivencia de los camarones es la calidad del agua. Todas las actividades del camarón son afectadas por las condiciones físicas del estanque y la producción óptima de camarón está directamente correlacionada al manejo óptimo de los parámetros hidrológicos más que a cualquier otro factor. Del mismo modo, la baja producción, en muchos casos, puede ser directamente atribuido a la pobre calidad del agua. Consecuentemente, se deben de monitorear meticulosamente los parámetros hidrológicos para un buen desarrollo de la producción.

Los parámetros físico-químicos del agua del estanque que se registraron siguiendo la metodología usada por los técnicos encargados de la granja son los siguientes:

- 1) Oxígeno disuelto. (diariamente a las 6:00 a.m. y 4:00 p.m. aproximadamente. Por medio de un oxímetro de batería en la salida del agua del estanque)
- 2) Iones amonio y pH. (cada 3 días. Por medio de un kit colorimétrico en la salida del agua del estanque [Sea test kit, Aquarium Systems]).
- 3) Iones nitritos y nitratos. (cada 3 días. Por medio de un kit colorimétrico en la salida del agua del estanque [Sea test kit, Aquarium Systems]).
- 4) Turbidez (diariamente a las 4:00 p.m. aproximadamente. Por medio de un disco de Secchi en la salida del agua del estanque).
- 5) Salinidad (diariamente, dependiendo de la hora de bombeo. Por medio de un refractómetro en la salida del agua del estanque).
- 6) Temperatura (diariamente a las 6:00 a.m. y 4:00 p.m. aproximadamente. Por medio de un termómetro en la salida del agua del estanque).
- 7) Recambio de agua (diariamente a las 6:00 a.m. y 4:00 p.m. aproximadamente. Por un nivel con escala métrica colocado a un costado de las jaulas de experimentación).

RESULTADOS

FORMULACION Y FABRICACION DE DIETAS EXPERIMENTALES

ANALISIS PROXIMAL

Como se muestra en la tabla de análisis proximal de las dietas en base húmeda, el nivel de proteína entre las dietas varió de 32.24 (dieta control) a 35.35% para la dieta de 100 ppm, esto es, una diferencia de 3.11% entre estas dietas. El extracto etéreo varió de 5.59 a 6.86%. El ELN varió en un rango de 36.99 a 41.37%.

Tabla 5.- Análisis proximal de las dietas en base húmeda (%).

DIETAS EXPERIMENTALES					
	0 ppm	50 ppm	80 ppm	100 ppm	200 ppm
HUMEDAD	7.67	8.51	7.65	6.27	6.70
MATERIA SECA	92.33	91.94	92.35	93.73	93.30
CENIZA	8.09	9.27	10.46	9.77	10.29
EXTRACTO ETEREO	5.59	5.63	6.33	6.35	6.86
FIBRA CRUDA	5.04	3.41	3.83	5.27	3.03
PROTEINA	32.24	32.68	34.12	35.35	35.27
ELN	41.37	40.50	37.61	36.99	37.85

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN PELLETS Y CAMARON

Primeramente se estandarizó la técnica microbiológica que marca el Laboratorio de Smith & Kline, y se trazó una curva estándar obteniéndose lo siguiente:

Tabla 6.- Valores de diámetros de inhibición para la curva estándar de virginiamicina (STAFAC 25 MR).

CAJA PETRI	DISCO	0.4 ppm	1 ppm	0.6 ppm	1 ppm	0.8 ppm	1 ppm	1 ppm	1 ppm	1.3 ppm	1 ppm	2 ppm	1 ppm
1	1	10	13	14	14	12.5	12	14	13.5	16.5	15	18	13
	2	10	13	12.5	13	12.5	13	14	13	16	14	17	13.5
	3	11	12	13.5	12.5	13	13.5	14	13	15.5	14	16.5	14.5
2	1	9.5	13	13	14	11	15	13	14	15	14	17	15
	2	9.75	13	14	14	14.5	15	13	14	16	13.5	18	14
	3	10	12	13.5	13	11	14	13	13	15	14.25	16.5	ND
3	1	9	12.5	12	13	12	13	13	14	15	16.5	18	15
	2	9.5	13.5	12.5	12.5	13	13.5	14	13.5	16	13.5	17	13
	3	10	12	12	13	12.5	13.5	14	14	16	14.5	17	13
4	1	8.5	13.5	13.5	15	11.5	14.5	13	13	15	14.5	16.5	13.5
	2	12	13	14	13.5	13	15	14	14	15	14	18	12.5
	3	13	12	13	13	12.5	13.5	13	13.5	14.5	14.5	18	14
D =		10.1875	13.1250	12.4166	13.5000	15.4583	17.2916						
1 ppm =		12.7083	13.375	13.7916	13.5416	14.3541	13.7272						
				M = 13.5809									
E =		11.0601	13.3309	12.2059	13.5393	14.6851	17.1453						

ND = No determinado

D = diámetro promedio de cada punto de la curva estándar.

M = promedio de los diámetros de la dilución de 1 ppm (estándar interno) en todos los puntos de la curva estándar.

E = diámetro de inhibición corregido para graficar en la curva estándar.

La siguiente gráfica nos permite observar los puntos que se determinaron en base al método microbiológico antes descrito y la recta de regresión calculada a partir de éstos puntos, con la siguiente ecuación: $y = 10.1 + 3.5x$.

Gráfica 1.-

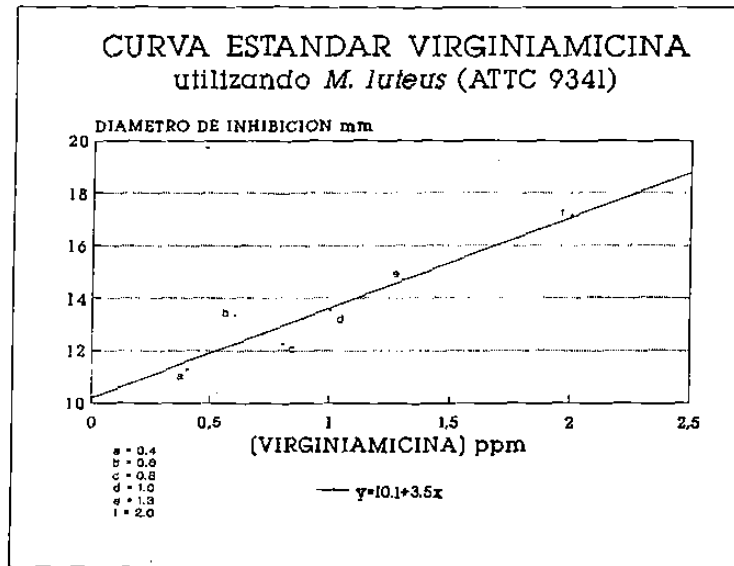


Tabla 7.- Puntos de la Curva estándar.

Concentración de virginiamicina (ppm)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.3	2.0
E = observado	11.0601	13.3309	12.2059	13.5393	14.6851	17.1453
E = calculado	0.27	0.92	0.60	0.98	1.3	2.01

Los análisis de la actividad antibiótica que se realizaron en las dietas experimentales para determinar la actividad residual del antibiótico, así como en tejido abdominal de camarón a los 28 y 42 días de experimentación, se muestran a continuación (Tabla 8 , Gráfica 2).

Tabla 8.- Resultados obtenidos para cada una de las muestras de tejido abdominal de camarón y de las dietas experimentales.

DIETA REPLICADOS	TEJIDO ABDOMINAL (ppm)	PELLETS RECIENTES FABRICADOS (ppm)	PELLETS ALMACENADOS (ppm)	PELLETS ALMACENADOS Y LIXIVIADOS (ppm)
0 ppm	< 0.04 *	0.0	0.0	0.0
50 ppm	<0.04 *	53.65	27.81	16.84
50 ppm	<0.04 *	47.31	37.65	35.10
promedio	<0.04 *	50.48	32.73	25.97
D.E.	0	4.48	6.95	12.91
80 ppm	<0.04 *	42.37	41.92	36.64
80 ppm	<0.04 *	46.78	50.79	32.90
promedio	<0.04 *	44.57	46.36	34.77
D.E.	0	3.11	6.27	2.64
100 ppm	<0.04 *	-14.78 **	-2.00 **	31.13
100 ppm	<0.04 *	66.29	7.98	44.09
100 ppm	<0.04 *	-12.32 **	ND	ND
promedio	<0.04 *	66.29	7.98	37.61
D.E.	0	46.11	7.05	9.16
200 ppm	<0.04 *	92.48	94.19	89.18
200 ppm	<0.04 *	103.56	91.61	102.95
promedio	<0.04 *	98.02	92.90	96.07
D.E.	0	7.83	1.82	9.73

* No se observó ninguna zona de inhibición.

** Se observó un diámetro de inhibición muy bajo, traduciendo en la recta de regresión en un resultado negativo de concentración de virginamicina.

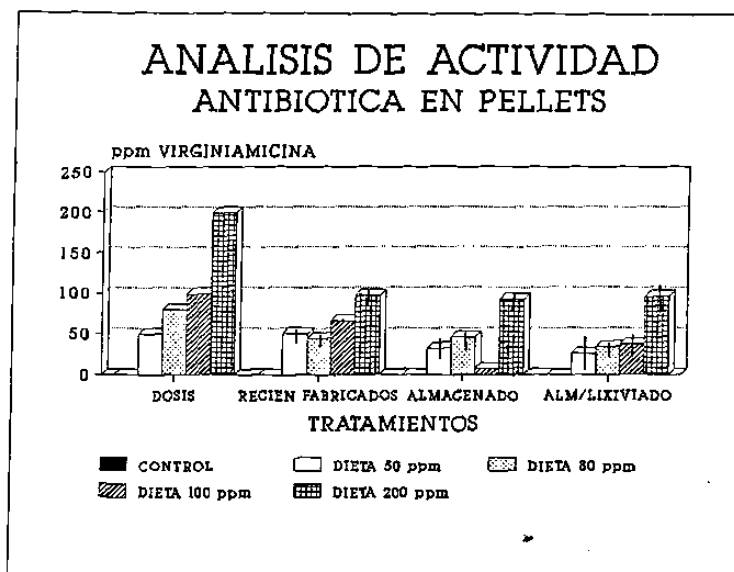
El límite de detección del método es de 0.04 ppm (Gráfica 1).

Los resultados reportados del laboratorio de control analítico Alfredo Rodríguez G., S.A. de C.V., muestran que no se detectó virginiamicina en ninguna de las muestras de las dietas experimentales analizadas por cromatografía de capa delgada.

Como se observa en la Tabla 8, en las muestras de camarón no se detectó residuo alguno. El resultado con menos variación entre los replicados se obtuvo con la dieta 200 ppm. En cuanto a los pellets recién fabricados, los valores promedios de actividad antibiótica corresponden al 0, 44.28, 33.71 y 50.99% de pérdida con respecto al nivel de inclusión en las fórmulas de 50, 80, 100 y 200 ppm respectivamente.

En cuanto a los pellets almacenados, la pérdida corresponde al 34.54, 42.05, 92.02 y 53.55% de las dosis respectivas. Y por último en cuanto a pellets almacenados y lixiviados, la pérdida corresponde al 48.06, 56.53, 62.39 y 51.96% de las dosis antes mencionadas.

Gráfica 2.-

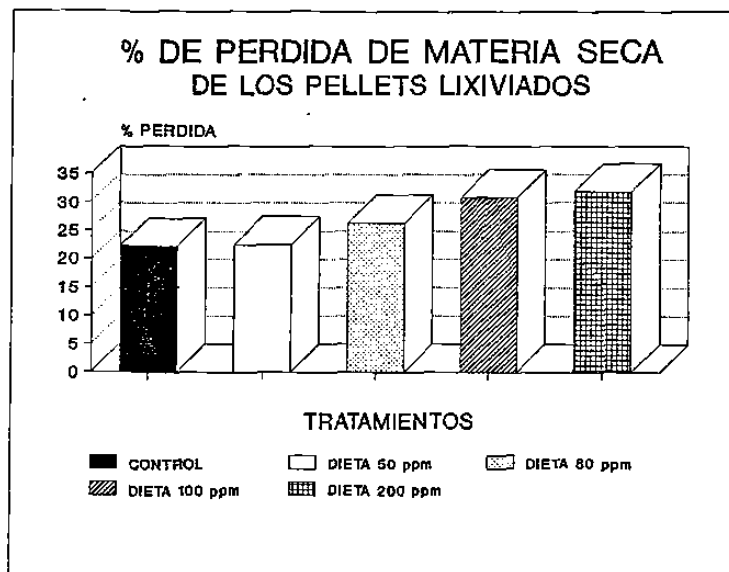


LIXIVIACION

Tabla 9.- Porcentaje de pérdida de materia seca de cada una de las dietas experimentales.

DIETA	PORCENTAJE DE PERDIDA DE MATERIA SECA
0 ppm	22.29%
50 ppm	22.60%
80 ppm	26.38%
100 ppm	30.93%
200 ppm	31.90%

Gráfica 3.-



El porcentaje de pérdida de materia seca, varió de 22.29% a 31.90% según las dietas (Tabla 9). De manera general a mayor concentración de virginiamicina en las dietas, se obtuvo una mayor pérdida de materia seca.

EVALUACION BIOLOGICA EN GRANJA

Al final 42 días de experimentación, se registraron los pesos finales de 6.68 a 6.88 g según los tratamientos, es decir, tasas de crecimiento de 300 a 325% (tabla 10, gráfica 4). Las tasas de conversión alimenticia aparente variaron de 2.6 a 2.8 y la mortalidad semanal registrada de 5.6 a 6.6.

Tabla 10.- Resumen de resultados zootécnicos obtenidos del bioensayo nutricional.

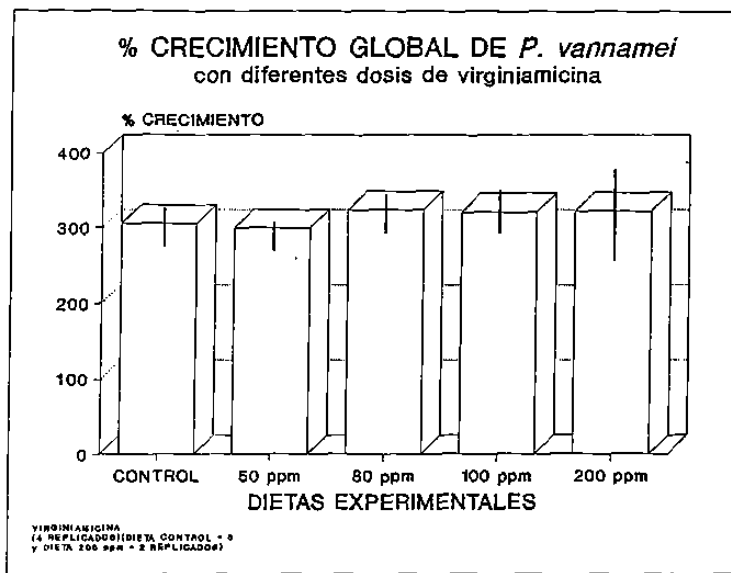
PRUEBA	DIETA CONTROL	DIETA 50 ppm	DIETA 80 ppm	DIETA 100 ppm	DIETA 200 ppm	P
DOSIS	0	50	80	100	200	
DURACION (DIAS)	42	42	42	42	42	
No. CAMARONES	22	22	22	22	22	
No. REPLICADOS	6	4	4	4	2	
PESO INICIAL (g)	1.66 a	1.67 a	1.59 a	1.63 a	1.61 a	0.37
DE	0.07	0.02	0.04	0.06	0.02	
PESO FINAL (g)	6.74 a	6.68 a	6.77 a	6.88 a	6.83 a	0.93
DE	0.25	0.35	0.16	0.40	0.68	
GANANCIA DE PESO (G)	5.08 a	5.01 a	5.18 a	5.24 a	5.22 a	0.85
DE	0.25	0.34	0.21	0.39	0.70	
% DE CRECIMIENTO	306 a	300 a	325 a	322 a	323 a	0.54
DE	22.93	17.17	22.60	28.23	48.76	
TCA APARENTE	2.6 a	2.6 a	2.6 a	2.7 a	2.8 a	0.94
DE	0.29	0.15	0.53	0.60	0.81	
% MORTALIDAD SEMANAL	5.7 a	5.6 a	6.6 a	5.7 a	5.7 a	0.98
DE	1.64	1.45	3.17	5.23	1.6	

P = probabilidad del análisis de varianza entre los tratamientos.
Valores con letras similares no muestran diferencia significativa.

Los resultados obtenidos del bioensayo nutricional no muestran diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a peso final, % de crecimiento, tasa de conversión alimenticia aparente y mortalidad.

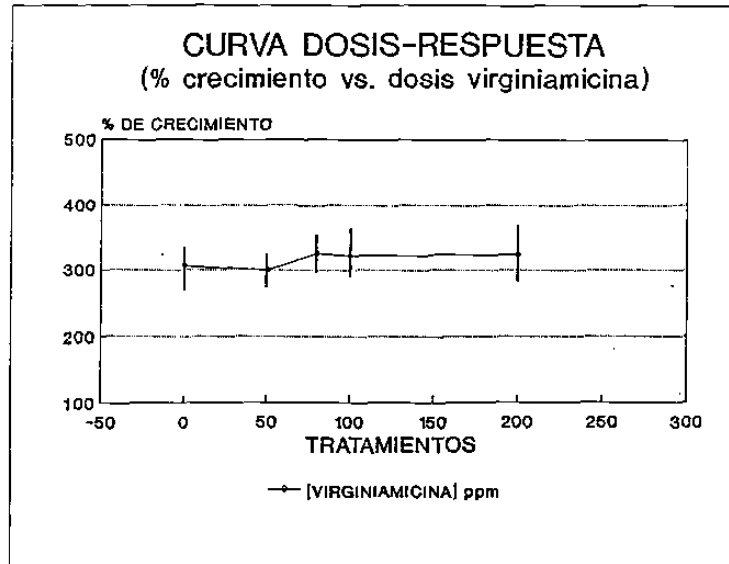
El porcentaje de crecimiento en todo el bioensayo fue de 306 para la dieta control, 300, 325, 322 y 323 para las dietas 50, 80, 100 y 200 ppm respectivamente. La dieta 80 ppm tuvo el mejor porcentaje de crecimiento, aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Gráfica 4.-



En la gráfica 5 se muestra la curva de dosis-respuesta con respecto al porcentaje de crecimiento y de las dosis de virginiamicina administradas en las dietas, donde se muestra que la dieta de 80 ppm se obtuvo el valor más alto (325) con respecto al crecimiento.

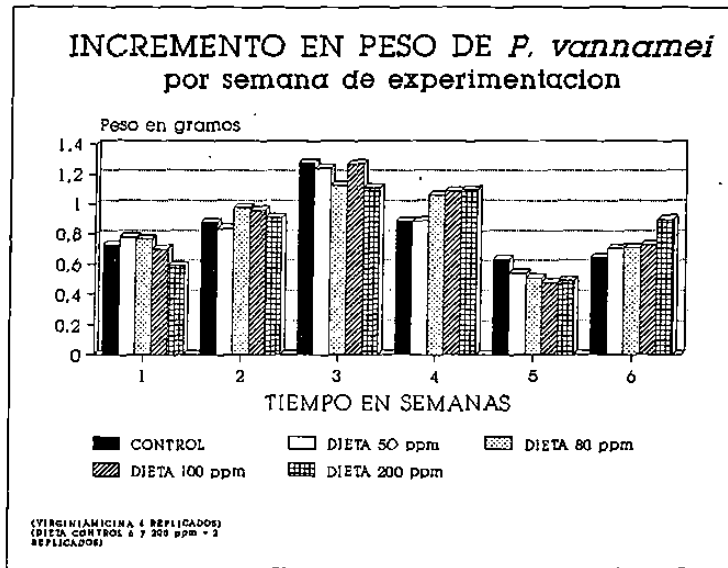
Gráfica 5.-



No se obtuvieron diferencias significativas. La adición de virginiamicina no mejoró significativamente ($P = 0.54$) el crecimiento de los camarones con respecto al control.

En la semana 4 la dieta 200 ppm tuvo el mayor incremento en peso, obteniendo una diferencia significativa del 19% ($P < 0.05$) con respecto al control y a la dieta 50 ppm. Pero globalmente no existió ninguna diferencia significativa entre los tratamientos. En esta misma gráfica podemos observar que en la semana 5 existió una disminución considerable del incremento en peso de todos los tratamientos.

Gráfica 6.-



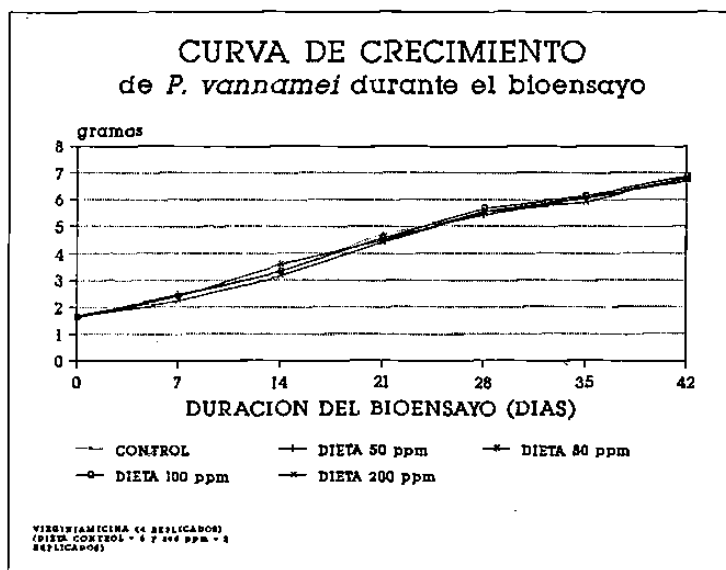
Se presentan en la Tabla 11 los pesos finales por semana con el resultado de la comparación de medias y en la gráfica 7, la curva de crecimiento de los diferentes tratamientos donde no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 11.- Peso promedio y desviación estándar por tratamiento para cada semana.

DIETA	PESO INICIAL	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
0 ppm	1.66	2.40	3.30	4.72	5.45	6.10	6.74
DE	0.07	0.12	0.20	0.18	0.22	0.18	0.25
50 ppm	1.67	2.46	3.29	4.57	5.42	6.05	6.68
DE	0.02	0.19	0.21	0.41	0.37	0.32	0.35
80 ppm	1.59	2.39	3.56	4.49	5.55	6.05	6.77
DE	0.04	0.09	0.18	0.16	0.13	0.19	0.16
100 ppm	1.63	2.36	3.29	4.57	5.66	6.14	6.88
DE	0.06	0.10	0.09	0.06	0.08	0.26	0.40
200 ppm	1.61	2.21	3.13	4.42	5.54	5.90	6.83
DE	0.02	0.12	0.21	0.02	0.16	0.42	0.68
P	0.42	0.58	0.29	0.78	0.30	0.44	0.57

P = probabilidad de que exista diferencia entre los tratamientos cada semana.

Gráfica 7.-



Como observamos de la gráfica anterior, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

El consumo de alimento aumentó semana tras semana, debido al incremento en biomasa y edad de los camarones en experimentación, en la semana 5 y 6 el consumo de alimento disminuyó en un 17.19% (DE = 4.10), probablemente debido a la mala calidad del agua registrada al final de la semana 4 del experimento.

Tabla 12.- Consumo de alimento por semana de cada tratamiento (g).

DIETA	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
0 ppm	23.39	34.89	48.25	52.29	45.47	41.13
DE	1.82	2.56	2.69	2.11	4.94	1.14
50 ppm	24.31	35.52	47.05	52.12	44.60	40.87
DE	1.03	1.66	4.19	5.45	6.15	1.32
80 ppm	24.46	34.28	49.35	54.20	44.71	40.99
DE	1.06	1.39	3.48	2.34	5.76	.76
100 ppm	24.03	35.08	48.94	54.10	44.73	41.84
DE	.24	1.38	1.50	1.91	6.72	2.59
200 ppm	23.7	32.2	43.21	54.13	41.30	40.42
DE	.43	3.83	1.37	.32	6.79	1.86

La tasa de conversión alimenticia aparente por tratamiento para cada semana se obtuvo haciendo un promedio de cada tasa de conversión alimenticia de cada una de las jaulas de cada tratamiento.

Tabla 13.- Tasa de conversión alimenticia aparente por tratamiento en cada semana.

DIETAS	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
0 ppm	1.5	1.8	1.9	2.8	4	3.1
DE	0.43	0.29	0.22	0.36	1.70	0.41
50 ppm	1.5	2	1.8	3	3.7	3.3
DE	0.34	0.15	0.26	1.08	0.68	0.75
80 ppm	1.4	2.5	2	2.4	4.7	3.2
DE	0.11	1.35	0.15	0.22	3.14	0.38
100 ppm	1.5	1.9	1.8	2.4	5.7	2.9
DE	0.12	0.23	0.25	0.06	3.81	0.42
200 ppm	1.8	1.7	1.5	2.3	7	2.3
DE	0.45	0.21	0.12	0.18	3.96	0.61

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos para cada una de las semanas. Presentándose las mejores tasas de conversión alimenticia al principio del experimento zootécnico. También observamos que las tasas de conversión alimenticia con valores más altos se presentaron en la semana 5, volviendo a disminuir en la semana 6.

La mortalidad semanal registrada cada semana por tratamiento se obtuvo haciendo un promedio de los organismos faltantes para cada jaula para cada uno de los tratamientos por semana.

Tabla 14.- Mortalidad promedio de Penaeus vannamei registrada por tratamiento en cada semana (%).

DIETAS	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6
0 ppm	1.52	1.52	9.86	4.55	10.61	6.07
DE	3.71	2.34	7.82	4.97	7.95	3.71
50 ppm	2.28	2.28	6.83	3.42	13.65	7.96
DE	4.54	2.62	5.86	2.27	6.42	9.36
80 ppm	4.55	6.83	2.28	3.42	12.51	10.24
DE	5.24	5.86	2.62	2.27	11.36	5.72
100 ppm	3.41	5.69	3.41	7.96	4.55	9.1
DE	6.81	8.60	6.81	7.76	6.42	8.29
200 ppm	0	6.82	2.28	6.83	6.83	11.37
DE	0	9.63	3.21	3.21	3.21	3.21

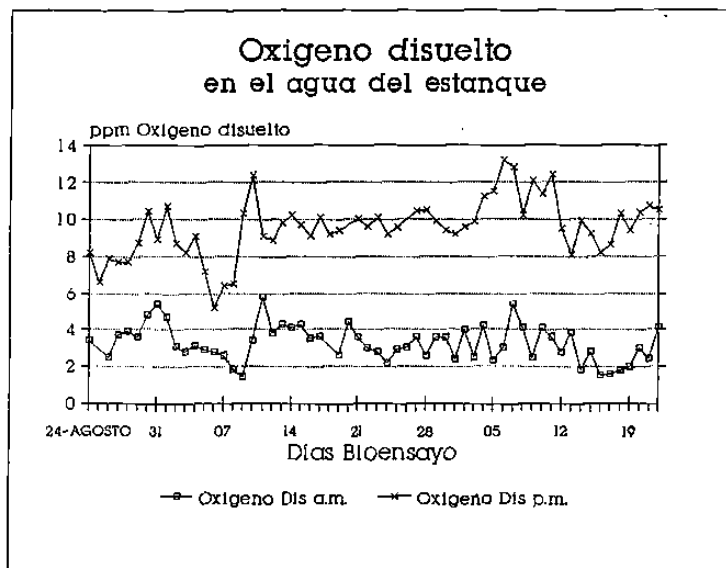
De los datos obtenidos de la tabla 14, podemos mencionar que la semana 5 fué en donde se presentó mayor mortalidad, para todos los tratamientos; presentando los tratamientos control, 50 y 80 ppm los valores más altos.

PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL ESTANQUE EN EXPERIMENTACION

OXIGENO DISUELTO:

Durante el bioensayo nutricional los valores registrados de oxígeno disuelto en el agua del estanque por la mañana variaron en un rango de 2 a 6 ppm, pero en las semanas 4 y 5 los valores variaron de 2 ppm a 3 ppm, siendo el valor mínimo recomendable para el cultivo de camarón de 3 ppm (gráfica 8). Los valores registrados en la tarde fueron de 6 a 13.5 ppm.

Gráfica 8.-



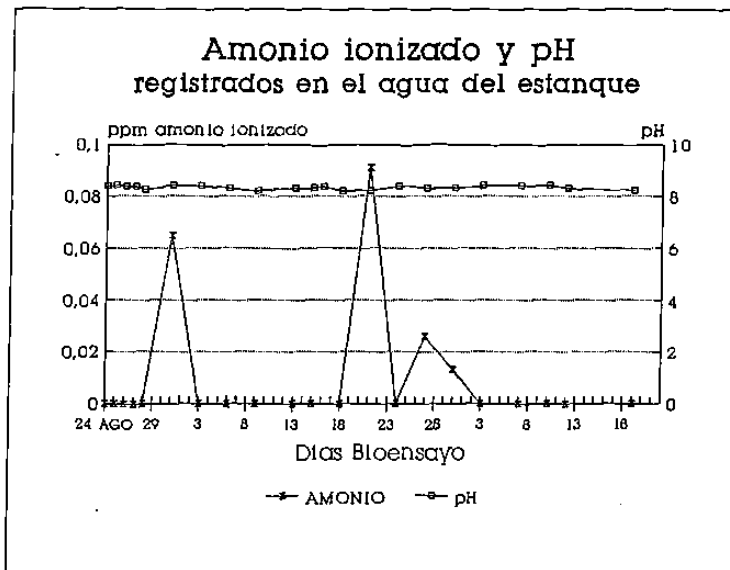
AMONIO IONIZADO:

En ocasiones la tasa de amonio ionizado alcanza valores de 0.065, 0.09 y 0.03 ppm sin peligro para los camarones; tomando en cuenta el pH, la salinidad y la temperatura, éstos valores son inferiores a 0.1 ppm de amonio no ionizado (nivel tóxico para camarón) (gráfica 9).

pH:

El pH registrado durante el bioensayo nutricional varió de 8 a 8.2, siendo éstos valores bajos si se compara con la lectura de Secchi registrada (gráfica 9).

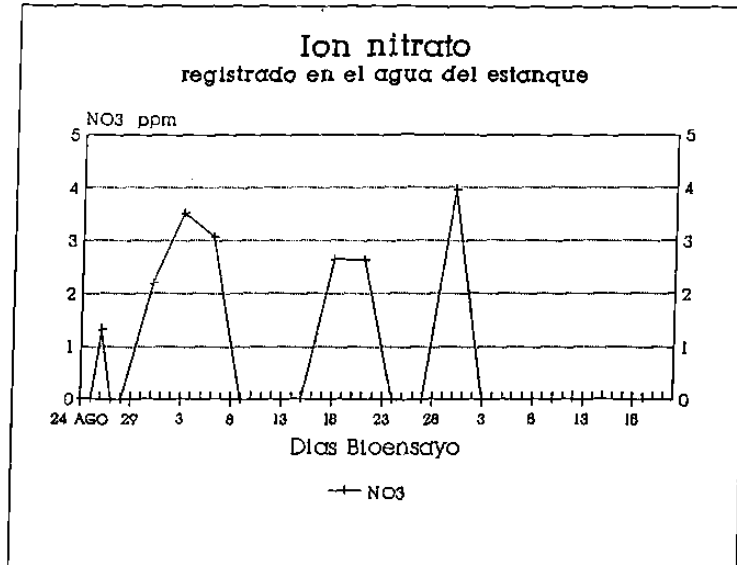
Gráfica 9.-



NITRITOS Y NITRATOS:

El registro de los iones nitritos y nitratos se llevó a cabo cada 3 días. No se obtuvo lectura para nitritos por lo que no se presentan en la gráfica. Los valores del ión nitrato variaron de 0 a 4 ppm, presentando el valor más alto en la semana 4 de experimentación (gráfica 10).

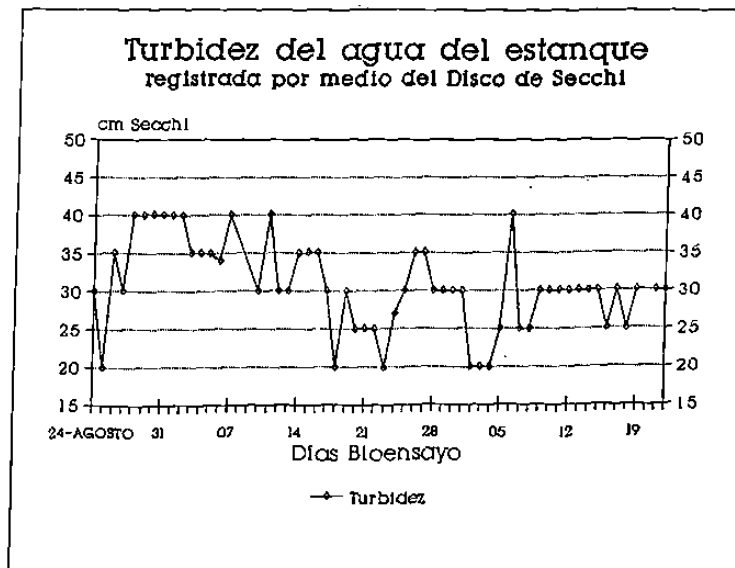
Gráfica 10.-



TURBIDEZ:

Los valores de turbidez registrados con el disco Secchi variaron en un rango de 20 a 40 cm, considerados rangos normales para el cultivo de camarón en estanques (gráfica 11).

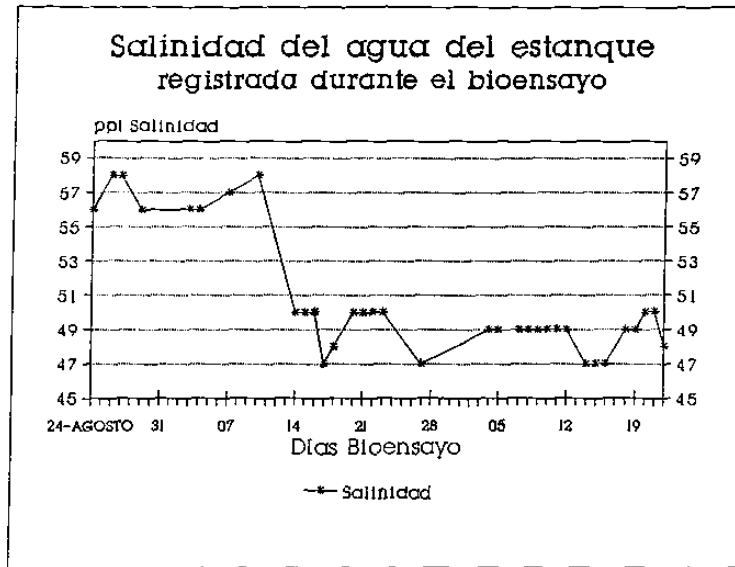
Gráfica 11.-



SALINIDAD:

Los valores de salinidad registrada durante el bioensayo variaron de 47 a 58 ppt. Siendo registrados los valores más altos en las dos primeras semanas de experimentación, posteriormente se presentó una estabilización en cuanto a los valores de salinidad hacia las dos últimas semanas del experimento (49 ppt) (gráfica 12).

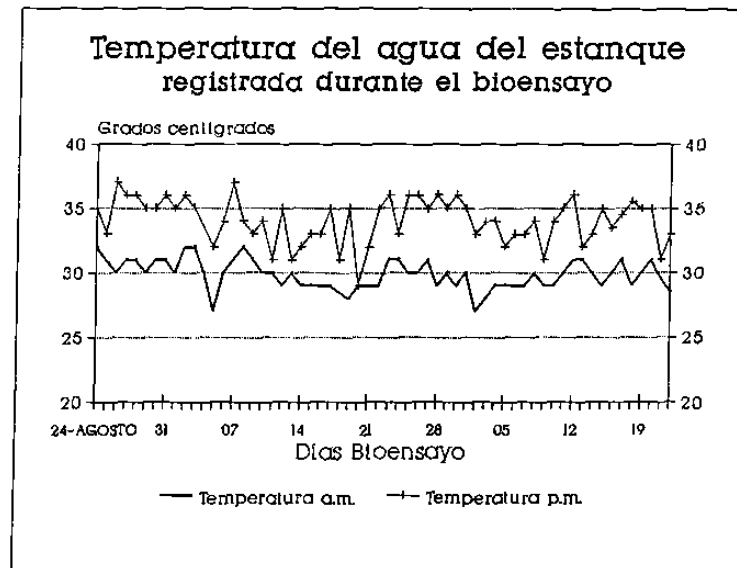
Gráfica 12.-



TEMPERATURA:

Las temperaturas registradas durante el experimento variaron de 26 a 37°C. La temperatura óptima reportada del agua del estanque es de 25 a 30°C, siendo las temperaturas registradas en la tarde generalmente superiores a las óptimas, lo que pudo contribuir a incrementar el estrés de los animales en experimentación.

Gráfica 13.-



DISCUSION

COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Aunque las dietas experimentales fueron formuladas con el fin de ser isoproteicas (35% base húmeda), la diferencia en los porcentajes de proteína encontrados (máximo 3%) no corresponde a lo esperado, posiblemente debido a la falta de precisión en el pesado de los ingredientes a escala comercial y a la variabilidad del análisis bromatológico (coeficiente de variación del orden del 10%). Los niveles de lípidos encontrados en las dietas variaron en 1.2% probablemente por las mismas razones.

Si consideramos cuales dietas fueron afectadas por esas variaciones aleatorias en nutrientes, constatamos (Tabla 5) que las dietas con 80, 100 y 200 ppm fueron favorecidas simultáneamente en proteína (+2%) y en lípidos (+1%) resultando en un contenido más alto en energía. Eso podría ser una de las razones de la ligera ventaja en el crecimiento para esas 3 dietas; sin embargo, se trabajó con niveles de nutrientes para cubrir los requerimientos (Akiyama *et al.*, 1991) con cierto margen de seguridad: los valores protéicos obtenidos en base húmeda 32.24 a 35.35 % en las dietas experimentales se encuentran dentro del rango propuesto por New (1976), aunque, Convin (1976) y Colvin y Brand (1977) consideran que los niveles óptimos de proteína varían desde 25 a 40% para *Penaeus vannamei* y el porcentaje de proteína que recomiendan es del 30% (Smith *et al.*, 1985 en Akiyama, *et al.* 1991). Los niveles de lípidos encontrados en nuestra dieta variaron de 5.59 a 6.86%, éstos se encuentran dentro de los niveles recomendados por Akiyama *et al.* (1991), de 6 a 7.5% para camarón.

En nuestra dieta encontramos de 36.99 a 41.37% de ELN, esas diferencias son ligadas al aumento en proteína y lípidos en las dietas 80, 100 y 200 ppm. Cabe señalar que la adición creciente de Stafac 25 no es la causa del cambio de composición bromatológica de la dieta por dos razones: 1) por los bajos niveles de inclusión (máximo 0.8% de la fórmula). 2) porque se adicionó en sustitución de harina de trigo, que es exactamente el mismo vehículo de este aditivo.

Por lo tanto, podemos considerar que las ligeras diferencias en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de las dietas experimentales no afectaron el resultado del experimento

El aglutinante utilizado en alimentos para especies de producción acuícola es de naturaleza diferente a los utilizados en alimentos para aves, cerdos o ruminantes; esto se debe a que el alimento de especies acuícolas debe permanecer cierto tiempo en el agua sin perder su integridad ni permitir la pérdida de los nutrientes por el proceso de lixiviación y por el manipuleo de los alimentos por el camarón. El aglutinante utilizado en las dietas experimentales fué a base

urea formaldehído, tipo Basfin; este polimeriza por efecto de humedad y temperatura el radical amino de la urea pero también puede polimerizar con los radicales amino de otros componentes de la dieta disminuyendo su solubilidad, por lo que puede bajar la digestibilidad de los nutrientes. Los factores M₁ y S₁ de la virginiamicina no tienen radicales amino libres por lo que se desconoce el tipo de reacción química que pueda ocurrir entre la virginiamicina y el aglutinante.

ANALISIS DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA EN PELLETS Y CAMARON

De acuerdo con los antecedentes, se esperaba encontrar una inactivación únicamente del orden del 8-12% en los alimentos por efecto del peletizado (Norden, 1991a); de tal manera que nuestras dietas deberían tener una actividad residual, al menos después del peletizado, de 40, 70, 90 y 180 ppm respectivamente. Sin embargo, la pérdida importante y variable encontrada con el método microbiológico así como la ausencia total de virginiamicina reportada por medio de un método químico: cromatografía en capa fina (técnica especializada de identificación del antibiótico) son resultados contradictorios que llevan a poner en cuestión el mezclado, la metodología de los análisis y la estabilidad del antibiótico en los alimentos peletizados.

Si el problema hubiera sido la falta de homogeneidad del aditivo en el alimento por el proceso del mezclado, la actividad antibiótica encontrada debería ser superior, menor o igual a la esperada. Sin embargo, la actividad encontrada siempre fue menor a la esperada, por lo que esta hipótesis puede ser eliminada.

Metodología del análisis: precisión y extracción. Según Ralph Fell de A.L. Laboratories (com. pers, 1994), los métodos microbiológicos pueden tener un porcentaje de variación del orden del 30% y seguir considerándose dentro de los valores normales de veracidad, lo que lleva a una falta de exactitud en determinaciones realizadas por este método. Salvatore (1993) menciona que casi todos los sistemas de difusión carecen de especificidad y requieren de confirmación por sistemas especiales para la apropiada identificación de antibióticos individuales. Estos métodos asumen que la dosis del antibiótico es proporcional al tamaño de la zona de inhibición, por lo que la respuesta del organismo es primariamente responsable de la precisión y estas determinaciones son efectivas midiendo sólo en especies biológicamente activas. En nuestro caso no hay duda sobre la constancia de la sensibilidad de la cepa *M. luteus*, la cual fue comprobada en cada caja gracias al testigo positivo de concentración 1 ppm.

Siguiendo el método que marca SmithKline & French, suponíamos una extracción del 100% del antibiótico a partir de las dietas experimentales. Tomando en consideración los porcentajes la pérdida de actividad de la virginiamicina en los pellets recién fabricados, almacenados y lixiviados, vemos que existe un incremento en el porcentaje de pérdida conforme aumenta la dosis añadida en las dietas (sin tomar en cuenta a la dieta 100 ppm, ya que los valores de esta dieta presentan una gran desviación con respecto a los resultados de todas las otras dietas), lo que hace suponer que la extracción de la virginiamicina de los pellets, etapa previa al empapado de los discos del antibiograma, no fue completa.

Varias etapas del proceso de extracción presentan riesgos de pérdida de la virginiamicina: 1) Etapa de contacto con los solventes: una cantidad excesiva de material puede saturar los solventes e impedir la extracción completa de la virginiamicina presente en la muestra. La saturación de los solventes pareció particularmente posible con la muestra de 10 g del alimento 200 ppm. La extracción completa de la virginiamicina de esta muestra debería conducir a una concentración de 4 ppm en la solución depositada sobre los discos, con la necesidad de extrapolar la curva estándar hasta un diámetro de inhibición cercano a 30 mm; sin embargo, se obtuvieron diámetros cercanos a 18 mm, llegando a la conclusión de que se había perdido la mitad del antibiótico durante la extracción. 2) El pH se mantuvo ácido con las muestras de 10 g de alimento por lo que este factor parece no haber influido en la eficiencia de la extracción. 3) Las grasas animales u otros componentes de las dietas como el aglutinante en las dietas pudieron secuestrar la virginiamicina, disminuyendo la eficiencia de la extracción. 4) Efecto "matriz": es probable que se haya extraído no solo la virginiamicina de las muestras sino también otras sustancias presentes en la muestra, llamadas "matriz", las cuales pueden limitar la difusión de la virginiamicina en el agar por efecto de obstrucción de los poros. La matriz del alimento seguramente es más compleja que la de la harina de trigo presente en el STAFAC, lo que conlleva a una posible reducción del diámetro de inhibición, que no se tomó en cuenta al usar una curva estándar establecida con cantidades crecientes de STAFAC 25; sin embargo, este efecto debió de actuar de la misma manera con la dieta 50 ppm que con las otras dietas; por lo tanto, se puede considerar que el efecto "matriz" no fue importante. 5) Etapa de filtración: el método original menciona una etapa de centrifugación antes de diluir una alícuota del extracto y de depositar en discos de papel; sin embargo, en lugar de centrifugar se dejó decantar y se filtró el sobrenadante sobre un filtro de papel el cual pudo haber absorbido parte de la virginiamicina. 6) Conservación del extracto: desde la extracción hasta el depósito en el disco pudieron haber transcurrido varias horas a temperatura ambiente y en presencia de luz, posibles responsables de la inactivación de la virginiamicina en ciertos extractos.

El problema de extracción se reconfirma con los resultados de

cuantificación de virginiamicina, obtenidos por un laboratorio particular de control analítico, mediante cromatografía de capa delgada los cuales reportan que no se detectó la virginiamicina en los mismos alimentos, a partir de extractos con metanol. Esto hace suponer que el método de extracción del antibiótico para su posterior análisis con cromatografía de capa delgada tampoco fue el adecuado. Los resultados del análisis microbiológico demuestran que si existió virginiamicina en las dietas experimentales, ya que se obtuvo diámetro de inhibición para las muestras analizadas de pellets de la diferentes dietas.

Por otro lado, al no obtenerse diámetros de inhibición para las muestras de tejido abdominal de camarón extraídos de la misma forma, se comprueba que los reactivos de extracción por si solos no tienen un efecto antimicrobiano que fuera la causa de los diámetros de inhibición encontrados en los alimentos.

Otra evidencia de la deficiente extracción la constituye las 3 extracciones repetidas de la dieta 100 ppm recién pelletizada. Cuando una de las extracciones dió 66 ppm, para los otros dos extractos se registró un diámetro de inhibición inferior a 10 mm, dando como resultado un valor cercano a 0 ppm (Tabla 8, valores negativos).

Del examen del método de extracción, resalta que fenómenos tales como la saturación de los solventes, el secuestro de la virginiamicina por las grasas de la dieta, y la filtración del extracto sobre el papel, son factores que alteraron la cuantificación de la virginiamicina en el alimento. Siendo la hipótesis del secuestro de la molécula de virginiamicina por algún ingrediente de la dieta la que explicaría los resultados obtenidos tanto microbiológica como químicamente.

Para fines de las interpretaciones del bioensayo no podemos asegurar el nivel de virginiamicina residual que realmente recibieron los camarones en el alimento. Sin embargo, los resultados del bioensayo representan la respuesta al efecto del alimento con virginiamicina fabricado comercialmente bajo condiciones de cultivo comercial.

EVALUACION BIOLOGICA EN GRANJA

Considerando la forma de acción de la virginiamicina sobre la flora bacteriana del tracto digestivo, se hizo necesario evaluar este producto en granja y no en laboratorio, por la relación de la flora microbiana en el medio ambiente.

Se propuso un bioensayo en jaulas y no estanques porque existen variaciones muy importantes de las condiciones físico-químicas de un estanque a otro, aún dentro de una misma granja. Además, el costo del bioensayo es más económico y se puede considerar como representativo de la producción a escala comercial.

Los resultados obtenidos del bioensayo nutricional no muestran diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al peso final, tasa de crecimiento, TCA aparente y mortalidad. La ausencia de resultados positivos de la virginiamicina en este experimento pudo deberse a razones ligadas al mecanismo de acción del antibiótico utilizado en los camarones, a la necesidad de un diseño experimental más robusto y a las condiciones ambientales en el estanque durante el desarrollo del experimento.

Cabe resaltar que estos resultados pudieron deberse a que el efecto positivo del STAFAC 25 MR es disminuido o nulificado debido al alto % de grasa en las dietas: retomando los resultados obtenidos del análisis proximal de las dietas experimentales elaboradas, tenemos que, el contenido de grasas en las mismas varió de 5.59 a 6.86%, siendo las fuentes principales de lípidos la lecitina de soya y el aceite de pescado. Existen recientes publicaciones en donde se ha demostrado que el efecto positivo en crecimiento del STAFAC en raciones para cerdos se reduce o es anulado cuando se agrega más del 3% de grasa animal en el alimento (A.L. Laboratories, 1994). Debido a esto, podríamos pensar que en el presente experimento la nula diferencia significativa en el porcentaje de crecimiento, ganancia de peso, TCA y mortalidad con respecto al control pudo deberse al porcentaje de grasa añadida a las dietas. También este porcentaje de grasa en las dietas experimentales pudo interferir en la extracción de virginiamicina de las dietas, aumentando de esta manera el error en la determinación, así como al tipo de aglutinante empleado que no permitió la liberación de los nutrientes y/o atractantes.

Por otro lado, si la extracción de la virginiamicina debe hacerse a un pH ácido, es posible que este antibiótico no se solubilice en el agua del estanque de cultivo de camarón, debido a que el pH es de 8 y el agua marina actúa como buffer hacia el rango de la alcalinidad. Así mismo, este antibiótico podría no ser soluble y activo en el tracto digestivo del camarón peneido por tener este un pH básico en todo el recorrido del alimento por su tracto digestivo.

Además, el reemplazar a los organismos muertos o faltantes en cada jaula, cada semana, con organismos de peso similar del estanque no sometidos a las dietas experimentales, hizo que el tiempo de acción de la virginiamicina sobre algunos camarones fuera reducido. Cabe resaltar que el pesar a los camarones cada semana es un factor de estrés para los organismos en experimentación.

Todos los anteriores factores posiblemente contribuyeron a que no se presentaran diferencias significativas entre los tratamientos y el control. La funcionalidad de la virginiamicina pudo haber sido afectada por el alto porcentaje y el tipo de grasas en la fórmula, así como, el pH del estanque y del tubo digestivo del camarón. Otras limitantes para la sensibilidad del experimento pudieron ser: el diseño experimental (número limitado de animales y jaulas), el tiempo reducido de acción de la virginiamicina, así como el estrés de manejo y ambiental.

PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL ESTANQUE EN EXPERIMENTACION.

La calidad del agua del estanque a lo largo del experimento no fue siempre la más adecuada para el óptimo crecimiento de los camarones, problemas de oxígeno causado por la falta de bombeo o recambio de agua, así como, una elevada salinidad fueron las principales dificultades presentadas en el experimento. Sin embargo, estas variables son propias de cualquier granja y reflejan condiciones de aplicación reales.

OXIGENO

El extremo agotamiento de oxígeno en un estanque de cultivo muchas veces resulta en grandes mortalidades de camarón. Cuando las concentraciones de oxígeno disuelto caen por debajo de 3 ppm se puede observar a los camarones nadando en la superficie (Villalón, 1991) tal y como ocurrió en la semana 5 de experimentación en donde fueron más frecuentes los niveles de oxígeno por debajo de 3 ppm, lo que lleva a los camarones a un estrés muy grande, provocando así una disminución de crecimiento, alta TCA aparente y una marcada mortalidad. El oxígeno fue un factor muy importante que contribuyó al estrés de los organismos en experimentación. El número de camarones muertos en la orilla es generalmente una fracción muy pequeña de la probable mortalidad en el fondo del estanque.

AMONIO

Los valores de amonio ionizado registrados no sobrepasan los límites de tolerancia reportados para camarón (0.1 ppm), siendo estos valores considerados como niveles frecuentemente encontrados en estanque de cultivo de camarón.

pH

La oscilación del pH del agua está directamente asociada con la actividad fotosintética de la población de fitoplancton del estanque. El pH del estanque sólo fué registrado por la tarde, por lo que no se puede saber si es que hubo una oscilación durante el día. A pesar de esto, el pH del estanque se mantuvo más o menos constante de un día para otro (pH = 8 a 8.2) siendo estos valores bajos si se comparan con la lectura de turbidez registrada en el estanque. Villalón (1991) considera que el pH típico del agua salobre oscila entre 7.4 y 8.5 en la mañana como en la tarde respectivamente, por lo que el pH registrado concuerda con el rango típico de un estanque de cultivo de camarón.

SECCHI

La turbidez es generalmente asociada a la abundancia de fitoplancton en la columna de agua. Los valores de turbidez registrados variaron en un rango de 20 a 40 cm considerados como rangos normales para estanque de cultivo de camarón, sin embargo, existen diversas publicaciones en donde marcan que el valor de turbidez para un estanque de camarón debe ser entre 30 y 60 cm.

SALINIDAD

El rango de salinidad óptima reportada para el cultivo de camarón va de 5 a 45 ppt. Como se observa en la gráfica 12, durante las 3 primeras semanas del bioensayo se registraron valores de 56 a 58 ppt, en las 4 últimas semanas se presentó una estabilización de la salinidad a 49 ppt, siendo estos valores superiores a los valores óptimos reportados para camarón. Por lo que los altos valores de salinidad registrados pudieron contribuir a aumentar el estrés de los organismos.

TEMPERATURA

Otro factor importante que pudo contribuir a la mala calidad del agua del estanque en experimentación y al estrés de los organismos fueron las altas temperaturas del agua registradas durante el bioensayo (26 a 37° C), siendo las temperaturas óptimas reportadas para el cultivo de camarón de 25 a 30° C.

Los parámetros físico-químicos de la calidad del agua del estanque en experimentación presentados a lo largo del bioensayo probablemente tuvieron una influencia negativa en cuanto al % de crecimiento, TCA aparente y a la mortalidad registrada, sobre todo en la semana 5 del experimento, limitando el crecimiento, lo cual debió mejorar la expresión del potencial de la virginiamicina.

Por los resultados obtenidos, el presente estudio no proporcionó evidencia

de mejoría en cuanto a la utilización de dietas suplementadas con virginiamicina. Sin embargo, el desarrollo de los datos presentados y el análisis de las dificultades enfrentadas pueden ayudar a los productores de camarón a estimar las consecuencias económicas de los tratamientos bajo una situación de producción específica.

En la realización de ensayos cualitativos de los antibióticos utilizados en alimentos balanceados para animales se deberá poner especial atención a su funcionalidad en el ambiente de los estanques de producción acuícola y a la interacción con otros ingredientes de la dieta. Ya que generalmente estos productos son añadidos en pequeñas dosis, hay que cerciorarse (utilizando métodos de marcado) que los aditivos sean distribuidos homogéneamente en toda la mezcla.

Bajo las condiciones de fabricación de alimento y de cultivo de camarón no funcionó la virginiamicina. Así que, al estado actual de los conocimientos, el uso de virginiamicina a nivel comercial no puede ser recomendado.

CONCLUSIONES

Se demostró la ausencia de diferencias significativas en el crecimiento y sobrevivencia del camarón alimentado con dietas procesadas comercialmente que contenían un nivel estimado de virginiamicina activa de 50 (dieta 50), 44.6 (dieta 80), 66.2 (dieta 100) y 98 ppm (dieta 200 ppm).

Los bajos niveles obtenidos por análisis de virginiamicina en las dietas experimentales se debieron probablemente a:

- 1) La aplicación del método para la valoración de virginiamicina fué deficiente para la completa extracción del antibiótico de las dietas.
- 2) El antibiótico pudo ser atrapado por las grasas presentes en la fórmula y no permitir así la extracción del 100 % de la virginiamicina en las dietas.
- 3) Cierta grado de inactivación de la virginiamicina durante el peletizado

El almacenamiento y la lixiviación son factores que provocaron una disminución adicional de la actividad antibiótica en las dietas consumidas por el camarón.

La virginiamicina no deja residuos en el tejido abdominal del camarón, por lo menos no fueron detectables con el método microbiológico utilizado.

Por lo tanto bajo las condiciones de estudio y con los niveles utilizados, no fué posible concluir sobre el efecto positivo o negativo de la virginiamicina como promotor de crecimiento en camarón Penaeus vannamei.

RECOMENDACIONES

Nos permitimos hacer las siguientes recomendaciones para posteriores investigaciones y para la aplicación comercial de aditivos alimenticios en nutrición acuícola:

- Se confirma que es de suma importancia verificar que el aditivo a emplear no sea desactivado por el proceso de peletizado (Protegidos).
- Es esencial conocer que el antibiótico utilizado no sea atrapado por algún componente de la dieta formulada.
- Es necesario verificar que el proceso de mezclado sea el adecuado, ya que de una buena mezcla va a depender la reproductibilidad de los resultados.
- Es necesario verificar la estabilidad de un aditivo en condiciones de cultivo de especies acuáticas (proceso de lixiviación).
- Se recomienda estudiar el comportamiento químico y la solubilidad de la virginiamicina en dietas formuladas y en medio marino antes de hacer un bioensayo nutricional para especies acuáticas.
- En el caso de la virginiamicina sería interesante realizar dos métodos de determinación:
 - microbiológico (que mide la actividad antibiótica)
 - colorimétrico (que determina la presencia de la molécula activa).
- Para la realización del método microbiológico es conveniente establecer la curva estandar incluyendo el STAFAC en una mezcla completa sin peletizar, para poder tomar en cuenta el "efecto matriz" sobre el agar.
- La cantidad de virginiamicina a extraer tiene que ser constante para las diferentes muestras. Para evitar problemas de saturación en los solventes

LITERATURA CITADA

- Akiyama, D.M., W. Dominy y A.L. Lawrence. 1991. Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry: revised. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia. September 19-25. American Soybean Association. 80-98 pp.
- A.L. Laboratories, Inc. 1994. Technical Information. Seminario técnico de información. Marzo 1994. Mty., Nuevo León. México. 300 p.
- A.O.A.C. 1990. Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth edition. Washington, D.C. U.S.A. 30-120 pp.
- Avila, E.G.; A.S. Shimada y G.L.L. Lamas. 1990. Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Ed. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C. Primera edición. México, D.F. 253 p.
- Brown, J.H. y I. Higuera-Ciápara 1991. Antibiotic Residues in Farmed Shrimp. A developing problem. In: Proceedings of the International Meeting of the International des Epizooties. Paris. France. March.
- Buresh, R.E., R.H. Harms y R.D. Miles. 1986. A Differential Response in Turkey Poults to Various Antibiotics in Diets Designed to be Deficient or Adequate in Certain Essential Nutrients. Poultry Science 65:2314-2317.
- Buresh, R.E., R.H. Harms y R.D. Miles. s/año. Energy Utilization by Turkey Poults as Affected by Four Antibiotics. SPSS Abstracts. 8 pp.
- Castro, C. E. sin/año. Evaluación del Flavofosfolipol como promotor de crecimiento para salmónidos.
- Colvin, L.B. y C.W. Brand. 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment systems. Proceedings World Mariculture Society 8. 821-840.
- Combs, G.F. y E.H. Bossard. 1963. Comparison of Growth Response of Chicks to Virginiamycin and Other Antibiotics. Poultry Science 42:681-685.
- Convin, P.M. 1976. Nutritional studies on penaeid prawn: protein requirements in compound diets for juvenile Penaeus indicus. Aquaculture 7:315-326.
- Cowey, C.B. y J.R. Sargent. 1972. Fish nutrition. Advances in Marine Biology 10: 77-81.

- Cravedi, J.P., 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.
- Cravedi, J.P., M. Baradat y G. Choubert. 1991. Digestibility tissue distribution and depletion kinetics of [¹⁴C]-Virginiamycin and related factors feed to rainbow trout. *Aquaculture* 97:73-83.
- Cuarón-Ibarguengoytia, J.A. 1990. Agentes Antimicrobianos y drogas afines. En: Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C. México, D.F.165-189 pp.
- Cupo, M.A. y J.A. Rogers.s/año. Efficacy of Virginiamycin in Combination with Salinomycin and Roxarsone on Growth and Performance of Broilers. Abstracts of Papers.
- Dafwang, I.I., M.E. Cook, M.L. Sunde y H.R. Bird. 1985. Bursal, Intestinal, and Spleen Weights and Antibody Response of Chicks Fed Subtherapeutic Levels of Dietary Antibiotics. *Poultry Science* 64:634-639.
- Decuypere, J.A., N.A. Dierick, I. J. Vervaeke y H.K. Henderikx. 1991. Influence of Virginiamycin on the digestive physiology in precaecal re-entrant cannulated pigs. *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin 41(4), 373-393 pp.
- Eyssen, H., V. De Prins y P. De Somer. 1962. The Growth-Promoting Action of Virginiamycin and its Influence on the Crop Flora in Chickens. *Poultry Sci.* 41:227-233.
- Food and Drug Administration. 1992. Approved drus for fish aquaculture. FDA. Center for Veterinary Medicine Communications and Education Branch. HFV-12.
- Gaskin, J. y J. Latchford. 1993. How Oxytetracycline affects prawns. *Fish Farmer. International File*. 7. 1 Jan/Feb.
- George, B.A., C.L. Quarles y D.J. Fagerberg. 1982. Virginiamycin Effects on Controlling Necrotic Enteritis Infection in Chickens. *Poultry Science* 61:447-450.
- Gottschall, D.W., C. Gombatz y R. Wang. 1987. Analysis of tissue residues and comparative metabolism of Virginiamycin in rats, turkeys and cattle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35:900-904.

- Green, J.D. 1993. Daily Lysine Intake Appears to Affect Antibiotic Response. *Feedstuffs*. January. 65.4. 14-16pp.
- Hardy, J. 1992. Mixit-2+ and Mixit-3+ Reference Manual. Least cost ration balancing programs. Mixit-2+ version 3.0, Automixit version 2.0, Parametrics version 1.1. Agricultural software consultants, Inc. Kingsville, Texas, U.S.A. 336 p.
- Henry, P.R., C.B. Ammerman, D.R. Campbell y R.D. Miles. 1987. Effect of Antibiotics on Tissue Trace Mineral Concentration and Intestinal Tract Weight of Broiler Chicks. *Poultry Science* 66:1014-1018.
- Higuera-Ciápara, I., J.H. Brown y K. Jauncey. 1991. Effect of oxytetracycline and sulphamethazine on weight gain and survival of Penaeus monodon under stress. Proceedings of the International meeting of the Office International des Epizooties. Paris, France. March.
- Higuera-Ciápara, I., J.M. Nieblas y L. Noriega-Orozco. 1992. Problemática del uso de los antibióticos en el cultivo del camarón. Memorias de la Reunión sobre Nutrición y Biopatología Acuícola. Hermosillo, Son, 18-24.
- Izat, A.L., R.A. Thomas y M.H. Adams. 1989. Effects of Dietary Antibiotic Treatment on Yield of Commercial Broilers. *Marketing and Products*. *Poultry Science* 68:651-655.
- Jukes, H.G., D.C. Hill y H.D. Branion. 1956. Effect of Feeding Antibiotics on the Intestinal Tract of the Chick. *Poultry Sci.* 35:716-722.
- Jukes, T. H. 1955. Antibiotics in Nutrition. *Antibiotics Monographs*. 4. Medical Encyclopedia, Inc. 57-79 pp.
- Keshavarz, K. y McDougald L.R. 1982. Anticoccidial Drugs: Growth and Performance Depressing Effects in Young Chickens. *Poultry Science* 61:699-705.
- Khajareern, J.M., S. Jhajarern, D. Bunsidhi y S. Yoøseranee. 1983. Los efectos promotores del crecimiento del Bayo-n-ox, la Lincomicina y el Acido arsanílico en pollos de engorda. *Thai. J. Agric. Sci.* 16:95-106.
- Lovell, R.T. 1991. Foods from Aquaculture. *Food Technology*. 45 (9): 87-92. Scientific Status Summary.

- March, B.E., R. Soong y C. MacMillan. 1978. Growth Rate, Feed Conversion and Dietary Metabolizable Energy in Response to Virginiamycin Supplementation of Different Diets. *Poultry Sci.* 57:1346-1350.
- Mameesh, M.S., B. Sass y B. Connor Johnson. 1959. The Assessment of the Antibiotic Growth Response in the Chick. *Poultry Science.* 512-515 pp.
- Martínez-Vega J. A. 1991. Evaluación de dos subproductos de camarón en forma de Harina como fuente proteica en dietas balanceadas para Penaeus vannamei. Tesis Profesional. Biología. Universidad Autónoma de Nuevo León. (Inédita).
- Maynard, L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz y R.G. Warner. 1983. Antibióticos, hormonas y otras sustancias estimulantes del crecimiento. Capítulo 12. En: *Nutrición Animal.* (Cuarta edición). McGraw-Hill. México. 381-397 pp.
- McGinnis, J.; L.H. Merrill; R.E. Fry y L.S. Jensen. 1958. Use-History of Antibiotics as Related to their Efficacy in Promoting Growth of Turkeys. *Poultry Sci.* 37:810-813.
- Meyers, S.P. y Z.P. Zein-Eldin. (s/año). Binders and pellet stability in development of crustacean diets. World Mariculture Society Workshop.
- Miles, R.D., D.M. Janky y R.H. Harms. 1984. Virginiamycin and Broiler Performance. *Poultry Science* 63:1218-1221.
- Miles, R.D., Janky, D.M. y Harms, R.H. 1987. Enhancement of Pigmentation in Broilers Fed Milo Based Diets Containing Virginiamycin. Florida Agricultural Experiment Stations. Nutrition Reports International. Journal Series No. 7886. July. 36. 1: 169-173.
- Milhaud, G. 1977. Les Antibiotiques. Enseignement de pharmacie & toxicologie. Ecole National Vétérinaire D'Alfort. France. 74 p.
- Moats, W.A. y L. Leskinen. 1988. Determination of Virginiamycin residues in swine tissue using High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Agricultural & Food Chemistry.* Nov/Dec. 1297-1300 pp.
- Molinero, A.A., D.G.I. Kingston y J.W. Reed. 1989. Biosynthesis of antibiotics of the Virginiamycin family, 6. Biosynthesis of Virginiamycin S₁. *Journal of Natural Products.* 52, 1. 99-108 pp. Jan-Feb.

- Nelson, F.E., L.S. Jensen y J. McGinnis. 1963. Effect of Antibiotics on Metabolizable Energy of the Diet. Studies on the Stimulation of Growth by Dietary Antibiotics. *Poultry Sci.* 42:906-909.
- New, M.B. 1976. A review of shrimp and prawn nutrition. *Proceedings World Mariculture Society* 7: 277-287.
- Norden de México. 1982. Método Microbiológico para valoración de virginiamicina en STAFAC 1000. División Veterinaria de SmithKline & French, S.A. 6 p. (Inédito).
- Norden de México. 1991a. Virginiamycin in Aquaculture. División Veterinaria de SmithKline & French, S.A. (Inédito).
- Norden de México. 1991b. Información Técnica de Virginiamicina. División Veterinaria de SmithKline & French, S.A. (Inédito). 35 p.
- Ofori B., K. 1988. Effects of Bacitracin Methylene Disalicylate, Bacitracin Zinc, and Virginiamycin in Combination with New Coccidiostats on the Performance of Commercial Broiler Chickens. Master of Science Thesis. Poultry Science. Texas A & M University. 69 p.
- Salmon, R.E. y V.I. Stevens. 1990a. Research Note: Virginiamycin and Monensin, alone or in Combination in Turkey Broiler Diets. *Poultry Science* 69:1016-1019.
- Salmon, R.E. y V.I. Stevens. 1990b. Response of Large White Turkeys to Virginiamycin from Day-Old to Slaughter. *Poultry Science* 69:1383-1387.
- Salvatore, M.J. y S. E. Katz. 1993. Unified Procedure for the Determination of Antibiotics in Animal Feeds. *Journal of AOAC International*. 76, 3. 514-525 pp.
- Stutz, M.W. y G.C. Lawton. 1984. Effects of Diet and Antimicrobials on Growth, Feed Efficiency, Intestinal Clostridium perfringens, and Ileal Weight of Broiler Chicks. *Poultry Science* 63:2036-2042.
- Tacon, A.G.J. 1987a. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual. 1.- The essential nutrients. A report prepared for the FAO trust fund GCP/RLA/075/ITA project support to the regional aquaculture activities for Latin America and the Caribbean. Food and Agriculture Organization of the United States. Brasilia, Brazil. 117 pp.

- Tacon, A. 1987b. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual. 2.- Nutrient sources and composition. A report prepared for the FAO trust fund GCP/RLA/075/ITA project support to the regional aquaculture activities for Latin America and the Caribbean. Food and Agriculture Organization of the United States. Brasilia, Brazil. 119.
- Takahashi, Y., T. Itami, A. Nakagawa., H. Nishimura y T. Abe. 1985. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against Vibriosis in cultured Kuruma prawns Penaeus japonicus BATE. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 51(10), 1639-1643 pp.
- Villalón, J.R. 1991. Practical Manual for Semi-intensive Commercial Production of Marine shrimp. TAMU-SG-91-501. April 1991. Institutional Grant to Texas A & M University Sea Grant Collage Program. Texas, U.S.A. 70-90 pp.
- Visek, W.J. 1978. The Mode of Growth Promotion By Antibiotics¹. Journal of Animal Science. 46, 5: 1447-1469.
- Waibel, P.E., O.J. Abbott, C.A. Bauman y H.R. Bird. 1954. Disappearance of the Growth Response of Chick to Dietary Antibiotics in an "Old Environment". Poultry Science 33:1141-1146.
- Waibel, P.E., J.C. Halvorson, S.L. Noll y S.L. Hoffbeck 1991. Influence of Virginiamycin on Growth and Efficiency of Large White Turkeys¹ . Poultry science 70:837-847.
- Waldroup, P.W., G.K. Spencer, P.E. Waibel, C.L. Quarles y R.J. Grant. 1985. The Use of Bambermycins (Flavomycin) and Halofuginone (Stenorol) in Diets for Growing Turkeys¹. Poultry Science 64:1296-1301.
- Waldroup, P.W. H.M. Hellwig, Z.B. Johnson, R.V. Fell, R.K. Page, W.F. Krueger, B.S. Benibo, R.A. Primo, S.E. Cheng, M.D. Sims, P.E. Culhane y O.W. Charles. 1986. The Response of Broiler Chickens to the Addition of Bacitracin Methylene Disalicylate to Diets Containing Salinomycin and Roxarsone. Poultry Science 65:757-763.
- Wiegers, H.L. y T.W. Sullivan. 1959. Effect of Environment and Dietary Antibiotic Supplements on Growth and Feed Efficiency of Starting Turkeys. Poultry Science. 38, 5. 1259 pp.
- Williams, R.R., T.A. Bell and D.V. Lightner. 1992. Overview of Treatable Diseases of Cultured Shrimp and the Rational Use of Chemotherapeutants. En: Memorias de la Reunión sobre Nutrición y Biopatología Acuícola. Hermosillo, Son.

- Yates, J.D. y Philip J. Schaible. 1962. Virginiamycin as an Antibiotic for Poultry feeds. Nature. April 14, 194. 183-184 pp.
- Zendejas, H.J. (1989a). Guía para el manejo de estanques camaronícolas. Curso de Acuacultura. Purina. Cd. Obregón, Son.
- Zendejas, H.J. (1989b). Guía para realizar un ensayo de alimentación. Curso de Acuacultura. Purina. Cd. Obregón, Son.

APENDICE I

METODOLOGIA FABRICACION DE DIETAS (NUTRIPAC)

ANALISIS
MICROBIOLOGICOS
(Actividad residual
del antibiótico)
(CIAD)

ANALISIS
BROMATOLOGICOS
(UANL)

FABRICACION DE JAULAS Y CHAROLAS (LAS LOMITAS)

BIOENSAYO
28 DIAS
(LAS LOMITAS)

ANALISIS
MICROBIOLOGICOS
EN CAMARON
(Acumulación ó residuos)
(CIAD)

PARAMETROS TCA
BIOLOGICOS % CRECIMIENTO
%SOBREVIVENCIA
(LAS LOMITAS)

BIOENSAYO
42 DIAS
(LAS LOMITAS)

ANALISIS
MICROBIOLOGICOS
(CIAD)

PARAMETROS
BIOLOGICOS
(LAS LOMITAS)

EN:

-ALIMENTO ALMACENADO
-ALIMENTO LIXIVIADO

- TCA
- %CRECIMIENTO
- % SOBREVIVENCIA

EN : -CAMARON

APENDICE II

MAPA DE LA GRANJA "LAS LOMITAS", ESCUINAPA, SIN. MEXICO.



APENDICE III

JAULAS EXPERIMENTALES EN ESTANQUE DE PRODUCCION COMERCIAL.



