



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología

**Incorporación de tres antibióticos en nauplios,
metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana*
(Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria
*Aeromonas hydrophila***

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología

PRESENTA

Germán Castro Mejía

Directores de Tesis
Dra. Thalía Castro Barrera
Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Asesor:
Dr. Horacio Sandoval Trujillo

México, D.F. Septiembre del 2005

CARTA DE ASIGNACION DE JURADO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-Iztapalapa
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Coordinación Maestría en Biología



México, D.F., a 29 de junio del 2005.

Biólogo Germán Castro Mejía
Alumno de la Maestría en Biología
Presente.

Le informo que el Comité Académico de la Maestría en Biología, en su sesión del 28 de junio del 2005, acordó asignarle el siguiente jurado para el Examen de Maestría de su tesis titulada “**Incorporación de tres antibióticos en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*”.**

Firma de aceptación

Dra. Thalía Castro Barrera

Presidente

Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Secretario

Dr. Horacio Sandoval Trujillo

Vocal

Dr. Jorge Manuel Romero Jarero

Vocal

M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza

Vocal

Es requisito que Ud. recabe las firmas de los integrantes del jurado con el objeto de validar el nombramiento.

A nombre del Comité Académico, le deseo el mayor éxito durante esta etapa de su formación académica, esperando a la brevedad posible contar con la solicitud de fecha para su examen de grado.

Sin otro particular le envío un cordial saludo.

Dr. Manuel Castillo Rivera
Coordinador Maestría en Biología.

**El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó**

GERMÁN CASTRO MEJÍA

El día 6 de Septiembre del año de 2005

Comité Tutoral

Tutor: Dra. Thalía Castro Barrera
(Nombre) _____ (Firma)

Tutor: Dr. José Luis Arredondo
Figueroa
(Nombre) _____ (Firma)

Asesor: Dr. Horacio Sandoval Trujillo
(Nombre) _____ (Firma)

Sinodal: Dr. Jorge Manuel Romero
Jarero
(Nombre) _____ (Firma)

Sinodal: M. en C. Mario Alfredo
Fernández Araiza
(Nombre) _____ (Firma)

“La maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT”

La parte experimental de esta maestría se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Area de investigación: Estrategias Biológicas para el Aprovechamiento de los Recursos Naturales Acuáticos. Laboratorios: Producción de Alimento Vivo y Producción Biológica (Departamento de Sistemas Biológicos).

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores: Dra. Thalía Castro Barrera y Dr. José Luis Arredondo Figueroa por su guía, orientación y tiempo que me dedicaron para cumplir mis estudios de maestría y su paciencia en la elaboración de mi documento de tesis. Muchas gracias.

A mi asesor de tesis: Dr. Horacio Sandoval Trujillo, por su guía y dirección en la parte microbiológica y en las técnicas de extracción y determinación de la concentración de los antibióticos en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia*. A Nora, muchas gracias por su constante apoyo en esta parte también.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio de Producción de Alimento vivo de la UAM-Xochimilco: Dra. Thalía Castro Barrera, Biól. Ramón de Lara, M. en C. Jorge Castro Mejía y M. en C. Aída Malpica Sánchez, por su apoyo durante todo este tiempo. Muchas gracias.

A mis padres: Luciralia Mejía González y Juan Castro Barrera, por enseñarme la dedicación al estudio. Por su constante apoyo y oraciones. Muchas gracias.

Al Dr. Jorge M. Romero Jarero y a su esposa la Dra. Pilar Negrete, y al M. en C. Mario A. Fernández Araiza, por sus valiosas observaciones al trabajo escrito y por su apoyo. Muchas gracias.

Al final y la más importante, mi hermosa familia: mi amada esposa Carina Carmona Torres; mis hijos: Roxana Itzel y Germán Esteban Castro Carmona, por su apoyo, comprensión y mucha paciencia en todo el tiempo que duraron mis estudios de maestría, durante todo el proceso de la investigación y elaboración de este documento. Ustedes son los que me impulsan a seguir preparándome. Muchas gracias. Los quiero mucho.

RESUMEN

El gran desarrollo que ha tenido la acuicultura en el mundo en los últimos años, ha inducido el mejoramiento de técnicas de cultivo, con las que se manejan grandes densidades de organismos en espacios reducidos; ésto ha permitido, por un lado, un incremento en los rendimientos de producción en la acuicultura, pero también han aparecido, con mayor frecuencia, enfermedades en los organismos en cultivo, provocando altas mortalidades y pérdidas económicas (Alderman, 1988). El desarrollo de biotecnias que utilizan al alimento vivo como transportador, no solo de sustancias enriquecedoras sino también de sustancias profilácticas y terapéuticas que permitan eliminar o disminuir a los organismos patógenos, ya que el medicamento no se pierde en el agua y se puede suministrar la dosis adecuada que necesita cada especie y en cada fase de su desarrollo.

El crustáceo *Artemia* se ha utilizado como agente transportador de medicamentos, principalmente en su etapa de nauplio, por su fácil disponibilidad, manejo y por su tamaño que sirve como alimento en las primeras etapas de vida de las especies acuícolas en cultivo (Castro *et al.*, 2003). También, el emplear las otras fases de desarrollo: metanauplios, juveniles y adultos de este crustáceo, han permitido tratar enfermedades en organismos juveniles, adultos y aún hasta reproductores, evitando así la transmisión horizontal y vertical del patógeno, y la consecuente pérdida económica por la muerte de los organismos en cultivo causada por enfermedades virales, bacterianas, micóticas y parasitarias.

El desarrollo de esta investigación, permitió determinar la incorporación de antibióticos, en las diferentes fases de desarrollo *Artemia*, nauplio, metanauplio, juvenil y adulto, para inhibir a la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*, la cual aparece en sistemas de cultivo de peces de agua dulce, puede causar daños morfológicos, fisiológicos y mortalidad en los organismos, y con las consiguientes pérdidas económicas de los acuicultores.

Los antibióticos utilizados fueron Cloranfenicol (antibiótico base), Nitrofurantoina (Macrofantina®, cápsulas 50 mg) y Ciprofloxacino (Ciprofloxi®, cápsulas de 250 mg).

Se hizo un bioensayo para cada etapa de *Artemia* con cada uno de los antibióticos mencionados. Con nauplios, se colocaron 5,000 organismos (10 org/mL) en un vaso de precipitado con 500 mL con agua a 40 g/L de salinidad, 23 ± 2 °C de temperatura y aeración constante. En cada vaso, se agregó el antibiótico y después de 4 h, los nauplios se filtraron y se lavaron con agua dulce y se trituraron en un mortero. En cajas de Petri con medio de agar soya tripticaseina (TSBA) y con 1 mL del inóculo de bacteria, se hicieron cuatro pequeñas excavaciones (pozos), uno para cada antibiótico y uno para el testigo. Posteriormente se colocó, en cada pozo, 1 mL del triturado de nauplios. Las cajas de Petri se colocaron en la incubadora durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición. Para el

bioensayo con los metanauplios, de 48 h de nacidos, el procedimiento de incorporación y determinación del efecto del antibiótico ante la bacteria fue el mismo que se siguió con los nauplios.

En los bioensayos con juveniles de *Artemia*, se tomaron del cultivo 200 organismos juveniles (de 10-12 días de nacidos) y se colocaron en vasos de precipitado de 1 L con 500 mL de agua a 40g/L de salinidad, esto se hizo para cada antibiótico; los organismos se dejaron 24 h sin ningún alimento y posteriormente se incorporó cada uno de los antibióticos y se dejaron 4 h en esta solución. Después, los organismos se lavaron con agua dulce y se hicieron cinco grupos de 5, 10, 15, 25, 50 individuos y el testigo. Cada grupo se colocó en un mortero y se trituró. Para evaluar el efecto de los antibióticos en esta etapa de desarrollo, se siguió la misma técnica que para nauplios y metanauplios. Para los bioensayos con la etapa adulta (>15 días de haber nacido), el procedimiento de incorporación y determinación del efecto del antibiótico ante la bacteria fue el mismo que se siguió con los juveniles.

Para obtener los resultados, primero se elaboró la curva de calibración para cada antibiótico, la cual fue lineal ($R^2=0.9944$ para cloranfenicol; $R^2=0.9616$ para ciprofloxacino; y, $R^2=0.9721$ para nitrofurantoina) y, la relación entre la concentración de cada antibiótico contra el área de inhibición se expresa bajo la fórmula: $Y=3.192X+5E-14$ para cloranfenicol; $Y=24.517X+2E-13$ para ciprofloxacino; y, $Y=0.2831X-6E-14$ para nitrofurantoina. Con estos valores, se calculó la concentración alcanzada de cada uno de los antibióticos incorporados en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana*.

Las técnicas de extracción para identificar la presencia de los antibióticos dieron buenos resultados en el agua, tracto digestivo y en las heces fecales. En el agua, el sobrenadante se presentaron halos de inhibición, encontrando que el antibiótico cloranfenicol fue el que presentó el diámetro de halo más grande (13.75 ± 1.77 mm) con respecto a los otros dos antibióticos, alcanzando una concentración de $46.53 \mu\text{g/mL}$; en el precipitado, el ciprofloxacino y la nitrofurantoina, dieron halos de inhibición de 18.55 mm ($11.2 \mu\text{g/mL}$) y 18 mm ($898.55 \mu\text{g/mL}$) respectivamente. En el tracto digestivo, los tres antibióticos dieron halos de inhibición por arriba de 14 mm de diámetro. El ciprofloxacino alcanzó el valor más alto con 19.5 ± 0.71 mm que corresponde a $11.56 \mu\text{g/mL}$ del antibiótico. En las heces fecales, encontraron valores del diámetro de halo de inhibición por arriba de los 20 mm en los tres antibióticos, la concentración de los antibióticos en las heces fecales fue alta, alcanzando concentraciones de $287.87 \mu\text{g/mL}$ en cloranfenicol. El pH dentro del tracto digestivo de *Artemia* no presentó ningún problema para los antibióticos.

Con respecto a los bioensayos de incorporación de antibióticos se determinó que los metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia* requieren de 4 h para que su tracto digestivo se llene.

En los nauplios, el antibiótico que provocó el mayor halo de inhibición fue la nitrofurantoina con un valor promedio de 22.26 mm, dando una concentración de $1,375.42 \mu\text{g/mL}$. Los otros dos antibióticos

presentaron halos de inhibición ligeramente por arriba de 10 mm. En los metanauplios, el antibiótico que presentó mayor halo de inhibición fue el ciprofloxacino con un valor medio de 22.57 mm (16.32 µg/mL), el cloranfenicol con 15.4 mm (58.37 µg/mL) y la nitrofurantoina no formó halo de inhibición. En la fase juvenil, solamente se obtuvo un halo de inhibición con los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacino, alcanzando valores altos en el diámetro del halo con 38 mm (355.39 µg/mL) y 33 mm (34.89 µg/mL) respectivamente. La nitrofurantoina no presentó halo de inhibición. En la fase adulta, con los antibióticos cloranfenicol y en ciprofloxacino, se pudo observar un incremento en el tamaño del diámetro de halo de inhibición conforme la cantidad de organismos aumentaba, obteniendo valores que van de 26 hasta 33 mm en cloranfenicol (170.62 a 262.68 µg/mL) y, 29 hasta 40 mm en ciprofloxacino (27.56 a 50.41 µg/mL). La nitrofurantoina no presentó halo de inhibición.

Se puede concluir que los antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacino y nitrofurantoina presentaron áreas de inhibición contra la bacteria *A. hydrophila*; que el periodo de cuatro horas es suficiente para llenar el tracto digestivo de los metanauplios, juveniles y adultos y saturar a los nauplios de *Artemia* con los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacino; en cuanto al antibiótico nitrofurantoina solo se tuvo resultados positivos en la etapa naupliar. Aunque se alcancen mayores concentraciones de antibiótico en el tracto digestivo de *Artemia*, al dejarla más tiempo en la solución enriquecedora, su sobrevivencia se ve afectada.

En todo trabajo que se realiza con antibiótico es indispensable conocer la cantidad máxima que soporta el organismo transportador, en este caso *Artemia*, para poder recomendar la dosis adecuada. Este trabajo dio como resultado que para los antibióticos cloranfenicol (antibiótico base) y ciprofloxacino (Ciproflox®, cápsulas de 250 mg), presentación comercial, es necesario hacer diluciones al 50 % debido ya que *Artemia* no soporta la concentración comercial. El antibiótico nitrofurantoina (Macrofantina®, cápsulas 50 mg), al no dar resultados positivos en las fases de metanauplio, juvenil y adulto, surge la recomendación de probar con mayor dosis.

Aunque en este trabajo el objetivo fue llegar a incorporar antibióticos comerciales, de fácil adquisición, a diferentes fases de desarrollo de *Artemia* y lograr inhibir el crecimiento de la bacteria *A. hydrophila*, es conveniente señalar que para tratar profilácticamente a un pez de 454 g contra esta bacteria con el antibiótico cloranfenicol, se recomienda proporcionar 658,068 a 1,974,204 nauplios; 856,604 a 2,569,813 metanauplios; 703 a 2,110 juveniles; o 293 a 879 adultos de *Artemia*. Esto quiere decir, que el utilizar etapas más avanzadas como es juvenil y adulto de *Artemia*, permite con menor número de organismos alcanzar las dosis requeridas en los tratamientos profilácticos.

ABSTRACT

The worldwide expansion experienced by aquaculture in the last years has improved the culture techniques used to manage large densities of organisms in reduced spaces. This has induced, on one side, increased aquaculture production yields, but has also given rise to higher rates of diseases in cultured organisms, causing high mortality rates and economical losses (Alderman, 1988). The development of biotechnologies that use live feed as important carriers not only of enriching substances but also of prophylactic and therapeutic substances has been instrumental in eliminating or maintaining at their minimal pathogenic organisms, since medications are no longer lost in the water and the adequate dose can be administered according to each species and developmental phase.

The crustacean *Artemia* has been used as a carrier agent of medications, mainly during its nauplius stage, due to its availability, easy handling, and adequate size, serving as food during the first life stages of aquaculture species (Castro *et al.*, 2003). Besides, the use of other developmental stages, metanauplii, juveniles, and adults, of this crustacean has allowed treatment of diseases in juvenile, adult, even reproducer, organisms, avoiding horizontal and vertical transmission of pathogens, as well as the consequent economical loss caused by mortality due to viruses, bacteria, fungi, and other parasites affecting the organisms being cultured.

This research was aimed at determining antibiotic incorporation during the different developmental stages, nauplius, metanauplius, juvenile, and adult, of *Artemia* to inhibit the pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila*, which appears in culture systems of fresh water fishes, and can produce morphological and physiological damage to the organisms, high mortalities and, consequently, economical losses to aquaculture farmers.

The used antibiotics were chloramphenicol (base antibiotic), nitrofurantoin (Macrofantina®, caplets, 50 mg), and ciprofloxacin (Ciproflox®, caplets, 250 mg).

For the bioassay with nauplii, 5,000 organisms (10 org/mL) were placed in a precipitation flask with 500 mL water at 40 g/L salinity, temperature of 23 ± 2 °C, and constant aeration, this procedure was followed for each antibiotic. The antibiotic was added to each flask, 4 h later the nauplii were filtered, washed with fresh water, and ground in a mortar. In Petri dishes containing TSBA medium and 1 mL of bacteria inoculation, four small wells were made, each one for each antibiotic and one for the witness; 1 mL of the ground nauplii was added to each well. Petri dishes were incubated for 24 h at 37 °C and the inhibition halos were measured. For the metanauplii (48 h from birth) bioassay, the same procedure as that used for nauplii was followed.

For the bioassay with *Artemia* juveniles, 200 juvenile organisms (10-12 days from birth) were taken from the culture and placed in 1 L precipitation flasks with 500 mL of water at 40 g/L salinity, this was

made for each antibiotic. Organisms were kept 24 h without any food, then each antibiotic was added, and organisms were left in this solution for 4 h. Afterwards, organisms were washed with fresh waters and five groups of 5, 10, 15, 25, 50 individuals were formed and the witness. Each group was ground in a mortar. To determine the inhibition halo at this developmental stage, the same procedure used for nauplii and metanauplii was followed. For the adult stage (>15 days from birth) bioassays, the same incorporation procedure and determination of the antibiotic effect on the bacterium were followed as those used for juveniles.

For results, first determined the calibration curve for each antibiotic, which was linear ($R^2=0.9944$ for chloramphenicol, $R^2=0.9616$ for ciprofloxacin, $R^2=0.9721$ for nitrofurantoin). The relation between each antibiotic concentration and the inhibition area is expressed by: $Y=3.192X+5E-14$ for chloramphenicol, $Y=24.517X+2E-13$ for ciprofloxacin, $Y=0.2831X-6E-14$ for nitrofurantoin. With these values, the concentration reached by each of the antibiotics incorporated in *Artemia franciscana* nauplii, metanauplii, juveniles, and adults was calculated.

The extraction techniques to identify the presence of antibiotics yielded good results in water, digestive tract, and feces. In water, the supernatant presented inhibition halos, finding that chloramphenicol was the one with the largest halo diameter (13.75 ± 1.767 mm), reaching a $46.53 \mu\text{g/mL}$ concentration; in the precipitate, ciprofloxacin and nitrofurantoin gave inhibition halos of 18.55 mm ($11.2 \mu\text{g/mL}$) and 18 mm ($898.55 \mu\text{g/mL}$), respectively. In the digestive tract, the three antibiotics gave inhibition halos above 14 mm in diameter. Ciprofloxacin reached the highest value with 19.5 ± 0.71 mm, corresponding to $11.56 \mu\text{g/mL}$ concentration of the antibiotic. In faces, we found inhibition halo diameters above 20 mm with the three antibiotics; their concentrations were high in faces, reaching concentration of $287.87 \mu\text{g/mL}$ for chloramphenicol. The pH inside *Artemia*'s digestive tract posed no problem for the antibiotics.

Regarding, the bioassays on antibiotics incorporation, it was determined that *Artemia* metanauplii, juveniles, and adults require 4 h for the filling of their digestive traces.

In nauplii, the antibiotic with the largest inhibition halo was nitrofurantoin with an average value of 22.26 mm, corresponding to a $1,375.42 \mu\text{g/mL}$ concentration. The other two antibiotics presented inhibition halos barely above 10 mm. In metanauplii, the antibiotic with the largest inhibition halo was ciprofloxacin, with an average value of 22.57 mm ($16.32 \mu\text{g/mL}$), chloramphenicol with 15.4 mm ($58.37 \mu\text{g/mL}$); nitrofurantoin did not form inhibition halo. In the juvenile stage, an inhibition halo was obtained only with chloramphenicol and ciprofloxacin, reaching large halo diameters: 38 mm ($355.39 \mu\text{g/mL}$) and 33 mm ($34.89 \mu\text{g/mL}$), respectively. Nitrofurantoin presented no inhibition halo. In the adult stage, the diameters of the inhibition halo with chloramphenicol and ciprofloxacin increased as the amount of organisms increased, reaching values ranking from 26 to 33 mm for chloramphenicol

(170.62 to 262.68 µg/mL) and 29 to 40 mm for ciprofloxacin (27.56 to 50.41 µg/mL). Nitrofurantoin presented no inhibition halo.

It can be concluded that: the used antibiotics, chloramphenicol, ciprofloxacin, and nitrofurantoin, presented inhibition areas against the *A. hydrophila* bacterium; the 4 h period is sufficient to fill the digestive tract of *Artemia* metanauplii, juveniles, and adults, as well as to saturate *Artemia* nauplii, with the chloramphenicol and ciprofloxacin antibiotics. Regarding nitrofurantoin, positive results were only obtained in the nauplii stage. Even if larger concentrations of the antibiotic are reached in the *Artemia* digestive tract, leaving the organism for a longer time in the enriched solution would affect its survival.

When working with antibiotics it is indispensable to know the maximal amount tolerated by the carrier organism, in this case *Artemia*, to be able to recommend the adequate dose. This work revealed that for the antibiotics chloramphenicol (base antibiotic) and ciprofloxacin (Ciproflo^x, 250 mg caplets), commercial presentation, it is necessary to make 50% dilutions, since *Artemia* does not tolerate the commercial concentration. The antibiotic nitrofurantoin (Macro^d, 50 mg caplets), by not yielding positive results in the metanauplius, juvenile, and adult stages, raises the possibility of testing higher doses.

Although this paper was aimed at being able to incorporate commercial antibiotics, easily available, to different developmental stages of *Artemia* to achieve inhibition in *A. hydrophila*, it is worthwhile mentioning that to treat diseases caused by this bacterium with chloramphenicol in fishes of 454 g, the recommendations are: 658,068 to 1,974,204 nauplii; 856,604 to 2,569,813 metanauplii; 703 to 2,110 juveniles; and 293 to 879 adults. This means that use of more advanced stages, i.e., juveniles and adults, allows using smaller amounts of organisms to reach the required doses for prophylactic treatments.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Enfermedades de peces de agua dulce	3
2.1.1. Enfermedades no infecciosas	
Enfermedades por factores ambientales	
Enfermedades nutricionales	
2.1.2. Enfermedades infecciosas	
2.1.2.1. Enfermedades bacterianas	
<i>Aeromonas</i>	
Enfermedad producida por <i>Aeromonas salmocida</i>	
Septicemia causada por <i>Aeromonas</i> móviles	
Enfermedad producida por <i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Vibriosis</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
Enfermedad bacteriana de las branquias (BGD)	
2.2. Quimioterapia de las infecciones	12
2.2.1. Agentes terapéuticos	
Bacteriostáticos	
Bactericidas	
Quimioterapéuticos	
Antibióticos	
2.2.2. Aspectos terapéuticos y farmacológicos	
Diagnóstico clínico de certeza	
Identificación bacteriológica	
Test de sensibilidad y antibiograma	
Antibiograma por difusión en discos o placas	
Test de sensibilidad por dilución o turbidimetría	
2.3. Clasificación de los agentes antimicrobianos	14
2.4. Antibióticos	16
2.4.1. Clasificación de los antibióticos	
De acuerdo a su origen	
De acuerdo a su mecanismo de acción	
Antibióticos que inhiben o interfieren con la síntesis de la pared bacteriana	

	Pág.
Antibióticos que afectan la membrana celular	
Antibióticos que interfieren con la síntesis proteica o de los ácidos nucleicos	
De acuerdo a su actividad o espectro bacteriano	
2.4.2. Uso de los antibióticos en la acuicultura	19
Antibióticos de uso común	
2.4.3. Resistencia bacteriana a los antibióticos	20
2.4.4. Tratamiento de enfermedades bacterianas	21
2.5. Enriquecimiento de <i>Artemia</i>	22
Incorporación de antibióticos en <i>Artemia</i>	
2.6. <i>Artemia franciscana</i>	26
Biología de <i>Artemia</i>	
Tracto digestivo	
III. ANTECEDENTES	29
IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVO GENERAL	35
Objetivos particulares	
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1. Organismos	36
6.1.1. <i>Artemia franciscana</i>	
6.1.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	
6.2. Medicamentos	37
6.2.1. Curva estándar de calibración del antibiótico vs halo de inhibición	
6.3. Tiempo de incorporación de los antibióticos en <i>Artemia</i>	38

	Pág.
6.4. Técnicas de extracción para identificar la presencia de antibiótico	38
6.4.1. En el agua	
6.4.2. En el tracto digestivo	
6.4.3. En las heces fecales	
6.5. Prueba de pH dentro del tracto digestivo de <i>Artemia</i>	39
6.6. Pruebas de incorporación en las diferentes fases de desarrollo de <i>Artemia</i>	40
6.6.1. Nauplios y metanauplios	
6.6.2. Juveniles y adultos	
6.7. Análisis estadístico	41
VII. RESULTADOS	42
7.1. Curvas de calibración de los antibióticos	42
7.2. Técnicas de extracción para identificar la presencia de antibiótico	45
7.2.1. En el agua	
7.2.2. En el tracto digestivo	
7.2.3. En las heces fecales	
7.3. Prueba de pH dentro del tracto digestivo de <i>Artemia</i>	47
7.4. Bioensayos de incorporación de los antibióticos	51
7.4.1. Tiempo de incorporación de los antibióticos en <i>Artemia</i>	
7.5. Pruebas de incorporación en las diferentes fases de desarrollo de <i>Artemia</i>	54
7.5.1. Nauplios	
7.5.2. Metanauplios	
7.5.3. Juveniles	

	Pág.
7.5.4. Adultos	
VIII. DISCUSIÓN	60
8.1. Curvas de calibración	61
8.2. Tiempo de incorporación de los antibióticos	62
8.3. Bioensayos de incorporación de los antibióticos en las diferentes fases de desarrollo de <i>Artemia</i>	63
8.3.1. Nauplio	
8.3.2. Metanauplio	
8.3.3. Juvenil y adulto	
8.4. Concentración de antibiótico alcanzada en las diferentes fases de desarrollo	64
IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
X. LITERATURA CITADA	66

I. INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo que ha tenido la acuicultura en el mundo en los últimos años, ha provocado el mejoramiento de técnicas de cultivo, con las que se manejan grandes densidades de organismos en espacios reducidos; esto ha permitido, por un lado, un incremento en los rendimientos de producción en la acuicultura, pero también han aparecido, con mayor frecuencia, enfermedades en los organismos en cultivo, provocando altas mortalidades y pérdidas económicas (Alderman, 1988). Además, en los habitats acuáticos aledaños a las granjas acuícolas de producción, en donde se utilizan medicamentos para tratar enfermedades en los organismos y que vierten sus aguas de desecho, han provocado que proliferen cepas de bacterias resistentes a los medicamentos, ocasionando problemas a la biota en el habitat del lugar y causando daños a la salud humana (Alderman y Hastings, 1998).

Para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura, se usan productos químicos que son vertidos directamente al agua o administrados a través del alimento. En estas dos formas de administración, se pierde parte del medicamento en el agua, provocando problemas de contaminación de la misma; además, de que la dosis adecuada de medicamento no es consumida por el organismo. Por ello, ha sido necesario encontrar otras vías alternas para suministrar los medicamentos utilizados en acuicultura.

El desarrollo de biotecnias que utilizan al alimento vivo como un transportador, no solo de sustancias enriquecedoras sino también de sustancias profilácticas y terapéuticas que permiten eliminar o mantener en cantidades mínimas a los organismos patógenos, son de gran importancia, ya que el medicamento no se pierde en el agua y se puede suministrar la dosis adecuada que necesita cada especie y en cada fase de su desarrollo.

El crustáceo *Artemia* se ha utilizado como agente transportador de medicamentos, principalmente en su etapa de nauplio, por su fácil disponibilidad, manejo y que por su tamaño sirve como alimento para varias especies acuícolas en cultivo (Castro *et al.*, 2003); sin embargo, el emplear otras fases de desarrollo como son los: metanauplios, juveniles y adultos de este crustáceo, permite tratar enfermedades no solamente en los alevines de peces, cuando han empezado a alimentarse, sino que se abre la posibilidad de tratar a organismos juveniles, adultos y aún hasta reproductores, evitando así la transmisión horizontal y vertical del patógeno, y la consecuente pérdida económica por la muerte de los organismos en cultivo debido a virus, bacterias, hongos y parásitos.

El desarrollo de esta investigación, permitió determinar la incorporación de antibióticos en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia* propuestas e inhibir a la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila*, que cuando aparece en un sistema de cultivo de peces de agua dulce, puede causar altas

mortalidades, daños morfológicos y fisiológicos a los organismos, y por consiguiente de pérdidas económicas a los acuicultores (Negrete, 2004).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedades en peces de agua dulce

Las mortalidades que se presentan por enfermedad en organismos acuáticos enfermos en cultivo representan una pérdida directa sobre la inversión que se ha hecho en alimento, en el crecimiento y la reproducción de organismos.

Las enfermedades, particularmente las infecciones crónicas, llegan a producir un efecto negativo en la producción y se manifiesta en un crecimiento reducido debido al bajo aprovechamiento del alimento y por consiguiente a una pobre asimilación (Hepher, 1991).

Las cuarentenas, la prevención a través de un control en los reproductores y las crías, las técnicas de bioseguridad y la vacunación, son algunas herramientas disponibles para luchar contra las enfermedades, pero significan gastos fuertes en el cultivo, influyendo en el costo global de la producción.

Los cultivos intensivos han provocado situaciones de estrés que conllevan a la aparición de enfermedades en los organismos acuáticos y usualmente está asociado con cambios en las condiciones ambientales como son de temperatura, de transferencia de peces, de oxígeno disuelto y de alimentación entre otros (Noga, 1996 y Harper, 2002).

Las enfermedades en peces se pueden dividir, de forma muy general, en no infecciosas e infecciosas según Southgate (2000):

2.1.1. Enfermedades no infecciosas

Enfermedades por factores ambientales

En este tipo de enfermedades se incluyen a los factores externos (ambientales) que ejercen un efecto directo en el pez, cualquier cambio en el medio físico ó incluso en el manejo, en la sobrepoblación o la administración de un tratamiento puede desencadenar una situación de estrés en los organismos, permitiendo a los organismos patógenos que ataquen y se manifiesten las enfermedades. Un ejemplo

físico es el aumento o disminución brusca de la temperatura del agua el cual produce estrés en los peces, dando como resultado que la tasa de sobrevivencia y la misma capacidad que tiene el pez para combatir las enfermedades se vea reducida al quedar fuera del intervalo óptimo de temperatura que soporta la especie. También, un aumento en la temperatura, causa que la concentración de oxígeno disuelto en el agua disminuya, produciendo problemas branquiales al pez y por lo tanto, alta mortalidad (Brown, 1993).

El pH en el agua juega un papel importante. Aunque se ha visto que los peces pueden adaptarse a valores de pH diferentes de lo óptimo, principalmente lo hacen hacia los pH alcalinos, pero se ha observado que el pH es dañino cuando ocurren cambios bruscos diferentes a los valores normales de la. El principal problema del cambio repentino de pH es la aparición de daños branquiales, causando una deficiencia respiratoria y hasta la muerte del organismo; pero, también se llegan a producir daños en la piel, aleta y córnea de los ojos y, por lo tanto, efectos a largo plazo sobre la fisiología y el crecimiento de los peces sobrevivientes.

La cantidad de sólidos en suspensión en el agua, ya sea por arrastre de partículas por lluvia, desbordamiento de ríos, la sobrealimentación y las altas concentraciones de heces fecales, causan un deterioro en la calidad del agua, dañan el epitelio branquial de los peces y causan problemas en la respiración (Brown, 1993).

Enfermedades nutricionales

Existe una amplia variación en la calidad de alimento utilizado para nutrir peces en las granjas acuícolas. La escasa disponibilidad de nutrientes adecuados en la dieta, una pobre formulación, un mal procesado, poco conocimiento de las necesidades nutricias de los organismos, o al almacenamiento inadecuado del alimento, son problemas que pueden causar la aparición de enfermedades nutricias en los peces (Brown, 1993).

La desnutrición se puede deber, tanto a la mala alimentación como a un alimento con características físicas inapropiadas: tamaño no adecuado para la fase de desarrollo a alimentar, que el alimento sea duro y difícil de digerir o que el alimento se hunda rápidamente y no sea aprovechado. La desnutrición causa la pérdida de peso corporal, una mala condición física, crecimiento lento, aparición de infecciones en piel y aletas y, aún, problemas reproductivos. La falta de alimento conduce al

canibalismo y a que los peces se dañen unos a otros lastimándose. También se pueden observar síntomas de desnutrición si hay deficiencias de ciertos nutrientes esenciales. Un alimento deberá estar bien balanceado en sus componentes de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas (Southgate, 2000).

2.1.2. Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas son producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos. En esta tesis, se enfocará únicamente a las enfermedades causadas por bacterias.

2.1.2.1. Enfermedades bacterianas

Entre las enfermedades más comunes, se encuentran las asociadas por la proliferación de bacterias que pueden ser la causa de grandes pérdidas de cultivo en peces, siendo estos organismos considerados como los patógenos más importantes. El agua es un medio ideal para el crecimiento bacteriano, sobre todo cuando contiene un exceso de materia orgánica (Reichenbach-Klinke, 1980). Las infecciones provocadas por bacterias pueden ocurrir en órganos internos, músculos y piel, incluyendo las aletas, entre otros (Eurell *et al.*, 1978). Numerosas bacterias que se encuentran en el agua se multiplican e infectan a los organismos acuáticos. En los cultivos se observa que las larvas de invertebrados o de peces, que son introducidos, constituyen un medio propicio para el desarrollo de una flora bacteriana oportunista (Bernabé, 1980).

La mayoría de las bacterias saprófitas patógenas son normales del pez y de su entorno. Estas bacterias se manifiestan cuando el pez se encuentra en estado de estrés o por la presencia de otras enfermedades. La sobrepoblación, los cambios de temperatura, el manejo, los ataques de depredadores, la competencia entre congéneres son algunas de las situaciones estresantes que pueden desencadenar la aparición de las enfermedades bacterianas (Petracini, 1979).

Un gran número de las bacterias patógenas son gram negativas que originan cuadros clínicos muy similares, ya que la mayoría de los peces presentan septicemia hemorrágica con o sin úlceras en la piel (Southgate, 2000). Unas pocas bacterias gram positivas son causantes de enfermedad en algunas especies de peces. Por otro lado, se han identificado bacterias ácido-alcohol resistentes como causantes de algunas enfermedades granulomatosas crónicas.

En la tabla 1 se muestra una clasificación de las bacterias patógenas en peces cultivados y de interés en acuicultura.

Tabla 1. Bacterias patógenas de peces cultivados		
Familia	Género	Ejemplo de proceso patológico comúnmente causado por el género
Gram negativas		
Vibrionaceae	<i>Aeromonas, Vibrio</i>	Furoncolosis, Vibriosis
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	Pseudomoniasis septicémica
Enterobacteriaceae	<i>Yersinia, Edwardsiella</i>	Boca roja o enterosepticemia hemorrágica
Pasteurellaceae	<i>Pasteurella</i>	Pseudotuberculosis
Cytophagaceae	<i>Cytophaga</i>	Enfermedad del invierno
Gram positivas		
Coriniformes	<i>Renibacterium</i>	BKD
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	
Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	Tuberculosis íctica
Bacillaceae	<i>Clostridium</i>	

Tomada de Southgate (2000)

A continuación se darán algunos ejemplos de algunas enfermedades bacterianas más importantes que aparecen en los peces cultivados

Aeromonas

Enfermedad producida por Aeromonas salmonicida

Esta especie contiene uno de los más importantes patógenos de los salmónidos, ya que es el agente



Figura 1. Fotografía presentando la enfermedad de furunculosis en trucha. Tomado de: http://www.fisheries.org/education/fisheries_techniques/Chapter14/Lake%20trout%20with%20furunculosis.JPG

causal de la enfermedad conocida como furunculosis (fig.1.). Este patógeno es obligado inmóvil. Puede sobrevivir fuera del hospedador por varias semanas, asociado con restos tisulares de los peces y otras materias orgánicas. La infección se da cuando se trasladan peces enfermos a la granja de cultivo o a través de portadores silvestres que dejan la bacteria en el agua, así como, en el

alimento vivo o balanceado. La mayoría de los salmónidos padecen la furunculosis, pero se ha visto que el salmón del Atlántico es el más susceptible y la trucha arco iris es la más resistente (Brown, 1993).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían de aguda a crónica dependiendo de la edad y la especie de los peces infectados, la cepa de la bacteria implicada y las condiciones del ambiente. Los peces jóvenes son los más propensos a sufrir la forma aguda de la enfermedad y a presentar síntomas que incluye la pérdida del apetito, oscurecimiento de la piel y mortalidad aguda. La forma clínica subaguda muestran los síntomas típicos de septicemia hemorrágica: órganos internos hemorrágicos y hemorragias en la base de las aletas, en el ano y por debajo de las escamas. Se pueden presentar lesiones hemorrágicas leves en la piel, pero los furúnculos, lesiones cutáneas abultadas que al romperse liberan un líquido hemorrágico rico en bacterias, se dan en los peces adultos que sufren una infección más crónica (Noga, 1996).

Septicemia causada por Aeromonas móviles

Esta enfermedad se presenta principalmente en ciprínidos, aunque también se han reportado en truchas y carpas. Algunos autores consideran que la enfermedad es de origen viral y que las *Aeromonas* son bacterias oportunistas que aprovechan la baja de defensa inmune de los peces. Este tipo de enfermedad recibe varios nombres, los principales son: septicemia hemorrágica (fig.2), boca roja de los peces y septicemia bacteriana (Amlacher, 1964).

De las diferentes especies de bacterias que forman el complejo de *Aeromonas* móviles, *A. hydrophila* generalmente es la bacteria que está asociada con la enfermedad de septicemia hemorrágica y ha sido reportada como la causante de este tipo de enfermedad en los peces. Como la bacteria forma parte de la flora intestinal de peces sanos y también se ha aislado en las aguas negras, es conocida como una bacteria indicadora de aguas contaminadas. Los peces u otros animales acuáticos pueden actuar como portadores sanos de este tipo de microorganismo. La septicemia hemorrágica puede transmitirse a través del agua, el estrés, la



Figura 2. Foto de la enfermedad septicemia hemorrágica en el hígado de carpas. Tomado de: http://www.fisheries.org/education/AFS_education_fisheries_techniques_visuals_chap_14_add.htm

sobrepoblación, la mala nutrición y entre otras situaciones, pueden ser las causantes de la aparición de la enfermedad (Amlacher, 1964).

La enfermedad por bacterias móviles generalmente se presenta en verano cuando la temperatura del agua se incrementa, o en el otoño cuando tiende a decrecer, el pez puede llegar a perder su equilibrio homeostático, se estresa y aunque esta enfermedad pase desapercibida y no presente algún cuadro clínico, los peces empiezan a perder apetito (Petracini, 1974), los que están enfermos muestran un nado errático y tienden a agruparse en un punto; aparecen manchas rojas en la base de las aletas, en la boca, en el opérculo y en el ano. Internamente hay hemorragia en órganos, el peritoneo y en los músculos; el hígado, el riñón y el bazo se inflaman y se vuelven hemorrágicos y hay exoftalmia.

Enfermedad producida por Aeromonas hydrophila

Una de las enfermedades bacterianas, como anteriormente se mencionó, con mayor presencia en los peces es la septicemia hemorrágica producida por *A. hydrophila*, que se caracteriza por la presencia de lesiones en la superficie, principalmente la pérdida de escamas, hemorragias en las branquias y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia e inflamación abdominal (Austin y Austin, 1987; Dixon, 1991 y Negrete y Romero, 1998).

A. hydrophila es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, son móviles debido a un flagelo que se encuentra en posición polar, de extremos redondeados y con frecuencia de aspecto cocoide, mide aproximadamente 1 x 1.7-2 μm (fig. 3). Su crecimiento óptimo se registra en temperaturas alrededor de 30 °C por lo que en ocasiones también se encuentran en organismos de sangre caliente (homeotermos) (Reichenbach-Klinke, 1980). *A. hydrophila* es residente habitual del intestino de las sanguijuelas (Frías y Díaz, 2001).

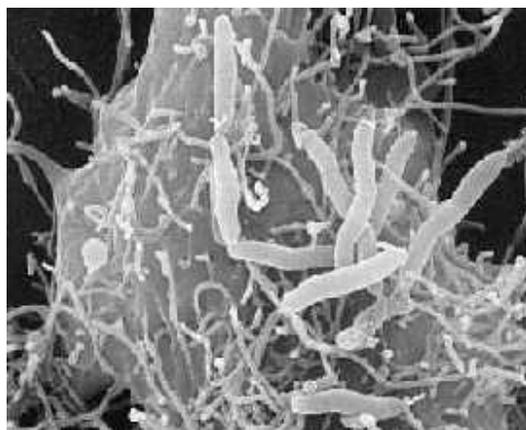


Figura 3. Fotografía de *A. hydrophila* con microscopio electrónico.

A. hydrophila esta asociada con severas enfermedades en peces, reptiles y anfibios, provocando pudrición en la cola, en las aletas y septicemias hemorrágicas (Eurell *et al.*, 1978). La septicemia hemorrágica es caracterizada por la presencia de lesiones en la superficie, principalmente la pérdida de escamas, hemorragia en las branquias y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia e inflamación abdominal. Internamente son más presentes en la cavidad peritoneal, anemia e inflamación de los riñones e hígado (Miyazaki y Kaige, 1985; Frías y Díaz, 2001). *A. hydrophila* produce hemorragias capilares que ocurren en la dermis de las aletas y en el tórax (fig.4), también señalan que esta bacteria afecta a células hepáticas y ocasionan degeneraciones progresivas a los túbulos renales (Miyazaki y Jo, 1985; Miyazaki y Kaige, 1985).



Figura 4. Lesiones provocadas por la bacteria *A. hydrophila* en peces.

Diversos agentes quimioterapéuticos son utilizados para el tratamiento de *A. hydrophila* en granjas acuícolas de peces. Cepas de *A. hydrophila* aisladas de peces son sensibles al cloroanfenicol, tetraciclina, sulfamidas y derivados de nitrofuranos (Endo *et al.*, 1973; Katae *et al.*, 1979; y Cipriano, 2001). A nivel de producción de alevines, la terramicina ha sido efectiva contra la bacteria cuando se ha incorporado en el alimento peletizado para peces (3.5 g de antibiótico por 4.5 g de pez por 10 días de tratamiento) (Warren, 1991).

Vibriosis

Es una enfermedad bacteriana sistémica que se presenta en gran cantidad de organismos acuáticos y que causan pérdidas económicas en granjas acuícolas. La patología externa e interna de la *Vibriosis*

es muy similar a la que causan las bacterias Gram negativas antes mencionadas. Aunque muchas especies de peces son susceptibles ante esta enfermedad, la mortalidad es más severa en las anguilas y en los salmones. Son muchos los vibrios que están relacionados con el ambiente acuático, pero algunos actúan como patógenos primarios y otros como oportunistas (Brown, 1993).

La especie *V. anguillarum*, es uno de los patógenos más comunes en los peces marinos y causa infecciones agudas y crónicas (fig. 5). También se ha encontrado formando parte de la flora intestinal de algunos peces marinos que no presentan síntoma alguno, indicando la posibilidad de que el patógeno se encuentre de forma latente (Sarig, 1972).

La enfermedad generalmente se presenta como una septicemia generalizada y sus síntomas son muy similares a las otras septicemias, hemorragia en la base de las aletas, en la boca y alrededor del ano, así como lesiones en la piel. Los peces presentan movimiento lento y tienden a agruparse en la superficie del agua. Internamente se presentan hemorragias en el hígado, bazo y riñón. La transmisión de la enfermedad es por vía oral, sobre todo cuando se alimentan de peces enfermos. Además, por vía cutánea, a través de heridas externas o por las branquias (Roberts, 1978).



Figura 5. Foto tomada de una perca (pez marino) mostrando la enfermedad por *V. anguillarum*. (Tomada de: http://www.mdsg.umd.edu/news/news_wperch_head.jpg)

Pseudomonas

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran en el suelo, el agua y en ocasiones en peces en descomposición. Se clasifican como secundarias, ya que muchas veces son oportunistas. La septicemia por *Pseudomonas* también se le denomina septicemia hemorrágica bacteriana o septicemia hemorrágica. Esta enfermedad puede aparecer en peces en cultivo y generalmente cuando se estresan por factores, tales como bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el agua, temperaturas elevadas, alimentación deficiente, sobrepoblación de peces o mal manejo de los mismos (Brown, 1993). Este tipo de septicemia se presenta como grandes lesiones hemorrágicas sobre la piel

(fig.6) que pueden causar una muerte rápida en los peces. Los órganos se alteran y puede llegar a producir ascitis. En la piel, los primeros síntomas son como una inflamación de los vasos de la dermis y termina con grandes ulceraciones que penetran hasta el músculo.

El patógeno puede entrar al pez por vía oral o por lesiones en la piel, ataca a las branquias y tanto la bacteria como las toxinas pueden destruir tejidos y órganos internos. Los peces que ya están infectados pueden depositar grandes cantidades de bacterias e infectar a peces sanos y que tan solo bastaría que cualquier cambio en el equilibrio homeostático del pez sano cambie para que el patógeno cause el daño (Southgate, 2000).



Figura 6. Foto de una carpa mostrando ulceraciones que han penetrado al músculo. (Tomada de: www.fisheries.org/education/AFS_education_fisheries_techniques_visuals_chap_14_add.htm)

Enfermedad bacteriana de las branquias (BGD)

La BGD es una enfermedad crónica y aguda que ocurre tanto en salmónidos, como en diversas especies de peces de aguas templadas y de acuario. Bacterias oportunistas de los géneros: *Flexibacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* pueden estar involucradas en la enfermedad bacteriana de las branquias. Esta enfermedad se conoce también como “enfermedad ambiental de las branquias”, ya que se le asocia a condiciones ambientales deficientes. Generalmente se considera que la enfermedad se presenta cuando las branquias se irritan debido a las condiciones del agua y posteriormente por invasión de bacterias oportunistas (Roberts, 1978). Factores como la cantidad de sólidos en el agua, concentraciones elevadas de amonio, bajo oxígeno disuelto y sobrepoblación de peces, pueden ser causas de brotes de esta enfermedad y pueden causar hasta el 50% de mortalidad a la población de peces.

La enfermedad bacteriana de las branquias se transmite por contacto con los peces enfermos o por agua contaminada. La acumulación de amonio en su forma no ionizada procedente de las excreciones de los peces, conduce a que esta enfermedad aparezca, presentándose los problemas patológicos de las branquias antes mencionadas. Además, uno de los principales síntomas es la anorexia, los peces tienden a ir hacia el flujo del agua y se mantienen en la superficie. Nadan erráticamente y con lentitud. Las branquias aparecen inflamadas y se observan manchas grises o blancas (Roberts, 1978).

2.2. Quimioterapia de las infecciones

Las enfermedades infecciosas, constituyen uno de los problemas terapéuticos más importantes de la medicina. Se estima que gracias al advenimiento de la era antibiótica y quimioterapéutica, la expectativa de vida de las poblaciones se incrementó significativamente en los últimos 30-40 años. Sin embargo, tanto los antibióticos como los quimioterapéuticos antibacterianos, son posiblemente los agentes farmacológicos de peor utilización en la terapéutica farmacológica. Esto mismo sucede en la acuicultura que se ha hecho un uso inadecuado de los antibióticos (Kümmerer, 2001).

Madigan *et al.* (1999), Prescott *et al.* (2000), Scott (2000) y Atlas y Bartha (2002) mencionan que es necesario destacar algunos conceptos que se utilizan en la quimioterapia de las infecciones y manejo de ciertos aspectos terapéuticos y farmacológicos para hacer uso racional de ellos.

A continuación se nombran los principales agentes terapéuticos:

2.2.1. Agentes terapéuticos

Bacteriostáticos

Son agentes antibacterianos, que impiden el desarrollo y la multiplicación de los microorganismos, pero que no los destruyen; requieren el complemento del sistema inmunológico defensivo del huésped, para dominar definitivamente la infección. Son ejemplos de bacteriostáticos las sulfonamidas, las tetraciclinas, el cloranfenicol, entre otros (Madigan *et al.*, 1999).

Bactericidas

Son antibióticos capaces de provocar la lisis bacteriana o destrucción de los microorganismos. Son bactericidas: las penicilinas, las cefalosporinas, los antibióticos polipeptídicos y los aminoglucósidos (en dosis altas) (Prescott *et al.*, 2000).

Quimioterapéuticos

Son agentes químicos antibacterianos, producidos en el laboratorio en forma sintética o semisintética (Scott, 2000).

Antibióticos

Son sustancias químicas elaboradas por numerosas especies de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos), que actúan sobre otros microorganismos y son capaces de suprimir su crecimiento y multiplicación (acción bacteriostática) o eventualmente provocar su destrucción (acción bactericida) (Alderman y Michel, 1991; Atlas y Bartha, 2002).

2.2.2. Aspectos terapéuticos y farmacológicos

Para realizar un buen tratamiento contra las enfermedades se deben de tomar los siguientes aspectos terapéuticos y farmacológicos:

Diagnóstico clínico de certeza

Antes de establecer una terapéutica farmacológica antibacteriana, debe confirmarse, con un análisis concienzudo de signos y síntomas, la presencia de una infección bacteriana.

Identificación bacteriológica

El uso racional de un agente antibiótico o quimioterapéutico, debe basarse en la identificación, previa a la administración del fármaco, del agente bacteriano que provoca la infección. Cuando sea necesario, deberá determinarse la presencia de gérmenes gram positivos o gram negativos, la cual es relativamente fácil de realizar, y en muchos casos, continuar con determinaciones posteriores para identificar exactamente el germen causante de la infección, y fijar la terapéutica más adecuada.

Prueba de sensibilidad y antibiograma

Esta prueba permite determinar con relativa exactitud la sensibilidad, *in vitro*, de un microorganismo cultivado en medios apropiados, frente a determinados antibióticos. El antibiograma, se realiza utilizando los siguientes dos métodos básicos:

Antibiograma por difusión en discos o placas

El germen proveniente del material séptico extraído del paciente, se cultiva en medios semisólidos o sólidos, contenidos en placas o discos que poseen pequeños agujeros o depresiones, que contienen diferentes antibióticos. El germen se multiplica, y desarrolla en el medio de cultivo. Alrededor de cada depresión o agujero, y dependiendo de la sensibilidad del germen hacia el antibiótico, se desarrolla un halo de inhibición que demuestra la sensibilidad del germen y la posibilidad de la utilización de dicho antibiótico en el tratamiento del paciente (Goodman y Gilman, 1986).

Prueba de sensibilidad por dilución o turbidimetría

Es un método mucho más exacto y sensible que el anterior, ya que es capaz de cuantificar el grado de inhibición del crecimiento bacteriano producido por diferentes concentraciones del antibiótico. Consiste en cultivos, utilizando medios líquidos que permiten el desarrollo bacteriano, en tubos de ensayo, donde se colocan concentraciones crecientes del antibiótico en estudio. El grado de turbidez, indica el mayor o menor desarrollo bacteriano, y el primer tubo de ensayo transparente y sin turbidez, indica la concentración mínima inhibitoria (CMI), del antibiótico en estudio, esto es importante, ya que indica con claridad la sensibilidad del patógeno al antibiótico.

2.3. Clasificación de los agentes antimicrobianos

Los agentes antibacterianos se clasifican de la siguiente manera (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación de los agentes antibacterianos (Universidad de Sevilla, Departamento de microbiología, 2004)

BETALACTÁMICOS

Penicilinas:

P. naturales

Benzilpenicilina

Penicilina V (vía oral)

Aminobencil-penicilinas

Ampicilina

Amoxicilina

Acilaminoureido-penicilinas

Piperacilina

Penicilinas resistentes a penicilinasa estafilocócica

Meticilina

Cloxacilina

Tabla 2. Clasificación de los agentes antimicrobianos.....(continuación)

Cefalosporinas:

<i>1ª generación</i>	<i>2ª generación</i>	<i>3ª generación</i>	<i>4ª generación</i>
Cefazolina	Cefuroxima Cefoxitina Ceftazidima	Cefotaxima Ceftriaxona	Cefepima Cefpiroma

Monobactamas:

Aztreonam

Carbapenemas:

Imipenem
Meropenem

Inhibidores de betalactamasa

Ac. Clavulánico: Amoxicilina + ac. Clavulánico
 Sulbactam: Ampicilina + Sulbactam
 Tazobactam: Piperacilina + Tazobactam

INHIBIDORES DE LA GIRASA

Antiguos
 Ac. Nalidíxico
 Ac. Pipemídico

Nuevos
 Norfloxacinó
 Ciprofloxacino
 Ofloxacino
 Levofloxacino
 Moxifloxacino

MACROLIDOS/CETOLIDOS

Eritromicina
 Roxitromicina
 Azitromicina
 Claritromicina
 Josamicina
 Telitromicina

AMINOGLUCOSIDOS

Estreptomina
 Gentamicina
 Amicacina
 Tobramicina

OTROS ANTIMICROBIANOS

Glicopéptidos
 Vancomicina

Tetraciclinas
 Tetraciclina
 Doxiciclina
 Minociclina

Polimixinas

Nitroimidazoles
 Metronidazol
 Tinidazol

Cloranfenicol

Oxazolidinonas
 Linezolid

Sulfonamidas

Streptograminas
 Quinupristina-dalfopristina

Trimetoprim-Sulfametoxazol

Rifampicina

Fosfomicina

Clindamicina

Tabla 2. Clasificación de los agentes antimicrobianos.....(continuación)

<i>REVERSIBILIDAD DEL EFECTO</i>	
<i>Primariamente bactericidas</i>	<i>Primariamente bacteriostáticos</i>
Betalactámicos	Macrólidos
Aminoglucósidos	Cloranfenicol
Vancomicina	Clindamicina
Inhibidores girasa	Sulfonamidas
Fosfomicina	Tetraciclinas
Colimicina	
Rifampicina	
<i>MECANISMOS DE ACCION</i>	
<i>Pared celular</i>	<i>Membrana citoplasmática</i>
Betalactámicos	Polimixinas
Glicopéptidos	
Fosfomicina	
<i>Síntesis de ácidos nucleicos o precursores</i>	<i>Síntesis protéica</i>
Rifampicina	Aminoglucósidos
Sulfonamidas	Tetraciclinas
Inhibidores girasa	Macrólidos
Nitroimidazoles	Cloranfenicol
	Clindamicina
	Oxazolidinonas
	Estreptograminas

Tomado de: la página web de la Universidad de Sevilla, Depto. De microbiología, 2004).

2.4. Antibióticos

Básicamente los antibióticos son producidos por microorganismos, aunque el conocimiento de su estructura química y el avance de la farmacología molecular y de los procedimientos de síntesis química, han posibilitado que en la actualidad algunos antibióticos puedan ser sintetizados en el laboratorio, como es el cloranfenicol. Otros muchos antibióticos tienen un origen semisintético, es decir que son producto de una modificación química en la estructura del antibiótico original producido por el microorganismo correspondiente. Estas modificaciones semisintéticas otorgan al antibiótico nuevas propiedades, tales como un mayor espectro antibacteriano o un espectro selectivo o mejor tolerancia y biodisponibilidad, ácido resistencia para su administración oral y otros cambios farmacocinéticos que pueden ser de utilidad en terapéutica (Alderman y Hastings, 1998).

2.4.1. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos pueden ser estudiados desde varios puntos de vista (Goodman y Gilman, 1986; Brown, 1993, Sumano-López y Ocampo-Camberos, 1997, Angulo, 2000; y Cabello, 2003).

De acuerdo a su origen

Los antibióticos pueden clasificarse en: Micóticos: producidos por hongos telúricos como las penicilinas y cefalosporinas. Bacterianos: como las polimixinas, tirotricina, colistina. Actinomicetos: como la estreptomycin. Sintéticos o semisintéticos: como la carbenicilina, mezlocilina y ampicilina.

De acuerdo a su mecanismo de acción

Antibióticos que inhiben o interfieren con la síntesis de la pared bacteriana

Estos antibióticos inhiben la síntesis de la pared bacteriana interrumpiendo en distintas etapas el proceso de transpeptidación y de unión de los péptidoglicanos que constituyen la pared bacteriana, como son: las penicilinas y las cefalosporinas.

Antibióticos que afectan la membrana celular

Estos agentes son, en general, detergentes catiónicos que modifican marcadamente la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, como son la Polimixinas, Colistina, Tirotricina, Anfotericina B (Antifúngico), y Nistatina, éstos provocan una grave alteración de la membrana celular, modificando la permeabilidad y permitiendo el escape de aminoácidos intracelulares, purinas, pirimidinas y otras moléculas fundamentales para la vida celular. Estos antibióticos reaccionan con los esteroides de la pared celular, como grupos fosfatos de los fosfolípidos de la membrana, con lo que desorganizan y alteran a las lipoproteínas, desencadenando los efectos mencionados.

Antibióticos que interfieren con la síntesis proteica o de los ácidos nucleicos

Los antibióticos pueden inhibir la síntesis proteica bacteriana, generalmente en forma reversible de las siguientes maneras:

- Por inhibición selectiva de la síntesis o replicación del DNA bacteriano: así actúan el ácido nalidíxico y sus análogos, la griseofulvina y el metronidazol.
- Inhibición del RNA polimerasa, por ligadura específica afectando el metabolismo de los ácidos nucleicos e impidiendo la síntesis de todas las formas del RNA bacteriano. Así actúan básicamente las Rifampicinas.
- Interferencia con la función de los ribosomas bacterianos: estas estructuras bacterianas actúan como una línea de montaje en la síntesis proteica, por lo que la afectación de su función provoca una supresión de la síntesis proteica. Los antibióticos que interfieren con los ribosomas bacterianos actúan de las siguientes maneras diferentes: Inhibición de la subunidad ribosomal 30S: así actúan los aminoglucósidos, las tetraciclinas y la espectinomicina. Inhibición de la subunidad ribosomal 50S: así actúan el cloramfenicol y derivados, los macrólidos, los azúcares complejos, la espiramicina y la virginiamicina entre otros. Fijación a enzimas virales esenciales para la síntesis del DNA, impidiendo la replicación viral: así actúan el aciclovir, la vidarabina.
- Inhibición de la síntesis del ácido fólico bacteriano. Los agentes que actúan por este mecanismo no son antibióticos sino quimioterápicos y son considerados aquí solamente para unificar los conceptos acerca de mecanismos de acción. Estos agentes interfieren con la síntesis del ácido fólico e inhibiendo secuencialmente la enzima dihidrofólico reductasa. Así actúan las sulfonamidas, la trimetoprima, la tetroxoprima, la pirimetamina y las sulfonas. Los tetrahidrofolatos que se forman finalmente a partir del ácido fólico actúan como enzimas necesarias para la transferencia de unidades de un átomo de C, metilos, formilos, en la síntesis de purinas, pirimidinas, componentes esenciales del DNA y RNA bacterianos.

De acuerdo con su actividad o espectro antibacteriano

- Antibióticos primariamente efectivos contra cocos y bacilos Gram positivos: Penicilinas, Cefalosporinas, Lincomicina, Clindamicina, Vancomicina y Bacitracina.
- Antibióticos primariamente efectivos contra bacilos Gram negativos: Aminoglucósidos y Polimixinas.

- Antibióticos efectivos contra cocos y bacilos Gram + y Gram - : Penicilinas de espectro ampliado Cefalosporinas de última generación Tetraciclinas, Cloramfenicol, Macrólidos, Rifampicina, Sulfas + TMP.
- Antibióticos de espectro selectivo o dirigido: Carbenicilina, Mezlocilina, Piperacilina, Tobramicina, Espectinomomicina, Ticarcilina.

2.4.2. Uso de los antibióticos en la acuicultura

El uso de químicos en cultivos de peces tiene una larga historia, iniciándose con los baños de sal para controlar ectoparásitos. El primer registro de utilizar formalina fue en 1909 para controlar una infección por *Costia*. Otros desinfectantes como el cobre y el verde malaquita hicieron su aparición en 1920 y 1930 respectivamente. A finales de los años 30 se empezaron a identificar enfermedades bacterianas y el medicamento sulfamerazine fue introducido a Estados Unidos de Norteamérica en 1948 para tratar a estas enfermedades (Alderman y Michel, 1991). Nuevos medicamentos fueron introducidos provenientes de la medicina humana y veterinaria y aplicados en el cultivo de peces y crustáceos (Alderman, 1988; Brown, 1989; Pillay, 1992 y Cabello, 2003).

Los principales medicamentos antimicrobianos usados en acuicultura se muestran en la tabla 3, indicando la vía de aplicación, la dosis recomendada y al agente bacteriano.

Tabla 3. -Principales antibióticos utilizados en el tratamiento de enfermedades en Acuicultura

	PRODUCTO	VIA	DOSIS	INDICACIÓN
ANTIBIÓTICO				
β lactámicos	Ampicilina	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram negativa
	Amoxicilina	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram negativa
Aminoglicosidos	Neomycina	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram negativa
	Kanamycina	Baño	20 mg/L	Gram negativa
Tetraciclina	Tetraciclina	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram negativa
	Oxytetraciclina	Baño	20 mg/L	
	Doxycyclina			
Macrolidos	Eristromicina	Oral	50 mg/kg 10 días (baño de huevos	Varios tipos de bacterias 2mg/l 1 h
No clasificada	Cloranfenicol	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram negativa

Tabla 3. -Principales antibióticos....(continuación)

	PRODUCTO	VIA	DOSIS	INDICACIÓN
AGENTES ANTIBACTERIALES SINTETICOS				
Sulfonamidas	Sulfametazina Sulfadimetoxina	Oral	200 mg/kg 10 días	Gram. negativa
Sulfamidas potenciadas	Sulfaguanidina Trimetropina + sulfadiazina	Oral	50 mg/kg 10 días	Gram. negativa
Nitrofuranos	Furazolidona Furaltodona	Oral	50-80 mg/kg 10 días	Gram. negativa
Quinolonas	Ácido oxolinico Flumequia	Baño, Oral Oral	10/50 mg/kg 10 días 12 mg/kg 10 días	Gram. negativa Gram. negativa

(Tomado de Alderman y Michel, 1991).

En la acuicultura también, las vacunas y otras prácticas preventivas se consideran como el método preferido para el manejo de la salud de los organismos acuáticos. Sin embargo, aún la vacuna más efectiva no puede proteger a todas las poblaciones de peces, de crustáceos o de otro organismo acuático en cultivo; además de que no puede tener un efecto completamente positivo, cuando se presentan malas prácticas en bioseguridad en las instalaciones acuiculturales, en el mal uso de pesticidas y fertilizantes en agricultura (Alderman y Michel, 1991 y Smith *et al.*, 2002). Por otro lado, no todas las vacunas que se encuentran en el comercio son adecuadas para los organismos acuáticos en cultivo, aunque existan vacunas específicas para peces de interés comercial. Cuando aparece una enfermedad, y no hay una vacuna, la utilización de antibióticos es la alternativa más usual, pero hay que mencionar que los tratamientos con antibióticos que están actualmente disponibles, tienen un amplio espectro y los antibióticos que son utilizados y que se encuentran aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) como: Romet30, Terramicina y Sulfamerazina, no son efectivos para todas las enfermedades bacterianas de los organismos acuáticos cultivados (Pillay, 1992).

2.4.3. Resistencia bacteriana a los antibióticos

Una de las principales preocupaciones en el uso de antibióticos en la acuicultura es la resistencia de bacterias patógenas a los antibióticos, los cuales pasan de los animales cultivados a los humanos

(Cabello, 2003). La resistencia antimicrobiana ha ido en aumento en todo el mundo. El desarrollo de bacterias resistentes no sólo es una preocupación importante en salud pública cuando se reducen las alternativas de tratamiento, sino que ese mismo problema se ha observado en el tratamiento de diversas enfermedades en las granjas de peces y crustáceos en cultivo (Alderman y Hastings, 1998).

Las bacterias tienen la habilidad de mutar y producir cepas que son resistentes a antibióticos. La resistencia puede ocurrir en un microorganismo que puede heredar un rasgo genético, una estructura, o un estado fisiológico que le da la ventaja de resistencia; también, como consecuencia de una mutación genética o por el traslado de material genético (plasmido-R) de otro microorganismo (Negrete, 2004). La resistencia antibiótica también puede ser transferida a través de patógenos del ser humano. En investigaciones genéticas, realizadas en organismos patógenos de peces y que presentan cierta resistencia hacia los antibióticos, han demostrado que la resistencia antibiótica proviene de bacterias patógenas en humanos (Sorum, 1998).

Algunas investigaciones que se han hecho alrededor del mundo mencionan que el ambiente acuático provee un medio favorable al desarrollo de la resistencia antibiótica (Sorum, 1998 y Schmidt *et al.*, 2000). Estudios que se han hecho en el sedimento, cercano a las granjas de acuicultura que utilizan gran cantidad de antibióticos, muestran que los organismos cultivados, en este tipo de granjas, contienen mayor número de cepas bacterianas con resistencia antibiótica individual y/o múltiple. (Schmidt *et al.*, 2001). Esto tiene implicaciones económicas importantes en las granjas acuícolas, ya que la resistencia antimicrobiana impide la efectividad de los tratamientos con antibióticos y disminuye el número de medicamentos que pueden usarse contra la proliferación y el avance de los organismos patógenos, por ejemplo, en Noruega, *Vibrio salmonicida*, que causa la “vibriosis de agua fría” y *Aeromonas salmonicida* que causa la “furunculosis”, dos agentes infecciosos tratados con antibióticos, han desarrollado resistencia a diferentes drogas que se usan contra ellos (Sorum, 1998).

2.4.4. Tratamiento de enfermedades bacterianas

El método práctico y más común que se usa para tratar enfermedades bacterianas en especies en cultivo, es el agregar el medicamento directamente en el agua o mezclarlo en el alimento (Dehert *et al.*, 1993). Cuando los tratamientos se dan en el alimento puede que ocurra una sobrealimentación y los excedentes, que contienen el antibiótico, se depositan en el fondo de los estanques causando contaminación al medio. El tratamiento, por medio de baños, se recomienda en las primeras fases del

ciclo de vida de los organismos acuáticos, debido al alto costo al usar cantidades considerables de agua. Existe otra técnica de administrar medicamento y es por inyecciones (Pérez, 1982).

2.5. Enriquecimiento de *Artemia*

En los últimos años 30 años se ha utilizado la técnica de bioencapsulación, con *Artemia*, para incorporar diferentes sustancias, obteniéndose buenos resultados. La bioencapsulación es un proceso donde un organismo vivo incorpora en su cuerpo un determinado producto o agente bioencapsulante. De esta forma, dicho organismo se convierte en una cápsula viva. La naturaleza del agente bioencapsulante que se suministra puede variar dependiendo de los deseos del acuicultor y generalmente el proceso esta dirigido a la incorporación de algún elemento esencial para la dietas del depredador (Gelabert *et al.*, 1996 y Chérel y Nin, 1991). Los principales trabajos se han enfocado al enriquecimiento de *Artemia* con ácidos grasos y carotenoides (Nordeng y Bratland, 1971; Watanabe *et al.*, 1980; Leger *et al.*, 1986; Leger *et al.*, 1987; y Watanabe, 1991). Recientemente, se han empezado a utilizar algunos antibióticos como lo demuestran los trabajos de Mohny *et al.* (1990); Nelis *et al.* (1991); Chair *et al.* (1995); Chair *et al.* (1996); Gapasin *et al.* (1996); Touraki *et al.* (1999) y Majack *et al.* (2000).

Artemia, debido a sus características de alimentación, permite de una manera muy conveniente el manipular su composición bioquímica, por lo que se han desarrollado métodos simples para incorporar ácidos grasos en los nauplios de *Artemia* antes de ser ofrecidos a las larvas de sus depredadores. El método de bioencapsulación, también llamado enriquecimiento de *Artemia*, se ha aplicado extensamente en los peces marinos y criaderos de crustáceos para mejorar su salud, su color, su valor nutritivo y otro tipo de sustancias (Gelabert, 2003) (figura 7).

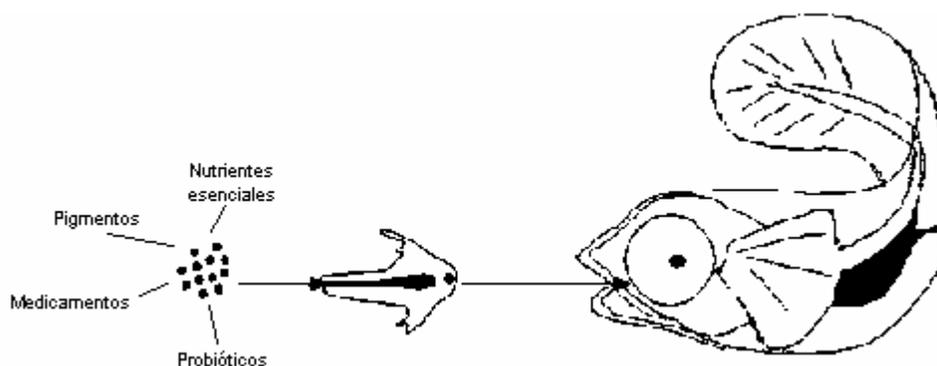


Figura 7. Diagrama esquemático del uso de *Artemia* como conductor de diferentes sustancias para alevines de peces en cultivo (tomado de Sorgeloos *et al.*, 1986).

En varios países, investigadores han desarrollado otros productos de enriquecimiento, como las algas unicelulares, las levaduras, las emulsiones, las dietas compuestas y las dietas microparticuladas.

Por otra parte, las técnicas de enriquecimiento con *Artemia*, varían de acuerdo al tiempo de enriquecimiento y a las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, pH). Mejores niveles de enriquecimiento cuando se utilizan emulsiones concentradas (fig. 8 y tabla 4).

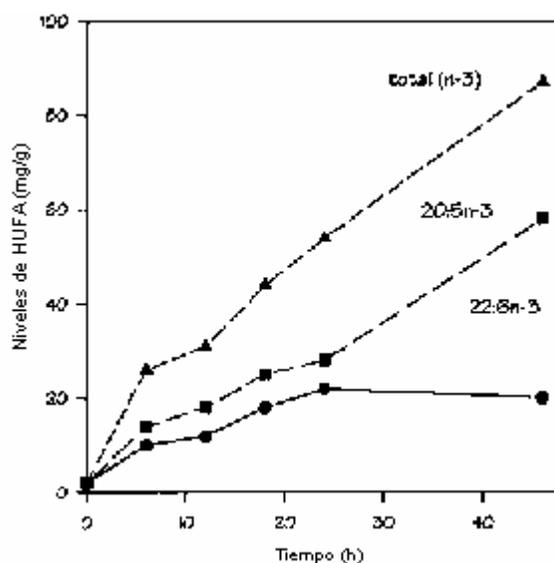


Figura 8. Niveles de HUFA en nauplios y metanauplios de *Artemia* del Gran Lago Salado (Utah, E.U.) enriquecidos con Selco® Premim (INVE Aquaculture NV, Bélgica) (Dhont *et al.*, 1991).

Tabla 4. Niveles de enriquecimiento (mg/mL peso seco) en nauplios de *Artemia* enriquecidos con diferentes productos.

	DHA	EPA (el ω -3)	HUFA
Selco excelente (INVE Aquaculture NV)	14.0	28.6	50.3
DHA Selco (INVE Aquaculture NV)	17.7	10.8	32.7
Superartemia (Catvis)	9.7	13.2	26.3
SuperHUFA (Torre de la Sal)	16.4	21.0	41.1

Tomado de Dehert *et al.* (1993)

El producto Selco es un complejo de fuentes de aceites marinos, vitaminas y carotenoides. Cuando se diluye en agua de mar se forman microglóbulos estables finamente dispersados, permitiendo que *Artemia* los ingiera rápidamente y que los niveles de HUFA superen los valores reportados normalmente (Léger *et al.*, 1986). Para enriquecer con esta emulsión, a los nauplios recién nacidos, éstos se colocan en un tanque de enriquecimiento, a una densidad de 100 a 300 nauplios/mL (en periodos de más de 24 h); el medio de enriquecimiento consiste en agua de mar desinfectada a 35 a 40 g/L de salinidad, a una temperatura de 25 °C. La emulsión de enriquecimiento normalmente se agrega en dosis consecutivas de 300 mg/mL cada 12 h con una aeración fuerte y constante, para mantener los niveles de oxígenos disueltos en 4 mg/mL y evitar altas mortalidades, los nauplios enriquecidos se cosechan después de 24 h (a veces aun después de 48 h), se enjuagan y se dan como alimento de forma inmediata a peces o crustáceos en cultivo ó se guardan en refrigeración por debajo de 10 °C, para minimizar el metabolismo posterior de la administración de los HUFA, ya que se ha observado que los niveles de HUFA se reducen entre un 0-30 % después de 24 h a los 10 °C (Gómez-Gil *et al.*, 2001).

Además de los ácidos grasos, otros nutrientes como las vitaminas y pigmentos pueden incorporarse en *Artemia*. Vitaminas solubles en lípidos (sobretudo la vitamina A y la E) se han reportado que pueden acumularse en *Artemia* en un corto tiempo (9 h). Los niveles de vitamina A se pueden incrementar desde valores de 1 IU/mg peso húmedo, hasta por arriba de 16 IU/mg, y los niveles de vitamina E de 20 µg/mg hasta aproximadamente 250 µg/mg. Recientemente también se han dirigido pruebas para incorporar ácido ascórbico en el alimento vivo (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Incorporación de antibióticos en *Artemia*

Es posible incorporar en nauplios de *Artemia* una dosis de 300 µg/g peso húmedo de una mezcla terapéutica 1:5 de Trimetoprim:Sulfamethoxazol. Tratamientos profilácticos y terapéuticos fueron probados, incorporando, en metanauplios de *Artemia*, previamente y después de una inoculación oral de la bacteria patógena *Vibrio anguillarum*, reduciendo la mortalidad de los organismos (Nelis *et al.*, 1991). Los niveles de enriquecimiento, así como la eficacia terapéutica, dependerán de los antibióticos usados. De hecho, el mismo procedimiento de enriquecimiento también puede usarse para incorporar y transferir vacunas a organismos acuáticos, y facilitando la vacunación oral.

Artemia puede acumular una gran variedad de quimioterapéuticos, como lo demuestran los trabajos de Verpraet *et al.* (1992) y Majack *et al.* (2000), y después, estos quimioterapéuticos pueden

transferirse al tejido de los organismos acuáticos en cultivo cuando ingieren *Artemia* con medicamento (Touraki *et al.*, 1996). Experimentos en larvas del pez *Dicentrarchus labrax* (L.) inoculados con *Vibrio anguillarum* han mostrado que mejora la sobrevivencia cuando se les ha suministrado nauplios de *Artemia* con antibióticos (Chair *et al.*, 1995; Gapasin *et al.*, 1996). Cao *et al.* (1996), utilizaron nauplios de *Artemia* con tres antibióticos: sulfadiazina, oxitetraciclina y eritromicina, y se dieron de comer a *Tilapia* sp. y a *Penaeus orientalis*, dando buen resultado en la transferencia del medicamento a los tejidos de estos organismos.

El uso de nauplios para incorporar antibióticos ha permitido mejorar la sobrevivencia en los primeros estadios de vida de peces y crustáceos en cultivo. Cuando se manejan fases juveniles y adultas en los cultivos, el nauplio de *Artemia* no resulta útil, porque las especies no lo distinguen con facilidad y, por lo tanto, el medicamento no es transferido, el uso de de las etapas juvenil y adulta de *Artemia* sería la solución al respecto para bioencapsular antibióticos.

Majack *et al.* (2000) mencionan que bioencapsular eritromicina (1 g/L) por un periodo de 12 h, permite a los adultos de *Artemia* incorporar el antibiótico al máximo y disminuye su mortalidad. Estos autores concluyen que la concentración de eritromicina en *Artemia* está en función de la concentración del antibiótico, en el medio donde se coloca este crustáceo, y en el tiempo, ya que cuando se utilizan concentraciones mayores de antibiótico, *Artemia* puede incorporarlo, pero la mortalidad aumenta.

El control de las enfermedades de forma profiláctica, se basa en el cuidado adecuado de los estanques, con secados periódicos, buenos fertilizantes que aseguren la producción de alimento natural, tener reproductores sanos para el cultivo y una alimentación adecuada, así como un estricto control de la sanidad de los peces introducidos (Alderman, 1988; Walliser *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1987; Nelis *et al.*, 1991; Hephher, 1991 y Pérez, 1982). Por otro lado, es importante apoyar prácticas que permitan minimizar o limitar el riesgo de tratamientos ineficaces en animales acuáticos cultivados. Por ejemplo, se deben realizar pruebas de sensibilidad antibiótica hacia los organismos patógenos, antes de prescribir un tratamiento que pueda llegar a producir resistencia antimicrobiana.

2.6. *Artemia franciscana*

Biología de *Artemia*

El crustáceo braquiópodo del género *Artemia* (Anostraca: Artemiidae) constituye un excelente alimento vivo, utilizado en la acuicultura, por su fácil manejo, sus características de desarrollo y pequeño tamaño, ya que puede ser adecuado para larvas, juveniles y adultos de crustáceos y peces (Sorgeloos *et al.*, 1986 y Tizol, 1994).

A lo largo del ciclo de vida de *Artemia* se pueden distinguir claramente cuatro estadios morfológicos de desarrollo: nauplio, metanauplio, pre-adulto y adulto. Este crustáceo ingiere el alimento ininterrumpidamente durante el proceso de natación mediante el constante movimiento de sus toracópodos. Los telopoditos dirigen las partículas alimenticias hacia un surco ventral, cuya función es canalizar una corriente de agua hacia el labrum. En el labrum, los elementos sólidos menores de 50 micras se adhieren a su superficie debido a la presencia de una sustancia pegajosa de revestimiento, para después ser removidos por las maxilas y dirigidas así hacia la boca, previa trituración mandibular (Sorgeloos *et al.*, 1986 y Vinatea, 1999) (fig.9 y 10).

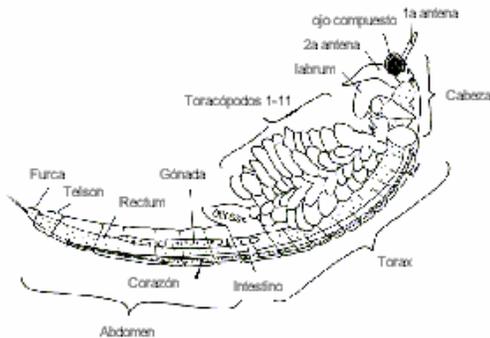


Figura 9. Diagrama esquemático de la morfología de una *Artemia*.

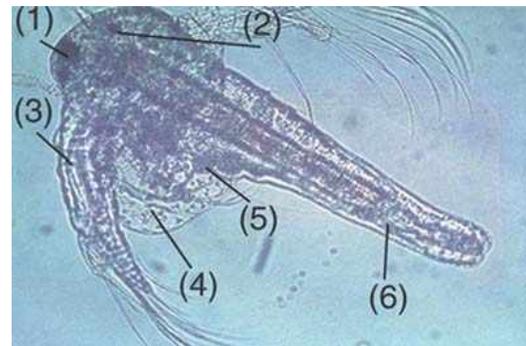


Figura 10. Fotografía de un metanauplio. 1. Ojo naupliar. 2. Antenas. 3 2ª antena. 4. Maxilas. 5. Labrum y 6. Tracto digestivo.

Tracto digestivo

El tracto digestivo de *Artemia* se encuentra libre en el hemocele y está cubierto por la hemolinfa. Existen pocas glándulas digestivas multicelulares. El tracto digestivo está dividido histológicamente en tres regiones: un estomodeo corto y vertical, seguido por un esófago que se encuentra a partir de la boca y formando un ángulo justamente cerca del mesentero o intestino medio y que se une a un corto proctodeo o intestino posterior (Schrehardt, 1987).

El esófago y el intestino posterior se encuentran rodeados por una capa muscular, circular y longitudinal y un músculo dilatador, mientras que el intestino medio se encuentra rodeado solamente por una capa de músculo circular. El epitelio del intestino medio consiste de células que tienen una forma cilíndrica ó cúbica con un borde en tipo de peine de forma conspicua, y se hayan separados por una membrana basal en donde se encuentra la capa del músculo circular. Las observaciones al microscopio indican que la secreción de sustancias se da más en el tracto digestivo medio anterior y la absorción en la parte posterior (Godelieve y Macrae, 2002).

Las células del intestino medio están cubiertas por largas micro vellosidades de un material finamente fibroso, probablemente de muco polisacáridos. La membrana apical de estas células están asociada a vesículas y el cuerpo citoplásmico fagolisosomal en cada una de las células sugiere la capacidad de una digestión intracelular (fig.11). Bajo las células epiteliales del intestino medio se encuentra la membrana basal, que en los adultos, esta compuesta de dos capas, una capa estriada que forma paquetes densos con gránulos gruesos, mezclada con material amorfo, adyacente a las células epiteliales y, la otra capa, que es exterior a la membrana basal, es delgada y orientada hacia el hemocele, compuesta de gránulos finos y pequeños (Kikuchi, 1972 y Schrehardt, 1987) (fig.12).

El intestino medio del nauplio y adulto son similares (Hootman y Conte, 1974). Una capa de glycocalyx, que encuentran en las micro vellosidades de otras regiones del tracto, se encuentran ausentes en el intestino medio del nauplio, pero en la membrana peritrófica posiblemente aparecen claramente como numerosas vesículas entre la micro vellosidades. Estas vesículas pueden representar la función de enzimas digestivas. Los fago-lisomas no se encuentran en el tracto digestivo del nauplio. Las células del intestino medio guardan pequeñas cantidades de glicógeno y lípidos. Muchas estructuras de mielina se encuentran en el intestino posterior del nauplio y la membrana basal esta formada de una sola capa.

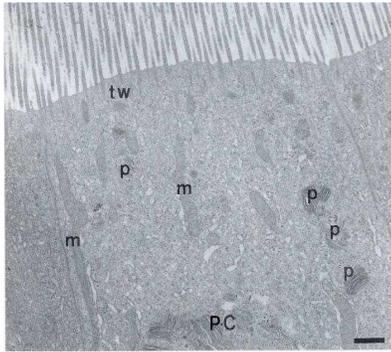


Figura 11. Fotografía por microscopio electrónico de la región apical de las células epiteliales del tracto digestivo medio. Bajo capa terminal (tw), mitocondria elongada (m), están orientados al eje microvelloso, pequeñas fagolisomas (p) van hacia el cuerpo citoplásmico fagolisosomal. Barra 1 μ m. (Tomado de Criel, 1991).

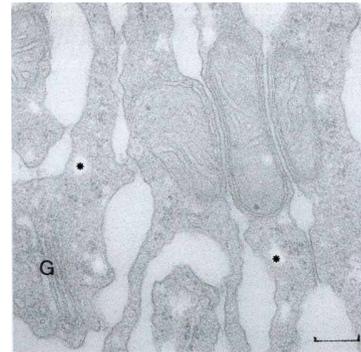


Figura 12. Microfotografía electrónica de la región basal de una célula epitelial en la parte distal del intestino medio. Se observa una especial asociación entre la mitocondria y los pliegues de la membrana del plasma. El aparato de Golgi (G); * son espacios claros de glicógeno durante la fijación y digestión intracelular. Barra: 200 nm. (Tomado de Criel, 1991).

Los paquetes fecales que se encuentran aún dentro del tracto digestivo de *Artemia* están rodeados por una membrana peritrófica muy semejante a la de los insectos (Reeve, 1963). Hansen y Peters (1998), determinaron que estas membranas en los metanauplios son altamente permeables a micro partículas de látex que tienen un diámetro de 70 nm, son menos permeables a las micro partículas de 130 nm y completamente impermeables a las que tienen un diámetro de 730 nm y los adultos presentan la misma permeabilidad de las membranas peritróficas de los metanauplios a las micropartículas.

III. ANTECEDENTES

El organismo *Artemia* es ampliamente reconocido como un alimento vivo que se utiliza ampliamente en los laboratorios de producción de postlarvas de camarón y de alevines de peces, porque presenta importantes propiedades alimenticias tales como: ácidos grasos y aminoácidos esenciales para las especies que se alimentan de él, además por la facilidad de tenerlo al alcance cuando se requiere, ya que por formar quistes, se pueden guardar por largos periodos (Sorgeloos *et al.*, 1986). Los nauplios de *Artemia* pueden obtenerse fácilmente a través de la eclosión de quistes (embriones dormantes). También, *Artemia* llega a la etapa adulta en poco tiempo (15 días), esta etapa puede proveer de mayor cantidad de biomasa y de nutrientes a las larvas de organismos acuáticos. No obstante que *Artemia* se utiliza ampliamente como alimento vivo, su valor nutricional, con respecto a la composición de los ácidos grasos no es la ideal para todos los organismos acuáticos en cultivo, como lo demuestran los trabajos de Leger *et al.* (1987) y Navarro *et al.* (1993 y 1999). Las larvas de peces y crustáceos marinos requieren del ácido graso poliinsaturado eicosapentanoico (EPA), 20:5 ω 2 y el ácidodocosahexanoico (DHA), 22:6 ω 3 para su desarrollo normal y su sobrevivencia. (Watanabe, 1991) y, aunque éstos están presentes, su cantidad es baja, especialmente el EPA en los nauplios y el DHA es prácticamente ausente; por esta razón, los nauplios deben ser enriquecidos antes de ser usados para alimentar larvas de camarones y alevines de peces marinos (Navarro *et al.*, 1999).

La técnica de enriquecimiento para los nauplios se realiza fácilmente, colocando los nauplios en un medio con una emulsión que contenga los ácidos grasos eicosapentanoico y docosahexanoico principalmente. Los nauplios se bañan y cubren con la emulsión y actúan como vectores de los ácidos grasos. Esta técnica de enriquecimiento también se le conoce con el término de bioencapsulación (Leger *et al.*, 1986). Bajo este procedimiento, los nauplios de *Artemia* han demostrado ser un buen alimento vivo en el éxito del cultivo de peces y crustáceos marinos.

Con el gran desarrollo de la acuicultura en los últimos años, las técnicas de cultivo se han mejorado y se manejan grandes densidades de organismos en espacios reducidos; esto ha permitido, por un lado, un incremento en la producción pero, por otro lado, se han presentado, con mayor frecuencia, enfermedades en los organismos en cultivo, provocando altas mortalidades. La principal causa de muerte de estos organismos es por medio de enfermedades bacterianas y virales, las cuales aparecen en los cultivos de organismos acuáticos, causando alta mortalidad y una pérdida económica importante para los acuicultores (Trust, 1986 y Alderman, 1988). Las enfermedades por bacterias, se deben principalmente a bacterias gram-negativas (Trust, 1986) y han sido tratadas aplicando

medicamentos antimicrobianos tanto en el agua del cultivo como en el alimento suministrado (Alderman, 1988; Samuelsen *et al.*, 1977). Debido a que los medicamentos son fáciles de perderse en el agua o en el alimento, se ha empleado *Artemia* en sus diferentes fases de desarrollo como transmisor de medicamentos, utilizando la técnica de bioencapsulación para combatir diferentes enfermedades por bacterias.

Nelis *et al.* (1991) determinaron la incorporación de los antibióticos Trimetoprim y Sulfametoxazol en *Artemia franciscana* a través de la técnica de cromatografía líquida, donde encontraron que los intervalos máximos de absorción fueron de 271 nm para Trimetoprim y 269 nm para Sulfametoxazol, correspondiendo a concentraciones de 1 a 8 µg/mL para Trimetoprim y 2.7 a 21.4 µg/mL para Sulfametoxazol. Además, obtuvieron concentraciones aproximadas en peso seco de *Artemia* de 34 a 266 µg/mL para Trimetoprim y de 99 a 713 µg/mL para Sulfametoxazol. Verpraet *et al.* (1992) incorporaron una mezcla terapéutica de los antibióticos Trimetoprim:Sulfametoxazol a nauplios de *Artemia* y a rotíferos de la especie *Branchionus plicatilis*, y obtuvieron valores para nauplios de 790 mg/kg y para rotíferos valores hasta de 116 mg/kg, después de seis horas de enriquecimiento.

Aguilar-Aguila *et al.* (1994) incorporaron en nauplios de *Artemia franciscana* la droga Romet-30, empleando concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/mL, en periodos de 2, 4, 6 y 8 h; y señalan que mientras mayor sean la dosis y el tiempo de incorporación, mayor será la concentración obtenida dentro del tracto digestivo de los metanauplios, alcanzando valores desde 0 hasta 9 mg/mL. Dixon *et al.* (1995b), también llevaron la incorporación de sarafloxacino en nauplios y además utilizaron *Artemia franciscana* adulta y determinaron el tiempo óptimo de enriquecimiento para los nauplios es de 6 h a una concentración de sarafloxacino al 15%; y en adultos, la bioencapsulación fue lograda a las 24 h en la misma concentración.

Touraki *et al.* (1999) incorporaron en nauplios de *Artemia* el antibiótico Trimetoprim, Sulfametoxazol y N-acetyl-sulfametoxazol, determinando que el tiempo óptimo de enriquecimiento es de 8 h a temperatura de 5 °C, y señalan que al aumentar la temperatura se observa una disminución del contenido terapéutico en nauplios. Bajo estas condiciones se reportó una sobrevivencia de 97.47% y una concentración alcanzada de 238.76 µg/mL en peso seco de *Artemia* para trimetoprim y de 568.50 µg/mL en peso seco para sulfametoxazol. Gómez-Gil *et al.* (2001) realizaron la estandarización de la bioencapsulación de los antibióticos enrofloxacino y oxitetraciclina en nauplios de *Artemia franciscana*, y determinaron que se necesita como mínimo 4 h para el enriquecimiento total de ambos antibióticos y se obtuvieron concentraciones de 6.844 µg/mL para enrofloxacino y 9.380 µg/mL para oxitetraciclina.

Gelabert (2001) elaboró un estudio acerca de las influencias de la concentración de partículas en el proceso de enriquecimiento, estableciendo que un incremento en el llenado del aparato digestivo se presenta al aumentar la concentración de partículas en el medio, además establece que concentraciones de 12,500 partículas/mL llenan el tracto digestivo de individuos que miden 3.2 mm en 1 h de tratamiento; mientras que concentraciones de 200,000 y 400,000 partículas/mL permiten el llenado total de individuos de 5.6 mm en 1 h.

Aunque la mayoría de los trabajos que se registran sobre encapsulación o enriquecimiento han sido realizados con nauplios; son escasos los trabajos con *Artemia* adulta incorporando medicamentos, dentro de éstos está el de Majack *et al.* (2000), quienes incorporaron eritromicina en esta fase de *Artemia franciscana*, registrando concentraciones de 5.8 ± 0.5 µg/mL de eritromicina/mL durante un periodo de enriquecimiento de 3 h; sin embargo, la máxima concentración se registró después de 12 h de enriquecimiento alcanzando valores de 177.0 ± 30.8 µg/mL eritromicina/. Otro trabajo con adultos de *Artemia* es el de Cook y Rust (2002), los cuales incorporaron cinco formas químicas de eritromicina: fosfato de eritromicina (EP), estearato de eritromicina (ES), estolato de eritromicina (EE), hidrato de eritromicina (EH) y eritromicina cristalina (CE), encontrando un 100% de sobrevivencia de *Artemia* con EP con una concentración baja del medicamento (16.4 a 33.4 µg/mL); mientras que utilizando EE se obtuvieron concentraciones entre 67–79 µg/mL y una sobrevivencia de 67 a 75 %, siendo esta presentación la más efectiva.

El método de bioencapsulación, no sólo se ha utilizado para incorporar medicamentos en *Artemia* sino también ha sido probado en otros organismos. Göksan y Gökpinar (2001) incorporaron en el rotífero *Brachionus plicatilis* oxitetraciclina y flumequina en diferentes dosis: 25, 50, 100 y 200 ppm para cada uno, alcanzando concentraciones de antibiótico de 125, 250, 500, 750 y 1000 mg/mL para flumequina; mientras que para oxitetraciclina se registraron concentraciones de 1,250, 2,500, 5,000, 7,500 y 1,0000 mg, de acuerdo a estos resultados se determinó que oxitetraciclina es más efectiva que flumequina, debido a que se disuelve mejor en el agua. Además, Katharios *et al.* (2005), usaron los huevos del nematodo *Nereis virens* y les agregaron oxitetraciclina con buenos resultados para tratar enfermedades del pez lenguado *Solea solea*.

Por otro lado, por las características morfológicas y fisiológicas de *Artemia*, es posible enriquecerla con otras sustancias, como el trabajo de Stewart *et al.* (2001), quienes incorporaron en nauplios de *Artemia*, la hormona 17β -estradiol y 17α -metildihidrotestosterona, y posteriormente dar estos nauplios

a peces para lograr su reversión sexual. La concentración de hormona incorporada en nauplios fue de 461 ± 40 ng de 17β -estradiol/mg de peso seco y para 17α -metildihidrosterona fue de 546 ± 31 ng/mg.

Incorporar medicamentos en el alimento vivo, ha demostrado ser una técnica viable para tratar enfermedades en los sistemas de cultivo, pero el uso indiscriminado de los antibióticos puede promover el desarrollo de la resistencia bacteriana en los organismos en cultivo (Alderman y Hastings, 1998; Brown, 1989; Bjorklund *et al.*, 1991; Angulo, 2000; Sahul-Hameed y Balasubramanian, 2000; Smith *et al.*, 2002). Por otro lado, el alimento vivo puede llegar a ser un transmisor e introducir cierto tipo de patógenos en los estanques de cultivo de larvas de crustáceos y alevines de peces, causando enfermedades y altas mortalidades, como lo señalan los trabajos de Tatani *et al.* (1985); Muroga *et al.* (1987); y Nicolas *et al.* (1996). Existen estudios por Richards *et al.* (1991) y Spanggaard *et al.* (2001), que reportan la resistencia bacteriana en peces cultivados, tanto de agua dulce y marina como de agua fría y agua templada.

Sahul-Hameed y Balasubramanian (2000), determinaron la resistencia bacteriana a cinco antibióticos, obteniendo que más del 60 % de las bacterias aisladas de nauplios de *Artemia* fueron resistentes a la eritromicina, nitrofurazona y oxitetraciclina, además estos autores mencionan que en concentraciones altas de cloranfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina, formaldehído e hipoclorito de sodio, los nauplios presentan altas mortalidades. Goñi-Urriza *et al.* (2000), determinaron la resistencia de *Aeromonas spp* a 19 antibióticos y cuatro asépticos. En cuanto a la resistencia de las bacterias, los antibióticos que presentaron mayor resistencia fueron Ampicilina con un 99 %, Cefalotina 93 % y Sulfametoxazol 90 %. Halling-Sorensen *et al.* (2000), realizaron una evaluación de los riesgos ambientales de los antibióticos mecilinam, trimetoprim y ciprofloxacino, determinando que mecilinan y ciprofloxacino son fácilmente degradables en el sedimento, y son altamente tóxicos para la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*. Kümmerer (2003), menciona que el uso excesivo de antimicrobianos en hospitales, agricultura y ganadería vacuna, porcina y avícola, han traído como consecuencia casos de resistencia bacteriana, estableciendo que el 50% de los antibióticos son aplicados en medicina veterinaria y como promotores del crecimiento. Este autor menciona que algunos de los principales antibióticos encontrados son las quilonas tales como ciprofloxacino, sulfonamidas, roxitomicin, dihidrato de eritromicina y otros. Cabello (2003), establece que los antibióticos en acuicultura pareciera que se usan para corregir las deficiencias higiénicas de prácticas de cultivo inadecuadas y para prevenir potenciales enfermedades bacterianas de peces y menciona que fenómenos genéticos básicos de mutación y de transmisión de material genético entre bacterias son los responsables de la aparición de resistencia en la flora

bacteriana y concluye que el uso de antibióticos en acuicultura puede producir alteraciones en la ecología marina y en las poblaciones bacterianas, capaces de generar y transmitir al humano y a los animales acuáticos, bacterias resistentes a los antibióticos.

IV. HIPÓTESIS

Para obtener buenas producciones en la acuicultura, en años recientes, se han desarrollado nuevos modelos de cultivo de organismos acuáticos, el tipo de cultivo intensivo es el que confina mayor cantidad de organismos en un espacio y con mejor control de los factores bióticos y abióticos que intervienen; no obstante, este tipo de cultivo tiene desventajas, entre ellas se tienen a las enfermedades que causan altas mortalidades, sobretodo en los sistemas cerrados de cultivo. En la actualidad, se cuentan con una gran variedad de productos comerciales para controlar distintos tipos de enfermedades, las vías de administración de estos productos son: oral, baños y algunas veces, por inyección del medicamento a los organismos. En el caso de la administración oral, el medicamento se puede incorporar con el alimento, aunque tiene desventaja de que puede no ser consumido por todos los organismos o que el medicamento se pierda por lixiviación en el agua; en el caso de que el medicamento se agregue en el agua, los problemas de contaminación están presentes al hacer recambio de agua en los estanques y ésta se vierte en los ríos, lagunas o al mar, provocando que se creen cepas de bacterias resistentes a estos medicamentos. Cuando el medicamento se administra por baño o inyectados, surge el problema de estrés en los peces debido al manejo que se les da y a veces llegan hasta la muerte, además, estos dos tratamientos resultan complejos, ya que se requiere de mayor esfuerzo y tiempo para aplicarlos.

Teniendo en cuenta lo anterior, surge la pregunta ¿qué método sería el adecuado para tratar enfermedades en organismos acuáticos sin causar un desperdicio en el uso del medicamento en el agua, sin contaminar el ambiente y sin ocasionar altas mortalidades?, para tratar de responder esta pregunta y tomando en cuenta el conocimiento que se tiene sobre la utilización del alimento vivo como transportador o conductor de sustancias, en este caso, de medicamentos, permite exponer la siguiente hipótesis:

Al incorporar antibióticos a nauplios, metanauplios, juveniles y adultos *Artemia franciscana*, su efecto inhibitorio permanece para combatir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar en las etapas de desarrollo de *Artemia*: nauplio, metanauplio, juvenil y adulto la actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos para inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*, mediante la técnica de bioencapsulación.

5.1. Objetivos particulares

Determinar *in vitro* la actividad antimicrobiana de Ciprofloxacino, Nitrofurantoina y Cloranfenicol para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

Valorar el tiempo de incorporación de los antibióticos mediante la técnica de bioencapsulación, en las etapas de desarrollo seleccionadas de *Artemia*.

Determinar *in vitro* el efecto de cada antibiótico incorporado en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia* para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*.

Evaluar bajo diferentes técnicas de extracción la presencia de los antibióticos en: el medio de bioencapsulación, en el tracto digestivo y las heces fecales de *Artemia* y su efecto antimicrobiano.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Organismos

6.1.1. *Artemia franciscana*

La especie utilizada fue *Artemia franciscana*. Para obtener los nauplios se siguió el siguiente procedimiento: a los quistes se les removió el corion empleando la técnica de descapsulación descrita en Sorgeloos *et al.* (1986) y modificada por Castro y De Lara (1991). Los huevos ya sin el corion se colocaron en un recipiente de vidrio de 3.8 L de capacidad, con 3 L de agua a 40 g/L de salinidad, con aereación constante y con temperatura controlada ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Después de 24 h, todos los nauplios se cosecharon, se lavaron con agua dulce y se colocaron en un recipiente cilíndrico de plástico con capacidad de 200 L en 160 L de agua a 60 g/L de salinidad, con aeración constante, a una densidad de 1 org/mL. Con esta densidad se inició el cultivo de *Artemia*, al cual se suministró 50 mL c/día de salvado de arroz durante los primeros cinco días de vida de los organismos y luego 2 L c/día de microalgas *Tetraselmis* sp y *Chlorella* sp. en relación 1:1 hasta alcanzar los estadios de desarrollo requeridos en los experimentos de incorporación de antibióticos.

6.1.2. *Aeromonas hydrophila*

La bacteria empleada en este trabajo fue *Aeromonas hydrophila* Stainer, 1943 ATCC 7966, proporcionada por el cepario de bacterias de la Facultad de Química de la UNAM (octubre 2003), con las indicaciones específicas de la cepa: temperatura de cultivo $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; morfología: bacilos gram (-), sin agrupación; forma: redonda; color: crema; consistencia: suave. De acuerdo a la técnica descrita por Gherna (1994), la bacteria se mantuvo en refrigeración ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para su utilización, la cepa se descongeló manteniéndola a temperatura ambiente (24 h), y para verificar su viabilidad se puso en un medio líquido de Soya-Triptocaseína (TSB, Bioxon, México) y se incubó durante 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se revisó su movilidad con la ayuda de un microscopio.

6.2. Medicamentos

Para seleccionar los antibióticos se llevó al cabo un antibiograma con 39 antibióticos, de los cuales, tomando en cuenta su acción inhibitoria a la bacteria *Aeromonas hydrophila*, y formando halos de inhibición mayores de 10 mm y a la facilidad de obtenerlos en el comercio se seleccionaron tres de ellos, ya fuera en forma base (pura) o en cápsulas: Cloranfenicol (antibiótico base), Nitrofurantoína (Macrofantina®, cápsulas 50 mg) y Ciprofloxacino (Ciprofloxx®, cápsulas de 250 mg).

6.2.1. Curva estándar de calibración del antibiótico vs halo de inhibición

Para cada antibiótico, se realizó una curva de calibración para determinar la relación entre el diámetro del halo de inhibición y la concentración del antibiótico. Esta relación se utilizó para calcular la cantidad apropiada de antibiótico para incorporar en los diferentes estadios de desarrollo de *Artemia*. Para hacer la curva de calibración de la concentración de los antibióticos, primero se pesaron los sensidisos (6 mm de diámetro) con cada uno de los tres antibióticos seleccionados (cloranfenicol 30 µg, nitrofurantoina 300 µg y ciprofloxacino 5 µg). Los sensidisos se cortaron a la mitad, y una de las mitades se cortó nuevamente a la mitad para así obtener tres partes, después cada una se pesó en una balanza analítica (*com. pers.* Dr. H. Sandoval, 2003). Para obtener los halos de inhibición de cada parte del sensidisco, se colocaron estas tres partes en cajas de Petri que contenían un medio de agar soya tripticaseína (TSBA) y un 1 mL de caldo de bacteria. Las cajas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midió el halo de inhibición con la ayuda de un Vernier. Este proceso se hizo por triplicado.

La curva de calibración se realizó tomando en cuenta el valor de la concentración de cada parte del sensidisco y se contrastó contra el área de halo de inhibición. La regresión lineal entre estos dos valores se expresó bajo la fórmula y (concentración) = $a \times$ (área de inhibición) + b ; donde el valor de a es la pendiente de la curva, y b es la intercepción. Para evitar cualquier error en los datos, con la ayuda de la herramienta estadística de Excell se procedió a llevar la recta a la intercepción al valor de cero. La estimación de la concentración de los antibióticos obtenidos en cada uno de los bioensayos se realizó de acuerdo a esta fórmula.

6.3. Tiempo de incorporación de los antibióticos en *Artemia*

Para determinar el tiempo de incorporación de los antibióticos (Cloranfenicol, Nitrofurantoina y Ciprofloxacino) en el cuerpo de los nauplios y en el tracto digestivo de metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia*, se pesó 1 g de Cloroanfenicol, 250 mg de Ciprofloxacino (una cápsula) y 100 mg de Nitrofurantoina (dos cápsulas); cada concentración de antibiótico, se colocó en 500 mL de agua a 40 g/L de salinidad, se disolvió y se filtró a través de un tamiz de 53 micras. En cada solución con antibiótico se colocaron por separado 1,000 metanauplios, 100 organismos en etapa juvenil y 100 en etapa adulta. Los organismos se observaron al microscopio cada 20 minutos para determinar el tiempo que se requería para que más del 90% tuvieran el tracto digestivo lleno con los medicamentos.

6.4. Técnicas de extracción para identificar la presencia de antibiótico

6.4.1. En el agua

Para determinar si los antibióticos cloranfenicol, nitrofurantoina y ciprofloxacino no perdían su acción inhibitoria en el agua, se tomaron 1.5 mL del agua de la solución con medicamento y se colocaron en dos tubos Ependorff de 1.5 mL y se centrifugaron a 15,000 rpm durante dos minutos. Tres cajas de Petri (9 cm diámetro) por antibiótico, se llenaron con medio TSBA y 1 mL de la bacteria *A. hydrophila*. Con la ayuda de un tubo de vidrio de 6 mm de diámetro se hicieron dos horadaciones (pozos) en cada caja de Petri. De las muestras centrifugadas de los tres antibióticos se tomó todo el precipitado y el sobrenadante y se colocaron por separado en los pozos de las cajas. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición.

6.4.2. En el tracto digestivo

Para determinar la presencia del antibiótico en el tracto digestivo de *Artemia* se realizó la extracción del antibiótico incorporado en 30 organismos adultos para cada antibiótico y el testigo, a éstas se les aplicó la técnica de incorporación descrita en el punto para determinar el tiempo de incorporación, se trituraron y se colocaron en tubos Ependorff. Cada tubo se centrifugó durante 2 minutos en una microcentrífuga a 15,000 rpm. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante, y al precipitado se le agregó como solvente, 1 mL de butanol para ciprofloxacino y cloranfenicol, para la

nitrofurantoina y el testigo fue 1 mL de hexano. Los tubos Ependorff se agitaron hasta que el precipitado se diluyó en el solvente. Ya disuelto, se centrifugó durante 2 minutos a 15,000 rpm, el sobrenadante se retiró y se colocó en otro tubo Ependorff. A los precipitados se les agregó 0.5 mL de los solventes indicados para cada uno de los antibióticos y se agitaron y centrifugaron bajo el mismo procedimiento anterior; el sobrenadante obtenido se colocó en el tubo Ependorff que contenía la primera muestra de sobrenadante. Este último procedimiento se realizó por segunda vez para disolver cualquier residuo de materia orgánica. Después, cada muestra se secó con gas nitrógeno, hasta que el solvente quedara eliminado de la muestra. El producto del proceso en cada tubo Ependorff se disolvió nuevamente y el producto se colocó en los pozos de las cajas de Petri con medio TSBA y con bacteria *A. hydrophila* (vaciado en placa). Las cajas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición con la ayuda de un Vernier.

6.4.3. En las heces fecales

Para determinar si en los productos de desecho de *Artemia* existía antibiótico, se tomaron 100 organismos adultos para cada antibiótico y el testigo. El antibiótico se incorporó el tiempo suficiente en que el tracto digestivo comenzó a vaciarse. Se tomaron las heces fecales con la ayuda de pipetas Pasteur, se tomaron los paquetes de desecho que produce *Artemia*, se filtraron y lavaron con agua dulce y se colocaron en tubos Ependorf. Se agregaron 2 mL del solvente mencionado para cada antibiótico para eliminar la materia orgánica y dejar únicamente el antibiótico. Lo que quedó de muestra en cada tubo Ependorf se colocó en los pozos de las cajas de Petri con medio TSBA con bacteria *A. hydrophila* (vaciado en placa). Las cajas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición.

6.5. Prueba de pH dentro del tracto digestivo de *Artemia*

Para determinar si el pH dentro del tracto digestivo de *Artemia*, pudiera inhibir la acción de los antibióticos, se procedió a realizar una prueba con el indicador celulosa+verde de bromocresol. Para esta determinación se tomaron 100 organismos (50 juveniles y 50 adultos) y se colocaron en un vaso de precipitado de 1,000 mL, con agua a 40 g/L de salinidad, se agregó el indicador celulosa+verde de bromocresol hasta que la solución se tornó azul oscuro. Para mantener el indicador en suspensión, se tuvo aeración constante. Cada 15 minutos se tomaron cinco organismos de cada estadio y se revisaron al microscopio hasta observar un cambio de color en el tracto digestivo. Si el color del tracto

se tornaba amarillo, indicaba un pH ácido, el cual degrada la acción antimicrobiana; si era azul el pH era básico.

6.6. Pruebas de incorporación en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia*

6.6.1. Nauplios y metanauplios

Para el bioensayo con nauplios, se colocaron 5,000 organismos (10 org/mL) en un vaso de precipitado con 500 mL con agua a 40 g/L de salinidad, a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) y aeración constante, esto proceso se hizo para cada antibiótico. En cada vaso se agregó el antibiótico en las concentraciones antes señaladas. Tomando en cuenta que un nauplio no puede ingerir partículas, se les dejó en la solución durante 4 h para que se impregnara su cuerpo con el medicamento, todos los nauplios se filtraron y se lavaron con agua dulce y se trituraron en un mortero.

En cajas de Petri con medio TSBA y con 1 mL del inóculo de bacteria, se hicieron cuatro pequeñas excavaciones (pozos), uno para cada antibiótico y uno para el testigo. Posteriormente se colocó, en cada pozo, 1 mL del triturado de nauplios. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midieron los halos de inhibición.

Para realizar el bioensayo con la etapa de desarrollo de metanauplio, se utilizaron organismos de 48 h después de haber nacido. Dejándolos en la solución con el medicamento para que el 90% o más de los organismos tuvieran el tracto digestivo lleno. El procedimiento de incorporación y determinación del efecto del antibiótico ante la bacteria fue el mismo que se siguió con los nauplios.

6.6.2. Juveniles y adultos

Para realizar los bioensayos con estas dos etapas de desarrollo se tomaron del cultivo 200 organismos juveniles (de 10-12 días de nacidos) y se colocaron en vasos de precipitado de 1 L con 500 mL de agua a 40g/L de salinidad, esto se hizo para cada antibiótico; los organismos se dejaron 24 h sin ningún alimento y transcurrido este tiempo se incorporó cada uno de los antibióticos en las concentraciones ya mencionadas. Cuando el 90% de los organismos tuvieron el tracto digestivo lleno, se sacaron de la solución, se lavaron con agua dulce y se hicieron cinco grupos de 5, 10, 15, 25, 50

individuos y el testigo. Cada grupo se colocó en un mortero y se trituró. Para determinar el halo de inhibición en esta etapa de desarrollo se siguió la misma técnica que para nauplios y metanauplios.

Para los bioensayos con la etapa adulta (>15 días de haber nacido), el procedimiento de incorporación y determinación del efecto del antibiótico ante la bacteria fue el mismo que se siguió con los juveniles.

Cabe señalar que todos los bioensayos de incorporación del antibiótico se realizaron en un área estéril y se tuvo cuidado de que todo el material estuviera esterilizado.

6.7. Análisis estadístico

Para realizar la curva de calibración de los antibióticos, a los datos obtenidos se les aplicó una regresión lineal. La curva estándar se realizó por triplicado para confirmar que no existían diferencias significativas entre ellas.

VII. RESULTADOS

7.1. Curvas de calibración de los antibióticos

En la tabla 5 se muestran los resultados de la determinación de la inhibición de cada uno de los antibióticos tomando en cuenta el tamaño del sensidisco (1, ½ y ¼). En la figura 13 se pueden observar los halos de la inhibición del crecimiento bacteriano en las cajas de Petri, una para cada antibiótico. En la figura 14 se muestra la curva estandarizada de la concentración de cada antibiótico contra el área de inhibición del crecimiento bacteriano de *A. hydrophila* en cada uno de los bioensayos. La curva de calibración para cada antibiótico fue lineal ($R^2=0.9944$ para cloranfenicol; $R^2=0.9616$ para ciprofloxacino; y $R^2=0.9721$ para nitrofurantoina) y, la relación entre la concentración de cada antibiótico contra el área de inhibición se expresa bajo la fórmula: $Y=3.1912X+5E-14$ para cloranfenicol; $Y=24.517X+2E-13$ para ciprofloxacino; y $Y=0.2832X-6E-14$ para nitrofurantoina. Con estos valores, se calculó la concentración alcanzada de cada uno de los antibióticos incorporados en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana*.

Tabla 5. Determinación del área de halo de inhibición en los tres diferentes antibióticos, tomando en cuenta 1, ½ y ¼ del sensidisco.

Antibiótico	Sensidisco	Peso (gr)	Diámetro del halo de Inhibición (mm)	Área de halo de inhibición (mm ²)	Concentración de antibiótico (µg/mL)
Cloranfenicol	1	0.00860	11.2	98.52	30.0
	½	0.00238	6.8	36.32	8.3
	¼	0.00100	6.3	31.17	3.5
Ciprofloxacino	1	0.00661	12.7	126.68	5.0
	½	0.00233	10.2	81.71	1.8
	¼	0.00190	6.6	34.73	1.4
Nitrofurantoina	1	0.00858	10.0	79.33	300.0
	½	0.00360	9.1	65.04	125.9
	¼	0.00292	6.2	41.28	102.1

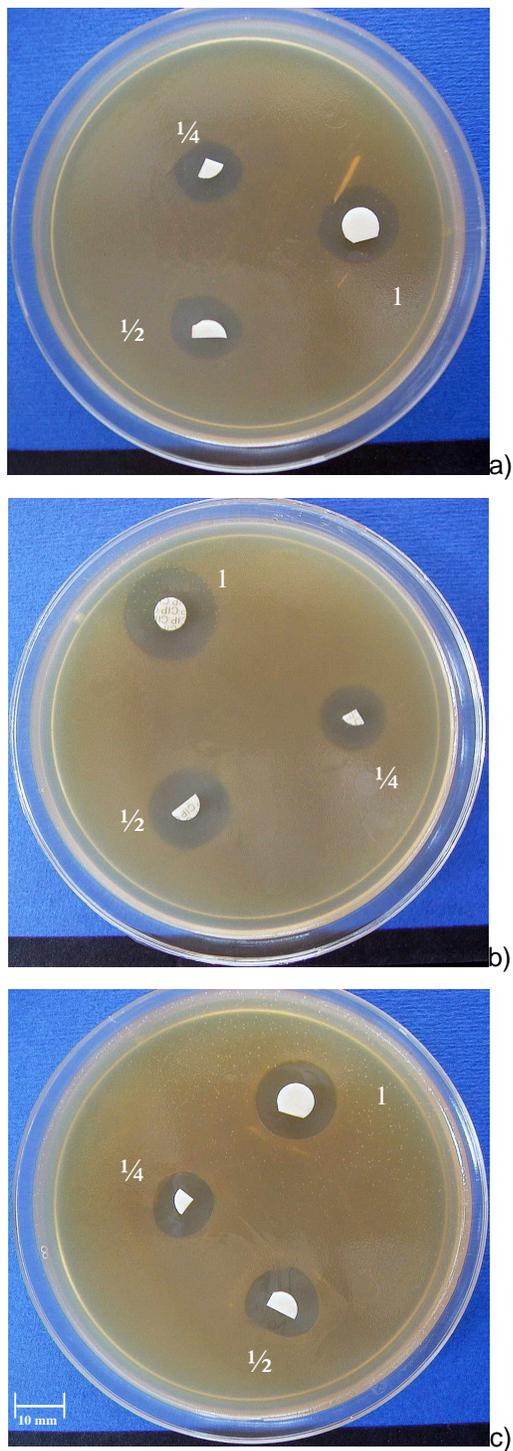


Figura 13. Fotografía de las cajas de Petri mostrando los halos de inhibición de cada uno de los antibióticos. a) cloranfenicol; b) ciprofloxacin y c) nitrofurantoina.

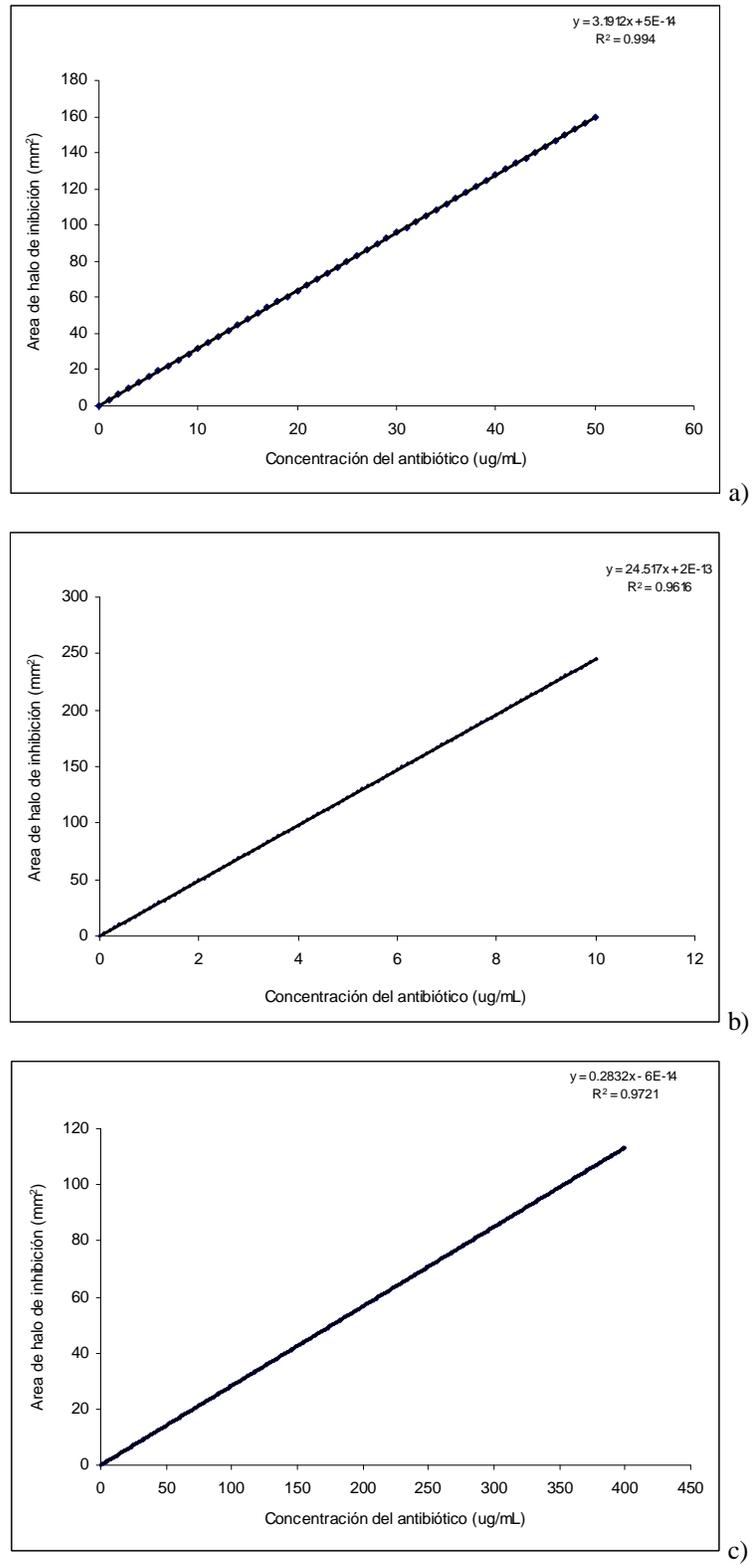


Figura 14. Curvas de calibración del área de inhibición contra la concentración de los tres antibióticos: a) Cloranfenicol; b) Ciprofloxacino; y, c) Nitrofurantoina.

7.2. Técnicas de extracción para identificar la presencia de antibiótico

7.2.1. En el agua

En el sobrenadante se presentaron halos de inhibición, encontrando que el antibiótico cloranfenicol fue el que presentó el diámetro de halo más grande (13.75 ± 1.77 mm) con respecto a los otros dos antibióticos, alcanzando una concentración de $46.53 \mu\text{g/mL}$ (tabla 6). En el precipitado, tanto el ciprofloxacino y la nitrofurantoina, dieron halos de inhibición de 18.55 y 18 mm respectivamente, incrementando sus valores de concentración de antibiótico de $6.67 \mu\text{g/mL}$ para el ciprofloxacino y de $621.2 \mu\text{g/mL}$ para la nitrofurantoina. El cloranfenicol disminuyó su valor en $11.53 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 6.- Valores de los diámetros y áreas de los halos de inhibición y concentración de los tres antibióticos en el sobrenadante y el precipitado del medio de enriquecimiento en la prueba de extracción.

Sobrenadante

Antibiótico	Diámetro de halo de inhibición (mm) Primera Prueba	Diámetro de halo de inhibición (mm) Segunda Prueba	Media	Área de halo de inhibición (mm^2)	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol	15	12.5	13.75 ± 1.77	148.49	46.53
Ciprofloxacina	10	13.3	11.65 ± 2.33	106.60	4.35
Nitrofurantoina	10	N.D.	10	78.54	277.33

Precipitado

Antibiótico	Diámetro de halo de inhibición (mm) Primera Prueba	Diámetro de halo de inhibición (mm) Segunda Prueba	Media	Área de halo de inhibición (mm^2)	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol	12	11.8	11.92 ± 0.11	111.69	35
Ciprofloxacina	19	18.1	18.55 ± 0.64	270.26	11.02
Nitrofurantoina	18	N.D.	18	254.47	898.55

Nota: N.D.= No detectado

7.2.2. En el tracto digestivo

Los resultados que se obtuvieron en la prueba de extracción de los antibióticos en el intestino de *Artemia* demuestran que el antibiótico se encuentra activo dentro del tracto digestivo, ya que en los tres antibióticos los halos de inhibición tuvieron valores medios por arriba de 14 mm de diámetro. El ciprofloxacino alcanzó el valor medio más alto con 19.5 ± 0.71 mm que corresponde a $12.18 \mu\text{g/mL}$ del antibiótico (tabla 7 y fig. 15). Tanto en la primera como en la segunda prueba, los tres antibióticos presentaron valores altos de la concentración del antibiótico dentro del tracto digestivo.

Tabla 7. Valores del diámetro, área y concentración de antibiótico alcanzado en el tracto digestivo de *A. franciscana* en la prueba de extracción

Antibiótico	Diámetro de halo de inhibición (mm)	Área de halo de inhibición (mm ²)	Concentración del antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol			
Primera prueba	23	415.48	130.20
Segunda prueba	14	153.94	48.24
Media \pm D.E.	18.50 ± 6.36	268.80	84.23
Ciprofloxacino			
Primera prueba	20	314.16	12.81
Segunda prueba	19	283.53	11.56
Media \pm D.E.	19.50 ± 0.71	298.65	12.18
Nitrofurantoina			
Primera prueba	19	283.53	1,001.17
Segunda prueba	10	78.54	277.33
Media \pm D.E.	14.50 ± 6.36	165.13	588.03

7.2.3. En las heces fecales

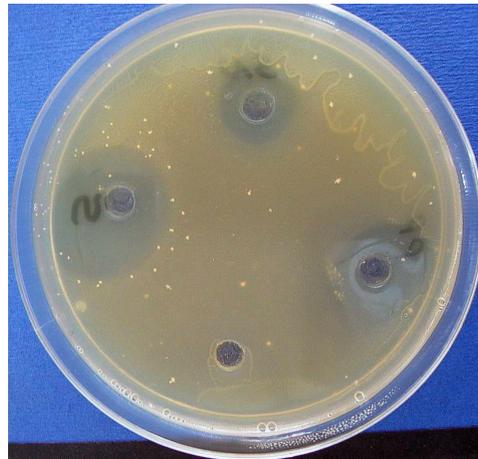
En los “pellets” de desecho de *Artemia*, se encontraron valores del diámetro de halo de inhibición por arriba de los 20 mm en los tres antibióticos, la concentración de los antibióticos en las heces fecales es alta (tabla 8 y fig. 16).

Tabla 8. Valores del diámetro y el área de los halos de inhibición y concentración de los tres antibióticos en las heces fecales en la prueba de extracción.

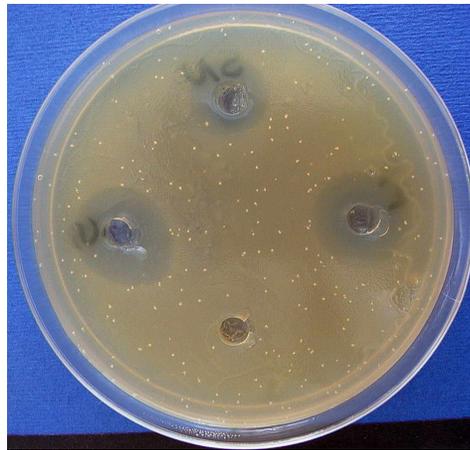
Antibiótico	Diámetro de halo de inhibición (mm)	Área de halo de inhibición (mm ²)	Concentración del antibiótico (µg/mL)
Cloranfenicol	34.2	918.64	287.87
Ciprofloxacino	25.0	490.88	20.02
Nitrofurantoina	21.3	356.33	1,258.23

7.3. Prueba de pH dentro del tracto digestivo de *Artemia*

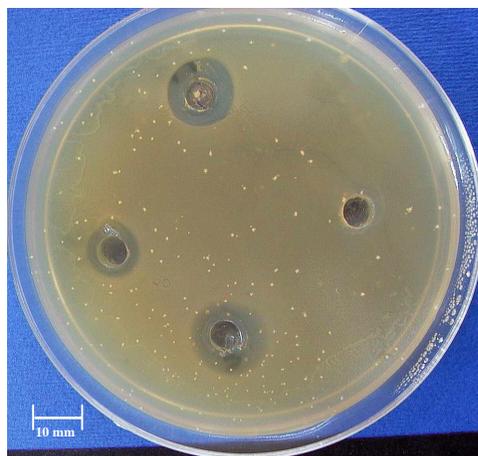
Al agregar el indicador de celulosa + verde de Bromocresol al agua donde se encuentra la solución de enriquecimiento de *Artemia*, el medio tornó a una coloración azul, indicando que el pH es básico. Cuando los organismos se colocaron en este medio y éste fue incorporado en el tracto digestivo, no se observó ningún cambio a color amarillo, indicando que el pH interno no es ácido, lo que se traduce en que no se inhibe la acción del antibiótico en el tracto digestivo dentro de los organismos (fig. 17).



a)

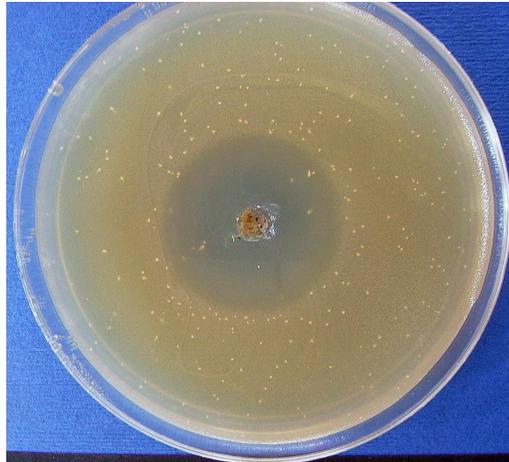


b)



c)

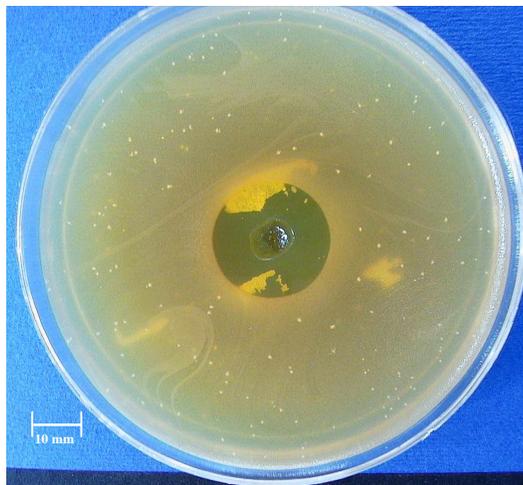
Figura 15. Prueba de extracción en el tracto digestivo de *Artemia* para determinar los halos de inhibición. a) cloranfenicol, b) ciprofloxacino y c) nitrofurantoina.



a)



b)



c)

Figura 16. Prueba de extracción en las heces fecales de *Artemia* para determinar los halos de inhibición de los tres antibióticos. a) cloranfenicol, b) ciprofloxacino y, c) nitrofurantoina.

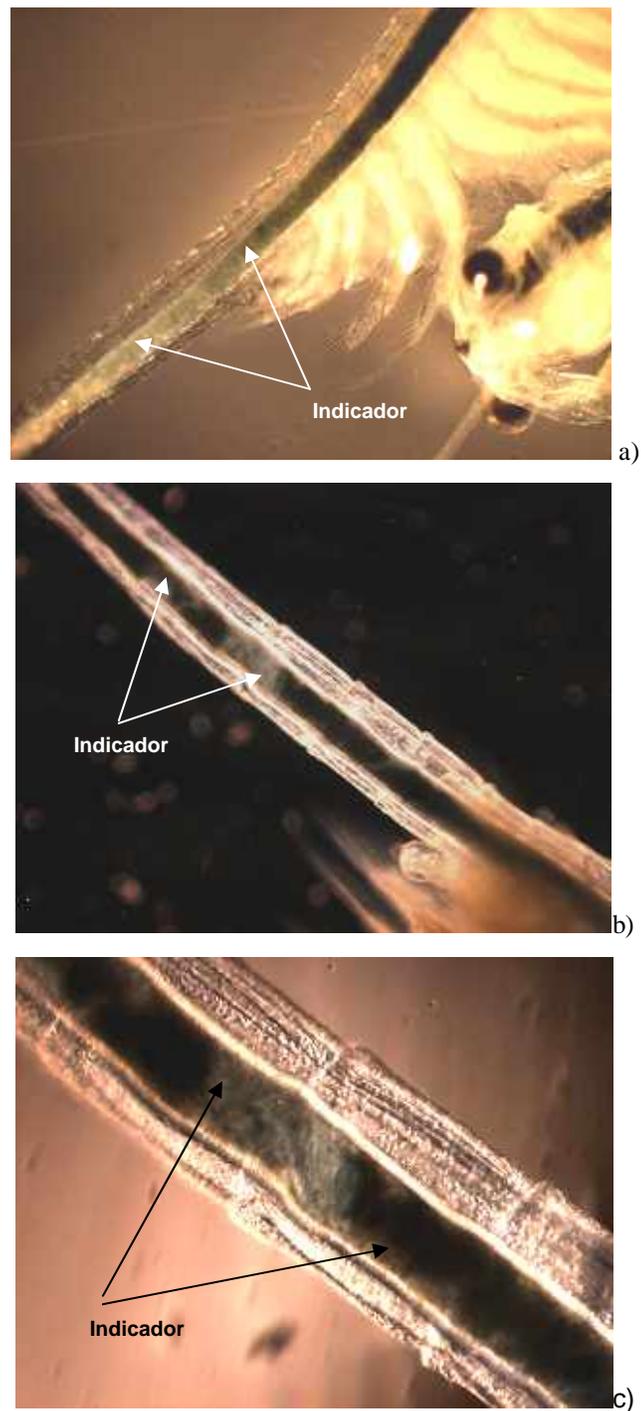


Figura 17. Fotografías al microscopio del tracto digestivo de *Artemia* mostrando la incorporación del indicador celulosa + verde de Bromocresol para determinar el pH. Aumento a) 7x, b) 12.5x y c) 25x.

7.4. Bioensayos de incorporación de los antibióticos

7.4.1. Tiempo de incorporación de los antibióticos en *Artemia*

En cada uno los estadios de *Artemia* el tracto digestivo se llenó de antibiótico en un intervalo de 3:30 a 4 h. No se observó ninguna diferencia en el tiempo de llenado, tanto en nauplios y metanauplios, juveniles y en adultos, con los tres antibióticos (figura 18, 19, 20).

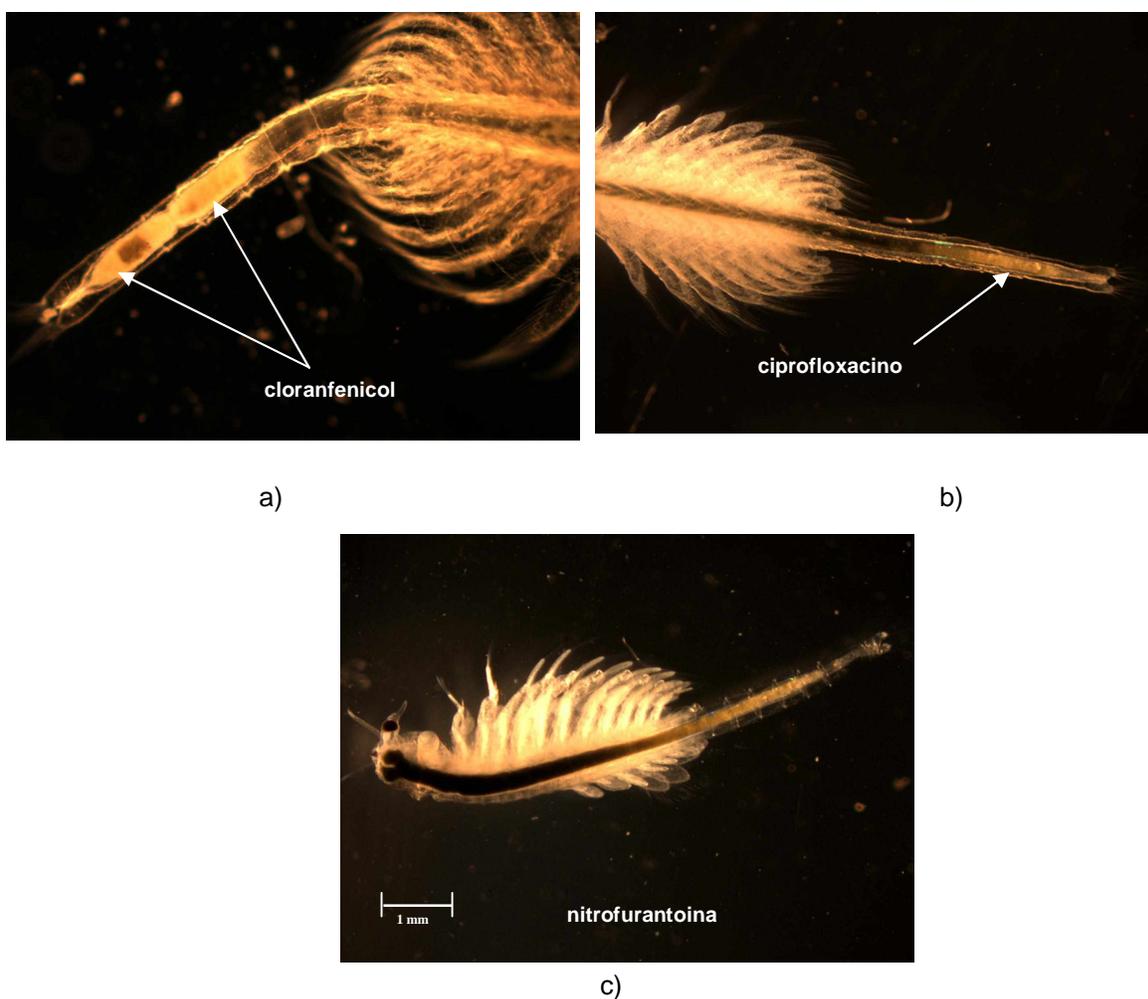


Figura 18. Fotografía de *Artemia* adulta con incorporación de antibióticos en el tracto digestivo en un intervalo de 4 horas. a) cloranfenicol; b) ciprofloxacino; c) nitrofurantoina.

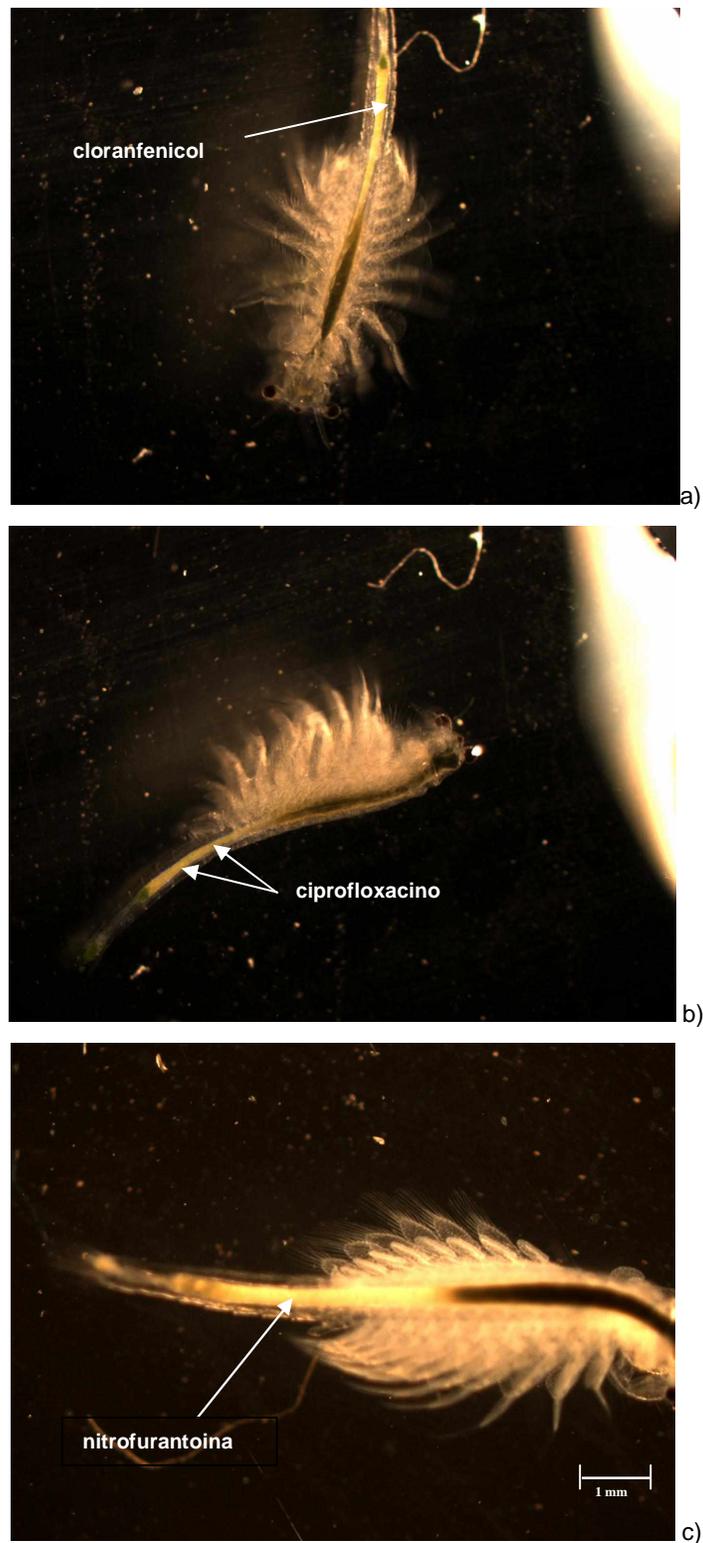


Figura 19. Incorporación de antibióticos en juveniles de *Artemia franciscana* en un intervalo de 4 h. a) cloranfenicol; b) ciprofloxacino y, c) nitrofurantoina.

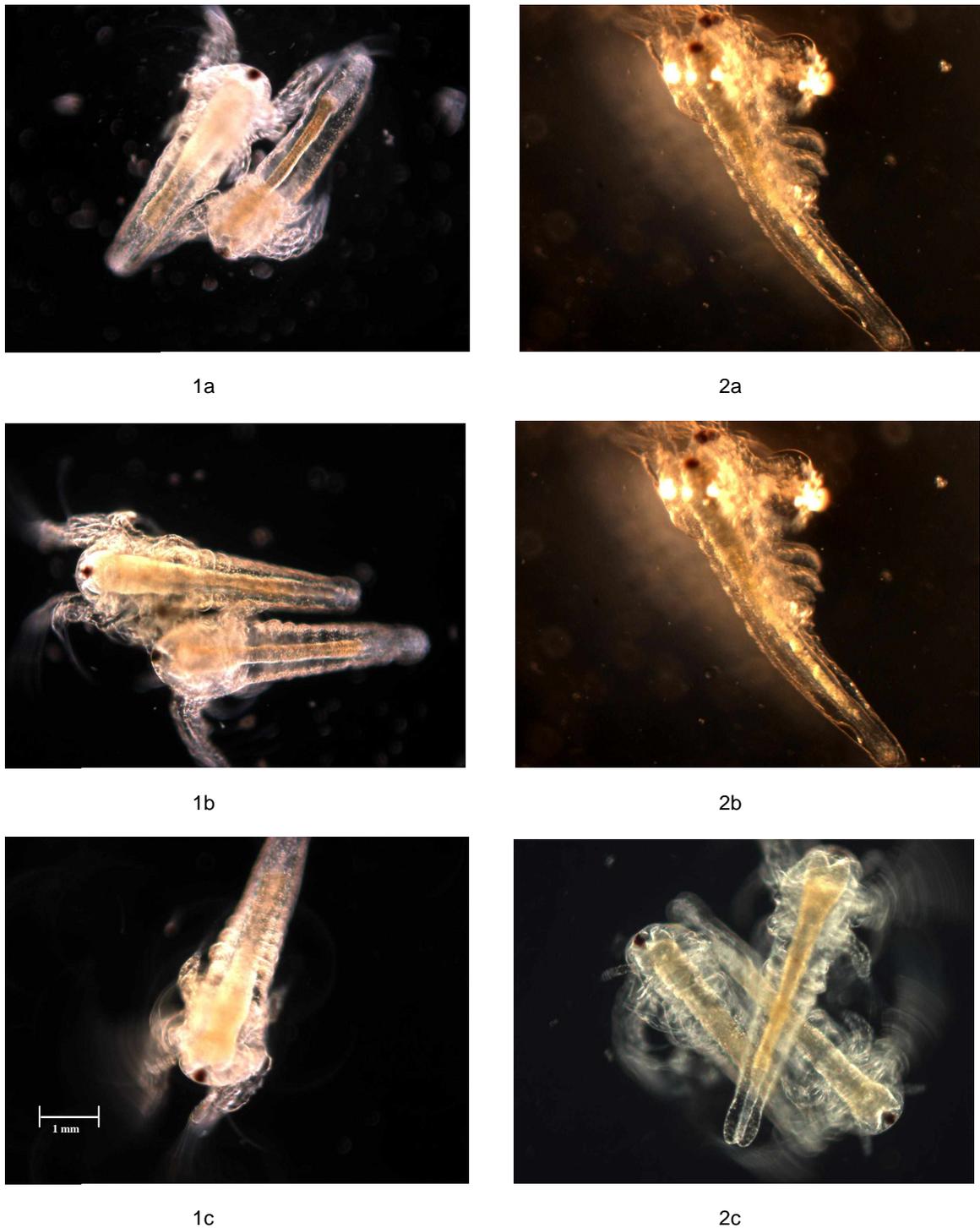


Figura 20. Fotografías de nauplios impregnados con antibióticos, 1a) cloranfenicol, 1b) ciprofloxacino y 1c) nitrofurantoina; y de metanauplios con el tracto digestivo lleno de antibiótico, 2a) cloranfenicol, 2b) ciprofloxacino y, 2c) nitrofurantoina, en un periodo de 4 h en la solución de bioencapsulación.

7.5. Pruebas de incorporación en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia*

7.5.1. Nauplios

Los resultados se muestran en la tabla 9 y fig. 21. El antibiótico que presentó mayor halo de inhibición fue la nitrofurantoina con un valor promedio de 22.27 mm, dando una concentración de 1,375.42 $\mu\text{g/mL}$. Los otros dos antibióticos presentaron halos de inhibición por arriba de 10 mm.

Tabla 9. Halos de inhibición producidos por los tres antibióticos en nauplios.

Antibiótico	Pozo 1 (mm)	Pozo 2 (mm)	Pozo 3 (mm)	Media \pm D.E.	Área de halo de inhibición (mm^2)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol	18.0	17.2	17.5	17.57 \pm 0.40	242.46	75.98
Ciprofloxacino	10.0	13.5	7.5	10.33 \pm 3.01	83.81	3.42
Nitrofurantoina	22.7	22.3	21.8	22.27 \pm 0.39	389.52	1,375.42

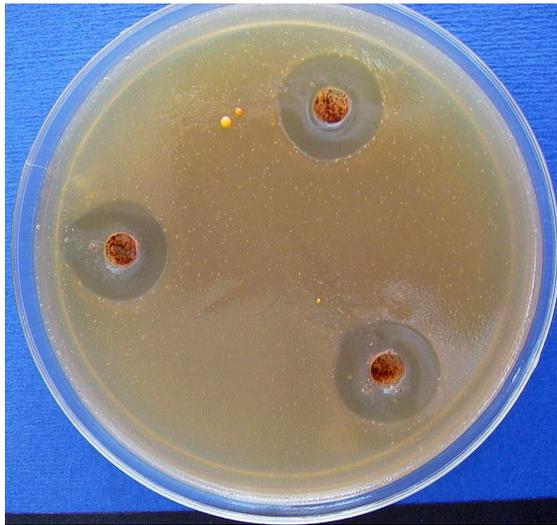
7.5.2. Metanauplios

Los resultados se muestran en la tabla 10 y fig. 22. El antibiótico que presentó mayor halo de inhibición fue el ciprofloxacino con un valor medio de 22.57 mm, el cloranfenicol con 15.40 mm y la nitrofurantoina no formó halo de inhibición.

Tabla 10. Halos de inhibición producidos por los tres antibióticos en metanauplios.

Antibiótico	Pozo 1 (mm)	Pozo 2 (mm)	Pozo 3 (mm)	Media \pm D.E.	Área de halo de inhibición (mm^2)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol	12.4	15.6	18.2	15.40 \pm 2.90	186.26	58.37
Ciprofloxacino	22.0	22.9	22.8	22.57 \pm 0.49	400.09	16.32
Nitrofurantoina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Nota: N.D. = No detectado



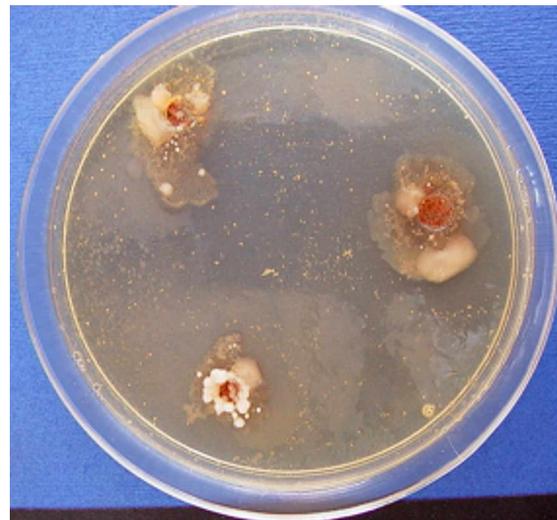
a)



b)



c)



d)

Figura 21. Fotografía de los halos de inhibición obtenidos con los tres antibióticos impregnados en nauplios de *Artemia franciscana*. a) cloranfenicol; b) ciprofloxacino; c) nitrofurantoina; y, d) testigo.

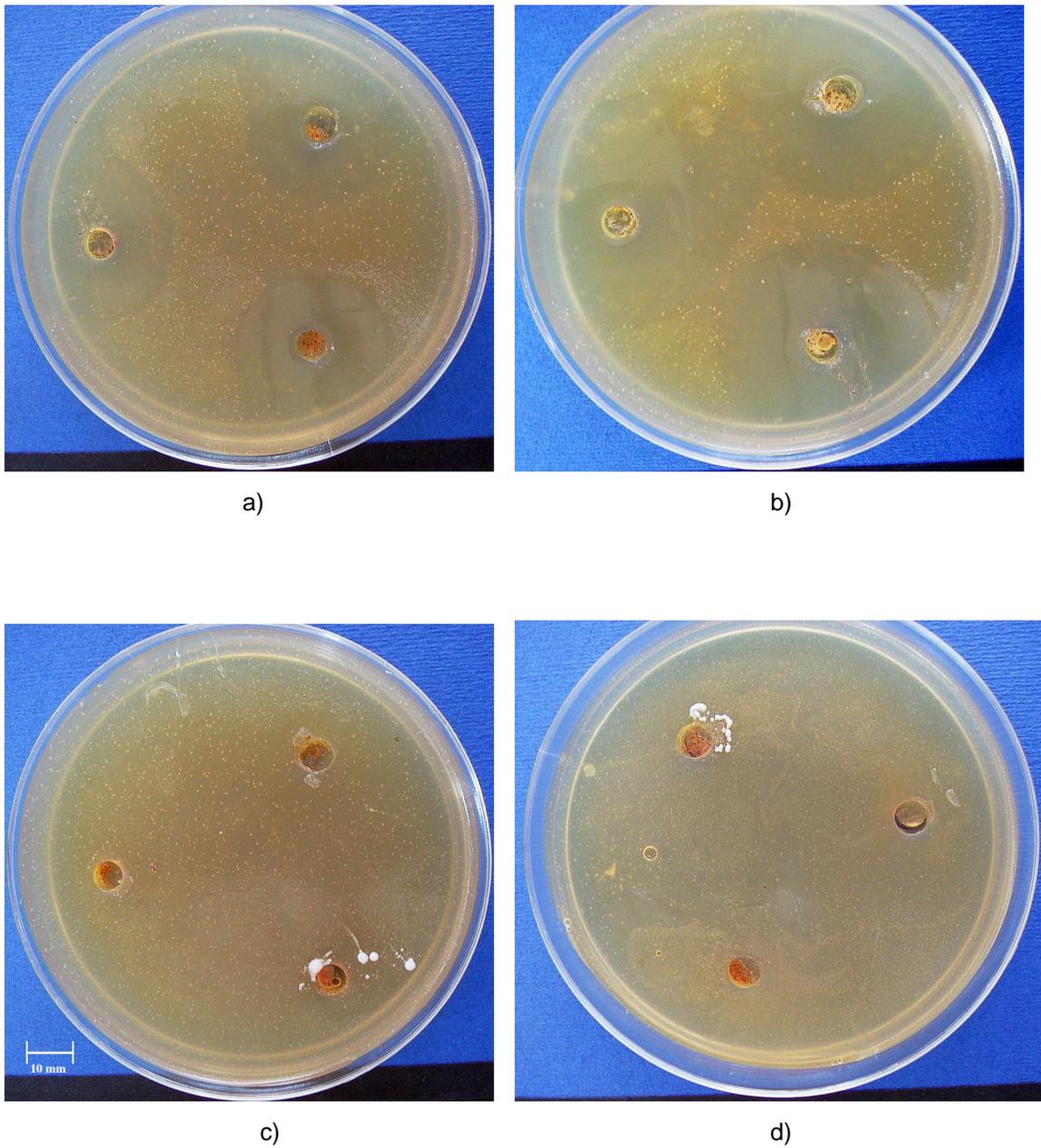


Figura 22. Fotografía de los halos de inhibición con los tres antibióticos incorporados en tracto digestivo de metanauplios de *Artemia*. a) cloranfenicol, b) ciprofloxacino, c) nitrofurantoina y, d) testigo.

7.5.3. Juveniles

La prueba con la etapa juvenil se hizo con 25 individuos para cada antibiótico. Con los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacino se obtuvo un halo de inhibición de 38 y 33 mm respectivamente. La nitrofurantoina no presentó halo de inhibición en las tres pruebas (tabla 11 y figura 23).

Tabla 11. Diámetro de halo de inhibición alcanzado al incorporar antibiótico en juveniles de *A. franciscana*.

Antibiótico	Diámetro de halo de inhibición (mm)	Área de halo de inhibición (mm ²)	Concentración (µg)
Cloranfenicol	38.0	1,134.12	355.39
Ciprofloxacina	33.0	855.30	34.89
Nitrofurantoina	0.0	0.00	0.00

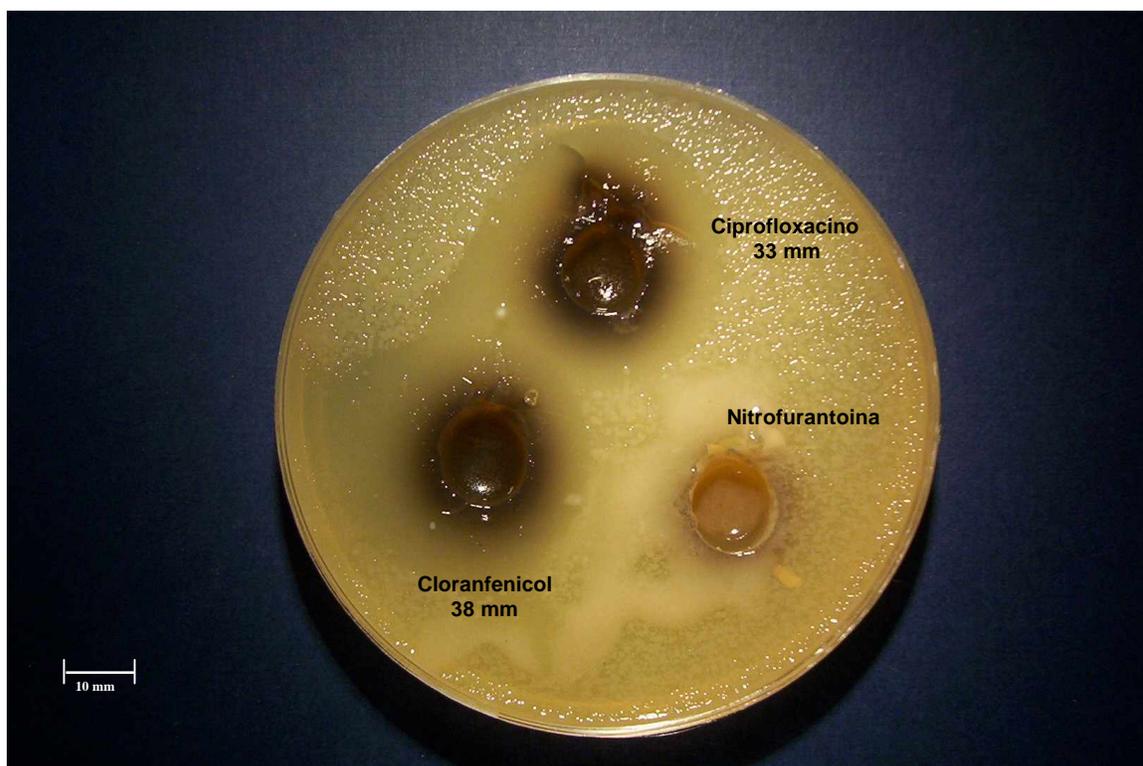


Figura 23. Fotografía de los halos de inhibición en juveniles de *A. franciscana* con los tres antibióticos

7.5.4. Adultos

En la tabla 12 se pueden observar los valores de los diámetros de halos de inhibición con los tres antibióticos en los diferentes grupos de *A. franciscana*. En el antibiótico cloranfenicol y en ciprofloxacino, se puede observar un incremento en el tamaño del diámetro de halo de inhibición conforme la cantidad de organismos aumenta, obteniendo valores que van de 26 hasta 33 mm en cloranfenicol y, 29 hasta 40 mm en ciprofloxacino. La nitrofurantoina no presentó ningún halo de inhibición en las tres muestras. En las figuras 24 y 25 se pueden ver las fotografías de los halos de inhibición que se obtuvieron en organismos adultos en los diferentes grupos.

Tabla 12. Diámetros de halos de inhibición en los tres antibióticos en los cinco grupos de organismos adultos.

	Grupos (No. de organismos)				
	5	10	15	25	50
Antibiótico					
Cloranfenicol	18	20	21	23	24
	33	37	38	38	39
	28	31	32	33	35
Media \pm D.E.	26.33 \pm 7.64	29.33 \pm 8.62	30.33 \pm 8.62	31.33 \pm 7.64	32.67 \pm 7.77
Área de halo de inhibición (mm)	544.49	675.64	722.50	770.92	838.28
Concentración del antibiótico (μ g/mL)	170.62	211.72	226.4	241.58	262.68
Ciprofloxacino	20	23	25	32	34
	37	39	40	43	43
	31	34	36	40	42
Media \pm D.E.	29.33 \pm 8.62	32.00 \pm 8.19	33.67 \pm 7.77	38.33 \pm 5.69	39.67 \pm 4.93
Área de halo de inhibición (mm)	675.64	804.25	890.38	1,153.90	1,235.99
Concentración del antibiótico (μ g/mL)	27.56	32.80	36.32	47.07	50.41
Nitrofurantoina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Nota N.D. = No detectado

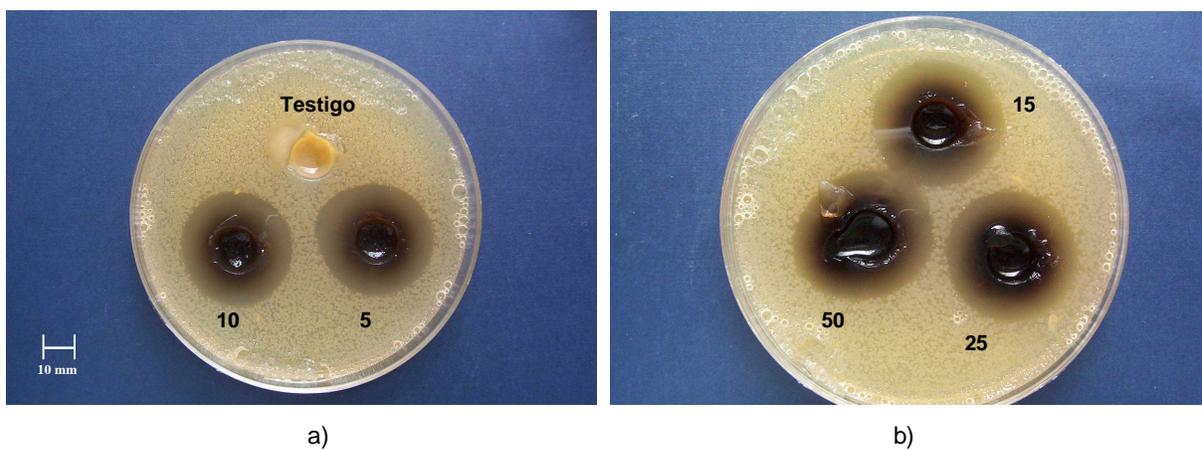


Figura 24. Fotografía de los halos de inhibición obtenidos con el antibiótico cloranfenicol incorporado en *Artemia* adulta en los cinco grupos. a) Testigo, y grupos 5 y 10; b) grupos 15, 25 y 50.

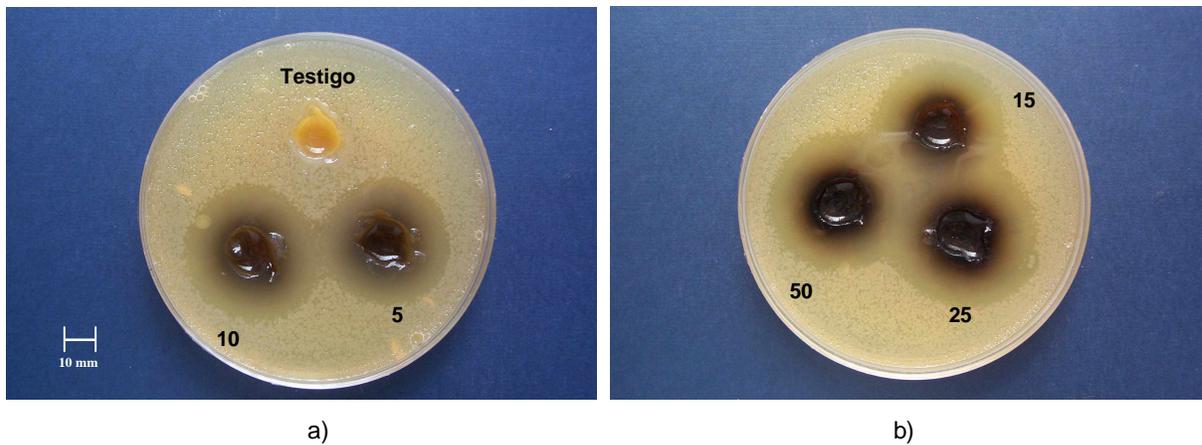


Figura 25. Fotografía de los halos de inhibición obtenidos con el antibiótico ciprofloxacino incorporado en *Artemia* adulta en los cinco grupos. a) Testigo, y grupos 5 y 10; b) grupos 15, 25 y 50.

VIII. DISCUSIÓN

Los antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacino y nitrofurantoina empleados en esta investigación presentaron áreas de inhibición contra la bacteria *A. hydrophila*. Estos antibióticos son fáciles de adquirir en el comercio farmacéutico en México y por su presentación en cápsulas, facilitan su manejo. Existe poca información bibliográfica sobre el empleo de estos tres antibióticos para ser incorporados en *Artemia franciscana*, en sus diferentes fases de desarrollo. Léger y Sorgeloos (1992), mencionan el uso del antibiótico cloranfenicol en nauplios de *Artemia*, enriqueciéndolos durante 6 h con una solución lipídica SELCO+10% de cloranfenicol, alcanzando valores terapéuticos de 3 a 4 partes por mil en el tejido caudal de larvas de peces. No se tienen trabajos de incorporación de ciprofloxacino y nitrofurantoina en nauplios. En la fase de desarrollo de metanauplios y juveniles de *Artemia*, tampoco se tienen registros de haber utilizado estos antibióticos. Solamente en la fase adulta, se encuentra el registro de Dixon *et al.* (1995b), que incorporaron el antibiótico sarofloxacino; Majack *et al.* (2000), Cook y Rust (2002) y Cook *et al.* (2003), que utilizaron el antibiótico eritromicina, en cinco formas químicas diferentes, con buenos resultados. Por esta razón, el presente trabajo aporta información valiosa con el uso de estos antibióticos.

Los antibióticos, de acuerdo con su estructura química, tienen diferente solubilidad que afecta la concentración final de los mismos. Cook y Rust (2002), incorporaron cinco formas químicas de eritromicina (fosfatada, estereada, estolada, hidratada y cristalina) en la fase adulta de *Artemia*, y encontraron que la forma química que presentó mejores resultados fue la eritromicina estereada ($68.5 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$), obteniendo una sobrevivencia de 74.7 %. Durante este experimento, las formas químicas estolada, hidratada y cristalina, resultaron ser tóxicas para *Artemia* adulta causando el mayor porcentaje de mortalidad en las primeras 4 horas. En este mismo trabajo, se señala que la forma química fosfatada presentó la mayor sobrevivencia pero alcanzó una concentración baja de antibiótico ($16.4 \pm 7.7 \mu\text{g/mL}$), y la eritromicina estereada y la estolada son insolubles a lo largo de la bioencapsulación; durante este periodo se observó que *Artemia* adulta se alimenta activamente de forma directa de las partículas que no se disolvieron. Estos autores además mencionan que la eritromicina fosfatada es totalmente soluble en agua, y por lo tanto, la concentración final de este antibiótico en *Artemia* adulta fue menor; además, las partículas de la eritromicina cristalina solamente se observaron en las primeras 8 horas del periodo de bioencapsulación, por otra parte, la eritromicina hidratada no se disolvió en el agua y se formó una solución lechosa, causando la muerte de los organismos.

En relación a la bacteria *A. hydrophila* que se utilizó en este experimento, es importante señalar que no obstante que esta bacteria causa mortalidades significativas en los cultivos de peces, existe escasa información referente a la utilización de organismos transmisores como es el caso de *Artemia* para llevar el medicamento adecuado. Dixon *et al.* (1995a) mencionan que se utilizaron los antibióticos Romet-30 (Trimetoprim y sulfametoxazol) y sarafloxacino en nauplios de *Artemia*, para inhibir el crecimiento de esta bacteria. Otros trabajos han tratado de inhibir el crecimiento de *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* utilizando nauplios con diferentes antibióticos (Samuelsen *et al.*, 1977; Touraki *et al.*, 1996; Gomez-Gil *et al.*, 2001 y Roque y Gomez-Gil, 2003).

8.1. Curvas de calibración

En todos los trabajos donde se evalúan antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano, es necesario realizar las curvas de calibración, las cuales permiten relacionar las áreas de inhibición con respecto a la concentración del mismo.

La técnica empleada en esta investigación para determinar la relación que hay entre el área de inhibición y la concentración del antibiótico, difiere de las técnicas señaladas por Roque *et al.* (1998), Mohny *et al.* (1990), Majack *et al.* (2000), Gómez-Gil *et al.* (2001) y Cook *et al.* (2003), estos autores realizaron diluciones de la concentración del antibiótico, tomando en cuenta un valor conocido y utilizaron la técnica de difusión de placas para determinar las áreas de inhibición. En este trabajo, la técnica tuvo la innovación de utilizar sensidiscos: uno completo, otro dividido a la mitad, y una de las mitades se dividió a la mitad, de tal manera que se tenían tres unidades. Cada unidad se pesó para relacionar su peso con la concentración de antibiótico, con el objeto de elaborar las curvas de calibración. Es de señalar que entre las tres unidades no hay una proporción en el diámetro del halo de inhibición y la concentración del antibiótico, sin embargo, los datos obtenidos permiten realizar la regresión, presentando una correlación a 0.9 en los tres antibióticos y, por lo tanto, una respuesta lineal del halo de inhibición contra la concentración del antibiótico. Aguilar-Aguila *et al.* (1994), obtuvieron un valor de correlación de $r^2=0.81$ para relacionar la concentración del antibiótico Romet-30 (trimetoprim+sulfametoxazol) con el área de inhibición obtenida utilizando las pruebas de difusión de placas.

8.2. Tiempo de incorporación de los antibióticos

El tiempo en que se incorpora un antibiótico en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia* es muy importante. En esta investigación se determinó que en un periodo de cuatro horas es más que suficiente para llenar el tracto digestivo en más del 90% de los metanauplios, juveniles y adultos e impregnar el cuerpo de los nauplios de *Artemia* con los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacino; en cuanto al antibiótico nitrofurantoina solo tuvo resultados positivos en la etapa naupliar. Al comparar estos datos con los de otros autores, se observa que hay una variación en el tiempo de incorporación que va de 1 h hasta 28 h. Para la etapa de nauplio, Touraki *et al.* (1991 y 1996), señalan que el tiempo de incorporación puede variar desde 1 h hasta 8 h, dependiendo de la sustancia que se está bioencapsulando. Dixon *et al.* (1995b) incorporaron el antibiótico sarafloxacin al 10% + SELCO en un periodo de 6 h; Mohny *et al.* (1990) y Touraki *et al.* (1999), incorporaron Romet-30 (80% de sulfadimetoxazol y 20% de ormetoprim) en un periodo de 4 h; y Gómez-Gil *et al.* (2001) incorporaron en 4 h el antibiótico enrofloxacin.

Con respecto a la incorporación de antibiótico en la etapa adulta de *Artemia*, están los trabajos de Majack *et al.* (2000) y Cook y Rust (2002) incorporando eritromicina empleando periodos de 14 hasta 18 h como máximo, y llegaron a la conclusión que dejar en la solución bioencapsuladora por más tiempo de 8 h, *Artemia* tiene una alta mortalidad. Majack *et al.* (2000), encontraron que se alcanzó la máxima concentración de eritromicina, en una suspensión de 2.0 g/L, en un periodo de 2 h.

Por lo antes expuesto, se menciona que aunque se alcancen mayores concentraciones de antibiótico en el tracto digestivo de *Artemia*, al dejarlas más tiempo en la solución enriquecedora, la sobrevivencia de los organismos se ve afectada. Además, Dixon *et al.* (1995 a, b), mencionan que existe un punto de equilibrio entre la ingestión y la excreción que se alcanza rápidamente en los metanauplios de *Artemia*. Ellos mencionan que el metanauplio de *Artemia* puede bioencapsular una concentración máxima de partículas en un intervalo entre 1 a 8 h como máximo, que depende de la sustancia que se esté incorporando. Después de este tiempo, es posible que metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia* no puedan incorporar una concentración mayor de antibiótico, ya que han alcanzado el equilibrio, por lo tanto, excederse de un tiempo límite mayor de 8 h llega a ser una pérdida de tiempo en la bioencapsulación y, por consiguiente, puede llegar a causar una mortalidad alta en los organismos.

8.3. Bioensayos de incorporación de los antibióticos en las diferentes fases de desarrollo de *Artemia*

8.3.1. Nauplio

En primer lugar, es importante señalar que en la etapa de nauplio (instar I) todavía está presente el saco vitelino y el tracto digestivo no está bien desarrollado y la boca y el ano están cerrados (Schrehardt, 1987), por lo que, no se incorpora alguna sustancia, sino que solamente el cuerpo de esta etapa larvaria se impregna o adhieren sustancias (Watanabe *et al.*, 1980, Léger *et al.*, 1987 y Dhert *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que los tres antibióticos se adhirieron al nauplio y, por lo tanto, presentaron halos de inhibición contra la bacteria *A. hydrophila*.

La etapa naupliar es la que más se utiliza como agente vector de medicamentos, precisamente por la facilidad de su manejo, y, aunque el nauplio pase de instar I a instar II después de 8 h de haber eclosionado y tener la boca abierta (Dhont *et al.*, 2001), la incorporación de partículas menores de 25 µm no es significativa (Gelabert, 2001).

8.3.2. Metanauplio

A diferencia del nauplio, en la etapa de metanauplio el tracto digestivo está completo, por lo que puede incorporar partículas. Gelabert (2003) señala que en organismos pequeños (0.8 a 3.2 mm) el proceso de filtración de partículas es más eficaz que en etapas posteriores y Wilson (1989) menciona que debido a la intensa actividad metabólica de *Artemia* en esta etapa, favorece la actividad de filtración. Este comportamiento se pudo observar cuando se suministró los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacino, que no son completamente solubles y sus partículas fueron asimiladas por los metanauplios, los cuales si dieron halos de inhibición; en cambio, cuando se suministró nitrofurantoina, que es soluble, no se observó la formación de halos de inhibición.

8.3.3. Juvenil y Adulto

En estas dos etapas, el desarrollo morfológico de los individuos es completo, los apéndices torácicos (toracópodos) juegan un papel importante en la filtración de las partículas, de tal manera que si el antibiótico es soluble, como la nitrofurantoina, no se incorpora fácilmente al organismo y por lo tanto, no se manifiesta el efecto inhibitorio hacia la bacteria. Así como en los metanauplios, los antibióticos

cloranfenicol y ciprofloxacino, dieron halos inhibitorios amplios en estas dos fases de desarrollo y son resultado de la retención de éstos en el cuerpo del organismo.

8.4. Concentración de antibiótico alcanzada en las diferentes fases de desarrollo

En todo trabajo que se realiza con antibiótico es necesario conocer la cantidad máxima que soporta el organismo transportador, en este caso *Artemia*, para poder recomendar la dosis adecuada. En este trabajo se puede decir que para los antibióticos cloranfenicol (antibiótico base) y ciprofloxacino (Ciproflox®, cápsulas de 250 mg), presentación comercial, es necesario hacer diluciones al 50 % debido a que estas cantidades no fueron soportadas por *Artemia* y se presentó gran mortalidad a las 4 h de bioencapsulación. El antibiótico nitrofurantoína (Macrofantina®, cápsulas 50 mg), al no dar resultados positivos en las fases de metanauplio a adulto, existe la necesidad de probar con una mayor dosis o emulsificando el medicamento.

Aunque en este trabajo el objetivo fue llegar a incorporar antibióticos comerciales, de fácil adquisición, a diferentes fases de desarrollo de *Artemia* y lograr inhibir el crecimiento de la bacteria *A. hydrophila*, es conveniente señalar la importancia que puede tener en la acuicultura la aplicación de *Artemia* enriquecida con antibióticos para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por esta bacteria. El trabajo de Warren (1991) señala una dosis de 10 a 30 mg de cloranfenicol en un pez de 454 g, en el tratamiento profiláctico contra *A. hydrophila* y tomando en cuenta los valores obtenidos en este trabajo con cloranfenicol se puede decir que para un pez de 454 g se necesitaría proporcionarle 658,068 a 1,974,204 nauplios con cloranfenicol; 856,604 a 2,569,813 metanauplios; 703 a 2,110 juveniles; o 293 a 879 adultos de *Artemia*. Es notable que al utilizar etapas de desarrollo de *Artemia* más avanzadas, como juveniles y adultos, el número de organismos necesarios para las dosis de antibióticos se reduce considerablemente y demostrando la conveniencia de emplear estas etapas en lugar de los nauplios que se utilizan más frecuentemente.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los antibióticos cloranfenicol y ciprofloxacina dieron resultados positivos en las cuatro fases de desarrollo (nauplios, metanauplios, juveniles y adultos), mostrando halos de inhibición contra la bacteria *A. hydrophila*.

En la etapa de nauplio (instar I) es en donde se observa el efecto inhibitorio de los tres antibióticos, debido a que únicamente se impregna el cuerpo del organismo sin haber ingesta de los mismos.

En etapas de metanauplio, juvenil y adulto se recomienda que los antibióticos suministrados no sean solubles en el agua, ya que *Artemia* incorpora partículas.

El tiempo máximo para la incorporación de un antibiótico en las fases de desarrollo de *Artemia* estudiadas es de 4 h.

El utilizar los antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacino en presentación comercial requiere hacer diluciones al 50 % para que *Artemia* sobreviva a la aplicación de la técnica de bioencapsulación.

Cuando se incorporen antibióticos solubles es recomendable agregar soluciones lipídicas a fin de que *Artemia* pueda incorporarlos.

Con base en los datos obtenidos en este trabajo se recomienda efectuar bioensayos con peces sujetos a tratamientos profilácticos y terapéuticos.

X. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Aguila, A.; A. Tejeda-Mansir y A. Ruiz-Enriquez. 1994. Using brine shrimp as a drug carrier for therapeutic applications in aquaculture. *Aquaculture Engineering* 13: 301-309.
- Alderman, D.J. 1988. Fisheries chemotherapy a review. pp. 1-61. En: *Recent Advances in Aquaculture*, vol. 3. Muir, J.F. Robertts. R.J. (Eds.). Croom Helm. London, United Kingdom and Timber Press, Porgtland, Or.
- Alderman, D.J. y Hastings, T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development on antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *J. Food Sci. Technol.* 33:139-155.
- Alderman, D.J y Michel, C. 1991. Chemotherapy in aquaculture today. En: *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. British Crown (Ed.), Great Britain. 567 p.
- Amlacher, E. 1964. *Manual de Enfermedades de los Peces*. Edit. Acribia, España. 323 p.
- Angulo, F. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: Potential impact on public health. *APUA Newsletter*. 18(1): 4-5.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educación, S.A. Madrid. 696 p.
- Austin, B. y D.A. Austin. 1987. *Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish*. Ellis Horwood. Ltd. England, pp.196-224.
- Bernabé, G. 1980. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). pp.470-473.
- Bjorklund, H.V., Rabeg, C.M.I., Bylund, G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97: 85– 96.
- Brown, H. 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture* 20(2): 34-43.

- Brown, L., 1993. Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford Press, New York, NY. 447 p.
- Cabello, F.C. 2003. Antibióticos y acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente, la salud humana y animal en Chile. *Análisis de Políticas Públicas* 17. Fundación Terram. Chile. 15 p.
- Cao, J., Bian, B. y Li, M. 1996. The brine shrimp (*Artemia parthenogenetica*) as encapsulation organism for prophylactic chemotherapy of fish and prawn. *Chinese Journal of Oceanography and Limnology*. 14: 183-188.
- Castro, M.J. y DeLara, A.R. 1991. Manual de técnicas para el manejo de quistes de *Artemia* sp. Manual. CBS: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 47 p.
- Castro, B.T.; Castro, M.J. y Castro, M.G. 2003. *Artemia*. p. 67-81. En: Alimento vivo para organismos acuáticos. Cap. 7. Castro, B.T. (ed.) AGT Editor, S.A. México. 129 p.
- Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet* 68. 25 p.
- Cook, M.A. y M.B. Rust. 2002. Bioencapsulation of five forms of erythromycin by adult *Artemia salina* (L.) . *Journal of Fish Diseases* 25: 165-170.
- Cook, M.A.; M.B. Rust; K. Messee; T. Majack y M.E. Peterson. 2003. Uptake of erythromycin by first-feeding sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), feed live or freeze-dried enriched adult *Artemia* or medicated pellets. *Journal of Fish Disease*. 26: 277-285.
- Criel, G.R.J. 1991. Morphology of *Artemia*. p. 119-153. En: *Artemia Biology*. R.A. Browne, P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Chair, M; M. Dehasque; P. Sorgeloos; H. Nelis; y A.P. Leenher. 1995. Live Food Mediated Drug Delivery as a Tool for disease Treatment in Larviculture: A Case Study with Turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(2): 217-219.

- Chair, M; H.J. Nelis; P. Leger; P. Sorgeloos y A.P. De Leenher. 1996. Accumulation of Trimethoprim, Sulfamethoxazole, y N-Acetylsulfamethoxazole in Fish and Shrimp Fed Medicated *Artemia franciscana*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 40:1649-1652.
- Cherel, P.; y F. Nin. 1991. Antibiotherapy using biocarriers (*Artemia salina*) in hatcheries. En: *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. (Ed.) British Crown. pp. 389-393.
- Dehert, P., P. Sorgeloos y Devresse, B. 1993. Contributions towards a specific DHA enrichment of the live food *Brachionus plicatilis* and *Artemia* sp. p. 109-115. En: H. reneirsten, L.A., Dahle, L. Jorgensen y K. Tvinnerheim (eds.). *Fish Farming Technology*. Balkema, Rotterdam.
- Dhont, J.; Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1991. Development of a lipid enrichment technique for *Artemia* juveniles produced in an intensive system for use in marine larviculture. In P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (eds). Larvi 91 - Fish & Crustacean Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication Nr. 15, Ostend, Belgium, pp.51-55.
- Dixon, B.A. 1991. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. 419 p.
- Dixon, B.A.; S.O. Van Poucke; D. Kawahigashi; M. Chair; M. Dehasque, H.J. Nelis; P. Sorgeloos y A.P. De Leenheer. 1995a. p. 508-510. Bioencapsulation of antibacterial drugs in nauplii and adult brine shrimp, *Artemia franciscana*. En: Larvi 95. Fish & Shellfish Larviculture Symposium. P. Lavens, E. jaspers y I. Roelants (Eds.). European Aquaculture Society. Specuial Publications. No. 24. Genth, Belgium.
- Dixon, B.A.; S.O. Van Poucke; M. Chair; M. Dehasque; H.J. Nelis; P. Sorgeloos y A.P. De Leenheer. 1995b. Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in naupliiii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 7: 42-45.
- Endo, T., Ogishima, K., Hayasaka, H., Kaneko, S. y Ohshima, S. 1973. Application of oxolinic acid as a chemotherapeutic agent against infectious diseases in fishes [in Japanese]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 39:165-171.

- Eurell, T.E.; D.H. Lewis y L.C. Grumbles. 1978. Comparison of selected diagnostic test for detection of motile *Aeromonas septicaemia* in fish. *Am. J. Vet. Res.* 39(8):1384-1386.
- Frías, J. y R.E. Díaz. 2001. El género *Aeromonas* como patógeno humano. *Rev. Enf. Inf. Ped.* 15(58): 49-53.
- Gapasin, R.S.J., Nelis, H.J., Chair, M. y Sorgeloos, P. 1996. Drug assimilation in the tissue of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry delivered orally through bioencapsulation. *Journal of Applied Ichthyology.* 12: 39-42.
- Gelabert, F.; T. Castro; C. Gallardo y G. Castro. 1996. Bioencapsulación en *Artemia*: mejoramiento de su valor nutricional. *Oceanología* 3(11): 27-34.
- Gelabert, F.R. 2001. *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes of the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology.* 21: 435-442.
- Gelabert, F. R. 2003. Bioencapsulation in *Artemia*: II. Influences of the particle concentration in the enrichment process. *Aquaculture* 216:143-153.
- Gherna, R.L. 1994. Culture preservation. En: Manual of methods for general bacteriology. *American Society Microbiology.* 278-290.
- Godelieve, R.J.C. y Macrae, T.H. 2002. *Artemia* morphology and structure. p.1-37. En: *Artemia: basic and Applied Biology.* Th.J. Abatzopoulos, J.A. Beardmore, J.S. Clegg y P. Sorgeloos (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 286 p.
- Gómez-Gil, B.; J. Cabanillas-Ramos; S. Paez-Brambilla y A. Roque. 2001. Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. *Aquaculture* (196)1-12.
- Göksan, T. y S. Gökpınar. 2001. The effects of tetracycline and flumequine on the Rotifers (*Brachionus plicatilis* O.F. Müller). *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 18(3-4): 367-373.

- Goñi-Urriza, M.; Pineau, L.; Capdepuy, M.; Roques, Ch.; Caumette, P. y Quentin, C. 2000. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from two European rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 297-301.
- Goodman, G y G. Gilman. 1986. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Séptima edición pp. 1124-1129.
- Halling-Sorensen, B.; H.C. Holten Lützhof; H.R. Andersen y F. Ingerslev. 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, Suppl. S1. 53-58.
- Hansen, U. y Peters, W. 1998. Structure and permeability of the peritrophic membranes of some small crustaceans. *Zoologischer Anzeiger*. 236: 103-108.
- Harper, C. 2002. Chemical resistance of pathogens in aquaculture. *Aquaculture Magazine* (Jan/Feb): 1-2.
- Hepher, B.1991. Cultivo de peces comerciales. Ed. Noriega LIMUSA. México D.F. pp. 271-273.
- Hootman, R. y Conte, F.P. 1974. Fine structure and function of the alimentary canal in *Artemia salina* nauplii. *Cell and Tissue Research*. 155: 423-436.
- Katae, H., Kouno, K., Takase, Y., Miyazaki, H., Hashimoto, M. y Shimizu, M. 1979. The evaluation of piromidic acid as an antibiotic in fish: an *in vitro* and *in vivo* study. *Journal Fish Disease* 2:321–335.
- Katharios, P.; R.P. Smullen y V. Inglis. 2005. The use of the polychaete worm *Nereis virens* eggs as vehicle for the delivery of oxytetracycline in *Solea solea* larvae. *Aquaculture* 24:1-7.
- Kikuchi, S. 1972. The fine structure of the alimentary canal of the brine shrimp, *Artemia salina*: the midgut. *Annual Report of Iwate Medical University, School of liberal art and Science*. 7: 15-47.

- Kümmerer, K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. *Chemosphere* 45: 957-969.
- Kümmerer, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 5-7.
- Léger, P.; Bengtson D.A.; Simpson, K.L. y Sorgeloos, P. 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 24, 521-623.
- Léger, P.; E. Naeseen y P. Sorgeloos. 1987. International study on *Artemia* XXXV. Techniques to manipulate the fatty acids profile in *Artemia* nauplii. And the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M). pp. 411-724. En: *Artemia research and its Applications Vol. 3 Ecology, Culturing use in Aquaculture*. P. Sorgeloos; D.A. Bengtson; W. Declair y E. Jaspers (eds.). Universa Press, Weteren, Belgium. 556 p.
- Léger, P. y Sorgeloos, P. 2002. Optimized feeding regimes in shrimp hatchery. p. 225-244. En: *Marine shrimp culture: principles and practices*. Chapter 9. A.W. Fast y L.J. Lester (eds.) Elsevier Science Publishers. U.S.A. 414 p.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. 1999. Brock. Biología de los microorganismos. 8ª ed. Revisada. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1, 064 p.
- Majack, T.J., M.B. Rust, K.C. Masee, G.W. Kissil, R.W. Hardy y M.E. Peterson. 2000. Bioencapsulation of erythromycin using adult brine shrimp, *Artemia franciscana* (Latreille). *Journal of Fish Disease*. 23: 71-76.
- Miyazaki, T. y Jo, Y. 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in ayu. *Fish Pathol.* 20:55–59.
- Miyazaki, T. y Kaige, N. 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in Crucian carp. *Fish Pathol.* 21:181–185.

- Muroga, K.; M. Higashi y H. Keitoku. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenil stages. *Aquaculture* 65: 79-88.
- Mohney, L.; D. Lightner y R. Williams. 1990. Bioencapsulation of therapeutic Quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of the Brine shrimp *Artemia* and in the Nematode *Panagrellus redivivus*. *Journal of the World aquaculture society*, 21(3):186-191.
- Navarro, J.C.; Batty, R.S.; Bell, M.V.; y Sargent, J.r. 1993. Effect of two *Artemia* diets with different content of polyinsaturated fatty acids on the lipid composition of larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Journal Fish Biology*. 43: 503-515.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J.; McEvoy, L.A.; Bell, M.V. y Amat, F. 1999. Lipid conversion during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174:155-166.
- Negrete, R.P. 2004. Estudio de *Vibrio fluvialis* (Lee *et al.*, 1981) y *Vibrio furnissi* (Brenner *et al.*, 1984) como agentes causales de infecciones en el pez dorado, *Carssius auratus* (Linnaeus, 1758). Tesis Doctoral. UAM-Xochimilco. 134 p.
- Negrete, R.P. y J.M. Romero. 1998. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio*, con bacterias de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. *Hidrobiológica*. 8 (2): 107-116.
- Nelis, H.J.; F.Leger; P. Sorgeloos; P. De Leenheer. 1991. Liquid Chromatogrephic Determination of Efficacy of Incorporation of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Brine Shrimp (*Artemia spp.*). Used for Prophylactic Chemotherapy of Fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 (12): 2486-2489.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27: 67-76.
- Noga, E.J. 1996. Fish Disease, diagnosis and treatment. Iowa State University Press. Editorial Ames. 367 p.
- Nordeng, H. y P. Bratland. 1971. *J. Coms. Perm. Int. Explor. Mer.* 34:51-57.

- Pérez, S. L.A. 1982. Piscicultura. El manual moderno (Ed.). México. pp. 105-128.
- Petracini, R.A.: 1979. Enfermedades Bacterianas en Peces Ornamentales. Ediciones El Acuarista, Buenos Aires. Argentina. 32 p.
- Pillay, T.V.R. 1992. Aquaculture and environment Fishing News Book. pp. 48-98.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2000. Microbiology. 5a edición Editorial McGraw-Hill. Toronto. 917 p.
- Reeve, M.R. 1963. The filter feeding of *Artemia*, III. Faecal pellets and their associated membranes. *Journal of Experimental Biology*. 40: 215-221.
- Reichenbach-Klinke, H.H. 1980. Enfermedades de los peces. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España) 2a ed. 507 p.
- Richards, R.H.; Inglis, V.; Frerichs, G.N.; y Millar, S.D. 1991. Variation in antibiotic resistance patterns of *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic *Salmon solar* L. in Scotland. Working papers from the conference: Problems of chemotherapy from theory to reality. Paris. 12-15.
- Roberts, R. J. 1978. Fish pathology. Bailliere Tindall, London. 319 pp
- Roque, A.; Turnbull, J.F. y Gomez-Gil. 1998. Delivery bioencapsulated oxitetracycline to the marine shrimp *Penaeus monodon*. *Journal World aquaculture Society*. 29: 249-251.
- Roque, A. y B. Gomez-Gil. 2003. Therapeutic effects of enrofloxacin in an experimental infection with a luminescent *Vibrio harveyi* in *Artemia franciscana* Kellog, 1906. *Aquaculture* 220: 37-42.
- Sahul-Hameed, A. y G. Balasubramanian. 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture* 183: 195-205.

- Samuelsen, O.B.; Lunestad, B.T.; Jelmert, A. 1977. Pharmacokinetic and efficacy studies on bath-administering potentiated sulphonamides in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Journal of Fish Diseases* 20:287-296.
- Sarig, S. 1972. Diseases of Fishes; Ed. T.F.H., Neptune City, N.J., U.S.A. 242 p.
- Scott, P. 2000. Terapéutica en acuicultura. p. 137-160. En: Acuicultura para veterinarios: producción y clínica de peces. Cap. 7. Brown, L. (ed.) Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 445 p..
- Scherehardt, A. 1987. Ultrastructural investigation of the filter-feeding apparatus and alimentary canal of *Artemia*. p. 33-52. En: *Artemia Research and its Applications*. Vol. 1. P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decler y E. Jaspers (eds.). Universa press. Wetteren, Bélgica.
- Schmidt, A.S.; Bruun, M.S.; Dalsgaard, I.; Pedersen, K. y Larse, J.L. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4908-4915.
- Schmidt, A.S.; Bruun, M.S.; Dalsgaard, I. y Larsen, J.L. 2001. Incidence distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5675-5682.
- Smith, D.L.; Harris, A.D.; Johnson, J.A.; Solbergeld, E.K. y Morris, J.G. 2002. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacterial. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6434-6438.
- Sorgeloos, P.; P. Lavens; P. Léger; P. Tackaert; y W. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Manual prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Artemia* Reference Center. Faculty of Agriculture, State University of Ghent, Belgium. 319 p.
- Sorum, H. 1998. Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *APMIS* 106 (Suppl. 84) : S74-S76.

- Southgate, P. 2000. Enfermedades en acuicultura. p. 95-135. En: Acuicultura para veterinarios: producción y clínica de peces. Cap. 6. Brown, L. (ed.) Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 445 p..
- Spanggaard, B.; Huber, I.; Nielsen, J.; Sick, E.B.; Pipper, C.B.; Martinussen, T.; Slierendrecht, W.J.; y Gram, L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous, microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3: 755-765.
- Stewart, A.B.; A.V. Spicer; E.K. Inskeep; y R.A. Dailey. 2001. Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 202(1): 177-181.
- Sumano-Lopez, H.S. y Ocampo-Camberos, L. 1997. Farmacología veterinaria. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana, S.A. de C.V. México. 680 p.
- Tatani, M.; Muroga, K.; Sugiyama, T.; y Hiramoto, Y. 1985. Detection of *Vibrio anguillarum* from reared fry and fingerlings of ayu. *Suisan Zoshoku* 33: 59-66.
- Tizol, C.R. 1994. Aspectos generales sobre la biología de la *Artemia* sp, y su uso para bioensayos. Centro de Investigaciones pesqueras de la Habana, Cuba, Departamento del Maricultivo. (Mimeo).
- Touraki, M.; P. Rigas; P. Pergantas; T. Abatzopoulos y C. Kastritsis. 1991. Optimizing bioencapsulation of the antibiotics trimethoprim and sulfametoxazole in *Artemia* nauplii. In: Lavens, P. Sorgeloos P.m Jaspers. E. Ollevier F. eds. Larvi. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Special Publication No. 15. European Aquaculture Society. Ghent, Belgium. Pp 415-417.
- Touraki, M., Mourelatos, S., Karamanlidou, G., Kalaitzopoulou, S. y Kastritsis, C. 1996. Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment in infection diseases of marine fish fry. *Aquaculture Engineering*. 15:133-147.
- Touraki, M.; I. Niopas y C. Kastritsis. 1999. Bioaccumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and N-Acetyl-Sulfamethoxazole in *Artemia* nauplii and residual kinetics in seabass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii. *Aquaculture*, 175: 15-30.

- Trust, T.J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annual Rev. of Microbiology* 40: 479-502.
- Universidad de Sevilla. Ciencias de la Salud. Microbiología. 2004. <http://www.microcsalud.us.es/Web%20departamemto/4.%20Programas/Clasificaci%C3%B3n%20de%20los%20antimicrobianos.doc>.
- Verpraet, R.; M. Chair; P. Léger; H. Nelis; P. Sorgeloos y A. De Leenheer. 1992. Live-food mediated drug delivery as a tool of disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia* nauplii. *Aquaculture Engineering* 11: 133-139.
- Vinatea, A.L. 1999. Manual de Producción de *Artemia* (Quistes y Biomasa) en módulos de Cultivo. Proyecto II-A/2. L, Caracterización y Evaluación del Potencial Extractivo de *Artemia* en Ibero-América con destino a la Acuicultura. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 80 p.
- Walliser, J. A.; H.M. Burt; T.A. Valg; D.D. Kitts and K.M. McErlane. 1990. High-performance liquid chromatographic analysis of Romet-30 in salmon following administration of medicated fed. *J. chromatogr.* 518:179-188.
- Warren, J.W. 1991. *Aeromonas* and *Pseudomonas* Infections. In: USFWS (eds.), Diseases of Hatchery Fish, sixth edition. U.S. Fish and Wildlife Service, Pacific Region. pp. 15–16.
- Watanabe, T. 1991. Importance of decosahexaenoic acid in marine larval fish. p. 19-22. En: Larvi'91. Fish and crustacean larviculture symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Oliverr (Eds.).
- Watanabe, T.; F. Oowa, C. Kitajima y S. Fujita. 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp *Artemia* and their content of W3 highly unsaturated fatty acids. *Bull. Jap. Soc; Scient Fish*; 46: 35-41.
- Weiss, G.; P.D. Duke, y L. Gonzales. 1987. HPLC. Method for the simultaneous analysis of sulfadimethoxine and ormetoprim in tissues and blood of cattle, chickens and catfish. *J. Agricult. Food Chem.* 35: 905-909.

Wilson, J.A. 1989. Nutrición y temperatura corporal. En: Fundamentos de fisiología animal. Cap. 14.
Limusa. (Ed.). McMillan, México. 984 p.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología**

**Incorporación de tres antibióticos en nauplios,
metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana*
(Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria
*Aeromonas hydrophila***

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biología**

PRESENTA

Germán Castro Mejía

**Directores de Tesis
Dra. Thalía Castro Barrera
Dr. José Luis Arredondo Figueroa**

**Asesor:
Dr. Horacio Sandoval Trujillo**

México, D.F. Septiembre del 2005

CARTA DE ASIGNACION DE JURADO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-Iztapalapa
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Coordinación Maestría en Biología



México, D.F., a 29 de junio del 2005.

Biólogo Germán Castro Mejía
Alumno de la Maestría en Biología
Presente.

Le informo que el Comité Académico de la Maestría en Biología, en su sesión del 28 de junio del 2005, acordó asignarle el siguiente jurado para el Examen de Maestría de su tesis titulada "Incorporación de tres antibióticos en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*".

Firma de aceptación

Dra. Thalía Castro Barrera	Presidente
Dr. José Luis Arredondo Figueroa	Secretario
Dr. Horacio Sandoval Trujillo	Vocal
Dr. Jorge Manuel Romero Jarero	Vocal
M. en C. Mario Alfredo Fernández Araiza	Vocal

Es requisito que Ud. recabe las firmas de los integrantes del jurado con el objeto de validar el nombramiento.

A nombre del Comité Académico, le deseo el mayor éxito durante esta etapa de su formación académica, esperando a la brevedad posible contar con la solicitud de fecha para su examen de grado.

Sin otro particular le envío un cordial saludo.

Dr. Manuel Castillo Rivera
Coordinador Maestría en Biología.