CENAIM - ESPOL

¨INFORME TECNICO¨

¨Distribución de los residuos de enrofloxacina en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones¨

AUTOR:
Luis Geovanni Toro Marin

Supervisor:
M.Sc. Nelson Montoya V. (CENAIM)
Jefe Laboratorio de Cromatografía - Espectrofotometría

Guayaquil Ecuador
2000 - 2001

TABLA DE CONTENIDOS

Indice de tablas **Pag.**

Indice de figuras **Pag.**

1. INTRODUCCIÓN

La acuacultura en el Ecuador constituye una de las industrias más importantes, la producción de camarón cultivado está dirigida a la exportación hacia diferentes mercados tales como: Estados Unidos, Europa, Asia, entre otros (CNA, 1999), con una producción de 68 millones de libras de camarón, con ingresos por divisas de U.S. $ 249 millones (CNA, 2000), y 90.000 empleos tanto directos como indirectos (CNA, 1999). Esta actividad ocupa el segundo lugar en las exportaciones de productos tradicionales; durante 1997-1998 Ecuador se situó como el tercer exportador de camarón a nivel mundial por debajo de Tailandia e India (CNA, 2000) con 205.000 hectáreas a lo largo de la costa ecuatoriana dedicadas a la camaronicultura.

Desde los inicios de esta actividad, los pequeños y grandes camaronicultores han actuado en forma independiente para resolver sus necesidades tecnológicas, dentro de ellas: prácticas de manejo en el cultivo de camarón, control de patologías, etc. (Calderón *et al.,* 1997; Mialhe y Cedeño, 1997). Este ha sido uno de los motivos por el cual la visión positiva de la industria camaronera se ve empañada, debido a que desde sus inicios el desarrollo de la misma ha adolecido de prácticas de manejo estandarizadas y de condiciones adecuadas para su industrialización (Pillay, 1997).

Peeters y Rodríguez (1999), establecen que las patologías más comunes en el ciclo del camarón están estrechamente relacionadas a las prácticas de manejo de esta actividad. Por otro lado también se ha establecido que el uso no controlado de los alimentos artificiales y fertilizantes, la mala calidad del suelo (Liao, 1989; Chamberlain, 1997), el mal empleo de químicos incluyendo los antibióticos y pesticidas (Mialhe y Cedeño, 1997), la excesiva producción y la introducción de especies exóticas de camarón (Flegel *et* al., 1998; Flaherty y Karnjanakesorn, 1995; Macintosh y Phillips, 1997; Primavera, 1993; Spaargaren, 1998) así como el deficiente manejo medio ambiental (Flegel, 1996) favorecen la aparición de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Lightner y Redman, 1998; Mialhe y Cedeño, 1997).

En los últimos 30 años, el cultivo del camarón en el mundo ha mostrado un marcado incremento en la presencia de enfermedades infecciosas (bacterias, virus y hongos) y no infecciosas, ejemplos de estas: síndrome de la gaviota, síndrome de bolitas, síndrome de zoea, Baculovirus monodon (BVM) en *P. monodon*, necrosis hematopoyética (NHHI) en *P. stylirostris* y *P. monodon* respectivamente (Lightner, 1996; Pillay, 1997), síndrome de Taura en *P. vannamei* reportado en el Ecuador en 1992, sumándose recientemente a estas el denominado síndrome de la mancha blanca

(WSS) de origen asiático, que se reportó en el mismo país en 1999 como una seria amenaza (CENAIM, 1999; Siqueira, 1997).

Estas patologías han originado repercusiones económicas notorias, un ejemplo de ello: el síndrome del WSS con pérdidas de $ 1.200 millones al término del año 2000 (CNA, 2000).

Ante la presencia de enfermedades infecciosas y no infecciosas, una alternativa para contrarrestarlas fue la aplicación y/o utilización de una serie de antibióticos dentro de los sistemas de cultivos en granjas camaroneras, misma que a corto plazo se hizo común (Treviño *et al*., 1993; Valle, 1999). No obstante el uso indiscriminado de estas drogas ha traído como consecuencia el deterioro de la calidad del medio ambiente (Medina, 1994), el riesgo de la posible acumulación en sedimentos (Jacobsen y Berglind, 1988; Björklund *et al.,* 1991). y uno de sus principales efectos secundarios la resistencia bacteriana (Kupka *et al.,* 1992)

Los antibióticos aprobados por organismos internacionales como la FDA (Administración de drogas y alimentos), para uso en acuicultura (Cevallos *et al.,* 1999) son pocos, sin embargo en nuestro medio es una práctica de prevención establecida (Cenaim, 1999). Estas drogas han sido comúnmente empleados primeramente como promoteres de crecimiento, específicamente como estabilizadores de la flora bacteriana (Chamberlain, 1995), y recientemente como agentes profilácticos tanto en laboratorios como en piscinas camaroneras (Brown, 1989). A pesar de los beneficios que se ha obtenidos de esta actividad Esta práctica junto con la carencia de normativas estatales que regulen el uso de estas sustancias podría ser la causa de la aparición de nuevas enfermedades para el camarón (Plumb y Vinitnantharat, 1990; Gómez *et al.,* 1998).

Al momento, el estudio de estos aspectos está siendo considerado tanto a nivel nacional (CNA, 2000) como internacional. Así, la Comunidad Europea dictó una normativa sobre el uso de medicamentos que contengan sustancias farmacologicamente activas en especies productoras de alimento, que entró en vigencia en enero de 1997. Otros países preocupados por esta situación han desarrollado estudios y métodos sobre: distribución y eliminación de antibióticos para establecer los denominados límites máximos de residuos (LMR) (Cevallos *et al.*, 1999; Gesamp, 1998; Namdari *et al.*, 1996; O´Reilly & Smith, 1999). y en el Ecuador se ha planteado proyectos de permanente monitoreo de calidad del producto de exportación, residuos de antibióticos, pesticidas y metales pesados, calidad de agua tanto en piscinas camaroneras como de estuarios (CNA, 2000).

En el ciclo de vida del camarón, se utilizan una serie de sustancias químicas: oxilato verde de malaquita, cobre hidrosoluble (producto comercial: cutrine-Plus), formalina, trifuralina, que utilizados adecuadamente dan buenos resultados (Pillay, 1997), y los antibióticos, que son moléculas que bloquean ciertos procesos metabólicos bacterianos provocando de esta manera la inactivación o muerte de las bacterias, los mas comunes: oxitetraciclina, amoxacilina, sarafloxacina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, ácido nalidixico, eritromicina, entre otros.

Antibióticos de amplio espectro como las quinolonas de primera generación (ácido oxolínico, flumenquina, etc.) y fluoroquinolonas (sarafloxacina, norfloxacina, etc.) son utilizadas tanto en medicina veterinaria como humana (Pascual, 1995) para el tratamiento de varias infecciones (Paton y Reeves, 1998). En acuacultura las quinolonas representan el mayor grupo de antibióticos sintéticos ampliamente usados en los últimos quince años (Backhaus *et al.,* 1999) como agentes profilácticos y/o quimioterapeúticos e indicados para el tratamiento de varias especies de bacterías como *Vibrio harveyi* en *P. indicus* y *monodon* (Abraham *et al.,* 1997 a, b; Moriarty, 1998; Pitogo *et al.,* 1998), *V. alginolyticus* en camarones y peces (Mishra, 1998).

La enrofloxacina, quinolona perteneciente a la tercera generación, derivada del ácido carboxílico, obtenida por síntesis total, de amplio espectro de acción sobre bacterias gram positivas y negativas. Este antibiótico ha generado estudios desde su introducción en la acuacultura (Alderman, 1988), que en su mayoría han sido enfocados al área de piscicultura (Oshima *et al*., 1994; Rangdale *et al*., 1997). Su mecanismo de acción se basa en su acción sobre los ácidos nucleicos, interfiriendo en su síntesis por la inhibición de la enzima DNA girasa. Por sus ventajas se ha empezado a utilizar en el cultivo de camarones *Penaeus vannamei* (Valle, 1999).

No obstante, la enrofloxacina esta señalada como causante del desarrollo de resistencias para las quinolonas en aislamientos humanos, por la inclusión de esta en la medicina veterinaria (Gómez, 1998). Levinson y Jawetz (1998), indican que la resistencia bacteriana por quinolonas (enrofloxacina), tiene su origen en dos factores: mutaciones cromosómicas que modifican el DNA girasa, ó cambios en las proteínas exteriores de la membrana que reducen la captación del fármaco en el interior de la bacteria. hasta el momento no se ha reportado la existencia de plásmidos que codifiquen para dichos factores (Valle, 1999).

Los métodos para la determinación y cuantificación de antibióticos en tejidos de diferentes especies marinas mas comunes son: pruebas microbiológicas, discos de sensibilidad, entre otros (Williams, 1997). Uno de los métodos de reciente aplicación para el estudio de residuos de antibióticos lo constituye la cromatografía líquida de alta performance (HPLC, siglas en inglés), gracias a la facilidad de trabajo, límites de detección, cualificación y cuantificación presentados por este sistema, la mayoría de los trabajos realizados en este ámbito se han llevado a cabo en base a esta herramienta analítica (Bermingam *et al.,* 2000; Garrelts *et al.,* 1996; Intorre *et al.,* 2000; Kasuga *et al.,* 1982).

Trabajos realizados sobre la famacocinética de la enrofloxacina en varias especies han utilizado esta técnica (Samuelsen & Lunestad, 1996; Lewbart, G., 1997; Stoffregen, D., 1997; Intorre *et al.,* 2000).

Reiteradamente se ha propuesto que el indiscriminado uso y abuso de ciertos fármacos en el ámbito global de la medicina, trae consigo el incremento de bacterias patógenas hacia la salud humana; aunque este uso representa un peligro potencial, aun no esta confirmado (Gómez, 1998). Sin embargo en base a los diferentes mecanismos de resistencia y teniendo en cuenta el peligro inminente de que se difunda en la faz de la tierra, es necesario llegar a un concepto globalizado y racionalizado sobre el uso de los antibióticos.

De lo expuesto es menester de todas las instituciones ligadas a la acuacultura lograr una acción conjunta para poder disminuir el uso de estas sustancias, tanto a nivel nacional como internacional, y poder alcanzar las bases para una industría sustentable.

La propuesta de este estudio es determinar los residuos de enrofloxacina en camarón blanco *P. vannamei*, para generar datos que ayuden en el conocimiento de una adecuada medicación y/o necesidades terapéuticas, y por consiguiente estos datos podrán ser de utilidad sobre la farmacocinética de este antibiótico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Bioensayo: Condiciones experimentales

Con el objetivo de determinar la curva acumulación y eliminación de enrofloxacina en tejidos de camarón se administró dieta medicada por un período de 12 días, luego de este tiempo se administro la dieta control (sin antibiótico).

2.1.1 Tanques

Las unidades experimentales fueron 12 tanques rectangulares de fibra de vidrio; 8 tanques con un área de 0,95 m2 y con un volumen de 600 l. 4 tanques 0,76 m2. de 400 l. (fig. 1).

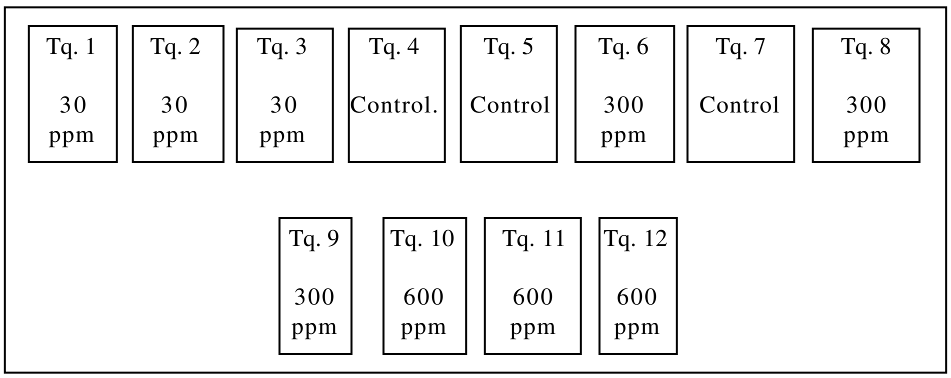

Fig. 1. Esquema de la disposición de los tanques

2.1.2 Animales

Para el bioensayo se utilizaron postlarvas de maduración de *P. vannamei*, originarios de laboratorio GCIF Marino (Mar Bravo-Ecuador), mantenidos hasta obtener peso adecuado para bioensayo. Se sembraron 50 camarones por tanque con un peso promedio inicial de 7,2 ± 0,44 g. Antes de iniciar el bioensayo se realizaron análisis para detectar la presencia de la enfermedad del punto blanco (white spot), obteniéndose resultados negativos.

Los tanques fueron previamente lavados con solución jabonosa y desinfectados con cloro; Para la eliminación del cloro residual se adicionó tiosulfato de sodio ($S_2O_3Na_2$); antes de la siembra estos tanques se encontraron a la mitad de su capacidad con agua de mar a una salinidad de 35 ppt y una temperatura de 26.°C, colocándose 50 camarones por tanque que fueron previamente pesados con el objetivo de obtener una mínima desviación estándar. Al terminar la siembra los tanques recobraron paulatinamente su nivel normal de agua.

2.1.1.3 Dietas

Se prepararon 3 dietas experimentales tomando como base la composición de la dieta CENAIM 40. Las concentraciones escogidas fueron a partir de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC's); estas pruebas fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología del CENAIM, por medio de la inoculación de bacterias aisladas en una serie de tubos conteniendo diluciones del fármaco (Levinsón y Jawetz, 1998).

2.1.3.1 Elaboración

Para la elaboración de la alimento medicado, se trabajó con la formulación de la dieta CENAIM 40 (tabla 1). Las dietas fueron elaboradas de forma experimental en la planta piloto de CENAIM, verificándose el siguiente procedimiento:

Tabla 1. Ingredientes de dieta CENAIM 40

Ingredientes	**Cantidad (g.)**
Harina de camarón	26,77
Harina de pescado	15,0
Harina de calamar	5,0
Pasta de soya	17,99
Polvillo de arroz	5,0
Gluten de trigo	5,0
Hígado de bacalao	5,2
Aceite de soya	0,53
Lecitina líquida	1,0
Colesterol	0,5
Vitamina 1er lote	4,0
Minerales ROCHE	2,0
Aglutinantes	0,08
Antioxidante	0,01
Maicena	11,82

Las cantidades de EF. necesarias para los diferentes niveles (30, 300 y 600 ppm) se calcularon tomando como base un 40% de pérdida por manufactura y enrofloxacina al 10%. Para la inclusión del antibiótico en la dieta, la maicena se sustituyó por el antibiótico. Se pesó y pulverizó los ingredientes y el antibiótico por separado, en una bandeja metálica los ingredientes se mezclaron de menor a mayor, el antibiótico se adicionó en porciones pequeñas y para asegurar una completa homogenización por cada paso se mezcló durante 5 minutos, terminada la mezcla de los ingredientes se agregó agua destilada 50 ml aproximadamente hasta llegar a obtener una masa blanda. La mezcla de los ingredientes se lo realizó en un lugar protegido de la luz blanca (lamparas, focos, etc.) y solar. La masa obtenida se hizo pasar dos veces a través de un molino de carne (oster, diámetro del orificio igual a 3 mm), los espaguetis formados se los colocó en latas metálicas dentro del secador por 2 horas a 60°C. y posteriormente se procedió a trocearlos para darles forma de un pellet (7 mm x 3 mm), se enfundaron, etiquetaron y almacenaron a -20°C. hasta momento de utilización.

2.3.1 Pérdidas por manufactura

Para determinar las pérdidas por proceso de manufactura se trabajó en dietas balanceadas comerciales procedentes de compañías productoras de alimento balanceado (compañía A, B y C), de las que se tomó muestras representativas (fig. 2) en el mezclado, molido, expandido, acondicionado peletizado y producto final, que fueron conservadas a - 20°C. para posterior análisis en contenido de enrofloxacina vía HPLC.

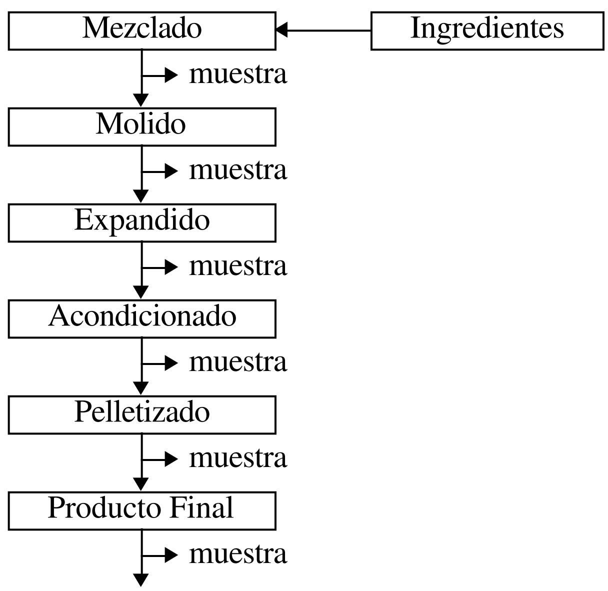

Fig. 2. Toma de muestra en proceso de manufactura de dietas balanceadas comerciales.

2.3.2 Pérdidas por lixiviación

Las pruebas de lixiviación se realizaron por triplicado en fiolas de 175 ml, con enrase a 100 ml. de agua de mar filtrada (0,2 µm). Las muestras utilizadas fuerón procedentes de las compañías A y B.

El método aplicado se describe a continuación:

En fiolas de 175 ml conteniendo agua de mar filtrada (0,2 µm) se adiciono 1 g. de pellet; se colocaron en el agitador a 70 r.p.m. y 26°C. A tiempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 minutos, se procedió a vaciar el contenido de las fiolas en mallas metálicas previamente pesadas y colocadas en la estufa por 24 horas a 60°C, transcurrido este tiempo se las colocó en desecador por espacio de 30 minutos para su enfriamiento, para luego ser pesadas y conservadas a -20°C. para su análisis en contenido de enrofloxacina vía HPLC. Con los datos obtenidos se procedió a realizar los respectivos cálculos.

2.1.4 Protocolos

2.1.4.1 Parámetros Físicos y Químicos

Para la determinación de estos parámetros se utilizaron los siguientes materiales: termómetro, medidor de pH TOA HM-5S, oxigenómetro YSI 85, con los cuales se obtuvo: 26.11 ± 0.59 ºC de temperatura, 3.5 ± 0.04 ppt de salinidad, 6.27 ± 0.59 mg/l de oxigeno y 7.9 ± 0.07 de pH del agua durante el bioensayo.

2.1.4.2 Alimentación

Previo a la alimentación con dieta medicada se mantuvo a los camarones en ayuno por dios días y durante el bioensayo los animales fueron alimentados al 7% de su biomasa en dosis repartidas a las 09:00 AM y 17:00 PM. En los primeros 12 días se administró dieta medicada, y a partir del día 13 hasta el 33 se administró dieta CENAIM 40 (sin antibiótico), para determinación de alimento consumido y para la corrección de los valores diarios de alimentación, se consideró el número de animales muertos y los de muestreo. Para ello el alimento sobrante de la primera y segunda alimentación se sifoneo a las 16:30 PM y 08:30 AM respectivamente, colocado sobre una malla previamente pesada, lavado en agua dulce, destilada y finalmente secado en una estufa por un tiempo de 24 horas a 60 ºC,.

2.1.4.4 Frecuencia de muda

Con el objetivo de obtener datos que ayuden en la interpretación de los resultados se sifoneó siguiendo el horario de sifoneo en la alimentación. Para la cuantificación de las mudas y para evitar problemas de confusión, la parte restante del cefalotorax fue tomada como una muda, para luego clasificarla en la tabla.

2.1.4.5 Muestreo

Con la finalidad de determinar la distribución de enrofloxacina en hemolinfa y tejidos (hepatopáncreas y músculo) del camarón, se muestrearon aleatoriamente 2 animales de los cuales se extrajo la hemolinfa, que junto al animal fue conservada a -80 °C. hasta su posterior análisis según el esquema en la tabla 2.

Tabla 2. Días y número de animales muestreados durante el bioensayo

Muestreo (día)	# de animales
0	2
2	2
4	2
6	2
8	2
10	2
12	2
14	2
16	2
18	2
20	2
22	2
25	2
29	2
33	2

2.1.4.5.1 Muestreo de hemolinfa

Se extrajo el plasma del camarón con ayuda de una jeringa estéril conteniendo citrato de sodio al 10% en volumen adecuado para obtener una relación plasma-citrato de sodio (1:1), colocándoselo en tubos eppendorf de 1,5 ml. con la precaución de que estos se encuentren marcados y a baja temperatura (con hielo) y se procedió a igualar el volumen con citrato de sodio al 10%. para luego centrifugarlos a 5000 r.p.m. a 1°C. y por 15 minutos, trasvasando el sobrenadante a un tubo eppendorf marcado y limpio.

2.1.4.5.2 Muestreo de tejidos y dietas

De los dos camarones muestreados diariamente se extrajo el hepatopáncreas teniendo precaución de no rasgarlo y se los colocó sobre papel de aluminio para realizar el pesaje respectivo; se desechó el exoesqueleto y el músculo fue colocado en el vidrio reloj y se procedió a cortarlo en trozos muy pequeños para luego en tubos de centrífuga pesar todo el hepatopáncreas y en músculo se peso 5-6 g.

En balanceados se pulverizó y se tamizó las muestras por 500 - 700 µm y en tubos de centrífuga limpios y rotulados se pesó por separado 1 g. por triplicado.

2.2 Implementación del método de análisis de enrofloxacina

Para la implementación de la metodología de extracción inicialmente se probaron las metodologías descritas por Intorre *et al.,* 2000, Oshima *et al.,* 1996, y

Ellerbroeck 1990, de las cuales se trabajo con la metodología de Intorre *eta al.,* 2000. por su mayor practicidad y facilidad de trabajo.

2.2.1 Químicos y reactivos

El acetonitrilo, etanol y metanol grado HPLC, el ácido fosfórico, citrato de sodio y trietilamina grado reactivo. El estándar fue obtenido desde laboratorios de Bayer-Ecuador

2.2.2 Extracción de enrofloxacina a partir de hemolinfa

2.2.2.1 Solución de extracción

La solución de extracción (SE) desde hemolinfa es: etanol con 1% de ácido acético y la solución de reconstitución es: solución de extracción y fase móvil en relación 1:1

2.2.2.2 Procedimiento

. En los tubos eppendorf se adicionó 1 ml. de etanol con 1% de ácido acético dentro de cada appendorf, se agitó y dejó en reposo por 10 minutos, centrifugándose luego a 5000 r.p.m. a 4°C. y 15 minutos y el sobrenadante se trasvasó a una pera de vidrio para luego rotaevaporar el contenido a una temperatura de 40°C. hasta sequedad. El remanente de la pera se reconstituyo con 1 ml. Fase móvil se filtró a través de 0,45 µm. en viales etiquetados color ámbar y con tapa rosca de teflón, inyectándose 50 µl. al sistema HPLC.

Cabe destacar que lo anterior se lo realizó a expensas de luz blanca y solar y encontrándose en un cuarto a temperatura ambiente de 21°C.

2.2.3 Extracción de enrofloxacina desde tejidos y dieta artificial

2.2.3.1 Solución de extracción

La SE en tejidos y dietas utilizada fue: etanol con 1% de ácido acético y la solución de reconstitución: fase móvil.

A cada tubo se agregó 15 ml. de solución de etanol con 1% de ácido acético, se agitó y se dejó en reposo durante 10 minutos. Las muestras fueron homogenizadas a 13500 r.p.m. usando un biohomogenizador (Ultra Turrax T25) por 1 minuto manteniendo la temperatura baja con hielo, El homogenado obtenido fue centrifugado por 15 minutos, 1 ºC y a 3000 r.p.m. utilizando una centrífuga refrigerada (Kokusan H2000B), el sobrenadante se trasvasó a una pera de vidrio limpia y etiquetada, con el precipitado se repitió todo el proceso de extracción y el sobrenadante se unió al anterior. Se rotaevaporó las peras hasta sequedad usando un rotavapor (Buchi H-2000B) a 40 ºC., el remanente fue reconstituido con 1 ml. de fase móvil y filtrado a través de 0,45µm. en viales etiquetados, color ámbar y tapa rosca de teflón. En caso de concentraciones altas se diluyeron hasta concentración adecuada de análisis.

2.2.3.3 Recuperación del método

Para determinar la capacidad de recuperación del método se lo realizó por medio de pruebas de spike, las cuales consisten en agregar una concentración conocida en la dieta y realizar el análisis de recuperación utilizando la metodología establecida, la concentración resultante de este análisis debe ser igual a la introducida al inició para que la recuperación de la metodología sea del 100%. Los análisis para determinar el porcentaje de recuperación fue realizado en dietas obteniendo: 71 % de recuperación de la metodología (tabla 3).

Tabla 3. Pruebas de recuperación de la metodología

Prueba	Recuperación
A	74.5 ± 0.26
B	70.1 ± 0.18
C	69.1 ± 3.39
Promedio	**71.2 ± 1.28**

2.2.4 Análisis de enrofloxacina vía HPLC

2.2.4.1 Instrumental

Sistema de Cromatografía liquida HPLC con inyección manual constituido de: una bomba Shimadzu LC -10 AS, detector Shimadzu UV/VIS SPD-6AV, integrador Shimadzu CR 501, la columna SORBAX-ODS (4.6 mm x 15 cm) en fase reversa, horno Shimadzu CTO -6A para la columna y un bucle de 50 µl.

2.2.4.2 Condiciones de análisis

2.2.4.2.1 Flujo

En este sistema el flujo de la fase móvil estuvo en 1,2 ml por minuto

2.2.4.2.2 Presión

La presión generada por el flujo de la fase móvil en la columna 101 kgf/cm^2

2.2.4.2.3 Temperatura

La temperatura en la cual se mantuvo el horno de la columna durante el período de análisis de EF en las diferentes muestras fue de 30°C. y con una temperatura ambiente de 21°C.

2.2.4.2.4 Longitud de onda

Para lograr la detección del la EF en el espectrofotómetro se trabajó a una longitud de onda de 278 nm (Intorre *et al.,* 2000).

2.2.4.3 Fase móvil

La fase móvil consta de ácido fosfórico 0.025 M y acetonitrilo en relación 87:13 ($^v/_v$) y ajustada a pH 3.00 con trietilamina. Se preparó la solución de PO_4H_3 0.025 M., y se procedió a la filtración (0,45 µm) y desgacificación, luego se procedió a mezclar el PO4H3 0.025 M. y el acetonitrilo en relación 87:13($^v/_v$) y se ajustó el pH 3.0 ± 0.01 con trietilamina.

La fase móvil debe ser colocada en un recipiente de color ámbar y tapado para evitar la introducción de gases. Cabe indicar que el proceso de desgacificación tiene que ser muy eficiente ya que de lo contrario los gases contenidos en la solución afectarían luego en la veracidad de los análisis cromatográficos.

2.2.5 Validación del método

2.2.5.1 Curva de calibración y estándares

Con la utilización de enfloxacina certificada por (Bayer) se prepararon estándares de 0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 0.1.6, 3.2 µg EF. / ml. con 3 replicas por estándar e inyectando al sistema de HPLC 50 µl. en forma aleatoria, con los datos obtenidos se obtuvo la curva de calibración con una linealidad de r2 = 0.9982 (fig. 3).

.

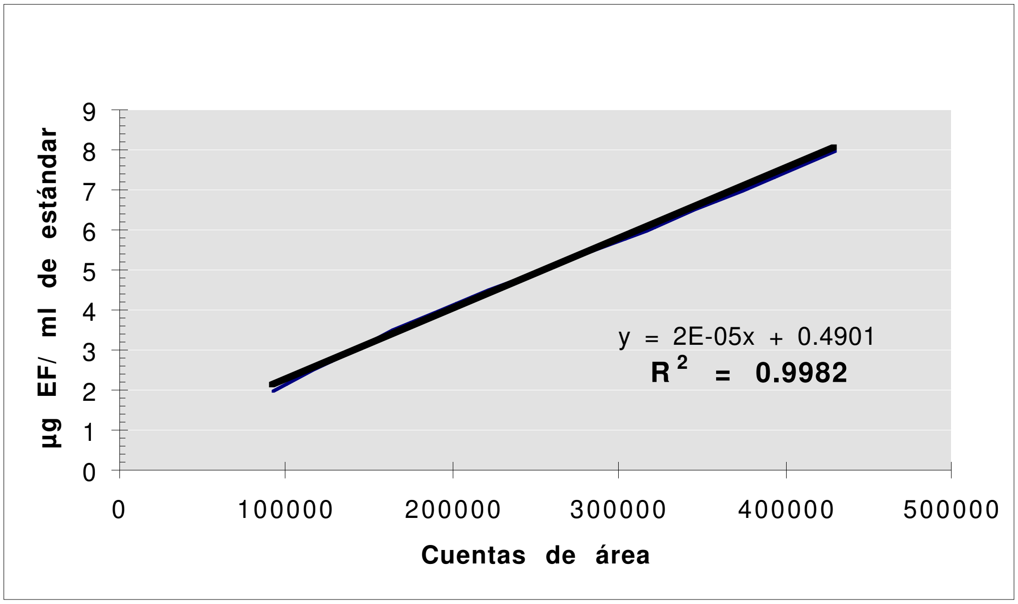

Fig. 3. Curva de calibración por medio de estándares

2.2.5.2 Límite de detección

Es la menor concentración de la sustancia referida detectada, y se efectúa comparando este con la respuesta de un blanco, siendo positiva si la señal supera la relación señal/ruido en un factor de 2 a 3. Para este estudio se utilizó un factor de 3, obteniendo un límite de detección de 0.1 ppm.

3 RESULTADOS

3.1 Dietas

3.1.1 Pérdidas por proceso de manufactura

De un aproximado de 15 fábricas productoras de alimento balanceado para camarones a nivel nacional, tres fueron seleccionadas para este estudio. Se analizó por triplicado, la concentración de EF presente en muestras de diferentes etapas del proceso de manufactura de una dieta medicada, la tabla 4 muestra los resultados de este ensayo, en la cual se observa la similitud en los resultados de pérdidas del antibiótico.

Tabla 4. Pérdidas por manufactura de EF en dietas comerciales (compañías A, B y C)

	Compañías							
	A1 (120ppm)		**A2** (60ppm)		A1 (120ppm)		**C** (120ppm)	
Proceso	Cantidad ppm	Pérdida %	Cantidad ppm	Pérdida %	Cantidad ppm	Pérdida %	Cantidad ppm	Pérdida %
Mezclado	103.0	0.0	52.2	0.0	117.3	0.0	104.1	0.0
Molido				39.0	66.8	30.6	70.6	
Expandido	36.2	64.9	25.8	50.6				
Acondicionado				33.3	14.6	24.6	19.6	
Pelletizado				26.2	21.3	28.0	0.0	
Producto final	21.3	41.2	8.7	66.3	21.0	20.2	20.2	27.9
Pérdida acumulada		**79.3**		**83.3**		**82.3**		**80.6**

3.1.2 Pérdidas por lixiviación

En los análisis a las dietas A, B y C se observó (fig. 4): pérdida acumulada: 90.1 % de A y 89 % B; de las cuales el 72.4 ± 1.92 y 70.9 ± 3.23 se lixivio en un tiempo de 0.3 horas, y con una pérdida promedio de 17 y 18.4 % de A y B en las restantes 3.7 horas.

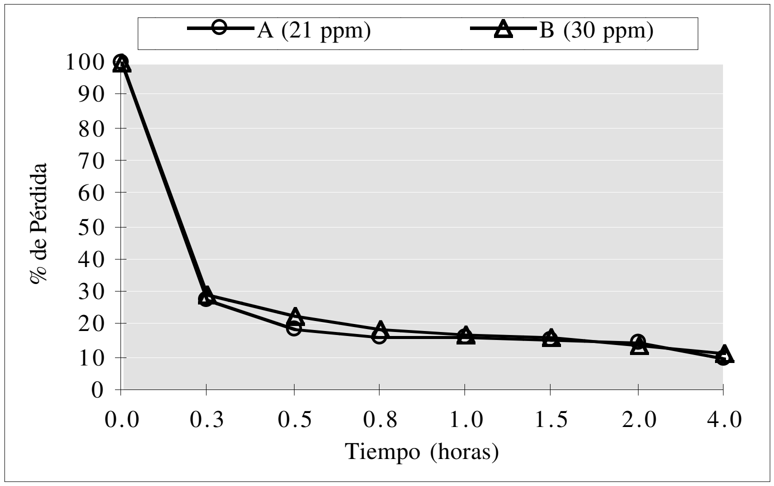

Fig. 4. Pérdidas por lixiviación en dietas comerciales A, B y C.

2.1.4.3 Consumo de alimento

Con los datos obtenidos de alimento no consumido se obtuvo las cantidades de alimento consumido durante el bioensayo, en fig. 5. se observa la tendencia del consumo de alimento.

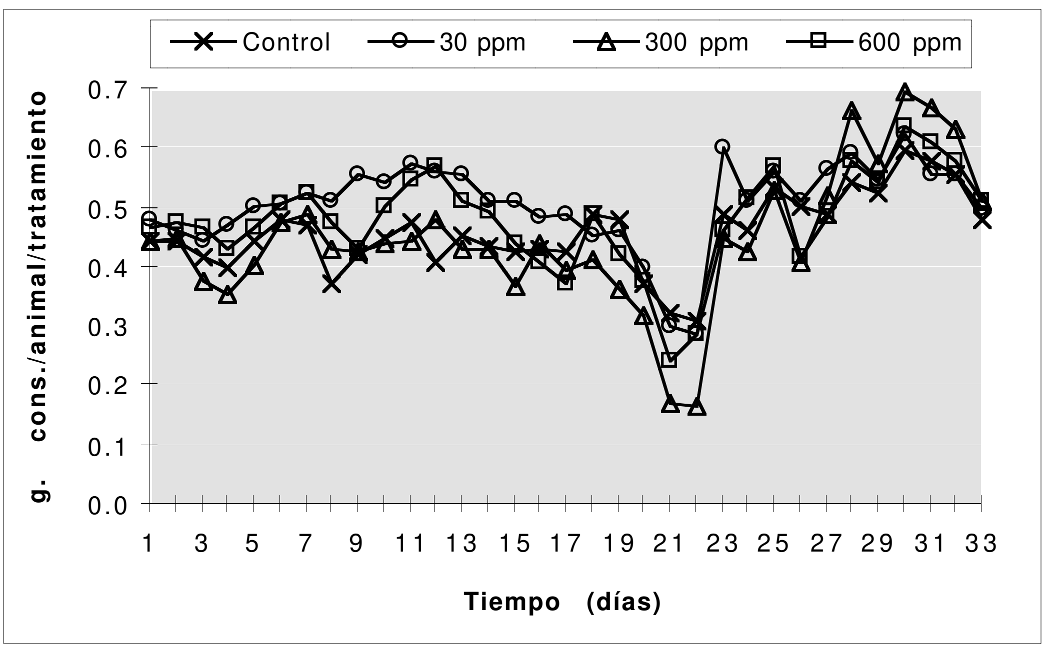

Fig. 5. Consumo de alimento por animal y por tratamiento durante el bioensayo.

3.2 Disposición en el plasma

La concentración de enrofloxacina (EF) que se observó en el plasma del camarón es dependiente de la concentración de EF. en la dieta. En el día 4 hay una eliminación de EF a diferencia del sexto día que existió un incremento de la misma (fig.6) siendo este eliminado parcialmente en el octavo día.

La absorción de enrofloxacina ocurrida en los tratamientos disminuyo lentamente presentando picos de concentración máxima (C_{max}) con su respectivo tiempo máximo (T_{max}), en: 30 ppm (C_{max} 0.21 ± 0.12 µg/ml y T_{max} de seis días), 300 ppm (C_{max} 1.07 ± 0.43 µg/ml y T_{max} de seis días) y 600 ppm (C_{max} 1.81 ± 0.15 µg/ml y T_{max} de dos días), con concentraciones promedios en los tratamientos de 30, 300 y 600 ppm de: (0.18 ± 0.02, 0.75 ± 0.27 y 1.36 ± 0.35 µg/ml respectivamente).

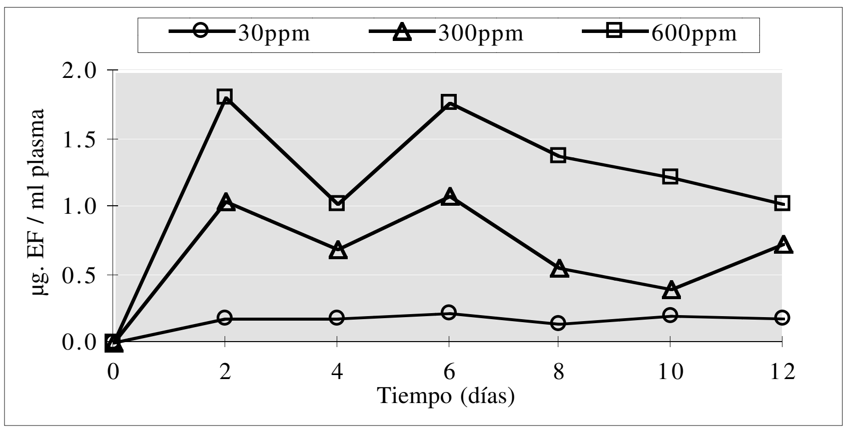

Fig. 6. Nivel de enrofloxacina en el plasma de *Penaeus vannamei*

3.3 Disposición en Hepatopáncreas

Las pruebas realizadas en los hepatopáncreas de *P. vannamei* presentaron diferencias significativas en los tratamientos 30 y 600 ppm respectivamente (tabla 5), observándose tendencias similares de crecimiento en 30 y 300 ppm contra 600 ppm entre los días (2 al 8).

Con concentraciones máximas alcanzadas por la absorción de EF en 30 ppm (C_{max} 3.48 ± 1.18 µg/g. y T_{max} de doce días), 300 ppm (C_{max} 4.26 ± 1.24 µg/g. y T_{max} de ocho días), 600 ppm (C_{max} 4.89 ± 3.54 µg/g. en T_{max} de seis días) y concentraciones promedios en los tratamientos de 30, 300 y 600 ppm (0.71 ± 1.25, 1.32 ± 1.64, 2.0 ± 2.04 µg/g. respectivamente). Durante el período de medicación se observo una acumulación de EF, mientras que al alimentar con dieta no medicada a partir del treceavo día hasta el final del bioensayo las concentraciones de EF disminuyeron considerablemente hasta concentraciones por debajo de los límites máximo de residuos (LMR) (fig. 7).

Tabla 5. Probabilidad de significancia para la concentración de EF en hepatopáncreas mediante tres métodos

Tratamientos	**Métodos**		
	Scheffe	**Bonferroni**	**LSD**
600 - 30	0.0399	0.038	0.0128
300 - 30	0.4420	0.5082	0.2106
300 - 600	0.2148	0.3557	0.1363

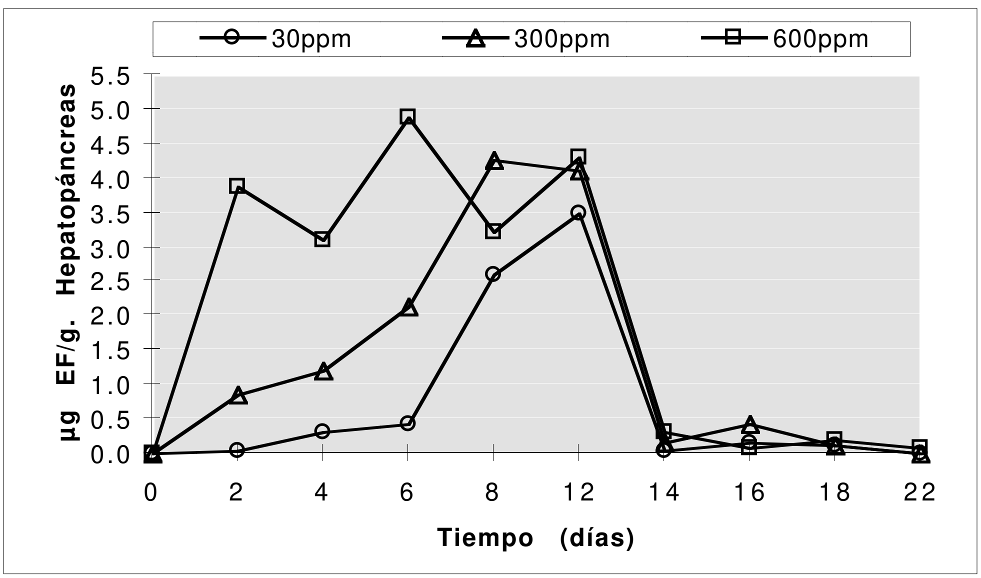

Fig. 7. Nivel de enrofloxacina en Hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*

3.4 Disposición en músculo

En las concentraciones de EF. detectadas en músculo no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos (tabla 6). con concentraciones máximas alcanzadas en 30 y 300 pmm (C_{max} 0.01 ± 0.05, 1.55 ± 0.92 µg/g y T_{max} de dos días respectivamente) y en 600 ppm (C_{max} 2.41 ± 1.80 µg/g. y T_{max} de dos días), con concentraciones promedios en los tratamiento de 30, 300 y 600 ppm (0.05 ± 003, 0.56 ± 0.56, 0.99 ± 1.08 µg/g. respectivamente) (fig. 8).

Tabla 6. Probabilidad de significancia para la concentración de EF en músculo mediante tres métodos

Tratamientos	**Métodos**		
	Scheffe	**Bonferroni**	**LSD**
600 - 30	0.0993	0.0999	0.0344
300 - 30	0.4739	0.5422	0.2293
300 - 600	0.5746	0.6577	0.3005

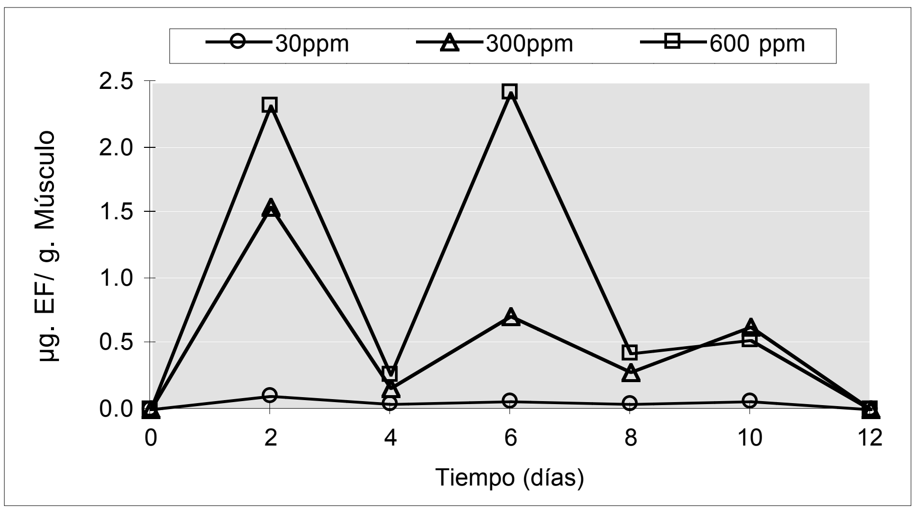

Fig. 8. Nivel de enrofloxacina en Músculo de *Penaeus vannamei*

3.5 Sobrevivencia

Con referencia a la sobrevivencia no se detecto diferencia significativa ($p > 0.05$), durante el período de medicación se observó un mayor porcentaje que fue del 98% en la dieta de 30 ppm, el cual disminuyó hasta un 94% en la dieta de 300 ppm. pero se observó que con la dieta de 600 ppm la sobrevivencia se mantuvo constante con un promedio del 99% (fig. 9). En la dieta control la sobrevivencia fue del 98,15% sin haber marcada diferencia con las dietas medicadas de las cuales se obtuvo un promedio del 98,28%. La sobrevivencia promedio obtenida durante el bioensayo fue del 95 ± 0.04 %, en tratamiento control (95 ± 0.03 %), 30 ppm (96 ± 0.03 %), 300 ppm (90 ± 0.07 %) y en 600 ppm (97 ± 0.02 %).

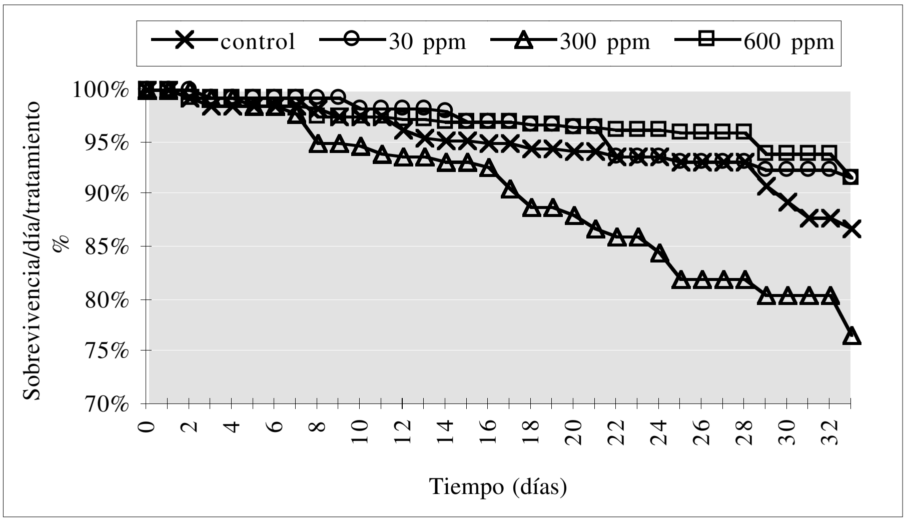

Fig. 9. Sobrevivencia de *P. vannamei* durante el período de medicación

3.6 Frecuencia de muda

En los primeros cuatro días de medicación hay un mínimo número de camarones que ha mudado, pero a partir del cuarto día se observa un mayor número de mudas (fig. 10). En el periodo de medicación se observa un mayor número de mudas en los días sexto y noveno para los tratamientos de 300 y 600 ppm. Comparando los primeros cuatro días con los restantes del periodo de medicación no se observa una sincronización en las mudas.

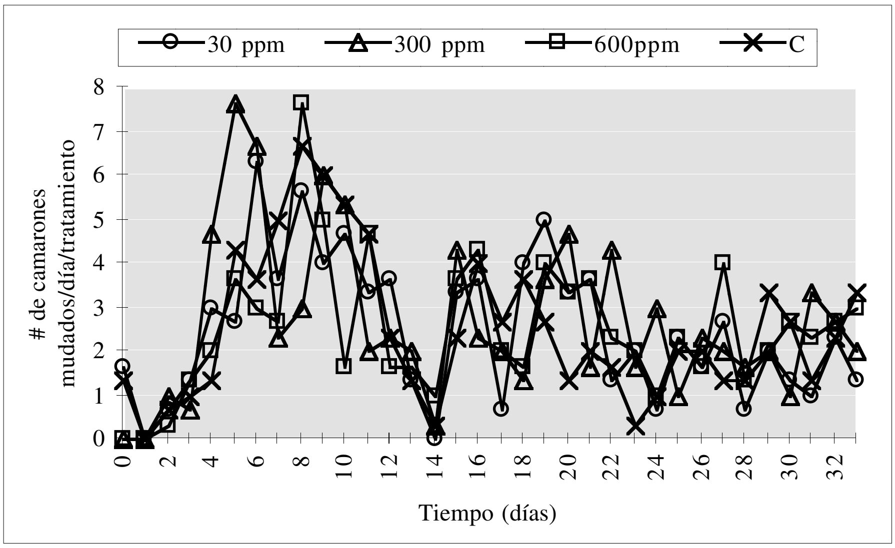

Fig. 10. Frecuencia de Mudas en *P. vannamei* durante el bioensayo

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- la EF presenta un porcentaje acumulado del 90.1% de lixiviación mayor comparado con otros antibióticos.

- En el sexto día se encontró la concentración máxima de la EF en el plasma y músculo, contra el hepatopáncreas que presentó un pico elevado en el octavo día, en los primeros dos días presentan una eliminación del antibiótico.

- En el plasma y en los tejidos (músculo y hepatopáncreas) hubo una eliminación del antibiótico en el día 4 a ecepción del hepatopáncreas, en las dietas 50 y 500 ppm respectivamente; a diferencia del dia sexto que presento un incremento.

- La supervivencia no fue afectada por la EF.

- El mal empleo del antibiótico traerá como consecuencia pérdidas económicas.

- Se recomienda tener un mejor control sobre el proceso de manufactura, lográndo un ahorro de dinero y antibiótico, pues en los primeros procesos es donde se produce la mayor pérdida.

5. REFERENCIAS

Abraham, T., Manley, R., Palaniappan, R., 1997a. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. J. Aquaculture. Vol. 12:1 1-8. In: Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón- Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Publireportaje Farmavet. Valle, J., 1999. 17-22 pp.

Abraham, T., Palaniappan, R., Dhevendaran, K., 1997b. Epibiotic of luminous bacteria in penaeid shrimp *Penaeus indicus* (Hmilene Edwards) larvae.- Indian Journal of Marine Sciences.- 26:2. 209-212 TD: J(Journal article): AS9 ER:M (Marine) LT:English LR. In: Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón- Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Publireportaje Farmavet. Valle, J., 1999. 17-22 pp.

Alderman, D.J., 1988. Fisheries chemoteraphy: a review. In: Muir JF, Roberts RJ (Eds) Recent advances in aquaculture, Vol. 3, Timber Press, Portland, Oregon, USA. 1-61 pp.

Backhaus, T., Scholze, M., & Grimme, L., 2000. The single substance and mixture toxicity of the quinolones to the bioluminescent *Vibrio Fischeri.* Aquatic Toxicology, 49, 49-61 pp.

Bermingham, E., Papich, M., & Vivrette, S., 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin administered intravenously and orally to foal. american Jourrnal of Veterinary Research. Vol. 61, No. 6, 706-709 pp.

Björklund, H., Rabergh, C., Bylund, G., 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. Aquaculture 97, 85-96. In: The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Aquatic Toxicology 49 (2000) 49-61 pp.

Brown, J., 1989. Antibiotics: Their use and abuse in Aquaculture. World Aquaculture Vol. 20(2), 34-43 pp.

Cámara Nacional de Acuacultura, 1999. Vol. 32, 6 pp.

Cámara Nacional de Acuacultura, 2000. Las cifras de la crisis. Noviembre-Diciembre. Vol. 40. 5-26 pp

Cámara Nacional de Acuacultura, 2000. Análisis de las Exportaciones de Camarón: Enero-Julio del 200. Acuacultura del Ecuador. Edición 39, 86 pp.

Calderón , J., Magallón, F., Andratta, E., Sánchez, R., 1997. Taller de trabajo: La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica. 5 pp.

Cenaim, 1999. Informe interno.

Cenaim, 1999. Actividades realizadas por el Cenaim ante el problema del virus de la Mancha Blanca hasta septiembre del 99. Boletin Informativo.

Cevallos, F., Solis, A., & Serrano, J., 1999. Evaluación de la aplicación de dieta medicada con sarafin durante un ciclo de producción de camarón en Ecuador. Panorama Acuícola. Vol. 4. No. 2. 18-20 pp.

Chamberlain, G., 1995. frontiers in shrimp nutrition research. En: Swiming through troubled waters. Proceedings of special session on shrimp farming, Aquaculture 95, Usa (Eds. C.L. Brody y J. S. Hopkings), pp. 108-117. In: Estado del Arte de la Investigación Científica en Nutrición de Peneidos. Galano, T., 1997. In: Taller de Trabajo: La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica. 1997. 47-60 pp.

Chamberlain, G., 1997. Sustainability of world shrimp farming. In.: Pikitch. E.K., Huppert, D.D., Sissenwine. M.P. (Eds). Global Trends: Fisheries Management. American Fisheries Society Symposium 20. Bethesda. MD. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Flaherty, M., Karnjanakesorn, C., 1995. Marine shrimp aquaculture and natural resource degration in Thailand. Environmental Management 19 (1), 27-37. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Flegel, T., 1996. A turning point sustainable aquaculture: The White Spot virus crisis in Asia shrimp culture. Aquaculture Asia, 29-34. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Flegel, T., Cedeño, V., Bachere, E., Rodríguez, J., 1998. Quantitative genetics transformation for the selection of pathogen-resistant shrimp. In: Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology. 5th Asian Fisheries Forum. Chiengmai, Thailand. In; Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón - Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Publireportaje Farmavet, 1999. 17-22 pp.

Garrelts, J., Jost, G., Kowalsky, S., Krol, G., & Lettieri, J., 1996. Ciprofloxacin pharmacokinetics in burn patients. Antimicrobial Agents and chemotherapy. May. 1153-1156 pp.

Gesamp (Joint Group of experts on the Scientific aspects of Marine Environmental Protection), 1998. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Gesamp Reports an Studies, No. 65, Roma, 5-31 pp.

Gómez-Gil , B., Tron M., Roque, A., Tumbull, J., Inglis, V., Guerra-Flores, A., 1998. Species of *Vibrio* isolated from the hepatopáncreas, hemolymph and digestive tract of healthy juvenile. *Penaeus vannamey*. Aquaculture 163, 1-9. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Gómez, G., 1998. Uso medico y veterinario de agentes antimicrobianos: implicaciones para la salud pública, una visión clínica de la resistencia antimicrobiana. Noticias Epidemiológicas, Vol. 2. No. 12.

Intorre, L., Cecchini, S., Bertini, S., Cognetti, A.M., Soldani, G. & Mengozzi, G., 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, Vol. 182. 49-59 pp.

Jacobsen, P., & Berglind, L., 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farm. Aquaculture, Vol. 70, 365-370. In: Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. Duis, K., Inglis, V., Beveridge, M., & Hammer, C., 1995. Aquaculture Research, 26, 549-556 pp.

Kasuga, Y., Sugitani, A., & Yamada, F., 1982. Simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acids in fishes by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan, 23, 344-347 pp. In: Oshima, Y., Fachrudin, L., Ishida, N., Imada, N., & Kobayashi, K., 1996. Effect of Drug-metabolizing Enzyme Activity Induced by PCB on the Residence Time of Oxolinic Acid, Piromidic Acid and Nalidixic Acid in Carp. Fisheries Science. Vol, 62, 302-306 pp.

Kupka H., Lunestad, B., & Samuelsen, O., 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. In: Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality (ed. by C. Michel & D. J. Alderman), pp 174-178. Office International des Epizooties, Paris. In: Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. Duis, K., Inglis, V., Beveridge, M., & Hammer, C., 1995. Aquaculture Research, 26, 549-556 pp.

Levinson y Jawetz, 1998. Mecanismos de Acción. Microbiología e Inmunología: Autoevaluación y Repaso. Segunda Edición. 3-104 pp.

Liao, I., 1989. *Penaeus monodon* culture in Taiwan: Through Two decades of growth. Int. J. Aquat. Fish. Technol. 1. 16-24.In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Lightner, D., 1996. (Ed), A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp World Aquaculture Society, Baton rouge, LA, USA, p. 305. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Lightner, D., Redman, R., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164, 201-220. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Macintosh and Phillips, 1997. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Medina, J., 1994. Problemas en la cuantificación de residuos de antibióticos en tejidos de peces. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Aquila II. 241-245 pp.

Mialhe, E., & Cedeño, V., 1997. Estado del Arte de la Investigación Científica en Genética de Peneidos. 33-36 pp. In: Calderón *et al.,*1997. Taller de trabajo: La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica.

Mishra, S., 1998. Use of dot immunoassay for rapid detection of pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila* from shrimps and fishes.- Indian Journal of Marine Sciences. 27:2. 222-226. In: Valle, J., 1999. Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón - Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Publireportaje Acuacultura del Ecuador. 17-22 pp.

Moriarty, 1998. Control de lominuos Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164:1-4. 351-358. In: Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón- Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Publireportaje Farmavet. Valle, J., 1999. 17-22 pp.

Namdari, R., Abidini, S. y Law, F., 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. Aquaculture, Vol. 144, 27-38 pp.

O'Reilly, A. y Smith, P., 1999. Development of methods for predicting the minimum concentrations of oxytetracycline capable of exerting a selection for resistance to this agent. Aquaculture, Vol. 180, 1-11 pp.

Oshima, Y., Fachrudin, L., Ishida, N., Imada, N. y Kobayashi, K., 1994. Effect of drug-metabolizing Enzyme Activity induced by PCB on the resistance Time of Oxolinic Acid, Piromidomidec Acid and Nalidixic Acid in Carp. Fisheries Science, Vol. 62(2), 302-306 pp.

Pascual, A., 1995. Uptake and intracellular activity of antimicrobial agents in phagocytic cells. Rev. Med. Microbial. 6: 228-235. In: Effects of enrofloxacin on porcine phagocytic function. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, vol. 43 No. 9, 2138-2143 pp.

Paton, J., & Reeves, H., 1988. Fluoroquinolone antibiotics: microbiology, pharmacokinetics and clinical use. Drugs 36, 193-228. In: The single substance and mixture toxicity of quinolone to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri.* Aquatic Toxicology 49 (2000) 49-61 pp.

Peeters, M. y Rodríguez, J., 1999. Problemas bacterianos en la industría camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. El Mundo Acuícola. Vol. 5 (1), 13 pp.

Pillay, T., 1997. Estado actual de la acuicultura. Acuicultura Principios y Prácticas. 1 (ed.) 26-30 pp.

Pitogo, L., Leaño E., Paner, M., 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon,* associated with faltainance of luminescent vibrios in the rearin environment. Aquaculture. 164:337-349. In: Comparación in vitro de los efectos de la Litofloxina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón-Estudio preliminar in situ de la Litofloxina. Acuacultura del Ecuador. Nov.-Dic. 1999. 17-22 pp.

Plumb, J. y Vinitnantharat, S., 1990. Dose tritation de sarafloxacina (A-56620) against *Edwardsiella ictaluri* Infection in Channel Catfish. Journal of aquatic animal health, Vol. 2, 194-197 pp.

Primavera, J., 1993. A critical review of shrimp pond farming in the Philippines. Reviews in Fisheries Science L1. 151-201. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Rangdale, R., Richards, R., & Alderman, D., 1997. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS). Aquaculture. Vol. 158 (3-4) 193-201 pp.

Samuelsen, O., Lunestad, B., Husevag, B., Hoelleland, T., Ervik, A., 1992. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. Dis. Aquat. Org. 12, 112-119. 1992. In: The single substance and mixture toxicity of quinolone to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri.* Aquatic Toxicology 49 (2000) 49-61 pp.

Siqueira, S., 1997. Enfermedades de camarones Peneidos: Una aproximación introductoria y bibliografía seleccionada. 23-32 pp. In: Calderón *et al.,* 1997. Taller de trabajo: La Investigación Científica en Peneidos de Iberoamérica.

Spaargaren, D., 1998. Cultivatión of tiger prawns, *Penaeus monodon*, Fabricius, 1798 (decapoda, Natantial) in Hainan, PR China. Crustaceana 71 (2), 144-157. In: Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture, Vol. 191, 145-161 pp.

Treviño, L., Cruz, E. y Ricque, D., 1993. Aplicación del uso de promotores de crecimiento en acuacultura: antibióticos. Memorias del primer simposium internacional de nutrición y tecnología de alimentos para la acuacultura, Universidad Autónoma de Nuevo León, 293-320 pp.

Valle, J., 1999. Comparación in vitro de los efectos de la litofloxina, norfloxacina y crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón - estudio preliminar in situ de la litofloxina. Publireportaje Farmavet. 17-22 pp.

Willians, J., Courtenay, S., & Wirgin, I., 1997. Effects of the antibiotic baytril (enrofloxacin) on pbc-initiated induction of cytochrome p4501a mRNA in sexually mature atlantic tomcod (*microgadus tomcod)*. Envirommental toxicology and chemistry. Vol. 16, No. 2, 241-244 pp.