

Growth, feed intake, survival, and histological response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing grains naturally contaminated with aflatoxin

Crecimiento, consumo de alimento, supervivencia y respuesta histológica del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas de granos contaminados naturalmente con aflatoxinas

M Tapia-Salazar, OD García-Pérez, RA Velásquez-Soto, MG Nieto-López*, D Villarreal-Cavazos, D Ricque-Marie, LE Cruz-Suárez

Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México.

* Corresponding author: E-mail: mgnietol@hotmail.com, martha.nietolp@uanl.edu.mx

ABSTRACT. Two feeding trials were carried out to evaluate the effect of diets containing corn or peanut grains naturally contaminated with aflatoxins on the growth, feed intake, survival, and histological response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. In trial 1, four experimental diets were formulated to contain 0, 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total aflatoxins (TA) and fed to *L. vannamei* juveniles for 28 days. In trial 2, six experimental diets were formulated to contain 0, 10, 20, 40, 60, and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA and fed to *L. vannamei* juveniles for 64 days. Feed intake and weight gain were significantly affected by the presence of aflatoxins from naturally contaminated grains. Feed conversion rate increased significantly from a level of inclusion of 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Survival was significantly reduced only for shrimp fed diets supplemented with 1000 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA. Shrimp exposed to higher aflatoxin inclusion levels presented significantly lower lipid vacuole levels in R-cells (12–28%), lower B-cell activity, and lower mitotic E-cell activity. Tubular epithelial atrophy increased from the inclusion level of 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Hepatopancreatocyte sloughing was significantly higher in shrimp fed diets supplemented with 1000 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA. It is worth noting that shrimp fed 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA presented a high hepatopancreatocyte sloughing coefficient. Based on these results we conclude that the presence of aflatoxins, even at low levels, reduces feed intake and weight gain, and alters the cells of the hepatopancreas.

Key words: aflatoxin, shrimp, growth, *Litopenaeus vannamei*.

RESUMEN. Se llevaron a cabo dos bioensayos para evaluar el efecto de granos de maíz y maní contaminados naturalmente con aflatoxinas sobre el crecimiento, consumo de alimento, supervivencia y daños histológicos de juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para el bioensayo 1, se formularon cuatro dietas con 0, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas totales (AT) y se proporcionaron a juveniles de *L. vannamei* durante 28 días. Para el bioensayo 2, se formularon seis dietas con 0, 10, 20, 40, 60 y 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT y se proporcionaron a juveniles de *L. vannamei* durante 64 días. El consumo de alimento fue significativamente afectado por la presencia de aflatoxinas. La tasa de conversión alimenticia incrementó significativamente a partir de un nivel de inclusión de 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La supervivencia fue significativamente reducida solamente en los camarones que fueron alimentados con las dietas suplementadas con 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT. Los camarones expuestos a los niveles de inclusión altos presentaron un menor nivel de vacuolas lipídicas en las células R (12–28%), y una menor actividad de las células B y de la actividad mitótica de las células E. La atrofia de los túbulos del epitelio se incrementó a partir de un nivel de inclusión de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La descamación de las células del hepatopáncreas fue significativamente mayor en camarones alimentados con las dietas suplementadas con 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT, mientras que para las dosis bajas no se observaron diferencias significativas, aunque en camarones alimentados a partir de 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT se observa un coeficiente de descamación alto. Con base en los resultados, se concluye que la presencia de aflatoxinas, incluso a niveles bajos, reduce el consumo de alimento y el aumento de peso y altera las células del hepatopáncreas.

Palabras clave: aflatoxinas, crecimiento, camarón, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUCTION

The end goal of aquaculture feed manufacturers and food suppliers is to make sure that the feed or food produced is safe and wholesome (Tacon and Metian 2008). Mycotoxins are secondary metabolites produced by different species of fungi, especially of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, and

INTRODUCCIÓN

El objetivo final de los fabricantes y proveedores de alimento acuícola es asegurar que los alimentos producidos sean seguros y saludables (Tacon y Metian 2008). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de hongos, especialmente de *Aspergillus*,

Alternaria (Kabak *et al.* 2006), and may be found in food in a conjugated form (Berthiller *et al.* 2009). A considerable reduction in feed intake, weight gain, and survival, as well as necrosis of the hepatopancreas (Boonyaratpalin *et al.* 2001, Soonngam and Hutacharoen 2007, Gopinath and Raj 2009) have been observed in shrimp receiving the pure form of aflatoxin B1, either injected or added to the diet. It has been shown that naturally contaminated feeds are more toxic than feeds containing a similar concentration of pure mycotoxin (Applebaum *et al.* 1982, Foster *et al.* 1986) due to the additive, synergistic, potentiative or antagonistic effect caused by the presence of other mycotoxins (Klaasen and Eaton 1991). There is no information, however, about the effect of the presence of naturally contaminated grains on shrimp; therefore, the aim of the present study was to determine the effect of different inclusion levels of mycotoxins (mainly aflatoxins, produced naturally through mold growth) on the growth rate, feed intake, survival, and histological response of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

MATERIAL AND METHODS

Contaminated grains

The corn and peanut grains were provided by Nutek company, Tehuacán, Puebla, Mexico, and were naturally contaminated to contain mainly aflatoxin following the methodology described by Shotwell *et al.* (1966). Briefly, a fungal inoculum was prepared from single-spore cultures of *Aspergillus parasiticus* and grown for 5 days at 25 °C in commercial potato dextrose agar (plate). Grains were incubated with *A. parasiticus* spores (1×10^6) for 7 days at 28 °C. The contaminated sample was then sterilized for 30 min at 121 °C and dried for 4 days at room temperature with air circulation. The contaminated grain sample was ground to reach a mean particle size of 850 μm (mesh #20). Aflatoxin concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) (method 2005.08 First Action 2005, AOAC 2006). Corn and peanut samples were used in trials 1 and 2, respectively.

Experimental diets

For trials 1 and 2, an uncontaminated control diet was formulated to contain 38% crude protein and 8% crude lipids. In trial 1, three more diets were formulated to contain the same nutritional composition as the control diet, but 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total aflatoxins were added. In trial 2, five more diets were formulated to contain the same nutritional composition as the control diets, but contained 10, 20, 40, 60, and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of total aflatoxins. In both experiments, fish meal and wheat meal inclusion levels were adjusted to meet lipid and crude protein contents (tables 1, 2).

Penicillium, *Fusarium* y *Alternaria* (Kabak *et al.* 2006), y pueden aparecer en los alimentos en forma conjugada (Berthiller *et al.* 2009). Se ha observado una reducción considerable en el consumo de alimento, aumento de peso y supervivencia, así como necrosis hepatopancreática (Boonyaratpalin *et al.* 2001, Soonngam y Hutacharoen 2007, Gopinath y Raj 2009) en camarones que recibieron la forma pura de aflatoxina B1, ya sea inyectada o añadida en la dieta. Se ha determinado que los alimentos contaminados naturalmente son más tóxicos que los que contienen una concentración similar de micotoxina pura (Applebaum *et al.* 1982, Foster *et al.* 1986) debido al efecto aditivo, sinérgico, potenciador o antagonístico causado por otras micotoxinas (Klaasen y Eaton 1991). No obstante, no existe información sobre el efecto en camarones de la presencia de granos contaminados naturalmente; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes niveles de inclusión de micotoxinas (principalmente aflatoxinas, producidas naturalmente mediante el crecimiento de moho) sobre la tasa de crecimiento, el consumo de alimento, la supervivencia y la respuesta histológica de juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Granos contaminados

Los granos de maíz y maní fueron proporcionados por la empresa Nutek, Tehuacán, Puebla, México, y fueron contaminados naturalmente para contener principalmente aflatoxinas siguiendo la metodología descrita por Shotwell *et al.* (1966). De forma resumida, se preparó un inóculo fungal a partir de cultivos de esporas únicas de *Aspergillus parasiticus* y se cultivó durante 5 días a 25 °C en un medio de agar papa dextrosa comercial (placa). Los granos se incubaron con esporas de *A. parasiticus* (1×10^6) durante 7 días a 28 °C. Posteriormente, la muestra contaminada se esterilizó durante 30 min a 121 °C y se dejó secar durante 4 días a temperatura ambiente con circulación de aire. La muestra de granos contaminados se molió hasta alcanzar un tamaño de partícula promedio de 850 μm (malla #20). La concentración de aflatoxina se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) (método 2005.08 First Action 2005, AOAC 2006). Las muestras de maíz y maní fueron utilizadas en los bioensayos 1 y 2, respectivamente.

Dietas experimentales

Para los bioensayos 1 y 2 se formuló una dieta control no contaminada que contenía 38% de proteína cruda y 8% de lípidos crudos. En el bioensayo 1 se formularon otras tres dietas con la misma composición nutricional que la dieta control, pero a éstas se les añadieron 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas totales. En el bioensayo 2 se formularon otras

Diet preparation and chemical composition and mycotoxin analysis of the test diets

The dietary ingredients were ground in a Cyclotec grinder (Tecator, model 1093) to obtain a mean particle size of 500 µm. Ingredients were mixed for 10 min in a Kitchen Aid mixer; water (30%) was added and mixed for a further 15 min. The wet diet mash was passed through a meat grinder (fitted with a die having 1.6 mm diameter holes) at a rate of 40 min kg⁻¹ and reaching a temperature of 70–75 °C. The spaghetti-like strands were dried in a convection oven at 100 °C for 8 min and allowed to cool and dry overnight at room temperature before packing. The chemical composition

cinco dietas con la misma composición nutricional que la dieta control y se les añadieron 10, 20, 40, 60 y 120 µg kg⁻¹ de aflatoxinas totales. En ambos experimentos se ajustaron los niveles de inclusión de harina de pescado y harina de trigo para cumplir con los contenidos de lípidos y proteína cruda (tablas 1, 2).

Preparación y composición química de la dieta y análisis de micotoxinas de las pruebas experimentales

Los ingredientes alimenticios fueron molidos en un molino Cyclotec (Tecator, modelo 1093) hasta obtener un tamaño de partícula promedio de 500 µm. Los ingredientes se

Table 1. Ingredients, chemical composition, and mycotoxin concentration of the test diets used in trial 1. ND, concentration below the detection limit (2 µg kg⁻¹ for aflatoxins B1, B2, and G1, and 4 µg kg⁻¹ for aflatoxin G2); NA, not analyzed.

Tabla 1. Ingredientes, composición química y concentración de micotoxinas de las dietas usadas en el bioensayo 1. ND, concentración por debajo del límite de detección (2 µg kg⁻¹ para las aflatoxinas B1, B2 y G1, y 4 µg kg⁻¹ para la aflatoxina G2); NA, no analizado.

Ingredients (g kg⁻¹)	Diet 0 µg kg⁻¹	Diet 500 µg kg⁻¹	Diet 1000 µg kg⁻¹	Diet 2000 µg kg⁻¹
Fish meal	388.60	387.49	386.40	385.57
Wheat meal flour	381.17	382.28	383.40	384.19
Uncontaminated corn grain	52.63	39.46	26.30	00.00
Contaminated corn grain	0.00	13.15	26.30	52.63
Constant ingredients ^a	177.60	177.60	177.60	177.60
Chemical composition (% , mean ± standard deviation)				
Moisture	7.9 ± 0.01	7.0 ± 0.19	7.1 ± 0.18	7.7 ± 0.12
Crude protein	37.6 ± 0.40	36.7 ± 0.05	37.1 ± 0.37	36.8 ± 0.17
Crude fat	8.3 ± 0.15	7.8 ± 0.61	8.2 ± 0.09	7.9 ± 0.38
Ash	7.8 ± 0.04	7.7 ± 0.01	7.8 ± 0.10	7.5 ± 0.03
Fiber	0.89 ± 0.10	0.86 ± 0.10	0.99 ± 0.00	1.13 ± 0.00
NFE ^b	37.4	39.9	38.8	39.0
Gross energy (kcal g ⁻¹)	4.2 ± 0.20	4.6 ± 0.20	4.3 ± 0.50	4.1 ± 0.40
Mycotoxin concentration (µg kg⁻¹)				
Deoxynivalenol	200	NA	NA	NA
Fumonisin B1	ND	NA	NA	NA
Fumonisin B2	ND	NA	NA	NA
Fumonisin B3	ND	NA	NA	NA
Ochratoxin A	ND	NA	NA	NA
T-2 toxin	ND	NA	NA	NA
Aflatoxin B1	ND	533	1067	1511
Aflatoxin B2	ND	71	144	204
Aflatoxin G1	ND	18	32	47
Aflatoxin G2	ND	ND	5	7
Total aflatoxins	0	622	1248	1769

^a Constant ingredients (g kg⁻¹): shrimp meal 40, soybean meal 80, fish oil 20, soybean lecithin 20, sodium alginate 10, vitamin mixture 3.5, mineral mixture 2.5, etoquin 0.5, mold inhibitor 0.5, cholesterol 0.2, vitamin E 0.20.

^b NFE: nitrogen free extract, calculated by difference.

Table 2. Ingredients, chemical composition, and mycotoxin concentration of the test diets used in trial 2. ND, concentration below the detection limit ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$ for aflatoxins B1, B2, and G1, and $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ for aflatoxin G2); NA, not analyzed.

Tabla 2. Ingredientes, composición química y concentración de micotoxinas de las dietas usadas en el bioensayo 2. ND, concentración por debajo del límite de detección ($2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para las aflatoxinas B1, B2 y G1, y $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ para la aflatoxina G2); NA, no analizado.

Ingredients (g kg^{-1})	Diet $0 \mu\text{g kg}^{-1}$	Diet $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	Diet $20 \mu\text{g kg}^{-1}$	Diet $40 \mu\text{g kg}^{-1}$	Diet $60 \mu\text{g kg}^{-1}$	Diet $120 \mu\text{g kg}^{-1}$
Fish meal	384.63	384.53	384.40	384.16	383.45	382.78
Wheat meal flour	439.83	439.69	439.48	439.14	438.45	437.07
Contaminated nut grain	–	0.23	0.58	1.15	2.30	4.60
Constant ingredients ^a	175.55	175.55	175.55	175.55	175.55	175.55
Chemical composition (% , mean \pm standard deviation)						
Moisture	9.7 ± 0.1	9.9 ± 0.1	9.7 ± 0.1	10.7 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.9 ± 0.0
Crude protein	36.3 ± 0.1	36.9 ± 0.7	36.6 ± 0.2	36.1 ± 0.6	36.5 ± 0.4	37.6 ± 1.3
Crude fat	8.2 ± 0.9	8.0 ± 0.1	7.8 ± 0.3	8.0 ± 0.1	7.0 ± 0.58	7.6 ± 1.4
Ash	8.2 ± 0.1	8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
Fiber	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.6	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.3
NFE ^b	37.7	35.9	36.9	36.0	37.7	35.9
Gross energy (kcal g^{-1})	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.6 ± 0.5	4.9 ± 0.05	4.7 ± 0.03	5.0 ± 0.2
Mycotoxin concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Deoxynivalenol	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumonisin B1	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumonisin B2	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Fumonisin B3	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Ochratoxin A	ND	NA	NA	NA	NA	NA
T-2 toxin	ND	NA	NA	NA	NA	NA
Aflatoxin B1	ND	7.2	16.5	32.3	48.6	92.4
Aflatoxin B2	ND	0	1.1	2.1	5.7	9.2
Aflatoxin G1	ND	2.8	2.4	5.6	5.7	18.4
Aflatoxin G2	ND	0	0	0	0	0
Total aflatoxins	0	10.0	20.0	40.0	60.0	120.0

^a Constant ingredients (g kg^{-1}): shrimp meal 40, soybean meal 80, fish oil 19, soybean lecithin 19, sodium alginate 10, vitamin mixture 3.5, mineral mixture 2.5, etoquin 0.5, mold inhibitor 0.5, cholesterol 0.15, vitamin E 0.20, vitamin C 0.20.

^b NFE: nitrogen free extract, calculated by difference.

of the ingredients and test diets was determined using the methods described by Cruz-Suárez *et al.* (2009). Aflatoxin concentrations (B1, B2, G1, and G2) in the test diets were analyzed by HPLC (method 999.07, AOAC 2005) at Trilog Analytical Laboratory, Washington, MO. The control diets were also analyzed for deoxynivalenol (MacDonald *et al.* 2005); fumonisins B1, B2, and B3 (method 49.5.02, AOAC 2002); ochratoxin A (method 2000.03, AOAC 2002); and T-2 toxin (Croteau *et al.* 1994).

Feeding trials

Both feeding trials were carried out in a closed recirculation system holding artificial seawater. The experimental

mezclaron durante 10 min en una mezcladora Kitchen Aid; se agregó agua (30%) y se continuó mezclando otros 15 min. La mezcla húmeda se pasó por un molino de carne (equipado con un dado con orificios de 1.6 mm de diámetro) a una tasa de 40 min kg^{-1} y hasta alcanzar una temperatura de $70\text{--}75 \text{ }^\circ\text{C}$. Las tiras en forma de espagueti fueron secadas en un horno de convección a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 min y se dejaron enfriar y secar durante la noche a temperatura ambiente antes de empaquetarlas. La composición química de los ingredientes de las dietas experimentales se determinó mediante los métodos descritos por Cruz-Suárez *et al.* (2009). Las concentraciones de aflotoxinas (B1, B2, G1 y G2) en las dietas fueron analizadas mediante HPLC (método 999.07, AOAC 2005) en Trilog Analytical Laboratory, Washington, MO.

facility consisted of 60-L fiberglass tanks, each tank continuously fed with synthetic marine water (Fritz, Dallas, TX) at a flow-through rate of 350 mL min⁻¹. Each tank was equipped with a double bottom covered with black screening and an air lift water system for internal recirculation. The facility was designed so that possible water quality variations affect all tanks simultaneously. Salinity and temperature were measured daily, while pH, total ammonia, nitrites, and nitrates were recorded weekly. In trial 1, water quality parameters were: salinity, 34–37; temperature, 24–29 °C; pH, 8.0–8.2; total ammonia, 0–0.2 mg L⁻¹; nitrites, 0–0.4 mg L⁻¹; and nitrates, 10 mg L⁻¹. In trial 2, they were: salinity, 32–38; temperature, 29–30 °C; pH, 8.0–8.2; total ammonia, 0–0.3 mg L⁻¹; nitrites, 0–0.3 mg L⁻¹; and nitrates, 50 mg L⁻¹. The parameters remained well within the optimum values for *L. vannamei* throughout the trials. Water samples from the facility were taken and analyzed for aflatoxins by HPLC following the methods described above. Results confirmed that aflatoxin concentration was below the detection limit, thus discarding any possible potential toxic effect due to aflatoxin accumulation in our system. Juvenile *L. vannamei* were obtained from Langostinos y Camarones Laboratory, a shrimp hatchery in Boca del Río, Veracruz, Mexico, and were acclimated to the conditions of the bioassay facilities in 500-L holding tanks, prior to the growth trial. In trial 1, each diet was evaluated in six replicate tanks each holding 15 shrimp with a mean initial weight of 121 ± 16 mg. In trial 2, each diet was evaluated in three replicate tanks each holding 10 shrimp with a mean initial weight of 614 ± 7 mg. Shrimp were individually weighed on a digital balance after blotting off excess water with a moist cloth. Care was taken to distribute animals with the same size distribution pattern in each tank. Dietary treatments were then randomly assigned to the tanks. Over the first three days after distributing the animals, any dead shrimp was replaced from a pool fed the same dietary treatment. A photoperiod was set up to provide 12 h light and 12 h dark.

Feeding protocol

Initial feeding ratio was 10% of the biomass of each tank. Feed was administered using feeding trays and uneaten feed was estimated using the methodology described by Cerecer-Cota *et al.* (2004). Three hours after the feed was supplied trays were removed from the tanks, allowed to dry, and weighed in order to determine the amount of uneaten feed by difference. Shrimp were fed twice at day (50% of the ration at 9:00 and 17:00); uneaten food was removed by siphoning before feeding. The weighed strands of feed were broken into small pieces to ensure availability of a minimum of one pellet per shrimp at each feeding.

Zootechnical parameters and histological analysis

In trials 1 and 2, shrimp were fed for 28 and 64 days, respectively. Weight gain was recorded every seven days.

Las dietas control también fueron analizadas para el deoxinivalenol (MacDonald *et al.* 2005); las fumonisinas B1, B2 y B3 (método 49.5.02, AOAC 2002); la ocratoxina A (método 2000.03, AOAC 2002); y la toxina T-2 (Croteau *et al.* 1994).

Bioensayos de alimentación

Ambos bioensayos se realizaron en un sistema cerrado de recirculación con agua marina artificial. El sistema consistió de tanques de fibra de vidrio de 60 L, cada uno alimentado continuamente con agua marina sintética (Fritz, Dallas, TX) a un flujo de 350 mL min⁻¹. Cada tanque tenía un doble fondo cubierto con una malla de color negro y un sistema de recirculación de agua interna. El sistema se diseñó para que las variaciones en la calidad del agua afecten todos los tanques simultáneamente. La salinidad y la temperatura fueron medidos diariamente, mientras que el pH, el amoníaco total y los nitritos y nitratos fueron registrados semanalmente. En el bioensayo 1, los parámetros de la calidad del agua fueron: salinidad, 34–37; temperatura, 24–29 °C; pH, 8.0–8.2; amoníaco total, 0–0.2 mg L⁻¹; nitritos, 0–0.4 mg L⁻¹; y nitratos, 10 mg L⁻¹. En el bioensayo 2, fueron: salinidad, 32–38; temperatura, 29–30 °C; pH, 8.0–8.2; amoníaco total, 0–0.3 mg L⁻¹; nitritos, 0–0.3 mg L⁻¹; y nitratos, 50 mg L⁻¹. Los parámetros se mantuvieron dentro de los valores óptimos para *L. vannamei* a lo largo de los bioensayos. Se tomaron muestras de agua del sistema y se analizaron para aflatoxinas mediante HPLC siguiendo los métodos descritos anteriormente. Los resultados confirmaron que la concentración de aflatoxinas estuvo por debajo del límite de detección, descartando así cualquier posible efecto tóxico potencial debido a la acumulación de aflatoxinas en el sistema. Los juveniles de *L. vannamei* provinieron del Laboratorio de Langostinos y Camarones en Boca del Río, Veracruz, México, y se aclimataron a las condiciones del sistema utilizado para los bioensayos en tanques de 500 L antes del experimento. En el bioensayo 1, cada dieta se evaluó en seis tanques (réplicas) que contenían 15 camarones con un peso promedio inicial de 121 ± 16 mg. En el bioensayo 2, cada dieta se evaluó en tres tanques (réplicas) que contenían 10 camarones con un peso promedio inicial de 614 ± 7 mg. Los camarones se pesaron individualmente en una balanza digital después de secarlos con una tela húmeda. Se tuvo cuidado de distribuir los animales con el mismo patrón de talla en cada tanque. Los tratamientos dietéticos fueron asignados a los tanques al azar. En los tres primeros días después de haber distribuido los animales, los camarones muertos fueron reemplazados con otros alimentados con el mismo tratamiento. El fotoperiodo fue de 12 h luz y 12 h oscuridad.

Protocolo de alimentación

La ración de alimentación inicial fue de 10% de la biomasa de cada tanque. El alimento se administró en bandejas y

The following response variables were determined for each experimental tank. Percentage weight gain, feed intake, feed conversion ratio, and survival rate were calculated using the formulas described by Cruz-Suárez *et al.* (2009). In trial 1, the hepatosomatic index (HSI) was measured using the following formula: $HSI = (\text{hepatopancreas (g)}/\text{individual weight (g)}) \times 100$. At the end of the experiment three shrimp per replicate tank were fixed in Davidson's solution for histological analysis at the Aquaculture Pathology Laboratory of the University of Arizona, Tucson. Shrimp samples were processed according to conventional techniques for paraffin embedding and sectioning. Serial longitudinal paraffin sections of the cephalothorax and transverse sections of the first abdominal segment of juvenile *L. vannamei* were stained with Mayer-Bennett's hematoxylin/eosin-phloxine (H&E) and examined under a light microscope for diagnostic evaluation. Assessment of histological damage was done following a qualitative method. The amount of lipid reserves in the hepatopancreas was scored on a 0 to 4 scale: L4 = the cytoplasm of most R-cells is completely filled with lipid vacuoles/droplets (76–100% of presumed capacity of the hepatopancreas R-cells); L3 = the cytoplasm of most R-cells contains numerous lipid vacuoles/droplets (51–75% of L4 level); L2 = there is a mix of R-cells with none, some or moderate numbers of lipid vacuoles/droplets (26–50% of L4); L1 = R-cells with small and/or sparsely distributed lipid droplets (10–25% of L4); and L0 = R-cells with no visible lipid vacuoles/droplets or with scattered foci of R-cells that contain only a few small droplets (<10% of L4). Severity grade of cell damage in the hepatopancreas was determined using a 0 to 4 scale, where stage 0 indicates absence, stage 1 indicates scattered (few aberrant nuclei, most hepatopancreatic tubules not affected, no epithelial sloughing into lumen), stage 2 denotes frequent (frequent aberrant nuclei present in numerous hepatopancreatic tubules, some separation of infected cells from their neighbors, epithelial sloughing is infrequent), stage 3 indicates abundant (majority of hepatopancreatic tubules contain numerous aberrant nuclei, separation of large numbers of infected cells from their neighbor cells, some epithelial sloughing of infected cells into lumen, some tubules appear degenerate), and stage 4 denotes severe (majority to all hepatopancreatic tubules contain cells with numerous aberrant nuclei, separation and apparent apoptosis of large numbers of infected cells, large numbers of epithelial cells are sloughed into lumen, tubules appear degenerate, often involving epithelial cells of the midgut). Mitotic E-cell activity was estimated considering the total of cells in metaphase observed in the apical section of the hepatopancreas tubules and the number of cells in metaphase found in normal and healthy shrimp was used as reference (100%). B-cell activity was estimated considering the relative number of B-cells found in the whole hepatopancreas expressed as percentage of the maximum abundance observable in normal and healthy shrimp.

el alimento no consumido se estimó mediante la metodología descrita por Cerecer-Cota *et al.* (2004). Tres horas después de haber proporcionado el alimento, las bandejas se retiraron de los tanques, se dejaron secar y se pesaron para determinar la cantidad de alimento no consumido por diferencia. Los camarones fueron alimentados dos veces al día (50% de la ración a las 9:00 y 17:00); el alimento no consumido se retiró con un sifón antes de proporcionar el alimento. Las tiras de alimento se pesaron y se rompieron en pedazos pequeños para asegurar un mínimo de un *pellet* por camarón por vez.

Parámetros zootécnicos y análisis histológico

En los bioensayos 1 y 2, los camarones fueron alimentados durante 28 y 64 días, respectivamente. El aumento de peso se registró cada siete días. Se determinaron las siguientes variables de respuesta para cada tanque experimental. El porcentaje de aumento de peso, el consumo de alimento, la tasa de conversión alimenticia y la tasa de supervivencia se calcularon con las fórmulas descritas por Cruz-Suárez *et al.* (2009). En el bioensayo 1, el índice hepatosomático (IHS) se midió usando la siguiente fórmula: $IHS = (\text{hepatopáncreas (g)}/\text{peso individual (g)}) \times 100$. Al final del experimento, tres camarones de cada tanque se fijaron en solución de Davidson para el análisis histológico en el Laboratorio de Patología Acuicola de la Universidad de Arizona, Tucson. Las muestras se procesaron según las técnicas convencionales para la incrustación en parafina y cortes. Las secciones longitudinales del cefalotórax y secciones transversales del primer segmento abdominal de los juveniles de *L. vannamei* fueron teñidas con hematoxilina/eosina-floxina (H&E) de Mayer-Bennett y se examinaron con un microscopio de luz para su evaluación diagnóstica. La evaluación del daño histológico se realizó mediante un método cualitativo. La cantidad de reservas lipídicas se evaluó en una escala de 0 a 4: L4 = el citoplasma de la mayoría de las células R completamente lleno de vacuolas o gotas de lípidos (76–100% de la supuesta capacidad de las células R del hepatopáncreas); L3 = el citoplasma de la mayoría de las células R con muchas vacuolas o gotas de lípidos (51–75% del nivel L4); L2 = se observa una mezcla de células R sin o con una cantidad pequeña o moderada de vacuolas o gotas de lípidos (26–50% de L4); L1 = células R con gotas de lípidos pequeñas o escasamente distribuidas (10–25% de L4); y L0 = células R sin vacuolas o gotas de lípidos o focos dispersos de células R con sólo unas cuantas gotas (<10% de L4). El grado de severidad del daño celular en el hepatopáncreas se determinó con una escala de 0 a 4, donde 0 indica ausencia de daño, 1 indica daño disperso (pocos núcleos anómalos, la mayoría de los túbulos hepatopancreáticos no afectados, ausencia de descamación de células epiteliales hacia el lumen), 2 indica daño frecuente (frecuentes núcleos anómalos en numerosos túbulos hepatopancreáticos, alguna separación de células infectadas de sus vecinos, descamación epitelial poco frecuente), 3 indica daño abundante (la mayoría de los túbulos hepatopancreáticos con

Statistical analysis

Growth performance parameters were compared using one-way analysis of variance, and when significant differences were obtained ($P < 0.05$), Tukey's test was used. Histological data were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test to find whether there was a difference between groups, and then the Mann-Whitney U-test was performed to analyze two groups consecutively. All data were analyzed using the statistical software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Experimental diets

The chemical composition was similar among test diets (tables 1, 2). No mycotoxins were detected in the control diets. Total aflatoxin (TA) concentrations in the test diets were close to the expected values (tables 1, 2). In trial 1, aflatoxins B1 and B2 were the predominant aflatoxins (about 85% and 11% TA), followed by aflatoxins G1 and G2 (<2.5% TA). In trial 2, aflatoxins B1 and G1 were predominant (77–83% and 10–28% TA), whereas aflatoxins B2 and G2 were absent from these diets.

Weight gain, feed intake, and feed conversion ratio

In trial 1, weight gain and feed intake were significantly different ($P < 0.05$) among treatments after 7 feeding days. At the end of the experiment, shrimp fed contaminated diets consumed less feed in comparison to shrimp fed uncontaminated diets (table 3). Reduction in feed intake resulted in a significant reduction in weight gain with a significant increase in feed conversion ratio (table 3). At the end of the experiment, final weight gains were 268%, 203%, 172%, and 145% for shrimp fed the uncontaminated diet and diets containing 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA, respectively. Survival was significantly reduced after day 21 and at the end of the experiment shrimp fed diets supplemented with 1000 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA presented lower survival (72% and 62%) in comparison to shrimp fed the uncontaminated diet and 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA (94% and 88%). The HSI was significantly higher in shrimp fed 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA than in shrimp fed the other test diets. This parameter was 6.3, 5.9, 6.0, and 7.1 for shrimp fed diets containing 0, 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA, respectively.

In trial 2, shrimp fed diets supplemented with 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA significantly increased feed intake (by 17% in comparison to the control diet), while shrimp fed 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA showed the lowest feed intake (table 3). Lower weight gain was observed in shrimp fed diets supplemented with 60 and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA (729% and 766%). Diets supplemented with 10, 60, and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA promoted higher feed conversion ratios (table 3). Survival was not affected by the low

muchos núcleos anómalos, separación de un gran número de células infectadas de sus células vecinas, poca descamación de células epiteliales infectadas hacia el lumen, algunos túbulos degenerados), y 4 indica daño severo (la mayoría de los túbulos hepatopancreáticos con células con muchos núcleos anómalos, separación y apoptosis aparente de un gran número de células infectadas, descamación de un gran número de células epiteliales en el lumen, degeneración de túbulos, frecuentemente involucrando las células epiteliales del intestino medio). La actividad mitótica de las células E se estimó considerando el total de células en metafase observadas en la sección apical de los túbulos hepatopancreáticos, usando el número de células en metafase encontradas en camarones normales y saludables como referencia (100%). La actividad de las células B se estimó considerando el número relativo de éstas en todo el hepatopáncreas expresado como el porcentaje de la máxima abundancia observable en camarones normales y saludables.

Análisis estadísticos

Se compararon los parámetros de crecimiento mediante un análisis de varianza de una vía, y cuando se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$), se utilizó la prueba de Tukey. Los datos histológicos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias entre grupos; posteriormente se usó la prueba U de Mann-Whitney para analizar dos grupos consecutivamente. Todos los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

Dietas experimentales

La composición química fue similar entre las dietas experimentales (tablas 1, 2). No se observaron micotoxinas en las dietas control. Las concentraciones de aflatoxinas totales (AT) en las dietas experimentales fueron comparables a los valores esperados (tablas 1, 2). En el bioensayo 1, las aflatoxinas B1 y B2 fueron las predominantes (alrededor de 85% y 11% AT), seguidas por las aflatoxinas G1 y G2 (<2.5% de AT). En el bioensayo 2, las aflatoxinas B1 y G1 predominaron (77–83% y 10–28% AT), mientras que las aflatoxinas B2 y G2 estuvieron ausentes en estas dietas.

Aumento de peso, consumo de alimento y tasa de conversión alimenticia

En el bioensayo 1, el aumento de peso y el consumo de alimento fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) entre tratamientos después de 7 días. Al final del experimento, los camarones alimentados con las dietas contaminadas consumieron menos alimento que los proporcionados las

Table 3. Growth performance of shrimp fed experimental diets for 28 days (trial 1) and 64 days (trial 2). Values with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).**Tabla 3.** Crecimiento de los camarones alimentados con dietas experimentales durante 28 días (bioensayo 1) y 64 días (bioensayo 2). Los valores con letras diferentes fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Trial 1	Weight gain (%)	Feed intake (g shrimp ⁻¹)	Feed conversion ratio
Diet 0 µg kg ⁻¹	268 ± 13 ^c	0.450 ± 0.018 ^c	1.38 ± 0.08 ^b
Diet 500 µg kg ⁻¹	203 ± 28 ^b	0.390 ± 0.032 ^b	1.59 ± 0.16 ^{ab}
Diet 1000 µg kg ⁻¹	172 ± 26 ^{ab}	0.347 ± 0.047 ^{ab}	1.69 ± 0.21 ^{ab}
Diet 2000 µg kg ⁻¹	145 ± 43 ^a	0.339 ± 0.016 ^a	2.08 ± 0.62 ^a
ANOVA probability	0.000	0.000	0.014
Trial 2			
Diet 0 µg kg ⁻¹	888 ± 2 ^{bc}	9.16 ± 0.36 ^c	1.60 ± 0.05 ^{ab}
Diet 10 µg kg ⁻¹	899 ± 1 ^c	10.72 ± 0.05 ^d	1.90 ± 0.01 ^c
Diet 20 µg kg ⁻¹	839 ± 12 ^b	8.34 ± 0.08 ^{ab}	1.61 ± 0.02 ^a
Diet 40 µg kg ⁻¹	897 ± 15 ^c	8.96 ± 0.08 ^{bc}	1.62 ± 0.04 ^a
Diet 60 µg kg ⁻¹	729 ± 27 ^a	8.45 ± 0.29 ^{abc}	1.87 ± 0.10 ^{bc}
Diet 120 µg kg ⁻¹	766 ± 22 ^a	8.11 ± 0.40 ^a	1.73 ± 0.06 ^{bc}
ANOVA probability	0.000	0.000	0.001

inclusion levels of aflatoxins and at the end of the experiment survival ranged from 70% to 85% among test diets.

Histological analysis

B-cell activity, mitotic E-cell activity, and lipid vacuoles in the hepatopancreas

In trials 1 and 2, B-cell activity was lower for shrimp fed contaminated diets (40–67%, table 4) than shrimp fed the uncontaminated diet (78–83%). The same tendency was observed for mitotic cell activity: shrimp fed contaminated diets showed lower activity (34–57%) than shrimp fed the control diet (68–77%). In trial 1, lipid storage decreased significantly ($P < 0.05$) as the aflatoxin inclusion levels increased (2.7, 1.2, 0.7, and 0.5 for shrimp fed 0, 500, 1000, and 2000 µg kg⁻¹ TA, respectively). In contrast, shrimp exposed to low inclusion levels of aflatoxins showed no significant differences among test diets; mean lipid score ranged from 1.0 to 1.5 among treatments.

Degeneration of hepatopancreas tissue

In trial 1, shrimp fed diets supplemented from 500 to 2000 µg kg⁻¹ TA presented higher tubular epithelial atrophy; more than 80% of sampled shrimp presented a severity grade of 1.8 to 2.3 (table 4). In trial 2, tubule atrophy was more evident in shrimp fed diets containing 20 µg kg⁻¹ TA; more than 90% of the shrimp sampled presented a severity grade of 2.0 to 2.4 (table 4). Hepatopancreatocyte sloughing was significantly affected only in shrimp fed diets supplemented

diets no contaminadas (table 3). La reducción en el consumo de alimento causó una reducción significativa en aumento de peso con un incremento significativo de la tasa de conversión alimenticia (tabla 3). Al final del experimento, los aumentos de peso totales fueron 268%, 203%, 172% y 145% para los camarones alimentados con la dieta no contaminada y las dietas con 500, 1000 y 2000 µg kg⁻¹ AT, respectivamente. La supervivencia fue significativamente reducida después de 21 días y, al final del experimento, los camarones proporcionados las dietas suplementadas con 1000 y 2000 µg kg⁻¹ AT presentaron menor supervivencia (72% y 62%) en comparación con los camarones alimentados con la dieta no contaminada y con 500 µg kg⁻¹ AT (94% y 88%). El IHS fue significativamente mayor para los camarones alimentados con 2000 µg kg⁻¹ AT que para los alimentados con las otras dietas experimentales. Este parámetro fue de 6.3, 5.9, 6.0 y 7.1 para los camarones alimentados con las dietas con 0, 500, 1000 y 2000 µg kg⁻¹ AT, respectivamente.

En el bioensayo 2, los camarones alimentados con las dietas conteniendo 10 µg kg⁻¹ AT incrementaron significativamente su consumo de alimento (en un 17% en comparación con los proporcionados la dieta control), mientras que los individuos proporcionados 120 µg kg⁻¹ AT presentaron el menor consumo de alimento (tabla 3). Se observó menor aumento de peso en los camarones proporcionados las dietas con 60 and 120 µg kg⁻¹ AT (729% y 766%). Las dietas suplementadas con 10, 60 y 120 µg kg⁻¹ AT promovieron mayores tasas de conversión alimenticia (tabla 3). La supervivencia no resultó afectada por los bajos niveles de inclusión de aflatoxinas y, al final del experimento, fue entre 70% y 85% para las dietas experimentales.

with 1000 and 2000 µg kg⁻¹ TA; about 27–38% of the shrimp sampled for these treatments presented higher sloughing rate than shrimp fed the uncontaminated diet and 500 µg kg⁻¹ TA. In contrast, shrimp exposed to low inclusion levels of aflatoxins presented a similar sloughing rate among treatments.

DISCUSSION

Growth performance

Weight gain

The significant reduction in weight gain observed in shrimp fed contaminated diets is in agreement with previously reported studies on shrimp using purified forms of aflatoxin B1 (Bautista *et al.* 1994, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995, Boonyaratpalin *et al.* 2001). Weight gain reduction ranged from 13–17% (for lower aflatoxin inclusion levels) to 26–48% (for shrimp fed higher amounts of aflatoxins). Considering aflatoxin B1 as the predominant mycotoxin in the test diets, low weight gain was observed in shrimp fed 60 and 120 µg kg⁻¹ TA, where aflatoxin B1 concentration was 49 and 92 µg kg⁻¹, respectively. The reduction of this parameter was observed at lower inclusion levels than those reported by Bautista *et al.* (1994), who found a significant reduction in weight gain in juveniles of the black tiger shrimp *Penaeus*

Análisis histológico

Actividad de las células B, actividad mitótica de las células E y vacuolas lipídicas en el hepatopáncreas

En los bioensayos 1 y 2, La actividad de las células B fue menor para los camarones alimentados con las dietas contaminadas (40–67%, tabla 4) que para los individuos proporcionados la dieta no contaminada (78–83%). Se observó la misma tendencia para la actividad de las células mitóticas: los camarones proporcionados las dietas contaminadas mostraron menor actividad (34–57%) que los alimentados con la dieta control (68–77%). En el bioensayo 1, el almacenamiento de lípidos decreció significativamente (*P* < 0.05) según incrementaron los niveles de inclusión de aflatoxinas (2.7, 1.2, 0.7 y 0.5 para camarones proporcionados 0, 500, 1000 y 2000 µg kg⁻¹ AT, respectivamente). En contraste, los camarones expuestos a niveles bajos de aflatoxinas no mostraron diferencias significativas entre las dietas experimentales; el valor medio de lípidos varió de 1.0 a 1.5 entre tratamientos.

Degeneración del tejido hepatopancreático

En el bioensayo 1, los camarones alimentados con las dietas suplementadas con 500 a 2000 µg kg⁻¹ AT presentaron

Table 4. B-cell activity, mitotic E-cell activity, tubular epithelial atrophy, and hepatopancreatocyte sloughing in shrimp fed experimental diets. Different letters in the same column show significant differences at *P* < 0.05. Values in parentheses indicate average severity grade based on a scale of 0 to 4.

Tabla 4. Actividad de las células B, actividad mitótica de las células E, atrofia de los túbulos del epitelio y descamación de las células del hepatopáncreas en los camarones alimentados con las dietas experimentales. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a *P* < 0.05. Los valores entre paréntesis indican el grado de severidad promedio con base en una escala de 1 a 4.

Trial 1	B-cell activity (%)	Mitotic E-cell activity (%)	Tubular epithelial atrophy (%)*	Hepatopancreatocyte sloughing (%)*
0 µg kg ⁻¹	78 ^b	68 ^c	35 (0.6) ^a	9 (0.13) ^{ab}
500 µg kg ⁻¹	60 ^a	55 ^{bc}	100 (2.3) ^b	4 (0.04) ^a
1000 µg kg ⁻¹	53 ^a	49 ^{ab}	79 (2.2) ^b	27 (0.79) ^c
2000 µg kg ⁻¹	52 ^a	34 ^a	79 (1.8) ^b	38 (0.59) ^{bc}
Probability	0.006	0.001	0.000	0.008
Trial 2				
0 µg kg ⁻¹	83 ^c	77 ^b	33 (0.7) ^a	33 (0.5) ^a
10 µg kg ⁻¹	66 ^{bc}	45 ^a	33 (1.0) ^a	50 (0.8) ^a
20 µg kg ⁻¹	67 ^{bc}	57 ^{ab}	92 (2.1) ^b	50 (0.6) ^a
40 µg kg ⁻¹	40 ^a	43 ^a	100 (2.2) ^b	75 (1.0) ^a
60 µg kg ⁻¹	56 ^{ab}	42 ^a	100 (2.0) ^b	50 (0.8) ^a
120 µg kg ⁻¹	54 ^{ab}	50 ^{ab}	100 (2.4) ^b	92 (1.1) ^a
Probability	0.000	0.014	0.000	0.117

* Percentage of tubular epithelial atrophy and hepatopancreatocyte sloughing were calculated from the number of organisms that presented damage and divided by the total number of shrimp sampled for each treatment and multiplied by 100.

monodon fed diets contaminated with 75 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1; this finding indicates an additive effect caused by the presence of other aflatoxins in the diet.

Multiple independent studies have shown that aflatoxin consumption affects growth in a hormetic-like biphasic manner with low-dose stimulation and a high-dose inhibition (Diaz *et al.* 2008). The low-dose stimulation is typically maximal at only about 30–60% greater than the control (Calabrese 2002). Higher body weight (1–7%) has been reported for chicks fed diets containing from 625 to 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aflatoxins as compared to animals fed uncontaminated diets (Huff 1980, Huff *et al.* 1986). Huang *et al.* (2011) observed a significant higher body weight (12%) in gibel carp fed diets contaminated with 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1 than an uncontaminated diet. In the present study, shrimp fed diets supplemented with 10 and 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT presented higher weight gain (about 2.1% to 2.5%) than shrimp fed the control diet; however, no significant differences were observed among test treatments.

Feed intake

Decrease in feed intake is a common result of the test aversion caused by the presence of aflatoxins in the diet. This reduction has been observed in terrestrial and aquatic species, such as gibel carp (Huang *et al.* 2011), tilapia (Deng *et al.* 2010), and shrimp (Wiseman *et al.* 1982, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995). In the present study, shrimp fed contaminated diets consumed less feed (2% to 24%) than shrimp fed control diets, and this was related to the aflatoxin inclusion levels in the test diets, with the exception of shrimp fed diets supplemented with 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA, in which feed intake was higher (about 17%) in comparison to shrimp fed the uncontaminated diet.

Survival

High mortalities have been reported for shrimp fed diets with high inclusion levels (15,000–300,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) of pure aflatoxin B1 (Wiseman *et al.* 1982, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995). In contrast, results from studies conducted using lower inclusion levels are contradictory. Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) did not observe a significant reduction in survival of *L. vannamei* shrimp fed diets containing from 15 to 900 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1. Bautista *et al.* (1994) concluded that supplementation of 25, 50, 75, and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1 to diets for *P. monodon* shrimp caused significant mortalities (40–60%) after 60 feeding days. Boonyaratpalin *et al.* (2001) reported a significant reduction in survival of *P. monodon* after eight weeks of feeding diets containing 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1 (26% vs 87–93% for the rest of the test diets); nevertheless, shrimp fed diets supplemented with 500 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ showed a slight reduction in survival (4% and 7%, respectively).

mayor atrofia de los túbulos epiteliales; más del 80% de los camarones muestreados presentaron un grado de severidad de 1.8 a 2.3 (tabla 4). En el bioensayo 2, la atrofia de los túbulos fue más evidente en los camarones proporcionados 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT; más del 90% de los individuos analizados presentaron un grado de severidad de 2.0 a 2.4 (tabla 4). La descamación de las células del hepatopáncreas resultó significativamente afectada sólo en los camarones alimentados con las dietas suplementadas con 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT; entre 27% y 38% de los camarones analizados en estos tratamientos presentaron una mayor tasa de descamación que los individuos alimentados con la dieta no contaminada y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT. En contraste, los camarones expuestos a niveles bajos de aflatoxinas presentaron una tasa de descamación similar entre tratamientos.

DISCUSIÓN

Crecimiento

Aumento de peso

La reducción significativa en aumento de peso registrada para los camarones alimentados con las dietas contaminadas concuerda con lo encontrado en otros estudios con camarones usando formas purificadas de aflatoxina B1 (Bautista *et al.* 1994, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995, Boonyaratpalin *et al.* 2001). La reducción en aumento de peso fue de 13–17% (para camarones proporcionados menores cantidades de aflatoxinas) a 26–48% (para camarones proporcionados mayores niveles). Considerando que la aflatoxina B1 es la micotoxina predominante en las dietas experimentales, se observó poco aumento de peso en los camarones alimentados con las dietas conteniendo 60 and 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT, en las cuales la concentración de aflatoxina B1 fue de 49 y 92 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. La reducción de este parámetro se observó a niveles de inclusión más bajos que los obtenidos por Bautista *et al.* (1994), quienes encontraron una reducción significativa en aumento de peso en juveniles del camarón tigre *Penaeus monodon* proporcionados dietas contaminadas con 75 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura; este resultado indica un efecto aditivo causado por la presencia de otras aflatoxinas en la dieta.

Varios estudios independientes han mostrado que el consumo de aflatoxina afecta el crecimiento de una manera bifásica y hormética con una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas (Diaz *et al.* 2008). La estimulación a dosis baja es típicamente máxima a sólo entre 30% y 60% mayor que el control (Calabrese 2002). Se ha registrado mayor peso corporal (1–7%) para polluelos alimentados con dietas con 625 a 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas en comparación con animales proporcionados dietas no contaminadas (Huff 1980, Huff *et al.* 1986). Huang *et al.* (2011) registraron un peso significativamente mayor (12%) para la carpa gibel alimentada con dietas contaminadas con 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de

Soonngam and Hutacharoen (2007) reported that feeding juvenile *P. monodon* with diets supplemented with 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1 did not affect survival. In the present study, a significant reduction in survival was observed after day 21 for shrimp fed diets containing 1000 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA (62–72% vs 88–94%), while for shrimp exposed to low inclusion levels survival was not affected. The lower survival rates observed for shrimp fed diets supplemented with 1000 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA, together with the results reported in studies carried out by Boonyaratpalin *et al.* (2001) and Soonngam and Hutacharoen (2007) at similar inclusion levels of pure aflatoxin B1, may suggest that the presence of other mycotoxins produced during natural grain contamination potentiates mortality.

Histological damages

B-cell activity, mitotic E-cell activity, and lipid vacuoles in hepatopancreas

The modifications in B-cell and mitotic E-cell activity observed in the present study are consistent with those previously reported for *P. monodon* fed diets contaminated with pure aflatoxin B1 (Gopinath and Raj 2009), affecting the normal function of absorption and storage of nutrients due to a reduced number of R-cells, production of digestive enzymes by F-cells, and secretion of enzymes by B-cells, culminating in the disruption of the digestive, metabolic, and detoxification functions of the hepatopancreas. Lightner *et al.* (1982) and Bautista *et al.* (1994) observed a significant reduction of lipid vacuoles in *Litopenaeus stylirostris* receiving 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pure aflatoxin B1 by injection and *P. monodon* fed diets containing pure aflatoxin B1. In the present study, only shrimp fed diets supplemented with 500, 1000, and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA presented a significant reduction of lipid vacuolization, whereas no significant changes were observed in shrimp fed low inclusion levels (<120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ TA). Differences reported in studies could be related to the source of aflatoxin used (pure vs naturally produced) and the susceptibility of the species, development stage, feed composition, etc.

Degeneration of hepatopancreas tissue

A degeneration of the hepatopancreas has been reported in shrimp fed diets contaminated with pure aflatoxin. Lightner *et al.* (1982) and Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) reported general lesions of the hepatopancreas, mandibular organ, and hematopoietic organs of the blue shrimp *L. stylirostris* and white shrimp *L. vannamei* fed diets supplemented with pure aflatoxin B1 (50 to 300,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Boonyaratpalin *et al.* (2001) observed severe hepatopancreas damage (atrophy, necrosis, and degeneration of the tubules) in juvenile and adult *P. monodon* fed for 28 days with diets containing 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aflatoxin B1, while shrimp

aflatoxina B1 pura que con una dieta no contaminada. En el presente trabajo, los camarones alimentados con dietas suplementadas con 10 y 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT presentaron mayor aumento de peso (de 2.1% a 2.5%) que los individuos alimentados con la dieta control; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Consumo de alimento

Una disminución en el consumo de alimento es un resultado común de la aversión causada por la presencia de aflatoxinas en la dieta. Esta reducción se ha observado en especies acuáticas y terrestres, tales como la carpa gibel (Huang *et al.* 2011), tilapia (Deng *et al.* 2010) y camarón (Wiseman *et al.* 1982, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995). En el presente estudio, los camarones alimentados con las dietas contaminadas consumieron menos alimentos (2% a 24%) que los camarones alimentados con la dieta control, y esto se relacionó con los niveles de inclusión de aflatoxinas en las dietas experimentales, con excepción de los camarones alimentados con la dieta suplementada con 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT, los cuales mostraron mayor consumo de alimento (~17%) que los proporcionados la dieta no contaminada.

Supervivencia

Se han documentado altas tasas de mortalidad para camarones alimentados con altos niveles de inclusión (de 15,000 a 300,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de aflatoxina B1 pura (Wiseman *et al.* 1982, Ostrowski-Meissner *et al.* 1995). En contraste, los resultados de estudios realizados con menores niveles de inclusión son contradictorios. Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) no observaron una reducción significativa de la supervivencia de individuos de *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con 15 a 900 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura. Bautista *et al.* (1994) concluyeron que la adición de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura a las dietas de *P. monodon* causó mortalidades significativas (40–60%) después de 60 días de alimentación. Boonyaratpalin *et al.* (2001) documentaron una disminución significativa de la supervivencia de *P. monodon* después de ocho semanas de alimentación con dietas suplementadas con 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura (26% vs 87–93% para las demás dietas experimentales); sin embargo, los camarones alimentados con dietas suplementadas con 500 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ mostraron una pequeña disminución en la supervivencia (4% y 7%, respectivamente). Soonngam y Hutacharoen (2007) documentaron que el consumo de dietas suplementadas con 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura no afectó la supervivencia de juveniles de *P. monodon*. En el presente estudio, se observó una disminución significativa de la supervivencia después de 21 días para los camarones alimentados con 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT (62–72% vs 88–94%), mientras que la supervivencia de los camarones alimentados con bajos niveles de inclusión no se vio afectada. Las menores tasas de supervivencia observadas

fed 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ aflatoxin B1 developed widely dispersed necrosis of the hepatopancreas with cell atrophy in some areas; nevertheless, after 56 days, both inclusion levels induced severe histological changes. Gopinath and Raj (2009) reported that the presence of aflatoxin B1, even at low concentrations (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of pure aflatoxin B1), in diets for *P. monodon* could cause hepatopancreas cell damage after 28 feeding days and this damage increased as the concentration of aflatoxin B1 increased. Tubular epithelial atrophy observed in the present study in shrimp fed contaminated diets agrees with that reported previously in shrimp. In contrast, shrimp fed low dietary aflatoxin diets exhibited a higher hepatopancreatocyte sloughing rate (50–92%) than shrimp fed high aflatoxin inclusion levels (4–38%); even shrimp fed the uncontaminated diet in trial 2 exhibited greater damage (33%) than those fed the uncontaminated diet in the trial 1 (9%). Severe lesions within the hepatopancreas could be associated with bacterial infection, which may explain the high hepatopancreatocyte sloughing value for shrimp fed the uncontaminated diet in trial 2. Nevertheless, if we consider that bacterial infection is a result of immune system depression caused by the presence of mycotoxin, this may explain the higher hepatopancreatocyte sloughing rate observed in shrimp fed low aflatoxin dietary inclusion levels; these animals were fed for 64 days in comparison to those fed diets containing higher dietary aflatoxin in trial 1 that was stopped after 28 feeding days due to the high mortality observed.

Implication for commercial conditions

The replacement of fish meal by plant-derived ingredients in commercial feeds for shrimp increases the probability of mycotoxin contamination. Villarreal-Cavazos *et al.* (2004) and Fegan (2005) reported that commercial feeds for shrimp and fish were contaminated with aflatoxin, T2, zearalenone, and ochratoxin. On the other hand, inappropriate storage conditions of the feed at the farms, especially in tropical climates, increases this risk even more, and incidence of intoxication from more than one mycotoxin may increase considerably. In the present study, shrimp fed lower aflatoxin supplementation reduced feed intake and growth performance without affecting survival. Mycotoxicosis also suppresses the immune system in the organism (Pier *et al.* 1980); consequently, if these compounds are present even at low inclusion levels in commercial feeds, the risk of disease will increase considerably. For that reason it is important to find products that help to reduce the negative impact caused by the presence of mycotoxins in shrimp feeds.

CONCLUSIONS

The presence of naturally produced aflatoxins, even at low levels, reduced feed intake and growth rate, and caused histological damage in the hepatopancreas of juvenile

para los camarones proporcionados dietas con 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT, junto con los resultados documentados en los trabajos de Boonyaratpalin *et al.* (2001) y Soonngam y Hutacharoen (2007) a similares niveles de inclusión de aflatoxina B1 pura, sugieren que la presencia de otras micotoxinas producidas durante la contaminación natural de los granos aumenta la mortalidad.

Daños histológicos

Actividad de las células B, actividad mitótica de las células E y vacuolas lipídicas en el hepatopáncreas

Las modificaciones en la actividad de las células B y la actividad mitótica de las células E observadas en el presente estudio son consistentes con las documentadas previamente para el camarón *P. monodon* alimentado con dietas contaminadas con aflatoxina B1 pura (Gopinath y Raj 2009): alteración de la función normal de absorción y almacenamiento de nutrientes debido a un número reducido de células R, producción de enzimas digestivas por las células F y secreción de enzimas por las células B, resultando en la perturbación de las funciones digestivas, metabólicas y de detoxificación del hepatopáncreas. Lightner *et al.* (1982) y Bautista *et al.* (1994) observaron una reducción significativa de vacuolas lipídicas en *Litopenaeus stylirostris* inyectado con 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 pura y en *P. monodon* alimentado con dietas con aflatoxina B1 pura. En el presente trabajo, sólo los camarones alimentados con dietas suplementadas con 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT presentaron una reducción significativa de vacuolización lipídica, mientras que no se observaron cambios significativos en los individuos expuestos a bajos niveles de inclusión (<120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AT). Las diferencias entre los estudios podrían estar relacionadas con la fuente de aflatoxina utilizada (pura vs producida naturalmente) y con la susceptibilidad de la especie, etapa de desarrollo, composición del alimento, etc.

Degeneración del tejido hepatopancreático

La degeneración del hepatopáncreas ha sido documentada en camarones alimentados con dietas contaminadas con aflatoxina pura. Lightner *et al.* (1982) y Ostrowski-Meissner *et al.* (1995) registraron lesiones generales en el hepatopáncreas, el órgano mandibular y los órganos hematopoyéticos de los camarones *L. stylirostris* y *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con aflatoxina B1 pura (50 a 300,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Boonyaratpalin *et al.* (2001) observaron daños severos en el hepatopáncreas (atrofia, necrosis y degeneración de los túbulos) en juveniles y adultos de *P. monodon* alimentados durante 28 días con dietas contaminadas con 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1, mientras que los camarones alimentados con 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxina B1 mostraron necrosis del hepatopáncreas con atrofia celular en algunas

L. vannamei. Only high inclusion levels caused significant mortality. More research needs to be done in order to evaluate the additive effect of other mycotoxins present in different ingredients used for shrimp feeds.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Ministry of Education/National Council for Science and Technology (SEP-CONACYT, Mexico) and the University of Nuevo León (PAICyT-UANL, Mexico). We thank the shrimp hatchery (Langostinos y Camarones) in Boca del Río, Veracruz, Mexico, for providing the experimental shrimp for the growth trial, and Nutek Company, Tehuacán, Puebla, Mexico, for providing the contaminated corn.

REFERENCES

- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International (Horwitz W, Latimer GW (eds.)). 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC. 2006. Aflatoxins in corn, raw peanuts, and peanut butter. Liquid chromatography with post-column photochemical derivatization. AOAC Official Method 2005.08 First Action 2005. J. AOAC Int. 89: 678.
- Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EL. 1982. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. J. Dairy Sci. 65:1503–1508.
- Bautista MN, Pitogo L, Subosa C, Begino ET. 1994. Response of *Penaeus monodon* juveniles to aflatoxin B₁ dietary contamination. The Third Asian Fisheries Forum Society, Manila, pp. 771–775.
- Berthiller F, Schuhmacher R, Adam G, Krska R. 2009. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. Anal. Bioanal. Chem. 395: 1243–1252.
- Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Aquacult. Res. 32: 388–398.
- Calabrese EJ. 2002. Hormesis: Changing view of the dose response, a personal account of the history and current status. Mutat. Res. 511: 181–189.
- Cerecer-Cota EE, Ricque-Marie D, Ramírez-Wong B, Salazar-García BG, Velazco-Escudero M, Cruz-Suarez EL. 2004. Correlación del consumo de alimento peletizado con la dureza del pellet en alimentos con diferente aglutinante. Proc. VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 16–19 November, Hermosillo, Sonora, México, p. 84.
- Croteau SM, Prelusky DB, Trenholm HL. 1994. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron-capture detection. J. Agric. Food Chem. 42: 928–933.
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D, Nieto-Lopez MG, Guajardo-Barbosa C. 2009. A comparison of the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* and Enteromorpha (*Ulva clathrata*) as ingredients in shrimp feed. J. Aquacult. Nutr. 15: 421–430.
- partes; sin embargo, después de 56 días, ambos niveles de inclusión produjeron severos cambios histológicos. Gopinath y Raj (2009) informaron que la presencia de aflatoxina B₁, incluso en concentraciones bajas (50 µg kg⁻¹ de aflatoxina B₁ pura), en las dietas para *P. monodon* podía causar daño a las células hepatopancreáticas después de 28 días de alimentación y que este daño incrementó conforme aumentó la concentración de aflatoxina B₁. La atrofia de los túbulos del epitelio observada en el presente estudio en camarones alimentados con dietas contaminadas concuerda con lo encontrado en otros estudios. En contraste, los camarones proporcionados dietas con bajos niveles de aflatoxina mostraron una mayor tasa de descamación de las células del hepatopáncreas (50–92%) que los individuos que recibieron altos niveles (4–38%); aun los camarones alimentados con la dieta no contaminada en el bioensayo 2 presentaron mayor daño (33%) que los proporcionados la dieta no contaminada en el bioensayo 1 (9%). Las lesiones severas en el hepatopáncreas podrían estar asociadas con una infección bacteriana, lo que explicaría el alto valor de descamación celular encontrado para los camarones alimentados con la dieta control en el bioensayo 2. Sin embargo, si se considera que la infección bacteriana es resultado de la depresión del sistema inmunológico causada por la presencia de micotoxinas, esto explicaría la mayor tasa de descamación de las células del hepatopáncreas obtenida para los camarones proporcionados bajos niveles de aflatoxinas; estos animales fueron alimentados durante 64 días en comparación con los alimentados con dietas conteniendo niveles más altos de aflatoxina en el bioensayo 1, el cual se detuvo después de 28 días debido a la alta mortalidad.

Implicación para condiciones comerciales

La sustitución de la harina de pescado por ingredientes derivados de plantas en los alimentos comerciales para camarones incrementa la probabilidad de contaminación por micotoxinas. Villarreal-Cavazos *et al.* (2004) y Fegan (2005) documentaron que los alimentos formulados para camarones y peces están contaminados por aflatoxina, T₂, zearalenona y ocratoxina. Por otro lado, el almacenamiento inadecuado de los alimentos en las granjas, especialmente en climas tropicales, incrementa aún más el riesgo, y la incidencia de intoxicación por más de una micotoxina puede incrementar considerablemente. En el presente estudio, los camarones expuestos a menores niveles de aflatoxina redujeron su consumo de alimento y crecimiento sin afectar la supervivencia. La micotoxicosis también suprime el sistema inmunológico del organismo (Pier *et al.* 1980); por ende, si estos compuestos se encuentran en los alimentos comerciales, incluso en niveles bajos, aumentará considerablemente el riesgo de enfermedad. Por tal razón es importante encontrar productos que ayuden a reducir el impacto negativo causado por la presencia de micotoxinas en los alimentos para camarones.

- Deng SX, Tian LX, Liu FJ, Jin SJ, Liang GY, Yang HJ, Du ZY, Liu YJ. 2010. Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) during long-term dietary exposure. *Aquaculture* 307: 233–240.
- Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. 2008. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): An example of hormesis? *Poult. Sci.* 87: 727–732.
- Fegan D (2005). Mycotoxins: The hidden menace? <http://www.alltech.com/>.
- Foster BC, Trenholm HL, Friend DW, Thompson BK, Hartin KE. 1986. Evaluation of different sources of deoxynivalenol (vomitoxin) fed to swine. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 1149–1154.
- Gopinath R, Raj RP. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B1-incorporated diets. *Aquacult. Res.* 40: 1235–1242.
- Huang Y, Han D, Zhu X, Yang Y, Jin J, Chen Y, Xie YS. 2011. Response and recovery of gibel carp from subchronic oral administration of aflatoxin B1. *Aquaculture* 319: 89–97.
- Huff WE. 1980. Evaluation of tibial dyschondroplasia during aflatoxicosis and feed restriction in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 59: 991–995.
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Corrier DE, Mollenhauer HH. 1986. Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 65: 1891–1899.
- Kabak B, Dobson AD, Var I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 593–619.
- Klaassen CD, Eaton DL. 1991. Principles of toxicology. in: Amdur MO, Doull J, Klaassen CD (eds.), *Toxicology, The Basic Science of Poisons*. Pergamon Press, Elmsford, New York, pp. 12–49.
- Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman MO. 1982. Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 40: 279–291.
- MacDonald SJ, Chan D, Brereton P, Damant A, Wood R. 2005. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 88: 1197–1204.
- Ostrowski-Meissner HT, LeaMaster BR, Duerr EO, Walsh WA. 1995. Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B1. *Aquaculture* 131: 155–164.
- Pier AC, Richard JL, Cyzewski SJ. 1980. Implications of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 719–724.
- Shotwell OL, Hesseltine CW, Stubblefield RD, Sorenson WG. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425–428.

CONCLUSIONES

La presencia, incluso en bajos niveles, de aflatoxinas producidas naturalmente redujo el consumo de alimento y la tasa de crecimiento, y causó daño histológico en el hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei*. Sólo los altos niveles de inclusión causaron mortalidad considerable. Se requiere de más estudios para evaluar el efecto aditivo de otras micotoxinas presentes en los diferentes ingredientes empleados en los alimentos para camarones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Secretaría de Educación Pública/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP/CONACYT, México) y por la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT-UANL, México). Agradecemos al Laboratorio Langostinos y Camarones (Boca del Río, Veracruz, México) el haber proporcionado los camarones para el experimento, y la empresa Nutek (Tehuacán, Puebla, México) el haber proporcionado los granos contaminados.

Traducido al español por Christine Harris.

-
- Soonngam CAL, Hutacharoen R. 2007. Vermiculite and hydrated sodium calcium aluminosilicates as the agent of aflatoxin B1 absorption for black tiger shrimp diets. *Environ. Nat. Resour. J.* 5: 50–58.
- Tacon AGJ, Metian M. 2008. Aquaculture feed and food safety. *Ann. New York Acad. Sci.* 1140: 50–59.
- Villarreal-Cavazos DA, Guajardo-Barbosa C, Ezquerria-Brauer JM, Scholz U, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D. 2004. Efecto de las micotoxinas en la nutrición de camarones Peneidos. In: Cruz Suárez LE, Ricque Marie D, Nieto López MG, Villarreal D, Scholz U, González M (eds.), *Avances en Nutrición Acuicola. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 16–19 November 2004, Hermosillo, Sonora, México, 463–479.
- Wiseman MO, Price RL, Lightner DV, Williams RR. 1982. Toxicity of aflatoxin B1 to penaeid shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1479–1481.

*Received December 2011,
received in revised form May 2012,
accepted June 2012.*