Tabla 3. Indicadores básicos de cultivo del ensayo de probióticos/β-glucanos realizado en verano

Tratamiento en precría	Tratamiento en engorde	Supervivencia (%)	Peso (g)	Producción (lb/ha)	Densidad (ind./m^2) Inicial	Densidad (ind./m^2) Final
Probióticos		5.7	14.3	563	28	1.8
Probióticos/β-glucanos	β-glucanos	12.5	12.5	927	32	3.4

probióticos/ß-glucanos, hemos sembrado sin embargo, únicamente 10 animales/m^2. Este ensayo sufrirá los efectos del cambio de temperatura esperado para el mes de mayo y permitirá evaluar además, la eficacia de la inmunoestimulación en la época de transición térmica.

Antes de terminar cabría recordar que en el sistema de cultivo en dos fases, 1 ha de invernadero puede servir de precría a 16 ha de piscinas descubiertas, sembrando a 10 animales/ m^2 y a 10 ha de piscinas sembrando a 15 animales/m^2 (Calderón y Sonnenholzner, 2002).

Agradecimientos

A todo el personal de la estación experimental PESGLASA, sin ellos este trabajo no habría sido posible.

Bibliografía

Bayot, B., 1999. Levantamiento de datos históricos de camaroneras en el estuario interior del Golfo de Guayaquil. El Mundo Acuícola 4 (2), 26-27.

Bayot, B., Ochoa, X., Cisneros, Z., Apolo, I., Vera, T., Van Biesen, L., Calderón, J. y Cornejo-Grunauer, M.P., 2002. Sistema de alerta para la acuicultura del camarón. El Mundo Acuícola 8(1), 9-13.

Calderón, J. y Sonnenholzner, S., 2002. El uso de invernaderos como una alternativa de producción camaronera en Ecuador. El Mundo Acuícola 8(2), 7-11.

CNA., 1999. Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura 30, 34-37.

CNA., 2000. Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura 40, 4-7.

ACUMULACION DE ANTIBIOTICOS Y SU EFECTO SOBRE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SEDIMENTOS DE PISCINAS CAMARONERAS

Nelson Montoya[1], Miguel Uyaguari[2] y Mariuxi Sotomayor[1]
[1]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM)
[2]Facultad de Ingenieria Marítima y Ciencias del Mar (ESPOL)

Introducción

La mayor preocupación que ha surgido al considerar el uso de agentes antibacteriales en acuicultura, es la posibilidad de que sus residuos puedan estimular la presencia de resistencia bacteriana. Los primeros trabajos de residualidad concluyen que la mayor parte de estas drogas están ligadas a diferentes partículas y al sedimento de las piscinas. Junto a estos reportes, el impacto residual de los antibióticos sobre la comunidad bacteriana también ha sido evaluado, estableciéndose que la presencia de estos agentes antimicrobianos en camaroneras a bajas concentraciones, conduciría al desarrollo de cepas bacterianas resistentes al agente (Tendencia y de la Peña, 2001). En Ecuador, la oxitetraciclina (OTC) y en forma reciente el florfenicol (FLO) son empleados en forma de recubrimientos en dietas artificiales para el tratamiento de infecciones bacterianas en camarones.

El objetivo del presente estudio es evaluar la residualidad de los antibióticos, oxitetraciclina (OTC) y florfenicol (FLO) y su efecto sobre la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras, luego de un tratamiento terapéutico con dietas medicadas.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se colectaron muestras de sedimento de dos piscinas camaroneras (10.5 ha) antes, durante y luego de 20 días de recibir un tratamiento (6 días) con alimento recubierto con OTC (6000 mg/kg alimento). Las muestras fueron colectadas por triplicado en la entrada (E), parte media (M) y salida (S) de las piscinas mediante tubos nucleadores (5 cm). Los conglomerados de muestras se dividieron en submuestras iguales para el análisis microbiológico y cromatográfico.

Para la estimación de residualidad e impacto ambiental del FLO, se acondicionaron 6 tanques rectangulares (0.5 m^3) con una capa de sedimento (15 cm) proveniente de la camaronera mencionada y sembrados con 90 juveniles *L. vannamei* (3.9 ± 0.3 g). Tres de los tanques sirvieron como control y recibieron una dieta libre de antibiótico; los restantes se trataron con la misma dieta pero recubierta (vehículo: aceite de pescado) con FLO (150 mg/kg alimento) durante 7 días. El ensayo tuvo una duración de un mes, tiempo en el cual se muestreó un total de 12 ocasiones por tanque. Cada muestra (n=6) de sedimento fue colectada en forma similar a la descrita para OTC pero con la ayuda de tubos nucleadores de 2 cm.

Análisis de antibióticos

La determinación de OTC y FLO en sedimentos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC). Experimentos previos de HPLC estimaron los parámetros de validación de los métodos de extracción empleados para la estimación de OTC y FLO en sedimentos (Montoya y Uyaguari, 2002).

Microbiología

Se homogenizaron 10 g de sedimento con 90 ml de solución salina al 2%; esta dilución inicial sirvió para preparar diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-5}. 100 µl de las diluciones preparadas se sembraron en agar marino (AM) y agar tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS), e incubadas a 28°C por 3 días. Las cepas bacterianas se seleccionaron y clasificaron en base a los criterios reportados por Norrell y Mesley, 1997. Las colonias predominantes a lo largo del período de observación fueron seleccionadas y aisladas para las pruebas bioquímicas y de concentración mínima inhibitoria (MIC). Para las pruebas de MIC, se realizaron diluciones a partir de soluciones stock : 5 a 5000 µg/ml para OTC-HCl (Sigma Chemical Co.) y 2.6E-06 a 5 µg/ml para FLO (Schering Plough). La lectura de Densidades ópticas (D.O.) fue realizada en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Bichromatic, tipo 348) y en un espectrofotómetro Jenway 6400 (Jenway Ltd, UK).

Resultados

Residualidad

Oxitetraciclina

Los resultados del experimento en la camaronera revelan diferencias en la acumulación y distribución espacial de la OTC entre piscinas. Las concentraciones de OTC halladas fueron bajas y significativamente distintas entre sí. P1 fue la de mayor acumulación con un total de 3.98 µgOTC/g frente a 1.05 µgOTC/g para P2 (Fig. 1). Estas diferencias a nuestro criterio, podrían ser el reflejo de parámetros no determinados en este estudio. A saber, la composición del suelo cuya carga orgánica o niveles de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) actúan como factores quelante o inactivador de la droga, y los procesos combinados de velocidad de sedimentación y lixiviación del fármaco podrían en mayor o menor grado explicar las diferencias en los niveles de OTC reportados entre piscinas.

Ambas piscinas demostraron al final del tratamiento una mayor acumulación promedio del antibiótico en la salida de las mismas (P1=2.10 µg/g; P2=0.49 µg/g); como un posible efecto de la pendiente y su incidencia en el movimiento de partículas en la parte bentónica de las piscinas. Estudios previos reportan una distribución hacia las partes centrales de las piscinas por acción del viento o ligeras corrientes de agua (Kerry *et al*. 1996).

Una gran variedad de estudios, coinciden en que la persistencia de la OTC en sedimentos piscícolas es elevada (Kerry *et al*., 1995; Hektoen *et al*., 1995; Capone *et al*., 1996). En oposición a estos reportes la figura 1 muestra una residualidad baja y variable de la OTC en sedimentos de piscinas camaroneras. Diferente a los estudios realizados en salmónidos (5 a 15°C; 12-15 m profundidad) durante este experimento se registraron mayores temperaturas promedio (30°C) y menor profundidad (0.82 m) de la columna de agua. Esto sugiere que la temperatura y fotosensibilidad del agente incidieron en la mayor degradación de la OTC en este tipo de sedimentos.

Florfenicol

La figura 2 muestra el comportamiento del FLO en el sedimento durante la experimentación. Las concentraciones del FLO promediaron niveles de 0.02 a 0.08 µg/g (Fig. 2). La curva polinomial (4to orden) usada para explicar la persistencia de la droga, muestra al quinto día un pico máximo (0.07 µg/g) de acumulación.

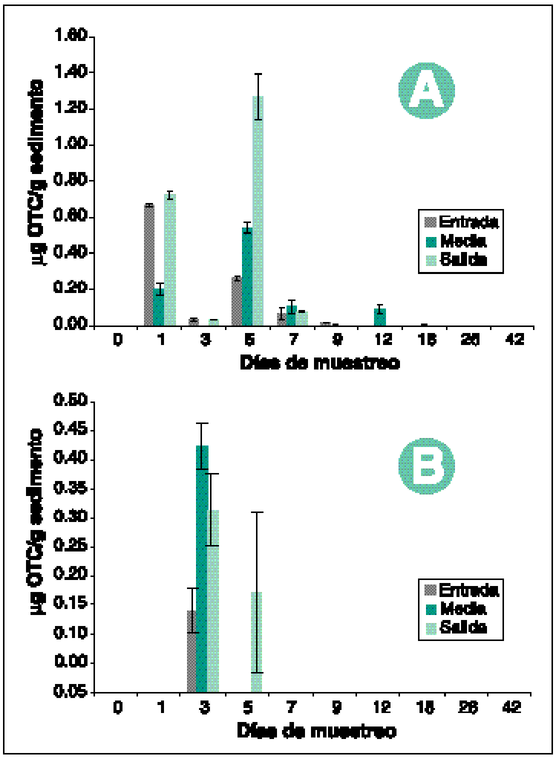


Figura 1. *Residualidad de la OTC durante el período de muestreo en las piscinas P1 (a) y P2 (b). Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=2).*

La estimación de la deposición del FLO, cálculo basado en la cantidad promedio de ingreso y su acumulación en los tanques tratamiento, muestran valores de deposición cercanos al 16%. El FLO al igual que la OTC, se empleó como recubrimiento en la dieta. Estudios recientes en dietas medicadas para camarones, formuladas con FLO (planta piloto), muestran porcentajes de lixiviación elevados (60%) (Pozo y Montoya, 2001). Comparada con esta última forma de medicación, la incorporación de antibióticos como recubrimiento en dietas medicadas, ha demostrado, al igual que en este estudio, una mayor lixiviación del antibiótico al medio acuoso.

Suspendido el suministro de alimento medicado, un total de 7 días fueron necesarios para estimar niveles residuales de FLO por debajo del límite de detección (0.8 ηg) del método. Calculándose un tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) de 5 días para el FLO en sedimentos de camaroneras.

El $t_{1/2}$ reportado, demuestra la rápida degradación del antibiótico.

Efecto sobre la microflora

Oxitetraciclina

Las figuras 3 y 4 muestran la ausencia de eficacia de la OTC acumulada en el sedimento sobre los contajes de bacterias totales (3.2 x 10^7 CFU/g) y vibrios estimados durante el período de medicación (2.4 x 10^3 CFU/g). La disminución significativa de la población bacteriana, observada luego de la medicación fue producto de la adición (día 7) de químicos no relacionados con el objetivo de nuestro estudio.

Tendencia y de la Peña (2001), establecen que la presencia de un agente antimicrobiano en camaroneras a bajas concentraciones, conduciría al desarrollo de cepas bacterianas resistentes al agente. Los valores de MIC (Fig. 5) reportados para las bacterias aisladas en ambas piscinas –*Aeromonas spp*., *Staphylococcus spp*. y *Vibrios*- muestran niveles de inhibición elevados (> 1000 ppm), comparados con los encontrados (< 100 ppm) para las mismas bacterias en sedimento de granjas de salmónidos. La correlación de estos parámetros: bajas concentraciones de OTC en sedimento y elevados valores de inhibición, reportados para las bacterias persistentes aisladas, explican la eficacia nula de los residuos de OTC para disminuir la carga bacteriana total y de *Vibrios* presentes en el sedimento.

Florfenicol

Los datos de este experimento demuestran que mientras existió una residualidad activa del FLO en el sedimento, este ejerció una acción inhibitoria significativa sobre las bacterias totales (Fig. 6) y la población de vibrios (Fig. 7). Concentraciones promedios de 0.08 µgFLO/g en el sedimento redujeron ($P<0.05$) la población bacteriana total. De igual forma el comportamiento en la población de vibrios, refleja la acción inhibitoria del FLO. En ambos casos este efecto inhibitorio es corroborado por el crecimiento exponencial en forma inversamente proporcional de la microflora ante la ausencia del fármaco en el sedimento.

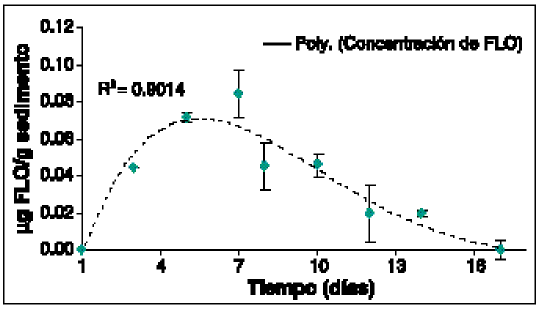


Figura 2. Persistencia de FLO en el sedimento de los tanques tratamiento. Las barras verticales representan los valores de desviación estándar (n=3).

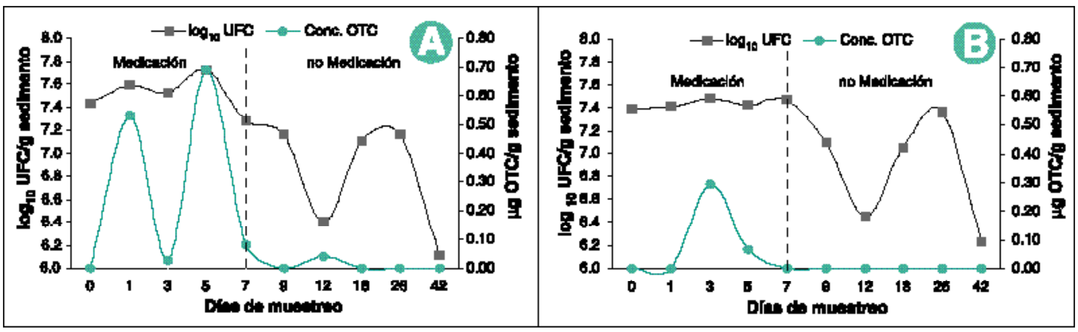
Los valores de MIC con FLO muestran el amplio espectro que tiene este agente sobre las bacterias en general. Los valores de inhibición y de D.O. mostrados en la figura 8, demuestran la acción bactericida del FLO sobre las bacterias persistentes (*V. anguillarum, V. alginolyticus, V. pelagicus*, *Bacillus spp., Staphylococcus spp., Aeromonas y*) aisladas durante este bioensayo. Se estimó valores de inhibición de 1 ppm de FLO para las bacterias Gram-positivas, exceptuando *Staphylococcus spp*. (5 ppm); mientras que niveles de 0.2 ppm de FLO inhibieron las bacterias Gram-negativas (vibrios y aeromonas).

De todas las bacterias que fueron afectadas por la acción inhibitoria del FLO, dos de las bacterias aisladas (*Bacillus spp*. y *V. alginolyticus*) han sido consideradas como probióticos que ayudan en la respuesta inmunitaria del camarón (Gatesoupe, 1999; Gullian, 2001). A nuestro criterio esto sería una forma indirecta de afectar a los animales por una interacción suelo-bacterias probióticas y camarón.

Conclusiones

Bacterias resistentes Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas*, fueron aisladas de los sedimentos en ambos experimentos. Las pruebas de MIC mostraron

Figura 3. Relación entre los promedios (n=3) de las poblaciones de bacterias totales (log_{10}) y la concentración de OTC en sedimento de las Piscinas P1 (a) y P2 (b).



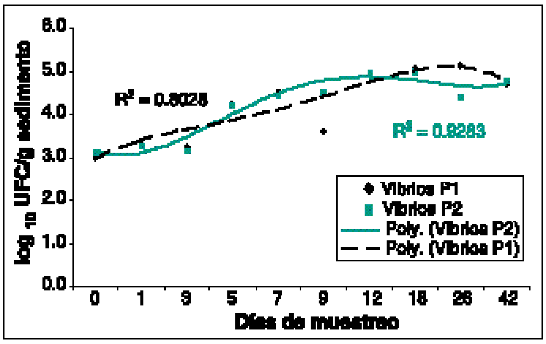


Figura 4. Promedio de vibrios totales expresados en log_{10} hallados en P1 y P2.

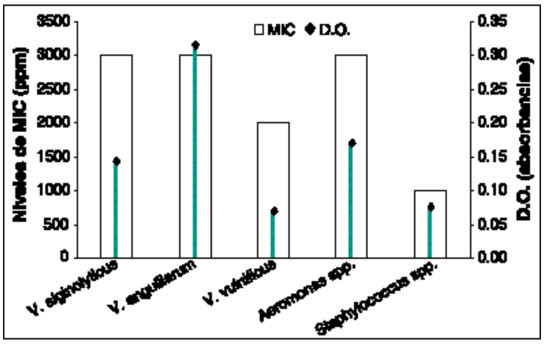


Figura 5. MIC y DO de las bacterias persistentes durante el tratamiento con OTC.

valores superiores a 1000 µg/ml y menores a 1 µg/ml para OTC y FLO respectivamente.

La acumulación en el sedimento, de los antibióticos estudiados, dependió de sus características propias para degradarse o ligarse a otras partículas.

Los resultados de residualidad demuestran una rápida degradación de los antibióticos, OTC y FLO en sedimentos de piscinas camaroneras, bajo las condiciones de cultivo detalladas.

Esta investigación confirman la hipótesis de que el uso indiscriminado de antibióticos como mecanismo que a largo plazo puede inducir resistencia bacteriana.

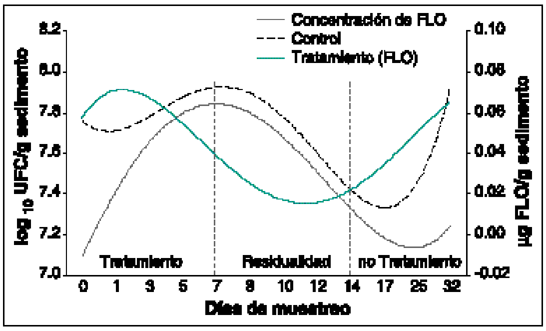


Figura 6. *Variación a través del tiempo de la concentración de bacterias totales (log_{10} UFC/g sedimento) en sedimento con y sin FLO en tanques experimentales y de la concentración de FLO en el sedimento.*

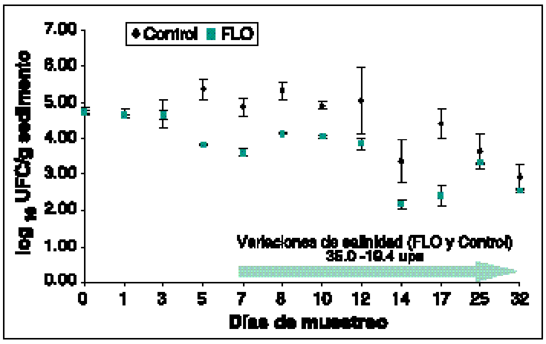


Figura 7. *Contaje de vibrios durante el tratamiento con FLO y control.*

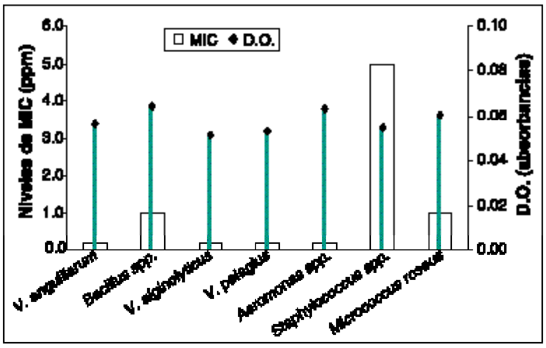


Figura 8. *MIC y D.O. de las bacterias persistentes durante el tratamiento con FLO.*

Referencias Bibliográficas

Capone, G., Weston, D., Miller, V., Shoemaker, C., 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. Aquaculture 145, 55-75.

Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147– 165.

Gullian, M., 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de Penaeus vannamei. Tesis de Maestría. ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador, 57 pp.

Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V., Yndestad M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. Aquaculture 133, 175-184.

Kerry, J., Nicgabhainn, I., Smith, P., 1997. Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic salmon. Aquaculture 157, 187-195.

Montoya, N., Uyaguari, M., 2002. Análisis de antibióticos en sedimentos de piscinas camaroneras mediante cromatografía liquida de alta performance (HPLC). Poster presentado en ESPOLCiencia 2002

Norrell, S., Messley, K., 1997. Microbiology. Laboratory Manual. Principles and applications. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA, 302 pp.

Pozo, J., Montoya, N., 2001. Evaluación del uso de agentes protectores sobre la lixiviación y palatabilidad de dietas medicadas (Florfenicol) para camarones. CENAIM, Ecuador, Informe técnico, 59 pp.

Tendencia, E. A., de la Peña, L. D., 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195, 193-204.