Acumulación de antibióti

y su efecto ante la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras.

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

Por: Nelson Montoya[1], Miguel Uyaguari[2] y Mariuxi Sotomayor[1].

La mayor preocupación que ha surgido al considerar el uso de agentes antibacteriales en acuacultura, 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 es ligada 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. 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.

Diseño experimental

Se colectaron muestras de sedimento de dos piscinas camaroneras (10.5 ha) antes, durante y después de 20 días de recibir un tratamiento (6 días) con alimento recubierto con OTC (600 mg/kg alimento). Las muestras fueron colectadas por triplicado en la entrada (E), parte media (M) y en la salida (S) de las piscinas mediante tubos core (5 cm). Los "pool" de muestras formados se dividieron en submuestras iguales para el análisis microbiológico y cromatográfico.

Para la estimación de residualidad e impacto ambiental del FLO, se acondicionaron seis tanques rectangulares ($0.5\ m^3$) con una capa de sedimento (15 cm) proveniente de la instalación camaronera mencionada y sembrados con 90 juveniles *L. vannamei* (3.9± 0.3 gr). 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 siete días. El ensayo tuvo duración de un mes, tiempo en el cual se muestreó en 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 core de 2 cm.

Análisis de antibióticos

La determinación de OTC y FLO en sedimentos se realizó mediante la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Experimentos previos de HPLC estimaron los parámetros de validación de los métodos de extracción empleados para la estimación de estos antibióticos en sedimentos.

Microbiología

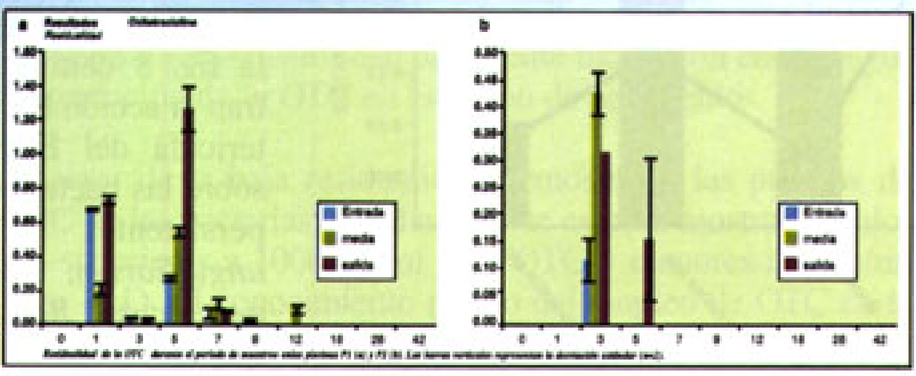
Se homogeneizaron 10 g de sedimento con 90 ml de solución salina al 2%; esta dilución inicial sirvió para preparar diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} 100µl de las diluciones preparadas se sem-

braron en agar marino (AM) y agar tiosulfato citrato bilis sucrosa (TCBS), e incubadas a 28 °C por tres días. Las cepas bacterianas se seleccionaron y clasificaron en base a los criterios reportados por Norrell y Mesley en 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 500µg/ml para OTC-HCL y 2.6E -06 a 5µg/ml para FLO. La lectura de densidades ópticas (DO) fue realizada en un lector de ELISA (*Labysistems Multiskan Bichromatic, tipo 34*) y en un espectrofotómetro Jenway 6400.

Residualidad

Los resultados del experimento revelan diferencias en la acumulación y distribución espacial de OTC entre las piscinas. Las concentraciones de OTC fueron bajas y significativamente distintas entre sí. P1 fue la de mayor acumulación con un total de 3.98µg OTC/gr frente a 1.05µg OTC/g de P2.

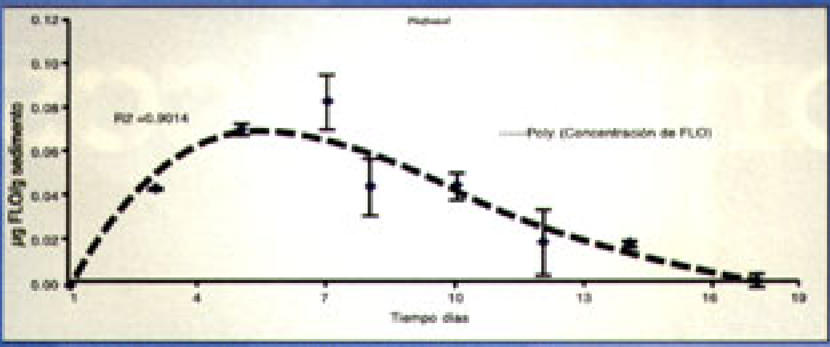


A nuestro criterio, estas diferencias podrían ser el reflejo de parámetros no determinados en este estudio, debido a que la composición del suelo cuya carga orgánica o niveles de cationes divalentes de calcio y magnesio actúan como factores quelantes o inactivadores de la droga y los procesos combinados de velocidad de sedimentación y lixiviación del fármaco podrían en mayor o menor grado explicar estas diferencias de los niveles encontrados entre las piscinas. Ambas mostraron al final del tratamiento, una mayor acumulación promedio de OTC en el sector S de las mismas (P1= 2.10 µg/g y P2=0.49µg/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 mismas por acción del viento o por ligeras corrientes de agua.

Una gran variedad de estudios, coinciden en que la persistencia de la OTC en sedimentos de piscícolas es elevada, en oposición a esos reportes, la figura 1 muestra una residualidad baja y variable de OTC en sedimentos de piscinas camaroneras.

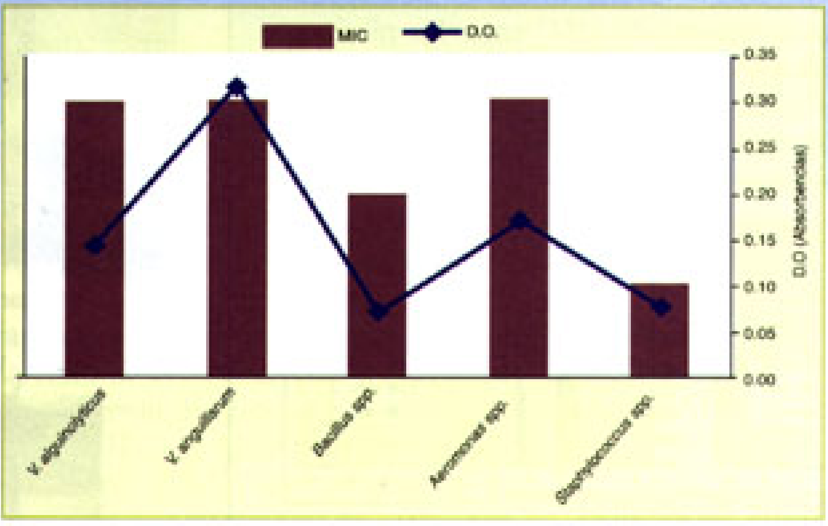
El comportamiento de FLO en el sedimento de las piscinas, donde las concentraciones de FLO promediaron niveles de 0.02 a 0.08 µg/g. La curva de la gráfica (polinomial de 4o orden) explica la persistencia de la droga, mostrando al quinto dia un pico máximo de 0.07µg/g de acumulación (fig. 2).

La estimación de la deposición de FLO, cálculo basado en la cantidad promedio de ingreso y su acumulación en los tanques de 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 muestran porcentajes de lixiviación elevados del 60%. 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.



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

Una vez suspendido el suministro de alimento medicado, se necesitaron dejar pasar siete días para estimar los niveles residuales de FLO por debajo del límite de detección del método. Calculándose un tiempo de vida medio (t 1/2) de cinco días para FLO en sedimentos de camaroneras, lo que demuestra la rápida degradación del antibiótico.



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

Efecto sobre la microflora.
Se establece 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 reportados para las bacterias aisladas en ambas piscinas -*Aeromonas spp, Staphylococcus spp. y vibrios*- muestran niveles de inhibición elevados mayores de 1000 ppm, comparados con los encontrados, menores de 100 ppm para las mismas bacterias en sedimentos de granjas de salmónidos. La correlación de estos parámetros; bajas concentraciones de OTC en sedimentos y elevados valores de inhibición, reportados para las bacterias persistentes aisladas, explican la nula eficacia de los residuos de OTC para disminuir la carga bacteriana total y de vibrios presentes en el sedimento.

Los datos de este experimento demuestran que mientras existió una residualidad activa del FLO en el sedimento, éste ejerció una acción inhibitoria significativa sobre las bacterias totales y la población de *vibrios*.

Concentraciones promedio de 0.08 µg FLO /g de sedimento redujeron la población bacteriana total. De igual forma el comportamiento en la población de vibrios, refleja la acción inhibitoria del FLO, siendo corroborado este efecto en ambos casos, por el crecimiento exponencial en forma inversamente proporcional de la microflora, ante la ausencia del fármaco en el sedimento.

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 fig. 8 demuestran la acción bactericida del FLO sobre las bacterias persistentes (*V. anguillarum, V. pelagicus, Bacillus spp, Staphylococcus spp y Aeromonas*) aisladas durante este bioensayo. Estimándose 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 inhibidora del FLO, dos de ellas *(Bacillus spp y V. alginolyticus)* han sido consideradas como probióticos que ayudan a la respuesta inmunitaria del camarón. A nuestro criterio esto sería una forma indirecta de afectar a los animales por una interacción suelo-bacterias probióticas y camarón.

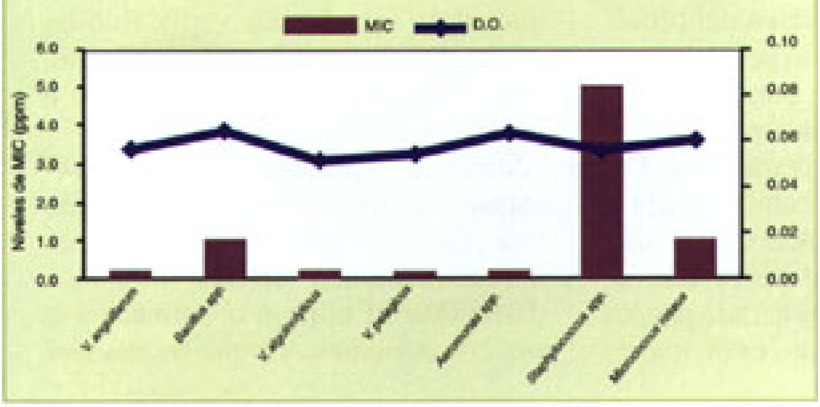
Conclusiones
Durante el período de medicación con OTC niveles acumulativos promedios de 3.98 (P1) y 1.05 ppm (P2) se cuantificaron en las piscinas medicadas. Los promedios establecidos, mantienen relación con los niveles encontrados en sedimentos de granjas piscícolas.
Los resultados de residualidad demuestran una rápida degradación de los antibióticos OTC y FLO en sedimentos

de piscinas camaroneras bajo las condiciones de cultivo detalladas. Contrario a los estudios realizados en granjas piscícolas, donde las temperaturas del agua oscilan de 5 a 15 °C, con profundidades promedio superiores (12-15 m), se registraron durante este experimento mayores temperaturas promedio (30 °C) y menor profundidad (0.87 m) de la columna de agua. Criterios que nos permiten deducir que la temperatura y fotosensibilidad del agente incidieron en la mayor degradación de la OTC en este tipo de sedimentos.

A pesar de la baja residualidad demostrada, las pruebas de MIC en las bacterias aisladas de este estudio mostraron valores superiores a 1000 µg/ml para OTC y menores a 1 µg/ml para FLO. El conocimiento previo del empleo de OTC en la camaronera y los valores elevados de inhibición registrados durante las pruebas de MIC, soportan la hipótesis de una resistencia adquirida a lo largo del tiempo ante la presencia de residuos de antibióticos (OTC) a bajas concentraciones en el sedimento. Si bien, otros autores difieren con este criterio, mencionando que la elevada resistencia es producto de los altos niveles de nutrientes o componentes considerados como portadores de factores de resistencia incorporados a las dietas. A nuestro criterio ambos factores habrían influido para que a largo plazo las bacterias hayan adquirido niveles elevados de inhibición.

El FLO es un antibiótico de uso reciente en camaronicultura. Estudios previos reportan valores de inhibición menores a 0.72 µg/ml en cepas de vibrios procedentes de la hemolinfa de camarones. El valor de MIC aquí estimado, muestra el amplio espectro que aún mantiene este agente sobre las bacterias en general, pero también revalida el enfoque del uso indiscriminado de antibióticos como mecanismo que a largo plazo puede inducir resistencia bacteriana.

*[1]*Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas- CENAIM*
[2]*Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar (ESPOL)*



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