

CAPITULO 8

ANTIBIÓTICOS EN ACUICULTURA

Pier Barattini

GENERALIDADES

Los antibióticos son compuestos de origen microbiano que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Estos pueden ser sintetizados, creándose una gran variedad de compuestos con distintos métodos de acción, especificidad y toxicidad. En animales, los antimicrobianos son utilizados para el tratamiento o prevención de enfermedades, así como también para promover el crecimiento, en algunos casos. Su elevado uso, sumado a una pobre absorción de estos medicamentos por parte del animal, ha causado que lleguen tanto al medio acuático como al terrestre.

El riesgo ambiental que potencialmente se produce por antibióticos puede tener varios efectos, siendo el más importante la generación de resistencia, en especial en organismos patógenos para el ser humano. El uso de estos químicos favorece la selección de bacterias resistentes y promueve la diseminación de los genes de resistencia, que pudiera eventualmente traspasar nichos ecológicos hasta llegar al ambiente humano. En el caso de este proyecto interesa también particularmente evaluar posibles efectos sobre la biota del suelo. Es por esto que la aplicación de antibióticos tanto en medio acuático como terrestre debe ser regulada, ya que implica un riesgo potencial en la salud humana y ecosistémica, y que debe ser estudiado.

En la industria acuícola, como en cualquier sistema ganadero (sistemas lecheros, de carne bovina, cerdos, aves, etc.), se utilizan comúnmente antibióticos, los que según su naturaleza, pueden eliminarse rápidamente o permanecer activos por tiempos prolongados. Para mu-

chos antibióticos, el lodo producido como desecho puede generar un ambiente más propicio para la permanencia de éstos que el agua. Los lodos además tienen una alta carga bacteriana, lo que facilitaría la eventual selección de organismos resistentes. Es decir, el eventual uso de antibióticos es un tema presente en todos los sistemas productivos que incluyen animales, ya sean terrestres o acuáticos.

ANTIBIÓTICOS Y ACUICULTURA EN CHILE

Chile es uno de los mayores actores en acuicultura en el mundo. En la industria acuícola existe uso de varios antibióticos, y está ligado a la necesidad de prevenir (uso profiláctico) y controlar la incidencia de patógenos que afectan los sistemas de cultivo, tal como *Piscirickettsia salmonis*.

Según Sernapesca, los antibióticos autorizados para su uso en el país son el ácido oxolínico, amoxicilina, eritromicina, flumequina, florfenicol y oxitetraciclina. De éstos, los más utilizados son el florfenicol y la oxitetraciclina, que corresponden a un 54 y 43%, respectivamente. El uso de fluoroquinolonas se ha ido desincentivando para prevenir la posible selección de resistencia en microorganismos, ya que es un antimicrobiano de última generación y de amplio uso en medicina humana; esto se ve reflejado en el abrupto descenso en el consumo de flumequina y ácido oxolínico a partir del año 2009, con valores que rondan el 1% (figura 8.1). Los datos disponibles no dan cuenta de qué cantidad de estos antibióticos se consumen en la etapa de agua dulce y en la de agua de mar.

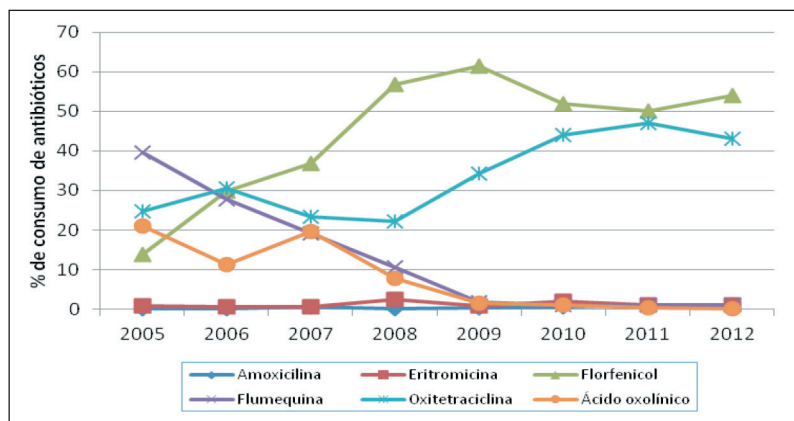


FIGURA 8.1 Porcentaje de antibióticos utilizados en la salmonicultura en Chile para el período 2005-2012 (Fuente: Sernapesca)

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS

Ácido oxolínico y flumequina:

El ácido oxolínico pertenece al grupo de las quinolonas, actuando sobre bacterias gram-negativas. Posteriormente se les agregó un átomo de flúor, surgiendo las fluoroquinolonas, grupo al que pertenece la *flumequina*. Estas últimas tienen un mayor espectro de acción, ya que afectan tanto gram-negativas como gram-positivas. Además tienen una mayor liposolubilidad, distribuyéndose ampliamente en el organismo. Su vía de administración es oral y parenteral.

Amoxicilina:

Es un antibacteriano sistémico perteneciente al grupo de los β -lactámicos, cuyos blancos son las enzimas que sintetizan la pared celular de las bacterias. La amoxicilina es un derivado semi-sintético de la ampicilina, en el cual se ha introducido un grupo hidroxilo parafenólico en la porción fenil de la cadena lateral. Esto ajusta el punto isoeléctrico del antibiótico a un valor más ácido, lo que mejora su absorción. Como es un ácido orgánico débil hidrosoluble, no atraviesa las membranas biológicas con facilidad, impidiendo su amplia distribución en el organismo.

Su espectro de actividad incluye bacterias gram-positivas y gram-negativas. Pueden ser de primera línea de elección en procesos infecciosos donde la bacteria patógena tiene una localización extracelular, como ocurre en la mayoría de las infecciones. La vía de administración en los salmones es preferentemente oral, pero también se puede administrar vía parenteral, con una biodisponibilidad cercana al 100%.

Eritromicina

Pertenece a la familia de los macrólidos. Inhibe la síntesis proteica al unirse reversiblemente a la unidad 50s del ribosoma bacteriano. Es usualmente bacteriostático, excepto a altas concentraciones, donde puede ser bacteriolítico, siendo más activo contra bacterias gram-positivas. Se absorbe a nivel del intestino, para luego distribuirse rápidamente en el líquido intracelular, alcanzando actividad antibacteriana en casi todo el organismo.

Se utiliza normalmente para controlar la renibacteriosis (BKD) y otras bacterias que sean sensibles a este fármaco. El modo de administración es principalmente por vía oral, aunque esto disminuye su disponibilidad.

Florfenicol:

Es un antibiótico perteneciente a la familia de los fenicoles, derivado del tianfenicol. Es un compuesto neutro, liposoluble, que atraviesa fácilmente las barreras celulares y es capaz de difundirse rápidamente por todo el organismo. Está catalogado como un antibiótico de amplio espectro, usado contra bacterias gram-positivas, gram-negativas y rickettsias.

El mecanismo de acción de la molécula se traduce en el bloqueo de la formación de proteínas por acción directa sobre los ribosomas. La consecuencia para la bacteria sensible es la inhibición de su multiplicación, por lo que el efecto es bacteriostático (no mata a la bacteria).

El florfenicol tiene una alta afinidad por moléculas lipídicas, lo que permite que se almacene con facilidad en los músculos de los salmónidos. Además, es de muy rápida eliminación en los tejidos, teniendo tiempos de eliminación más cortos que otros antibióticos utilizados en acuicultura (Entre 200 y 300 grados día). Su vía de administración en los salmones es preferentemente oral. También se puede administrar vía parenteral (atravesando una o más capas de la piel o de las membranas mucosas mediante una inyección).

Oxitetraciclina (OTC):

Pertenece al grupo de las tetraciclinas. Es moderadamente lipofílica, pero lo suficiente como para atravesar fácilmente las diferentes barreras celulares, distribuyéndose en todo el organismo. Es uno de los grupos de antibióticos de elección en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos intracelulares como rickettsias. Debido a su amplio espectro de acción, también pueden utilizarse en otro tipo de infecciones bacterianas como flavobacteriosis.

La vía de administración de OTC en los salmones es preferentemente oral. La presencia de cationes divalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} o Fe^{+2} en los alimentos disminuye la absorción de estos fármacos, debido al efecto quelante de estos iones, alterando a la vez la biodisponibilidad. También se pueden administrar por vía parenteral.

EFFECTOS DEL USO DE ANTIBIÓTICOS EN EL AMBIENTE

La principal vía de aplicación de antibióticos es a través del alimento, y la absorción del fármaco por parte del pez varía en gran medida según el tipo de antibiótico utilizado. Antibióticos como los fenicoles tienen un porcentaje de absorción mayor al 90%, siendo una cantidad muy baja la que es excretada a través de las heces. Otros, sin embargo, tienen porcentajes de absorción muy bajos en el intestino del pez, aumentando su presencia en el medio acuático, como es el caso de la oxitetraciclina. Estos valores van a depender de la biodisponibilidad de los antibióticos en el pez, la que puede verse influenciada por el medio donde se encuentre.

Los antibióticos excretados por el pez y en el alimento medicado no consumido, son incorporados al agua y/o al fondo del estanque de cultivo. En los procesos de limpieza, parte de estos antibióticos podrían quedar en los lodos, con una actividad antimicrobiana que es necesario evaluar. En el supuesto caso de existir antibióticos en los lodos de piscicultura y de definirse su uso en agricultura, es necesario estudiar su potencial efecto sobre el suelo. Fenómenos ambientales como lluvias y variaciones de temperatura, al igual que el tipo de suelo, pueden hacer variar enormemente el tiempo de permanencia de eventuales antibióticos en el lodo, pudiendo ser de días, semanas, e incluso meses.

En el caso de determinarse presencia de antibióticos en lodos que se apliquen al suelo, podría haber incidencia en el crecimiento y desarrollo de la vegetación, siendo los efectos variables según la planta. También podrían causarse cambios en la biodiversidad bacteriana, alterando la composición y diversidad de las comunidades del suelo y, lo que es más importante, perjudicar a bacterias que cumplen un rol importante en los ciclos bioquímicos del suelo, como la fijación de nitrógeno, afectando de manera indirecta a las plantas. En el hipotético caso de existir antibióticos en lodos que se vayan a usar en suelos, también estaría el eventual riesgo de que éstos ejerzan presión para la selección de ciertos genes de resistencia, los que eventualmente pudieren ser traspasados a bacterias patógenas.

La presencia o no de antibióticos en los lodos de piscicultura está muy poco estudiado y se hace evidente la necesidad de rastrear estos fármacos con el fin de determinar el potencial impacto que pudieran ocasionar. Factores como las concentraciones que llegarían al suelo, el tiempo de permanencia, el grado de degradación, debieran estudiarse antes de realizar cualquier tipo de aplicación.

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LODOS

El análisis químico de antibióticos desde diferentes matrices es complejo debido a la necesidad de realizar una extracción previa. Los antibióticos consisten normalmente de un centro apolar y uno o más grupos funcionales, los que se disocian o protonan dependiendo del pH del medio. Agentes extractantes apolares o muy polares pueden llevar a una extracción incompleta, por lo que en general se ocupan buffers levemente ácidos en combinación a solventes orgánicos. La limpieza de las muestras se realiza utilizando filtros de 0,45 ó 0,2 μm , o mediante extracción en fase sólida.

Actualmente, la cromatografía líquida de alta eficiencia en combinación con un detector UV (HPLC-UV), o cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) son los métodos de detección más utilizados por su gran sensibilidad. El INIA en Aysén está desarrollando y adaptando metodologías para la detección de antibióticos en diferentes matrices, centrándose en los dos antibióticos más utilizados en la industria, que son oxitetraciclina y florfenicol.

Existen antecedentes que indicarían que el uso de antibióticos es mucho más relevante en la fase marina (engorda de peces) y que su uso en pisciculturas sería menor. Ello debe ser cotejado en base a la analítica propuesta.

A través de estas metodologías, se han estado analizando muestras de lodo procedentes de pisciculturas de la zona y con la aplicación de estos protocolos no se ha detectado la presencia de antibiótico. Para comprobar la efectividad del método, se contaminaron inóculos

de la muestra con distintas concentraciones de florfenicol (entre 6,0 y 0,012 ppm). El nivel de concentración más bajo (0,012 ppm ó 12 ppb-partes por billón) no pudo ser detectado mediante esta técnica.

La metodología que se está desarrollando presenta la ventaja de ser rápida, lo que permite trabajar con una gran cantidad de muestras por día. Además, el consumo de insumos y reactivos es relativamente bajo, lo que permitiría ahorrar en gastos.

Los resultados hasta el momento han mostrado un nivel de sensibilidad bastante alto, lo que en teoría permitiría detectar la presencia de florfenicol hasta niveles muy bajos. Sin embargo, esta misma metodología se probó con lodos de distinto origen, y debe ser depurada, ya que a concentraciones muy bajas se dificulta la lectura del antibiótico.

La metodología podría ser usada en fracciones líquidas y lodos con bajo contenido de materia orgánica. Se hace necesario corregir la metodología para poder analizar muestras con alto nivel de materia orgánica que produzcan interferencias cromatográficas, lo que se lograría modificando el proceso de extracción desde el lodo.

Aunque en apariencia se recuperó todo el antibiótico aplicado (o su mayor parte), este fármaco tuvo un tiempo de estadía corto en el lodo (1 día), por lo que es posible que el florfenicol que lleva más tiempo en esta matriz se encuentre en estado degradado, lo que ha sido mencionado en sedimentos en explotaciones marinas. Sería de gran utilidad ampliar la metodología para incluir los metabolitos, ya que esto entregaría información sobre el destino final del florfenicol.

También se ha avanzado con metodología analítica para oxitetraciclina. Se seleccionaron siete muestras de lodo de distinto origen, las que se analizaron mediante la técnica propuesta, no detectándose la presencia del antibiótico.

Para comprobar la efectividad del método, estas mismas muestras se contaminaron con OTC, a tres niveles de concentración: 10, 1 y 0,1 ppm. Luego se les realizó el protocolo para extracción, y se analizaron por duplicado. El método propuesto para el análisis de OTC tiene la ventaja de ser de fácil manejo y baja variabilidad entre repeticiones. A esto se suman los bajos valores de detección a los que se podría llegar, que serían en última instancia los que definan si el método es útil o no.

Otra cosa a considerar es la alta variabilidad en la recuperación de OTC. Este fármaco se adhiere a las partículas del lodo, lo que hace muy difícil su completa extracción. Por otro lado, también es posible que el antibiótico no detectado se haya degradado en algún metabolito, permaneciendo todavía en el lodo. Poca información existe al respecto, desconociéndose los factores que promuevan esta degradación. Asimismo, queda la incógnita de si estos

metabolitos aún conservan actividad antibiótica o si pueden revertirse en algún momento para formar la molécula original. Ampliar esta metodología para el análisis de metabolitos permitiría saber qué productos de degradación se generan y, a partir de esa base, se podrían realizar estudios sobre su real impacto.

Otro tema que esta metodología permitiría abordar es el tiempo de persistencia que pueda tener el antibiótico en el lodo. Existe abundante información sobre la persistencia de OTC en sedimento, donde se comprobó que ambientes con bajo nivel de oxígeno daban las condiciones ideales para la persistencia de OTC. Estas condiciones hipóxicas

también se presentarían en los lodos. Un estudio enfocado en la posible persistencia permitiría obtener información de esta ocurrencia para las condiciones locales, tanto climáticas como de manejo.

CONSIDERACIONES FINALES

El estudio de los antibióticos utilizados en la salmonicultura, y su destino final, es de suma importancia al realizar un manejo de los residuos producidos. Al tomar conocimiento del comportamiento de un determinado fármaco en el ambiente, se podrían tomar mejores medidas de manejo fitosanitario, y así disminuir el potencial impacto que éste pudiera causar en el ambiente.

Resulta importante profundizar los estudios en antibióticos, ya que se genera una base sobre la cual se podría estudiar la dinámica de los fármacos, tanto en el lodo, como en el suelo. Por lo mismo, se necesita profundizar el estudio no sólo a los fármacos utilizados, sino también a los metabolitos que se puedan producir, ya que se pueden mantener en el ambiente por tiempo prolongado y no existe información sobre su posible efecto.

Los resultados aquí expuestos aún son basados en pocas muestras de lodo, y hasta el momento no dan cuenta de la presencia de antibióticos. Sin embargo, el reducido número de muestras analizadas, sumado a que la metodología se encuentra aún en desarrollo, no permiten aún afirmar categóricamente que éstos no estén presentes en la fase de agua dulce. Un mayor número de análisis se requerirán para poder afinar la metodología. De mejorar la técnica, se dispondría de una herramienta de medición de lodos generados de manera local, antes de ser aplicados al ambiente. Se continúa trabajando en esa línea, como también en cuanto a los efectos del lodo sobre el suelo.

