



*Universidad Nacional del Nordeste*

Facultad de Ciencias Veterinaria

Corrientes – Argentina

**TRABAJO FINAL DE GRADUACION**

**-MODULO DE INTENSIFICACION PRÁCTICA-**

**OPCION:** Salud Pública y Tecnología de los Alimentos.

**TEMA:**

Puesta a punto de una Técnica de Detección Biológica de Residuos Antimicrobianos en Músculo de *Piaractus mesopotamicus* (Pacú).

**TUTOR EXTERNO:** M.V Amable, Valeria Inés

**TUTOR INTERNO:** Dr. Marcos Gabriel Guidoli

**RESIDENTE:** Valdez Amarilla María José

**e-mail:** [majovaldez1992@gmail.com](mailto:majovaldez1992@gmail.com)

## **AGRADECIMIENTOS**

A Marcos, Valeria y Paula, pilares fundamentales de este proyecto.

A mi familia.

1. INTRODUCCIÓN:	5
1.1. Antecedentes del tema y experiencia previa en relación al mismo	7
1.2. OBJETIVOS:	7
2. MARCO TEORICO:	8
2.1. Acuicultura en el mundo:	8
2.2. Acuicultura en la Argentina:	9
2.3. Pacú ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	10
2.4. Antibióticos en medicina veterinaria	10
2.5. Normativas nacionales e internacionales ante el uso de antibióticos	11
2.6. Desventajas en el uso indiscriminado de antibióticos y riesgos de salud pública	13
2.7. Métodos de detección de residuos de antibiótico en productos de origen animal	15
2.8. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> :	16
3. HIPOTESIS:	18
4. MATERIALES Y METODOS:	19
5. RESULTADOS:	23
5.1. Desarrollo del microorganismo.	23
5.2. Evaluación de la estabilidad del medio APBg frente a distintas concentraciones de Enrofloxacina y Oxitetraciclina.	24
5.3. Determinación de la interacción entre antimicrobianos y microorganismos en APBg.	25
5.4. Análisis de la interacción entre antibióticos y <i>G. stearothermophilus</i> en medio APBg.	28
6. CONCLUSIONES:	33
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

## RESUMEN:

Las técnicas de determinación de residuos de antibióticos son complejas, caras y/o demasiado lentas. Una alternativa viable podría ser la detección biológica, que evalúa la actividad a través de la inhibición del crecimiento de un microorganismo. Este trabajo tiene como objetivo realizar la puesta a punto de una técnica biológica, económica, rápida y fácil de implementar para la detección de residuos de antibióticos en músculo de peces (*Piaractus mesopotamicus*). El fundamento de la misma se basa en la elevada sensibilidad a la presencia de antibióticos de un microorganismo termófilo, apatógeno, esporulado y de requerimientos nutricionales básicos, como el *Geobacillus stearothermophilus*. En ausencia de antimicrobianos esta bacteria crece, modificando el pH y produciendo un viraje en el color del medio (indicador). La existencia de bajas concentraciones de sustancias antimicrobianas impide su desarrollo y, por lo tanto, el medio no modifica su coloración. Para la puesta a punto de la técnica se comenzó por comprobar la pureza, estabilidad y viabilidad de una cepa ATCC de *G. stearothermophilus*, luego se procedió a evaluar la estabilidad del medio, analizar la interacción entre los antibióticos y microorganismos sensibles y resistentes a los mismos, y evaluar la interacción entre los antimicrobianos y *G. stearothermophilus* en el medio de cultivo elegido, una vez puesta a punto la técnica se trató de determinar la presencia de Enrofloxacin y Oxitetraciclina en las muestras de músculo previamente obtenidas. El método biológico de detección de antimicrobianos evaluado en este trabajo mostró ser efectivo, sin embargo, a la hora de confrontarlo con el músculo de pescado, no se pudo poner en evidencia la presencia de antibióticos en los mismos, por lo que se propone la realización de ensayos complementarios que permitan perfeccionar la técnica, ya que, si bien en este trabajo los resultados obtenidos no fueron los esperados, estudios previos, desarrollados sobre leche, carne de pollo o canales de *Bos taurus*, especificados en la bibliografía y consultados durante la confección del proyecto, dejan constancia de la viabilidad del método de cribado utilizando *Geobacillus stearothermophilus* para la detección de residuos de antibióticos en muestras orgánicas.

## 1. INTRODUCCIÓN:

La producción acuícola a nivel mundial, en particular la piscícola, evidenció una marcada expansión en las últimas décadas. Esto se debió, principalmente, a una creciente demanda de proteínas derivadas de la carne de pescado y a la necesidad de gestionar los recursos naturales de manera sostenible debido a la preocupante disminución del stock pesquero (Hennig *et al*, 2017). El consumo de pescado *per cápita* ha aumentado de 9 kg en 1961 a 20,2 kg en 2015 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura -FAO-, 2018); con predominio de pescado de cultivo. En consecuencia, desde el año 2012, la acuicultura supera a la pesca, cuyos volúmenes de producción anual se encuentran estancados (Hennig *et al*, 2017).

La acuicultura en Argentina produce anualmente 3900 toneladas. El 85% de esta producción se encuentra representado por pacú (*Piaractus mesopotamicus*), con un volumen aproximado de 2000 toneladas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria –SENASA-, 2018). Así, el cultivo de pacú ha tenido un crecimiento sostenido hasta la actualidad, superando durante los últimos 3 años a la trucha que tradicionalmente fuera la principal (Wicki & Wiltchiensky, 2017). Sin embargo, la baja tasa de supervivencia y desarrollo de larvas produce una disminución en el stock de animales maduros sexualmente. Una alternativa a este inconveniente es el uso de antibióticos para el tratamiento (terapéutico), prevención (profiláctico), y diseminación (metafiláctico) de enfermedades o como promotores de crecimiento. Si bien, en la actualidad se desconoce el mecanismo preciso por el cual los antibióticos incrementan el peso de los animales de producción, se sabe que disminuyen el microbioma intestinal, aumentando la disponibilidad de los nutrientes (Ramírez, 2017). Además, generan una disminución en el peso del tracto digestivo, el gasto energético y el incremento de la absorción intestinal, mejorando su eficiencia (Food and Drug Administration -FDA-, 1998; Hernández Serrano, 2005).

A pesar de todas estas ventajas, el uso empírico e indiscriminado de antibióticos, y los riesgos que esto conlleva en la salud humana, animal y ambiental, incentivan trabajos de investigación que permitan la detección rápida y económica de residuos de los mismos en productos que se destinan al consumo humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS), desde la plataforma “Una Salud”, trabaja en base a una estrategia conjunta con la FAO y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en un acuerdo de colaboración

tripartita desde el año 2010 estableciendo un programa integrado de vigilancia que incluye el estudio del uso de antimicrobianos y la propagación de genes bacterianos de resistencia a este tipo de drogas en los diferentes sistemas de producción, incluido el entorno acuático. Los principales objetivos de esta plataforma son: asegurar que los antibióticos mantengan su efectividad y utilidad para curar enfermedades en humanos y animales; promover el uso prudente y responsable de los agentes antimicrobianos y facilitar el acceso global a fármacos de buena calidad (Cabezón Marchant, 2016). Además, el Sistema Nacional de Control de Alimentos (SNCA) se encarga de la vigilancia de los productos obtenidos en la producción acuícola, a fin de que se cumpla lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA) y el decreto 4238/68 del SENASA. Por otra parte, determinados organismos internacionales se rigen por el *Codex Alimentario*, que establece normas específicas de calidad e inocuidad de alimentos y requisitos que deben cumplir los países para la exportación (FAO, 2018).

Es por ello que surge la necesidad de establecer la presencia o no de este tipo de sustancias en los productos acuícolas. Si bien existen técnicas físicas y químicas, altamente específicas y sensibles, para la detección de residuos antimicrobianos, las mismas resultan costosas y difíciles de realizar. Así, surge la necesidad de desarrollar técnicas alternativas sencillas, rápidas y económicas de detección cualitativa de residuos de antibióticos en productos alimenticios de consumo humano.

*Geobacillus stearothermophilus* es un microorganismo que se utiliza para monitorear los procesos de esterilización. Es ideal ya que carece de patogenicidad, pirogenicidad, toxicidad y es resistente a altas temperaturas (Zarama Ortiz & Rosero Torres, 2006). Además es sensible a muchos antibióticos (Torres Florez, 2019) por lo que en los últimos años se ha extendido su uso a la detección de residuos de estos compuestos en material biológico. La spora de la bacteria *G. stearothermophilus* es una de las esporas más termorresistentes de los microorganismos aeróbicos (Alvarenga-Venutolo & Rivas-Solano, 2012). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 50 y 70°C, temperatura que a su vez impide el crecimiento de posibles microorganismos contaminantes presentes en el medio de ensayo que puedan afectar el resultado del mismo.

### **1.1. Antecedentes del tema y experiencia previa en relación al mismo**

El Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE), a través de su servicio de extensión, trabaja de forma coordinada con productores acuícolas del NEA y otras regiones del país. Este trabajo conjunto ha permitido conocer el uso, muchas veces empírico, de antibióticos en acuicultura. Además, la Cátedra de Microbiología posee una amplia trayectoria en el estudio de microorganismos aislados de animales y la evaluación de sus perfiles de resistencia a antimicrobianos (RAM). Estos antecedentes, sumados al enfoque concebido por la OMS respecto de la lucha contra la resistencia a los antibióticos, “una salud”, motivaron el proyecto de tesis doctoral de la M.V. Amable, Valeria Inés, para evaluar el efecto del uso de antibióticos en acuicultura y del cual se desprende el presente proyecto.

### **1.2. OBJETIVOS:**

#### **Objetivo general:**

- Realizar la puesta a punto de una técnica biológica, económica, rápida y fácil de implementar para la detección de residuos de antibióticos en músculo de peces (*Piaractus mesopotamicus*).

#### **Objetivos particulares:**

- Obtener un testigo microbiano puro, viable y estable y conservarlo en forma de una suspensión de esporas.
- Determinar si diferentes concentraciones de los antibióticos en estudio alteran por sí solos las características fisicoquímicas del medio.
- Evaluar, mediante el uso de microorganismos resistentes y sensibles a los antibióticos en estudio, si el desarrollo bacteriano altera las características fisicoquímicas del medio.
- Establecer la sensibilidad de la técnica utilizando al *Geobacillus stearothermophilus* como indicador biológico.
- Evaluar, cualitativamente, la presencia de residuos antimicrobianos en muestras de músculo de juveniles de *P. mesopotamicus* a los que se les suministró los antibióticos en estudio en dosis subclínicas durante diferentes períodos de tiempo.

## **2. MARCO TEORICO:**

### **2.1. Acuicultura en el mundo:**

Los peces no solo son ricos en proteínas, sino que además aportan vitaminas y minerales, contienen bajos niveles de colesterol y son entre un 90 y 100 % más digestibles que cualquier otro alimento (Luchini & Panné-Huidobro, 2008). Cabe destacar que, aunque existen pescados grasos, ninguno iguala las cantidades de grasa de la carne vacuna, ovina, suina o de aves (Acuña Reyes, 2013). Es por ello que resulta decisivo para corregir dietas desequilibradas, y mediante sustitución, para contrarrestar la obesidad (FAO, 2016).

En 2014, la producción piscícola ascendió a 73,8 millones de toneladas, de las cuales 49,8 millones provenían de peces de escama (FAO, 2016). En 2016 la producción mundial de acuicultura ascendió a 110,2 millones de toneladas, 80 millones de las cuales pertenecían a peces comestibles (FAO, 2018). En forma paralela, la captura pesquera viene disminuyendo como consecuencia del paulatino agotamiento del recurso natural (Hennig *et al*, 2017). Según las estadísticas mundiales sobre acuicultura más recientes recopiladas por la FAO, la producción acuícola mundial alcanzó otro récord histórico de 114,5 millones de toneladas de peso vivo en 2018, con un valor total de venta en la explotación de 263.600 millones de dólares (FAO, 2020).

El comercio internacional desempeña un papel importante en el sector de la pesca y la acuicultura al crear empleo, proveer alimentos, generar ingresos y contribuir al crecimiento y el desarrollo económico, así como a la seguridad alimentaria y nutricional, fundamental sobre todo en los países en desarrollo. Las estadísticas oficiales indican que 59,6 millones de personas participaron en el sector primario de la pesca de captura y la acuicultura en 2016 (FAO, 2018). Las normas que rigen el comercio internacional de los alimentos se acordaron durante la Ronda de Uruguay de Negociaciones Comerciales Multilaterales y se aplican a todos los miembros de la Organización Mundial de Comercio. Con respecto a la inocuidad de los alimentos, las normas figuran en el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo MSF) (OMS, 1999), que se basa en el análisis de riesgos y permite a los países adoptar medidas legítimas para proteger a sus poblaciones, siempre y cuando no representen una restricción injustificable de comercio.



Pese a la importancia del pescado y la acuicultura en general para alimentar al planeta, hasta el día de hoy existen deficiencias marcadas que deben ser solucionadas a la brevedad y de manera coordinada entre los distintos países. Entre ellas se puede nombrar la falta de datos que los países proporcionan a entidades internacionales encargadas del comercio exterior (FAO, 2018), defectuosas condiciones sanitarias que favorecen la aparición y la diseminación de infecciones en los peces, excesiva densidad de peces en las jaulas, demasiada cercanía de las jaulas entre sí y a tierra firme, estrés por la excesiva e inadecuada manipulación de los peces e incorrecta disposición de peces muertos y desechos (Millanao *et al*, 2011).

## **2.2. Acuicultura en la Argentina:**

En Argentina, existe un potencial de crecimiento tangible de la acuicultura desde la década de los '90. Esto se debe a la diversidad de ambientes, recursos naturales, aguas de calidad, disponibilidad de insumos para producción de alimento balanceado y a la existencia de instituciones de enseñanza e investigación que respaldan la producción. La piscicultura se concentra en cuatro regiones geográficas: Región templada cálida y subtropical del norte argentino, Cuenca templada fría y cordillerana, Cuenca templada continental y Cuenca templada a templada fría, de las cuales las más importantes son las dos primeras (FAO, 2018).

La producción acuícola creció desde las 1.000 toneladas en 1996 con 2 especies cultivadas, hasta más de 3.700 toneladas para el 2016, incorporando más de 23 especies, con un máximo de producción en el año 2014 de 4.027 toneladas (Fernandez Cirelli *et al*, 2010).

La fuente de agua utilizada preponderantemente para las producciones acuícolas en la cuenca templado-cálida del Norte Argentino es la subterránea. Análisis de laboratorio llevados a cabo en establecimientos de las provincias de Formosa y Misiones indican que los niveles de elementos traza inorgánicos no superan los niveles guía para la protección de la vida acuática establecida por la Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación, por lo que el agua de la región evidencia una muy buena calidad para este tipo de producciones (Fernandez Cirelli *et al*, 2010)

El consumo de carne de pescado en Argentina es de 7,9 kg/hab/año, de los cuales se estima que sólo el 3,2% es producido por piscicultura continental de agua dulce en el NEA, no disponiéndose de información para otras regiones del centro/norte del país. La baja

participación de la zona, a pesar del alto potencial en cuanto a recursos naturales, se debe a la diversidad de actores y la no integración de acciones que formalicen cadenas o sectores bien definidos y que sean motores de desarrollo de la piscicultura (Hennig *et al*, 2017).

### **2.3. Pacú (*Piaractus mesopotamicus*)**

*P. mesopotamicus* es una especie autóctona subtropical, omnívora (de amplio espectro alimentario), muy demandada y con amplio desarrollo en la región NEA (Hennig *et al*, 2017). Un importante factor que influye en el crecimiento del cultivo de peces de esta región es la cultura de consumo de pescado, factor que no está presente en otras regiones del país (Fernandez Cirelli *et al*, 2010).

Debido a la tradición de consumir ejemplares con tallas mayores a 1.2 kg, en la zona subtropical son necesarios 16 meses de cultivo y densidades de engorde final bajas (0.2 ind/m<sup>2</sup>) (Wicki *et al*, 2007). A su vez, el pacú se adapta al cultivo en jaulas en conjunto con dos o más especies. Además de la Argentina, *P. mesopotamicus* se cultiva en varios países de América Latina como Brasil, Paraguay y Perú (Hennig *et al*, 2017).

### **2.4. Antibióticos en medicina veterinaria**

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos (Sárraga *et al*, 2006). Las tetraciclinas son los antibióticos más utilizados mundialmente en producción animal debido a su amplio espectro de acción (Occhi, 2013). La Enrofloxacin, antibiótico del grupo de fluorquinolonas, tiene buena actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y es eficaz contra *Mycoplasma spp.* Se utiliza ampliamente en peces de crianza artificial, obteniendo muy buenos resultados en el tratamiento de los patógenos habituales (Otero *et al*, 2001).

Para los peces, la medicación en masa es el único tratamiento factible (Anadón Navarro, 2007), y la vía más usada es a través de premezclas sólidas o líquidas añadidas al pienso, en general, en concentraciones relativamente elevadas (del orden de 100 a 1000 mg/L) y administradas durante periodos bastante cortos (Sárraga *et al*, 2006).

Estos medicamentos son, a su vez, los más usados como promotores de crecimiento en animales que se destinan a consumo humano a fin de disminuir los tiempos productivos (Máttar *et al*, 2009). La administración de antimicrobianos en dosis subterapéuticas y por

largos periodos de tiempo favorece el control de la microbiota bacteriana, lo que conlleva un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso en un menor tiempo (Sárraga *et al*, 2006). Además de los beneficios económicos, las principales ventajas para los productores son mayor uniformidad de crecimiento, estabilización de la microbiota intestinal de los animales y mantenimiento de la salud en casos de estrés medioambiental (Acevedo *et al*, 2015).

El peligro de la aplicación de altas cantidades de antibióticos son los efectos colaterales de estos medicamentos, puesto que modifican la comunidad bacteriana asociada al ambiente, afectando la conservación de la biodiversidad acuática e incluso pudiendo repercutir sobre la salud humana (Buschmann & Fortt, 2005). También es importante destacar el riesgo de que restos de estos antimicrobianos lleguen al consumidor en forma de trazas presentes en la carne de pescado (Avdalov, 2012).

## **2.5. Normativas nacionales e internacionales ante el uso de antibióticos**

Desde 1993, el Comité del *Codex Alimentarius* sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF) ha definido, en base a datos toxicológicos relevantes y parámetros cinéticos farmacológicos, la tolerancia o límite máximo para residuos de antibióticos (LMR) para el comercio internacional, además del tiempo de espera o de retirada de los mismos (Cabezón Marchant, 2016). La acuicultura, sin embargo, no suele generar ingresos suficientes de las ventas para respaldar la producción de estos datos, por lo tanto en la actualidad se están comenzando a aplicar, por ejemplo en Europa, programas de vigilancia que constan de la toma de muestra de tejido muscular de peces para detectar la presencia de una serie de residuos de medicamentos veterinarios (OMS, 1999), siendo Noruega el país más avanzado con publicaciones anuales de datos.

El uso imprudente de antibióticos en la acuicultura ha dado lugar a problemas relacionados con los residuos antimicrobianos y la resistencia a los mismos (FAO, 2018) y el conocimiento de dichos problemas ha llevado a la concientización por parte de los consumidores. Los productos de la agroindustria “orgánica verde” están siendo requeridos por los países desarrollados, aunque sus costos sean más elevados (Máttar *et al*, 2009). La “quimiofobia” no ha hecho más que crecer tras el gran impacto mediático de las “crisis alimentarias” (vacas locas, dioxinas, nitrofuranos, etc.) a nivel mundial (Birz, 2006). Todo esto ha llevado a que, por ejemplo, en 1986, el Parlamento Sueco prohíba el uso de los

antibióticos como promotores del crecimiento (Anadón Navarro, 2007). Posteriormente, el Reglamento 1831/2003 de la Comisión Europea ha establecido la desaparición progresiva de antibióticos usados como promotores del crecimiento. La medida se completó con la prohibición total de los mismos a partir del 1 de enero de 2006 (Anadón Navarro, 2007). Actualmente los países de la Unión Europea investigan continuamente la necesidad de controlar importaciones de canales de animales desde otros países (con menor control del uso de antibióticos promotores de crecimiento) a fin de preservar la salud pública sin generar conflictos comerciales y sus consecuencias (Torres & Zarazaga, 2002). EEUU, uno de los principales países productores de carne, que en 2012 utilizó aproximadamente el 72.5% del total de antibióticos como promotores de crecimiento (Ramírez, 2017), quizá podría sumarse a mediano plazo a la posición europea debido al aumento de la presión social contra el uso de antibióticos en producción animal.

Por desgracia, algunos países aplican programas de vigilancia a los productos de exportación pero no ofrecen las mismas garantías para los mercados nacionales (OMS, 1999). Tal es el caso de Chile, donde se ha registrado el uso a gran escala de antibióticos en ganadería, avicultura y acuicultura de manera totalmente incontrolada. A manera de ejemplo, la industria Chilena del salmón usa para producir una tonelada de salmón aproximadamente 75 veces más antibióticos que la industria acuícola noruega (Cabello, 2004). Por otro lado, en la salmonicultura norteamericana, por ejemplo, sólo se permite el suministro de antibióticos a través de inyecciones, en cambio en Chile se usan disueltos en los alimentos, produciendo una gran pérdida de estos en el medio acuático y la consiguiente contaminación de la fauna silvestre (Sommer, 2009). A su vez la presencia de residuos de estas drogas en los alimentos, sugiere la influencia de esta práctica en la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos en Chile (Buschmann & Fortt, 2005).

En Argentina, el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (CREHA), según lo establecido en el Capítulo IX del Decreto 4238/68 de la Resolución 290, determina el riesgo para la salud pública de residuos químicos, aditivos, toxinas, y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual, cumpliendo con las exigencias y los Límites Máximos Admitidos, según las legislaciones y normas nacionales e internacionales vigentes (Occhi, 2013).

En 2015, la Resolución conjunta de los ministerios de Salud y ex Agricultura, Ganadería y Pesca Números 834/2015 y 391/2015, formalizó la Estrategia Argentina para el Control de la Resistencia Antimicrobiana (RAM). La norma establece como autoridad de aplicación del Programa a la Dirección Nacional de Agroquímicos, Productos Veterinarios y Alimentos del SENASA y crea la Comisión de Vigilancia de la RAM en animales destinados al consumo humano que se ocupará de la planificación, seguimiento y evaluación del Programa Nacional y analizará para la adopción de posibles medidas de mitigación. A través del Programa Nacional de Vigilancia de la RAM en animales de consumo, creado y aprobado mediante la Resolución SENASA 591/2015, se busca como objetivo primario determinar y monitorear de forma sostenida en el tiempo la prevalencia de la resistencia de bacterias comensales y zoonóticas a diferentes antimicrobianos de importancia en salud humana. Todo esto, con el objetivo de poder evaluar posibles medidas que permitan retrasar o impedir la diseminación de bacterias resistentes y, de esta manera, minimizar su riesgo potencial sobre la salud pública y animal.

## **2.6. Desventajas en el uso indiscriminado de antibióticos y riesgos de salud pública**

Todas las actividades humanas dedicadas a la producción de alimentos de origen animal tienen peligros inherentes que pueden afectar la salud de las personas, los animales e incluso los ecosistemas naturales. Dichos peligros se incrementan con la paulatina intensificación y diversificación de estas actividades. Al igual que el pescado obtenido a través de la pesca extractiva, la acuicultura no está exenta del riesgo que implica el consumo de sus productos, para la salud humana (Avdalov, 2012). El análisis del riesgo en relación con la inocuidad de los alimentos y la base metodológica para la evaluación, gestión y comunicación de los mismos está todavía en evolución a nivel internacional (OMS, 1999).

En la acuicultura, los antibióticos más utilizados son oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, enrofloxacin, sulfonamidas y eritromicina (Cabello, 2006). Estos compuestos son considerados contaminantes emergentes y grandes amenazas para el ecosistema debido a su absorción incompleta, de hasta un 95%, y la producción de metabolitos que pueden ser incluso más tóxicos que el compuesto original y pueden llegar a acumularse en todas las matrices ambientales, principalmente las aguas superficiales,

subterráneas, suelos y sedimentos (Barrios *et al*, 2015). Los residuos antimicrobianos se acumulan, también, en los tejidos de los animales tratados, necesitando un largo periodo de tiempo para su eliminación (Anadón Navarro, 2007). El tejido muscular y la grasa son los lugares preferentes, aunque también se han identificado en los tejidos menos consumidos como hígado o riñón (Sárraga, *et al*, 2006).

El uso indiscriminado de toneladas de antibióticos en la industria acuícola puede acompañarse de las complicaciones que enfrentan quienes trabajan en ellas, sus familiares e incluso comunidades cercanas, creando en sus intestinos, piel, faringe y genitales alteraciones de la microbiota normal (Cabello, 2004), reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del germen causal, aparición de gérmenes antibiótico-resistentes (Sárraga *et al*, 2006), nefropatía y hepatotoxicidad (Aguilar Ccalla, 2018). Algunas de estas sustancias resisten las altas temperaturas de los tratamientos industriales y pueden llegar al consumidor a través de los alimentos (Machado, 2016).

El agua constituye la ruta principal por la cual se introducen genes de resistencia en los ecosistemas naturales, en donde bacterias no patógenas pueden servir como reservorio de estos genes (Barrios *et al*, 2015) debido al amplio intercambio genético, probablemente bidireccional, entre bacterias de los ambientes acuáticos y terrestres (Millanao *et al*, 2011), y que parte de la biota del intestino de los animales habita también en el intestino humano (Aguilar Ccalla, 2018).

Por otra parte, estudios realizados en una zona costera de Chile, donde se desarrolla la acuicultura del Salmón, confirman que peces silvestres que viven alrededor de los recintos de acuicultura y que son consumidos por humanos presentan cantidades detectables de antibióticos en carne (Fortt *et al*, 2007; Sommer, 2009).

Según directivas de la OMS, las quinolonas deberían ser reservadas para tratar solamente infecciones en los humanos, en quienes estos medicamentos son considerados esenciales para el tratamiento de múltiples infecciones (Anadón Navarro, 2007) sobre todo en pacientes inmunodeprimidos tras la radioterapia, quimioterapia para el cáncer, trasplante o VIH positivos. Es por eso que su uso en la producción animal para alimentos debiera ser totalmente restringida (Millanao *et al*, 2011).

Por todo ello, es necesario estandarizar técnicas sensibles, fáciles y de rápida ejecución, que ayuden a detectar residuos de fármacos de uso veterinario en alimentos de origen animal

(Restrepo Arango, 1998) y que traen como consecuencia problemas de comercialización internacional debido al incumplimiento en las normas establecidas en distintos países (Acevedo *et al*, 2015), afectando las exportaciones de productos, la imagen del país y la competitividad (Guamán & Noemi, 2019).

## **2.7. Métodos de detección de residuos de antibiótico en productos de origen animal**

Existen diversos métodos de detección de residuos microbianos en muestras orgánicas, principalmente alimentos de origen animal, con distinta especificidad y sensibilidad y que permiten la obtención de distintos tipos de resultados. Estos se clasifican en métodos de cribado y métodos de confirmación. Los primeros detectan la presencia de una sustancia o tipo de sustancia, mientras que los segundos permiten identificar y cuantificar de manera inequívoca la sustancia (Guamán & Noemi, 2019). Por su parte la Comisión Europea los clasifica en cualitativos (microbiológicos, enzimáticos, etc.) y cuantitativos (cromatografía, etc.) (Machado, 2016).

Las técnicas más usadas, citadas por Restrepo Arengo en 1998, son: Inhibición microbiana, Inmunoensayos con conjugados enzimáticos como ELISA, Ensayos cromatográficos, Electroespectrofotometría en masa, Método conductímetro, UV y Screening test.

Entre los métodos cuantitativos, la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) es el instrumento con mayor versatilidad debido a su alta aplicabilidad, sensibilidad y eficiencia en una gran gama de antibióticos (Acevedo *et al*, 2015). A pesar de ser una herramienta confiable presenta inconvenientes considerables como el costo del equipamiento, necesidad de capacitación técnica, infraestructura, costo y tiempo, entre otros (Zambrano *et al*, 2018).

Dentro de los métodos cualitativos, el microbiológico o de cribado, se basa en la inhibición del crecimiento microbiano en un medio de cultivo agarizado adecuado que contiene además una fuente rica en hidratos de carbono, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (como trimetoprim, cloranfenicol, etc.) e indicadores de pH o de potencial óxido-reducción (Machado, 2016). La prueba tiene sólo dos posibles resultados. El resultado es negativo cuando se observa cambio de coloración del medio debido al metabolismo de microorganismos que fermentan azúcares debido a la ausencia de sustancias antimicrobianas inhibidoras del crecimiento. El resultado es positivo cuando no se observan cambios de coloración en el medio debido a la presencia de inhibidores del crecimiento de

la bacteria. Las ventajas del método son: espectro razonablemente amplio, sencillez, no necesita equipamiento sofisticado, adaptable para analizar un gran número de muestras, bajo costo, resultados rápidos. Entre las desventajas se puede nombrar la falta de especificidad y que los resultados positivos necesitan posterior confirmación (Guamán & Noemi, 2019).

Existen en el mercado test comerciales de referencia como Delvotest MCS<sup>®</sup>, Eclipse<sup>®</sup>, Tetracyclines Test Bioeasy<sup>®</sup> y Rescreen<sup>®</sup>, entre otros, que usan *Geobacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*. Todos ellos tienen un tiempo de obtención de resultados de 3 horas, mientras que la empresa Gist-Brocades, con el método Delvotest<sup>®</sup>, ha logrado disminuir el tiempo a 2 horas 15 minutos, siempre y cuando se cuente con un lector fotométrico diseñado y comercializado exclusivamente para este fin, que posee un elevado costo y que debe ser amortizado posteriormente (Machado, 2016).

Aguilar Ccalla (2018) desarrolló una técnica de difusión en placa usando *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* que demostró ser confiable, fácil y sencilla para clasificar a los residuos según sus potenciales riesgos, aunque no permite identificar al tipo de residuo inhibidor.

## **2.8. *Geobacillus stearothermophilus*:**

El género *Bacillus* incluye bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram positivas, capaces de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos simples como sustrato respiratorio y algunas incluso fermentan azúcares. Son formadoras de endosporas -ovaladas o cilíndricas, subterminales o terminales- que se caracterizan por poseer bajo contenido de agua, no tienen un metabolismo detectable, son altamente resistentes a la desecación, congelación, radiación y a la acción de ciertas sustancias químicas (Alvarenga-Venutolo & Rivas-Solano, 2012). Un grupo fisiológico especial dentro del género, es el de los termófilos extremos, bacterias capaces de crecer a temperaturas tan elevadas como los 65°C y no crecen por debajo de los 45°C (Zarama Ortiz & Rosero Torres, 2006).

*Geobacillus stearothermophilus* es una bacteria termófila, aeróbica, esporulada y de requerimientos nutricionales básicos. Sobre agar nutritivo forma colonias redondas, mucosas, pequeñas, incoloras, con un diámetro aproximado de 1 mm a 5 mm (Zarama Ortiz et al, 2006). Posee una temperatura máxima de crecimiento de 65-75° C, con una temperatura mínima de 40° C y óptima de 55° C. Tiene una tolerancia limitada a la acidez con un pH mínimo para su crecimiento de 5,2. La actividad de agua mínima que requiere en



la temperatura óptima es de 0,93 (Matamala, 2012). Puede desarrollar en medios sintéticos y no requiere factores de crecimiento, vitaminas, NaCl o KCl (Zarama Ortiz et al, 2006).

### **3. HIPOTESIS:**

La presencia de residuos de antibióticos en carne de pescado puede ser puesta en evidencia a través de un método biológico utilizando *Geobacillus stearothermophilus*.

#### **4. MATERIALES Y METODOS:**

- a. Lugar de trabajo.** El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste, ubicado en Sargento Cabral 2139, Corrientes, Argentina. Por su parte, los ensayos con animales, de donde se obtuvieron las muestras con las que se trabajaron en el presente trabajo, fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Ictiología del Nordeste de la misma Facultad.
- b. Preparación y fraccionamiento del medio de cultivo.** El medio empleado para el método de detección fue Agar Púrpura de Bromocresol Fortificado con Glucosa (APBg) (en g/L: Pluripeptona 5; Extracto de carne 3; Glucosa 20; Agar 15; Púrpura de bromocresol 0,024). La suspensión se homogeneizó a baño maría hasta disolución total, fraccionó en tubos de 5 mL con tapa a rosca, esterilizó a 121°C durante 15 minutos y almacenó refrigerado hasta su utilización.
- c. Obtención de la suspensión de esporas de *G. stearothermophilus*.** Frascos conteniendo 100 ml de caldo nutritivo adicionado con sulfato de Magnesio 1mM se inocularon con 500 µL de la suspensión del testigo microbiano y se incubaron a 60° C durante 4 días. La esporulación se controló mediante observación microscópica por coloración de Schaeffer-Fulton. Una vez alcanzados niveles de esporulación superiores al 90% los microorganismos fueron lavados dos veces y resuspendidos en solución fisiológica estéril en una concentración equivalente al tubo N° 4 de la escala de McFarland (equivalente a una concentración de  $12 \times 10^8$  gérmenes por mililitro). Las suspensiones se calentaron a 80° C durante 3 minutos y conservaron a 4° C hasta su utilización.
- d. Evaluación de la estabilidad del medio APBg frente a distintas concentraciones de Enrofloxacin y Oxitetraciclina.** Tubos conteniendo 5 mL del medio de cultivo, adicionados con diferentes concentraciones de los antibióticos (**Tabla 1**) se incubaron a 60° C durante 24 horas a fin de comprobar la estabilidad del medio ante la presencia de antibióticos. Cambios en la coloración del medio de púrpura a amarillo indicaron que el medio se ve modificado por la sola presencia del antibiótico en el mismo.

**Tabla 1** -Concentraciones de antibióticos evaluadas para determinar la estabilidad del medio.

<b>Enrofloxacin</b> <b>(mg/mL)</b>	<b>Oxitetraciclina</b> <b>(µg/mL)</b>
1,25	2,8
0,625	0,92
0,3125	0,3
0,1562	0,1
0,078	0,03
0,039	0,01
0,01	0,003
0	0

- e. Determinación de la interacción entre antimicrobianos y microorganismos en el medio APBg.** Se prepararon 4 series de 8 tubos con 5 mL del medio de cultivo cada uno (32 tubos en total). De las mismas, 2 series fueron adicionadas con diferentes concentraciones de enrofloxacin y los 2 restantes, con diferentes concentraciones de oxitetraciclina. A su vez, todos los tubos de una de las series adicionadas con enrofloxacin se inocularon con 100 µL de un cultivo activo de un microorganismo sensible a enrofloxacin (*Staphylococcus coagulasa negativa*, proveniente del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico, referencia interna: EXG157) , mientras que los de la serie restante fueron inoculados con 100 µL de un cultivo activo de un microorganismo resistente a enrofloxacin (*Staphylococcus pseudintermedius*, también obtenido del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico, referencia interna: EXG150,) . Por otro lado, los tubos de una de las series adicionadas con oxitetraciclina fueron inoculados con 100 µL de un cultivo activo de un microorganismo sensible a oxitetraciclina (*Escherichia coli* EXG151), mientras que los de la serie restante fueron inoculados con 100 µL de un cultivo activo de un microorganismo resistente a oxitetraciclina (*Escherichia coli* EXG133). (**Tabla 2**) Todos los tubos se incubaron a 37° C durante 24 horas. Cambios en la coloración del medio de púrpura a amarillo indicaron crecimiento de los microorganismos inoculados.

**Tabla 2** – Series de tubos, sus inóculos y concentraciones de antibiótico para la determinación de la interacción entre antimicrobianos y microorganismos en el medio APBg.

Serie		1	2	3	4
Inóculo con microorganismo		Sensible a enrofloxacina	Resistente a enrofloxacina	Sensible a oxitetraciclina	Resistente a oxitetraciclina
Antibiótico (concentración)	Tubo 1	enrofloxacina (1,25 mg/mL)	enrofloxacina (1,25 mg/mL)	oxitetraciclina (2,8 µg/mL)	oxitetraciclina (2,8 µg/mL)
	Tubo 2	enrofloxacina (0,625 mg/mL)	enrofloxacina (0,625 mg/mL)	oxitetraciclina (0,92 µg/mL)	oxitetraciclina (0,92 µg/mL)
	Tubo 3	enrofloxacina (0,3125 mg/mL)	enrofloxacina (0,3125 mg/mL)	oxitetraciclina (0,3 µg/mL)	oxitetraciclina (0,3 µg/mL)
	Tubo 4	enrofloxacina (0,1562 mg/mL)	enrofloxacina (0,1562 mg/mL)	oxitetraciclina (0,1 µg/mL)	oxitetraciclina (0,1 µg/mL)
	Tubo 5	enrofloxacina (0,078 mg/mL)	enrofloxacina (0,078 mg/mL)	oxitetraciclina (0,03 µg/mL)	oxitetraciclina (0,03 µg/mL)
	Tubo 6	enrofloxacina (0,039 mg/mL)	enrofloxacina (0,039 mg/mL)	oxitetraciclina (0,01 µg/mL)	oxitetraciclina (0,01 µg/mL)
	Tubo 7	enrofloxacina (0,01 mg/mL)	enrofloxacina (0,01 mg/mL)	oxitetraciclina (0,003 µg/mL)	oxitetraciclina (0,003 µg/mL)
	Tubo 8	enrofloxacina (0 mg/mL)	enrofloxacina (0 mg/mL)	oxitetraciclina (0 µg/mL)	oxitetraciclina (0 µg/mL)

**f. Análisis de la interacción entre antibióticos y *G. stearothermophilus* en medio APBg.** Se prepararon 2 series de 8 tubos cada una conteniendo 5 mL del medio de cultivo, una de las series se adicionó con diferentes concentraciones de enrofloxacina y la otra con diferentes concentraciones de oxitetraciclina (**Tabla 1**). Todos los tubos se inocularon con 100 µL de la suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* y se incubaron a 60° C durante 24 horas. Cambios en la coloración del medio de púrpura a amarillo indicaron crecimiento de los microorganismos inoculados a pesar de la presencia de antibiótico en el medio, indicando que la concentración de antimicrobiano en el medio se encontraba por debajo de la CIM (concentración inhibitoria mínima) del microorganismo.

**g. Preparación de las muestras de músculo de *P. mesopotamicus*.** En ensayos previos del grupo de investigación, se congelaron muestras de músculo de juveniles de *P.*

*mesopotamicus* alimentados con dosis subterapéuticas de enrofloxacin (tratamiento E), oxitetraciclina (tratamiento O) y sin ningún antibiótico (tratamiento C) durante diferentes periodos de tiempo (30, 60, 90 y 120 días) y por triplicado. Además, 3 días después de suspender la administración de antibióticos, se tomó una única muestra de cada tratamiento, lo que da un total de 39 muestras. Porciones de 1 g de las mismas fueron descongeladas y maceradas junto con 2 mL de agua destilada estéril. Se determinó el pH de las suspensiones, corrigiendo el mismo si fuese necesario, a fin de asegurar la neutralidad de los mismos, ya que el violeta de bromocresol es un indicador de variaciones de pH en el medio.

- h. Determinación de la presencia de enrofloxacin y/o oxitetraciclina en muestras de músculo de peces.** Alícuotas de 100 µL de las muestras se sembraron junto con 100 µL de la suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* en tubos conteniendo 5 ml de medio APBg. Además, se incluyeron tres controles de los cuales uno se inoculó solo con una muestra de carne del grupo control, otro solo con la suspensión de esporas y un tercero sin inocular. Los tubos se incubaron en estufa a 60° C durante 48 h, con controles periódicos cada 4 h.

## 5. RESULTADOS:

### 5.1. Desarrollo del microorganismo.

Luego de un período de 24 horas a 60° C, el caldo nutritivo en el que se inoculó el contenido del vial con endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* empezó a evidenciar desarrollo bacteriano. El mismo se pudo comprobar por el enturbiamiento del medio líquido. Luego de la siembra por estriado en agar nutritivo y posterior incubación a 60°C, se observó la aparición de un solo tipo de colonias que determinó la pureza del cultivo. Las mismas presentaron forma circular, con bordes definidos, color crema y superficie lisa, características compatibles con las descritas en la bibliografía para el microorganismo en estudio.

Los resultados de la caracterización fenotípica (**Tabla 3**) coinciden con aquellos establecidos para *G. stearothermophilus*. Determinando que el cultivo obtenido a partir del vial se encontraba puro y pertenecía al microorganismo en estudio.

**Tabla 3** – Resultados de la caracterización fenotípica

Prueba química	Resultado	Tiempo de lectura
Coloración de Gram	Negativa	Inmediato
Catalasa	Negativa	Inmediato
Oxidasa	Negativa	Inmediato
Indol	Negativa	24 horas
TSI	Positiva	24 Horas
Reducción de nitritos/nitratos	Positiva	24 Horas
Fermentación de Azúcares:		
Manitol	Positivo	24 Horas
Arabinosa	Negativo	48 Horas
Citrato	Negativa	48 Horas
Rojo de metilo/Voges Proskauer	Positivo / Negativo	48 Horas

La coloración de Schaeffer Fulton de la suspensión cultivada a 60° C durante 4 días demostró un 90% de bacterias esporuladas en la suspensión de esporas de *G. stearothermophilus*, por lo que se prosiguió a su conservación.

## 5.2. Evaluación de la estabilidad del medio APBg frente a distintas concentraciones de Enrofloxacin y Oxitetraciclina.

La lectura del resultado del método elegido en el presente trabajo se basa en el cambio de color del medio de cultivo al sufrir una variación o modificación en los valores de pH. Debido a que algunos antimicrobianos presentan características ácidas o básicas, capaces de modificar el pH del medio en el que se encuentran, se procedió a la evaluación de la estabilidad del medio APBg frente a distintas concentraciones de Enrofloxacin y Oxitetraciclina (**Figuras 1 y 2**).



**Figura 1** – Diferentes concentraciones de Oxitetraciclina.



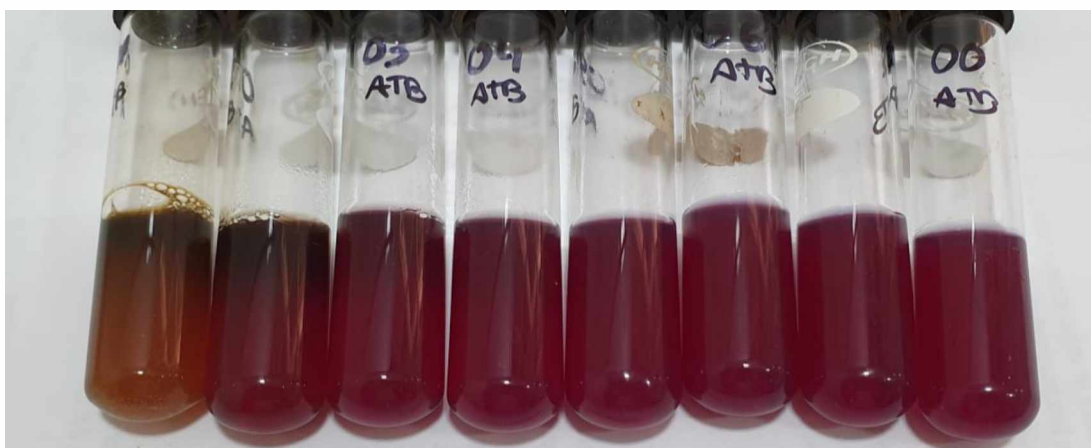
**Figura 2** – Diferentes concentraciones de Enrofloxacin.

La ausencia de modificaciones en la coloración del medio de cultivo ante la interacción con diferentes concentraciones de Enrofloxacin permitió determinar que la misma no produce inestabilidad, con lo cual es apta para continuar siendo utilizada en el presente trabajo de investigación (**Figura 3**). Por otro lado, los dos tubos correspondientes a las mayores concentraciones de Oxitetraciclina (2.8 y 0.9  $\mu\text{g/mL}$ ), sufrieron cambios de coloración, indicando inestabilidad del medio ante la interacción con este antibiótico (**Figura 4**).





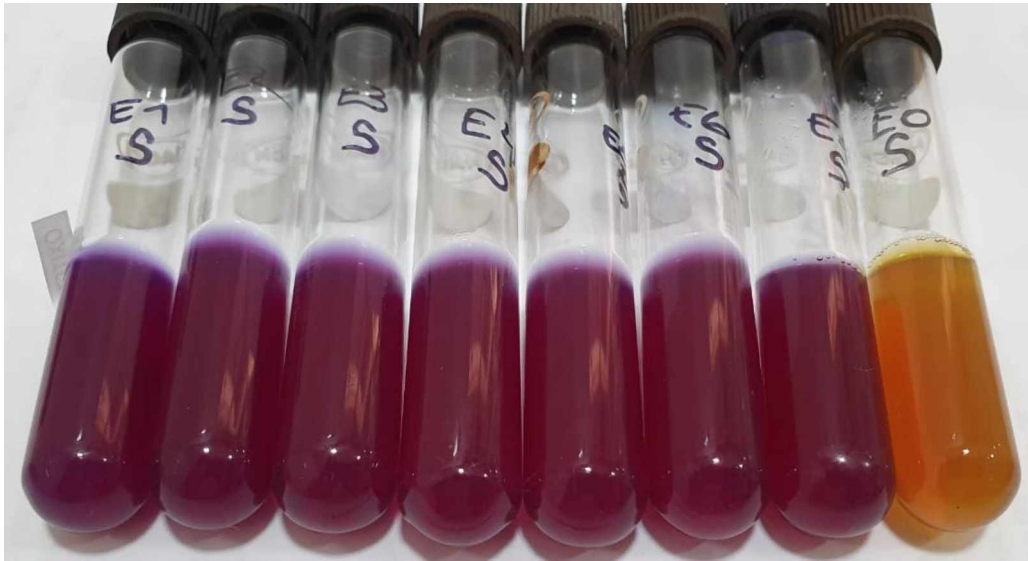
*Figura 3* – Interacción entre distintas concentraciones de Enrofloxacina y el medio APBg.



*Figura 1* – Interacción entre distintas concentraciones de Oxitetraciclina y el medio APBg.

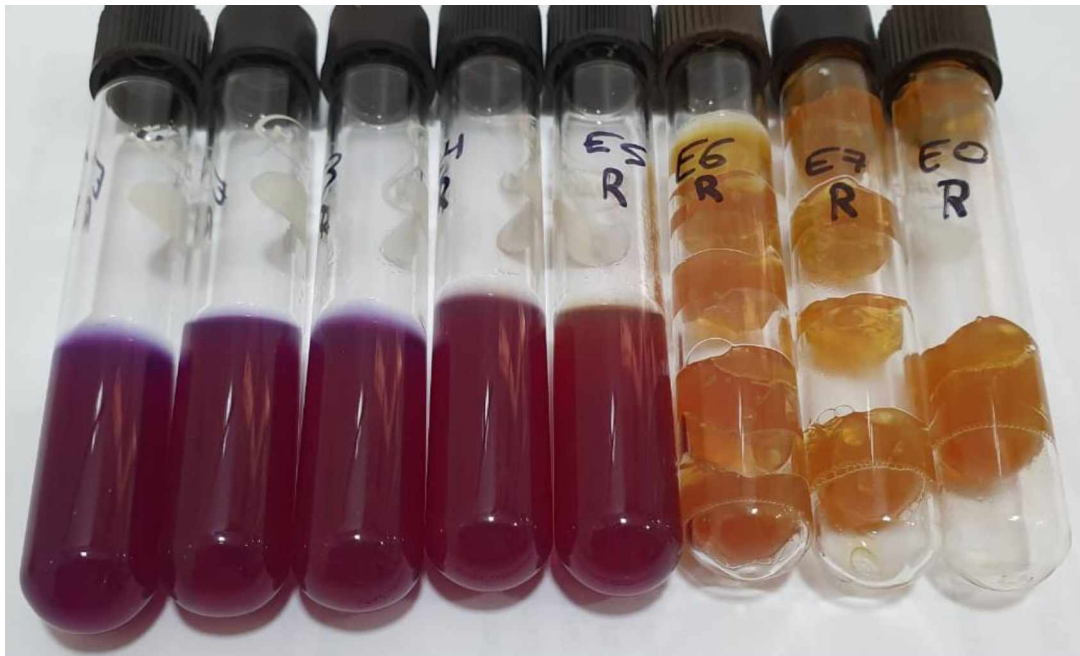
### 5.3. Determinación de la interacción entre antimicrobianos y microorganismos en APBg.

El método de detección seleccionado para el presente trabajo se basa en la imposibilidad de un microorganismo testigo de multiplicarse en presencia de un antibiótico presente en la muestra a analizar en concentración tal que supere la CIM. Es por ello que, para la puesta a punto de la técnica en estudio, se realizó la determinación de la interacción entre antimicrobianos y microorganismos en el APBg. Luego de 24 horas de incubación a 37° C, todos los tubos de la serie 1, inoculados con un microorganismo sensible a Enrofloxacin conservaron la coloración violeta inicial, incluso aquel con la menor concentración (0.01 mg/mL). Por su parte, el tubo 8 o control, sin agregado de antimicrobiano, evidenció cambios en la coloración tornándose amarillo debido a una disminución del pH por el metabolismo bacteriano (**Figura 5**).



**Figura 5** – Interacción entre Enrofloxacin y un microorganismo sensible a la misma en el medio APBg.

De la serie 2, inoculada con un microorganismo resistente a Enrofloxacin, luego de 24 horas de incubación a 37° C, los 5 tubos con mayor concentración de antibiótico (1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562 y 0,078 mg/mL) no presentaron cambios en la coloración del medio. Los dos tubos con menor concentración de Enrofloxacin (0,039 y 0,01 mg/mL) y el tubo control (0,00 mg/mL) sufrieron una alteración del color, tornándose amarillos y evidenciando producción de gas por parte del microorganismo (**Figura 6**).



**Figura 6** – Interacción entre Enrofloxacin y un microorganismo resistente a la misma en el medio APBg.

Por su parte, de los tubos de la serie 3, inoculados con un microorganismo sensible a oxitetraciclina, el primero, correspondiente a la máxima concentración del antibiótico (2.8  $\mu\text{g/mL}$ ), y el ultimo, correspondiente al control sin antimicrobiano (0  $\mu\text{g/mL}$ ), sufrieron cambios en la coloración debido al crecimiento bacteriano y la consiguiente disminución del pH. Los demás tubos de la serie no presentaron alteraciones en el medio (**Figura 7**).



**Figura 7** – Interacción entre Oxitetraciclina y un microorganismo sensible a la misma en el medio APBg.

Finalmente, de los tubos de la serie 4, inoculados con un microorganismo resistente a oxitetraciclina, los tres con las mayores concentraciones de antibiótico (2.8; 0.92; 0.30  $\mu\text{g/mL}$ ) demostraron un leve cambio en la coloración del medio, mientras que en los demás tubos de la serie se produjo un notable viraje de coloración violeta a amarillo y abundante producción de gas (**Figura 8**).





**Figura 9** – Interacción entre Oxitetraciclina y un microorganismo resistente a la misma en el medio APBg.

#### 5.4. **Análisis de la interacción entre antibióticos y *G. stearothermophilus* en medio APBg.**

El microorganismo seleccionado como testigo para la técnica de detección de antimicrobianos escogida para poner a punto en el presente trabajo es *Geobacillus stearothermophilus*, bacilo extremadamente sensible a ciertos grupos de antimicrobianos. Con el fin de determinar la capacidad de los antibióticos en estudio de inhibir a este microorganismo y, a su vez, de determinar la sensibilidad de la técnica, se procedió al análisis de la interacción entre antibióticos y *G. stearothermophilus* en el medio APBg. De los tubos de la serie 1, adicionados con diferentes concentraciones de Enrofloxacin y esporas de *G. stearothermophilus*, luego de 24 horas a 60° C, solo el control, sin adición de antibiótico, evidenció cambios en la coloración del medio de violeta a amarillo (**Figura 10**).



**Figura 10** – Interacción entre Enrofloxacin y *G. stearothermophilus* en el medio APBg.

Respecto de los tubos de la serie 2, adicionados con diferentes concentraciones de Oxitetraciclina y esporas de *G. stearothermophilus*, los dos tubos con mayor concentración del antimicrobiano evidenciaron un leve cambio en la coloración del medio, mientras que el tubo control (0,0 µg/mL) viró completamente a color amarillo (**Figura 11**).



**Figura 11** – Interacción entre Oxitetraciclina y *G. stearothermophilus* en el medio APBg.

### **5.5. Determinación de la presencia de enrofloxacin y/o oxitetraciclina en muestras de músculo de peces.**

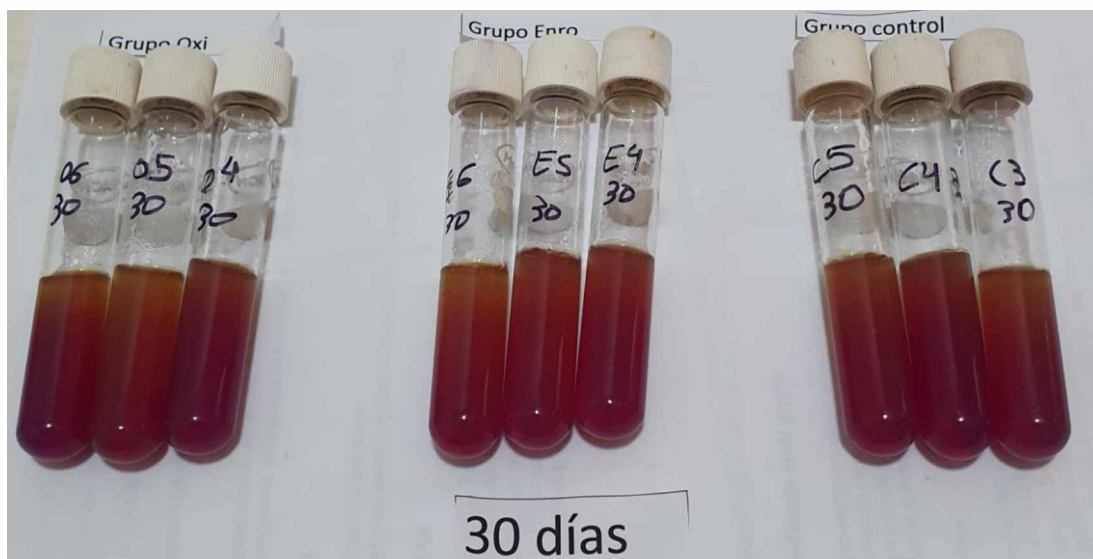
Una vez comprobada la sensibilidad del *Geobacillus stearothermophilus* ante la presencia de Oxitetraciclina y Enrofloxacin, se procedió a determinar la presencia de los antimicrobianos en muestras de músculo de juveniles de *P. mesopotamicus* alimentados durante 120 días con distintas formulaciones de balanceado que incluían Enrofloxacin

(tratamiento E), Oxitetraciclina (tratamiento O) y sin ningún antibiótico (tratamiento C) (Figura 12).



**Figura 12** – Muestras de músculo de *P. mesopotamicus* congeladas.

Los tubos conteniendo muestras de músculo de *P. mesopotamicus* pertenecientes a los tratamientos E y O y al grupo control luego de 30 días de ensayo, en todas sus réplicas, mostraron una leve variación del color cercano a la superficie (Figura 13).



**Figura 13** – Tubos de APBg conteniendo esporas de *G. stearotheophilus* y músculo de *P. mesopotamicus* alimentados durante 30 días con balaceado adicionado sin (C) y con dosis subterapéuticas de Oxitetraciclina (O), Enrofloxacin (E).



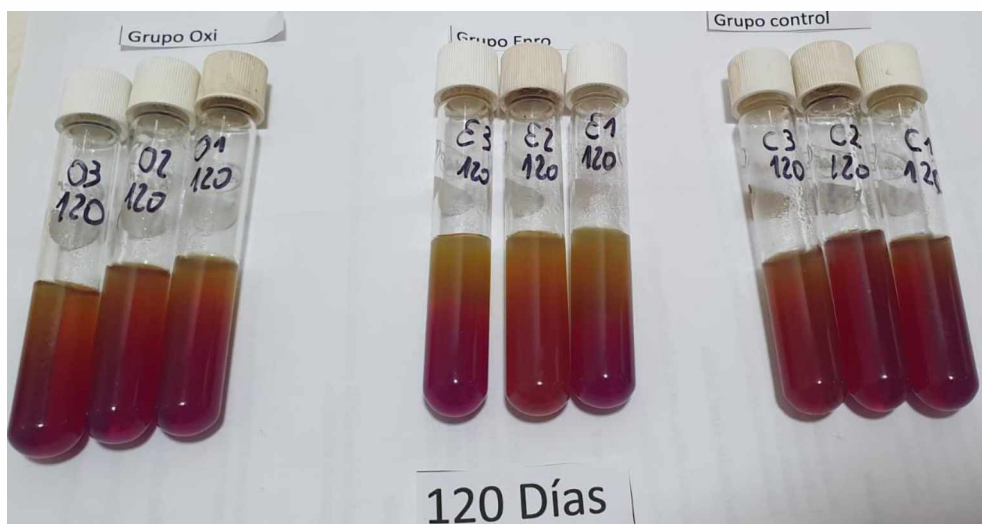
Resultados iguales se obtuvieron al analizar las muestras de músculo de los animales tratados luego de 60, 90 y 120 días (**Figuras 14, 15 y 16**).



**Figura 14** – Tubos de APBg conteniendo esporas de *G. stearothersophilus* y músculo de *P. mesopotamicus* alimentados durante 60 días con balaceado adicionado sin (C) y con dosis subterapéuticas de Oxitetraciclina (O), Enrofloxacina (E).



**Figura 15** – Tubos de APBg conteniendo esporas de *G. stearothersophilus* y músculo de *P. mesopotamicus* alimentados durante 90 días con balaceado adicionado sin (C) y con dosis subterapéuticas de Oxitetraciclina (O), Enrofloxacina (E).



**Figura 16** – Tubos de APBg conteniendo esporas de *G. stearotherophilus* y músculo de *P. mesopotamicus* alimentados durante 120 días con balaceado adicionado sin (C) y con dosis subterapéuticas de Oxitetraciclina (O), Enrofloxacin (E).

Los tubos conteniendo APBg a los que se les añadió las muestras obtenidas de músculo de peces luego de 123 días de tratamiento, sí mostraron diferencias entre sí. Los tubos a los que se les añadió el músculo de los peces alimentados con balanceado suplementado con antibióticos no sufrieron modificaciones en la coloración, mientras que el tubo al que se le agregó la muestra del grupo control viró completamente hacia una coloración amarilla (Figura 17).



**Figura 17** – Tubos de APBg conteniendo esporas de *G. stearotherophilus* y músculo de *P. mesopotamicus* alimentados durante 120 días con balaceado adicionado sin (C) y con dosis subterapéuticas de Oxitetraciclina (O), Enrofloxacin (E) y durante 3 días con alimento convencional.



## 6. CONCLUSIONES:

- El presente trabajo permitió la obtención de una suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* pura que se mantuvo viable y estable durante la duración de los trabajos aquí presentados. Dicha suspensión se empleó como testigo microbiano en los ensayos aquí descritos y servirá de base para la realización de futuros trabajos.
- Se logró determinar que ninguna de las concentraciones de Enrofloxacin evaluadas en el presente trabajo (1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,078; 0,039 y 0,01 mg/mL) alteran por sí solas características fisicoquímicas del medio. Esto permite inferir que la técnica podría emplearse para la detección de altas concentraciones de este antimicrobiano y que deben realizarse ensayos posteriores con el fin de poder determinar el límite máximo que podría detectarse mediante la misma. Con respecto a la Oxitetraciclina, se determinó que concentraciones superiores a 0,92 µg/mL del antimicrobiano alteran por sí solas las características del medio. Así, se puede deducir que la sensibilidad de la técnica no permitiría detectar concentraciones superiores a estos valores.
- Mediante los ensayos de interacción entre antimicrobianos y microorganismos en el medio APBg se logró asegurar que microorganismos sensibles a Enrofloxacin pueden ser usados como testigos ya que no alteran la coloración del medio en presencia de dicho antibiótico, aún en una concentración de 0,01 mg/mL. También se demostró que microorganismos resistentes a este antibiótico podrían dar resultados erróneos en bajas concentraciones. Con respecto a los ensayos con Oxitetraciclina, se comprobaron las conclusiones expuestas en el ítem anterior, ya que los tubos conteniendo concentraciones superiores a 0,92 µg/mL del antimicrobiano sufren variaciones de color aun estando inoculados con microorganismos sensibles al antibiótico. Además, se demostró que el uso de microorganismos resistentes a Oxitetraciclina como testigo es inviable ya que altera las características del medio en presencia de todas las concentraciones evaluadas.
- Los resultados de la interacción entre Enrofloxacin y *Geobacillus stearothermophilus* en el medio APBg permitió establecer que la sensibilidad de la técnica es superior a 1,25 e inferior a 0,01 mg/mL del antimicrobiano, debiendo

realizar estudios posteriores para determinar dicho parámetro con exactitud. Con respecto a los resultados de la interacción entre Oxitetraciclina y *Geobacillus stearothermophilus* en el medio APBg, los mismos permitieron establecer que la técnica posee una sensibilidad por debajo de los 0,92 µg/mL, debiendo realizarse ensayos posteriores para determinar el límite inferior.

- La evaluación cualitativa de la presencia de residuos de Enrofloxacin y Oxitetraciclina en muestras de músculo de juveniles de *P. mesopotamicus* a los que se les suministró antibióticos en dosis subclínicas durante diferentes períodos de tiempo presentó resultados inesperados. En las muestras de hasta 120 días de ensayo no se observó diferencias en la coloración de los medios adicionados con los distintos tipos de muestra, siendo los controles (sin administración de antimicrobianos) iguales a los tratamientos (con el agregado de estas sustancias). Esto podría deberse a una reacción físico-química inesperada entre el tejido muscular de los peces y el medio APBg. También podría existir la posibilidad de que el alimento balanceado comercial haya estado suplementado con algún tipo de sustancia que presente acción antimicrobiana y que la misma haya llegado al tejido muscular de los animales. El resultado esperado se observó a los 123 días de ensayo, desconociéndose las razones de este cambio en los resultados.

En base a lo expuesto anteriormente, la hipótesis del trabajo:

**“La presencia de residuos de antibióticos en carne de pescado puede ser puesta en evidencia a través de un método biológico utilizando *Geobacillus stearothermophilus*”** no puede afirmarse basándose en los resultados de las muestras hasta el día 120 de ensayo. Si bien los resultados obtenidos en las muestras del día 123 serían las esperadas, se propone la realización de ensayos complementarios para poder afirmar la hipótesis. Se propone determinar si fue adecuada la cantidad de esporas *Geobacillus stearothermophilus* inoculadas en el presente trabajo, pudiendo deberse los resultados a una mayor cantidad de microorganismos en el medio. Así mismo se plantea la posibilidad de evaluar tanto la cantidad de músculo inoculado como así también otros métodos de procesamiento de las muestras previas a su adición al medio APBg al igual que la realización de ensayos con otros productos de origen animal como ser leche y huevos.

Estas sugerencias se basan en el hecho de que, si bien en este trabajo los resultados obtenidos no fueron los esperados, estudios previos, desarrollados sobre leche, carne de pollo o canales de *bos Taurus*, especificados en la bibliografía y consultados durante la confección del proyecto, dejan constancia de la viabilidad del método de cribado utilizando *Geobacillus stearothermophilus* para la detección de residuos de antibióticos en muestras orgánicas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acevedo, D., Montero, P. M., & Jaimes, J. D. (2015) Determinación de antibióticos y calidad microbiológica de la carne de pollo comercializada en Cartagena (Colombia). *Información tecnológica*, 26(1), 71-76.
- Aguilar Ccalla, J. C. (2018) Residuos de antibióticos en canales de bovinos (*Bos taurus*) faenados en el camal municipal de la provincia de Ilave-Puno 2018. Disponible en: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7176/Aguilar\\_Ccalla\\_Julio\\_Cesar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7176/Aguilar_Ccalla_Julio_Cesar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Alvarenga-Venutolo, S. & Rivas-Solano, O. (2012) Cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en un biorreactor de 2.5 litros bajo el sistema “batch” (En línea). Disponible en: [https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2857/Informe\\_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2857/Informe_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Avdalov, N. (2012) Manual de control de calidad de los productos de la acuicultura. Lima, Perú (En línea). Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/DGA-PUBLICACIONES/manual-de-control-de-calidad-de-los-productos-de-la-acuicultura.pdf>
- Barrios, R. L. A., Sierra, C. A. S., & Morales, J. D. C. J. (2015) Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción+ Limpia*, 10(2) (En línea). Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>.
- Birz, R. C. (2006) Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. *Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza*. Disponible en: [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/wpsa1142587453a.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1142587453a.pdf)
- Buschmann, A., & Fortt, A. (2005). Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*, 21(3), 58-64.
- Cabello, F. C. (2004) Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006.
- Cabello, F. C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Cabezón Marchant, C. F. (2016) Evaluación de la percepción de un grupo de consumidores respecto al uso de antibióticos en animales de producción. *Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile*. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142250/Evaluacion-de-la-percepcion-de->

un-grupo-de-consumidores-respecto-al-uso-de-antibioticos-en-animales-de-produccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Acuña Reyes, M. J. (2013) Peces de cultivo, composición, comparación con carnes de consumo habitual. Ventajas del consumo de pescados. *Diaeta (Buenos Aires)* 2013; 31 (143): 26-30.
- FAO (2016) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma (En Línea). Disponible en: <http://naval582.com/pesca/pdf/informe.pesca.fao.pdf>.
- FAO (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma (En línea). Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9540es/i9540es.pdf>
- FAO (2020) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Roma (En línea). Disponible en: <http://www.fao.org/3/ca9229es/CA9229ES.pdf>
- Fernandez Cirelli, A., Schenone, N., Perez Carrera, A. L., & Volpedo, A. V. (2010) Calidad de agua para la producción de especies animales tradicionales y no tradicionales en Argentina. *AUGMDOMUS*, 1, 45-66.
- FDA (1998) Aquaculture Drugs. In: Fish and Fishery Products Hazards and Control Guide, 2nd edn. FDA: Washington, DC., pp 115-132.
- Fortt, A., Cabello, F., & Buschmann, A. (2007) Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Revista chilena de infectología*, 24 (1), 14-18.
- Guamán, C., & Noemi, E. (2019). Determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda comercializada (Bachelor's thesis). Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17391/1/UPS-CT008305.pdf>
- Hennig, H. H., Curto, A. E., Zeballos Bianchi, B., & Asoli, C. D. J. (2017) INTA y el desarrollo de la piscicultura en Argentina. Experiencias de tecnología organizacional y de agregado de valor en origen. *Ediciones INTA* (En línea). Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/piscicultura\\_en\\_pdf\\_liviano.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/piscicultura_en_pdf_liviano.pdf).
- Hernández Serrano, P. (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* No 469. FAO, Roma, Italia.
- Luchini, L. (2016) Actualidad de la acuicultura en Argentina. *Revista AquaTIC*, (5).
- Luchini, L. & Panné-Huidobro, S. (2008) Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. *Dirección de Acuicultura, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, SAGPyA*, Buenos Aires. Disponible en: [https://magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/\\_archivos//000000\\_Informaci%C](https://magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//000000_Informaci%C)

3%B3n%20y%20noticias%20vinculadas%20al%20sector/081110\_Perspectivas%20en%20acuicultura%20(nivel%20mundial,%20regional%20y%20local).pdf

- Machado, S. M. I. (2016) Bioensayo que emplea *Geobacillus thermoleovorans* como bacteria-test para la detección de residuos de antibióticos en la leche. *Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de ciencias veterinarias* (En línea). Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/842/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Matamala, A. W. N. (2012) Determinación de los parámetros de Resistencia Térmica del *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 bajo condiciones de Calentamiento No Isotérmico. Tesis Doctoral, Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fan731d/doc/fan731d.pdf>
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009) Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Revista de Salud Pública*, 11, 579-590.
- Millanao, A., Barrientos, M., Gómez, C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H., & Cabello, F. C. (2011) Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Revista médica de Chile*, 139(1), 107-118.
- Anadón Navarro, A. R. (2007) Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública (En línea). Disponible en: [http://www.racve.es/files/2013/03/contenido\\_racve\\_11584208032013.pdf](http://www.racve.es/files/2013/03/contenido_racve_11584208032013.pdf)
- Occhi, H. L. J. (2013) Métodos para la detección de residuos de antibióticos en leche para ser utilizado en el tambo (En línea). Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/417/tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.
- OMS (1999). Cuestiones de inocuidad de los alimentos asociadas con los productos de la acuicultura: informe de un grupo de estudio mixto FAO/RACCP/OMS (En línea). Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42257/9243208837\\_spa.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42257/9243208837_spa.pdf)
- Otero, J. L., Mestorino, O. N., & Errecalde, J. O. (2001) Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. *Analecta Veterinaria*, 21.
- Ramírez, R. V. (2017) Uso de Antibióticos y Coadyuvantes del Crecimiento Animal Y su Repercusión en el Ser Humano. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense*. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/RAMON%20VEGA%20RAMIREZ.pdf>



- Restrepo Arango, J. G. (1998) Antibióticos y su importancia como residuo en los alimentos de origen animal (En línea). Disponible en: [http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/6292/1/Restrepo\\_J\\_1998\\_Antibi%C3%B3ticos\\_residuo\\_alimentos\\_animal.pdf](http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/6292/1/Restrepo_J_1998_Antibi%C3%B3ticos_residuo_alimentos_animal.pdf)
- Sárraga, C; Carreras, J.A; García Regueiro & M. Castellari. (2006) The combined effects of  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation and enrofloxacin administration on oxidative stability of turkey meat. *British Poultry Science* 47:6, 708-713.
- SENASA (2018) Cadena Animal. Animales Acuáticos – producción primaria. Disponible en: [file:///C:/Users/norma/Downloads/senasa\\_-\\_produccion\\_primaria\\_-\\_2018-09-21%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/norma/Downloads/senasa_-_produccion_primaria_-_2018-09-21%20(1).pdf).
- Sommer, M. (2009) Acuicultura insostenible en Chile. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(3), 1-23.
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2002) Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino?. *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109-112.
- Torres Florez, F. E. (2019) Determinación de la prevalencia de residuos de antibióticos en bovinos procesados en el frigorífico río frío. Disponible en: [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/10904/4/2019\\_determinacion\\_prevalencia\\_residuos.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/10904/4/2019_determinacion_prevalencia_residuos.pdf)
- Wicki, G., Rossi, F., Pannú Huidobro, S., & Luchini, L. (2007) Alimento sin complemento vitamínico en producción de pacú en sistema semiintensivo. Compendio de trabajos e informes sobre acuicultura y pesca continental (No. SA M01 DAC 17942). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Buenos Aires (Argentina). Dirección de Acuicultura. Centro Nacional de Desarrollo Acuícola*. Disponible en: [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/\\_archivos/000000\\_Especies/000004-Pac%C3%BA/080520-Alimento%20sin%20complemento%20vitam%C3%ADnico%20en%20producci%C3%B3n%20de%20Pac%C3%BA.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/_archivos/000000_Especies/000004-Pac%C3%BA/080520-Alimento%20sin%20complemento%20vitam%C3%ADnico%20en%20producci%C3%B3n%20de%20Pac%C3%BA.pdf)
- Wicki, G & Wiltchiensky, E. (2017) Producción de Pacú en el Nordeste Argentino. Ministerio de Agroindustria. Argentina (en línea). Disponible en: [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/economia/\\_archivos/171027\\_Producci%C3%B3n%20y%20an%C3%A1lisis%20econ%C3%B3mico%20de%20Pac%C3%BA%20017.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/economia/_archivos/171027_Producci%C3%B3n%20y%20an%C3%A1lisis%20econ%C3%B3mico%20de%20Pac%C3%BA%20017.pdf)
- Zambrano, P. E. L. R., Espinoza, J. A., Conte-Junior, C. A., & de la Torre, C. A. L. (2018) Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal

mediante cromatografía líquida. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 6(2), 122-136.

- Zarama Ortiz, Á. M., & Rosero Torres, L. E. (2006) Determinación de la concentración ideal de esporas de *Bacillus stearothermophilus* como indicador biológico para el control de los procesos de esterilización. *Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Pontificia Javeriana. Bogotá, Colombia.* Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8810/tesis161.pdf?sequence=1&isAllowed=y>