

Autores

Dra. Sonia M^a Aguayo Balsas

Investigador Titular de Organismos Públicos de Investigación
Responsable Unidad de Contaminantes Orgánicos Ambientales
Investigador Responsable Proyecto*

Dr. Javier Méndez González

Jefe del Servicio de Contaminación Hídrica

Dra. Silvia Herrera León

Titulado Superior Especialista de Organismos Públicos de Investigación
Responsable Unidad de Enterobacterias, *Campylobacter* y *Vibrio*

***DATOS CONTACTO:**

Unidad de Contaminantes Orgánicos Ambientales del Servicio de Contaminación Hídrica.
Centro Nacional de Sanidad Ambiental. Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. Majadahonda a Pozuelo Km 2
28220 Majadahonda
Tlfno: 91 822 35 21
E mail: saguayo@isci.ii.es

Índice

| | | |
|----|--------------------------|----|
| 1. | Resumen | 4 |
| 2. | Introducción | 4 |
| 3. | Objeto y alcance | 5 |
| 4. | Materiales y metodología | 5 |
| 5. | Resultados | 7 |
| 6. | Discusión | 8 |
| 7. | Conclusiones | 10 |
| 8. | Bibliografía | 10 |

1. RESUMEN

Al medio ambiente receptor llegan un gran cúmulo de residuos de antibióticos de consumo humano que no se encuentran incluidas en la legislación actual de regulación, pero que no por ello dejan de tener importancia ya que son sustancias de producción continua y uso de grandes cantidades que por tanto se están vertiendo al medio de forma continua. Una vez administrados y tras ser metabolizados, se excretan en su mayor parte como el compuesto parental original y en menor porcentaje como metabolitos. Estos residuos van a parar a través de las aguas residuales urbanas a las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales o EDARs, donde pueden persistir al tratamiento en mayor o menor medida y por tanto alcanzar el medio ambiente a través de la reutilización agraria de los lodos. La cantidad de residuos de antimicrobianos va a depender de la frecuencia y cantidad de su dosificación (pautas de consumo), el tipo de patrón de excreción del compuesto original, de su metabolismo, la afinidad del fármaco o sus metabolitos a ser absorbido por la materia orgánica (propiedades físico químicas del principio activo) y la capacidad de transformación metabólica de los microorganismos durante el tratamiento de las aguas residuales o durante el almacenaje de las excretas animales. Son sustancias que continúan siendo activas en el medio produciendo efectos diversos en los organismos del medio receptor (aguas superficiales, aguas profundas, suelo) a través de exposiciones a largo plazo entre ellos la inducción de resistencias en poblaciones bacterianas. El estudio de su comportamiento ambiental y de su potencial para producir efectos únicamente se encuentra regulado por la legislación vigente actualmente para la autorización y registro de los medicamentos por las agencias europeas del medicamento, que incluyen la obligación de presentar una evaluación del riesgo ambiental de los medicamentos previo a su autorización de venta y comercialización. Por esta causa, existe una necesidad de realizar estudios ambientales de monitorización de los residuos de medicamentos en diferentes compartimentos ambientales así como de realizar una valoración de los diferentes efectos que pueden llegar a producir, sopesando si las concentraciones ambientales pueden suponer un riesgo de producir efectos.

Palabras clave: medio ambiente, lodos, antibióticos, resistencias.

2. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los objetivos prioritarios dentro de la I+D en materia de medio ambiente, se han encaminado casi exclusivamente al estudio de contaminantes convencionales (p.e.: fitosanitarios) o contaminantes incluidos en los listados de sustancias peligrosas prioritarias, sustancias persistentes y/o altamente tóxicos o carcinogénicos. Sin embargo, la realidad es que al medio ambiente

receptor llegan un gran cúmulo de sustancias químicas de origen antropogénico que no se encuentran incluidas en la legislación actual, pero que no por ello dejan de tener importancia ya que son sustancias de producción continua y uso de grandes cantidades que por tanto se están vertiendo al medio de forma continua. Estamos hablando de las especialidades farmacéuticas, y concretamente del grupo de los antimicrobianos. De un total de 200 antimicrobianos aprobados a nivel nacional, un 52% se destina a consumo humano (uso terapéutico y profiláctico, 10% hospitalario y 90% de la comunidad) y un 48% para uso veterinario (uso terapéutico y profiláctico). España es uno de los principales países consumidores de antimicrobianos de uso humano de la Unión Europea, y el tercero según fuentes de la Red Europea de Vigilancia de Consumo de Antimicrobianos (European Surveillance of Antimicrobial Consumption). Además consume sobre todo, antibióticos de amplio espectro que son los que tienen mayor impacto en el desarrollo de resistencias.

Los antimicrobianos alcanzan el medio principalmente a través de las aguas residuales. Otras rutas menos relevantes incluyen el desecho descontrolado de los residuos domésticos y hospitalarios de antimicrobianos no utilizados, o su vertido a través de los efluentes procedentes de las industrias farmacéuticas (Kostich y Lazorchak, 2008). En general, una vez administrados y tras ser metabolizados, se excretan en su mayor parte como el compuesto parental original y en menor porcentaje como metabolitos (Lienert y col., 2007). La cantidad de residuos de antimicrobianos en el efluente o en los lodos de depuradora va a depender de la frecuencia y cantidad de su dosificación, el tipo de patrón de excreción del compuesto original, de su metabolismo, la afinidad del fármaco o sus metabolitos a ser absorbido por la materia orgánica y la capacidad de transformación metabólica de los microorganismos del medio o de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) (Kim y Aga, 2007).

Los efluentes y lodos ya procesados y con ellos los residuos de antimicrobianos, pueden verter directamente a los ríos y contaminar las aguas superficiales y sus sedimentos (Kümmerer, K. 2008), o bien reutilizarse con fines agrícolas pudiendo dispersarse en el medio ambiente y alcanzar diferentes compartimentos ambientales (Kinney y col., 2006; Kümmerer, K. 2008).

En los últimos años, la producción de lodos procedentes de depuradora se ha incrementado un 41% en España como consecuencia de la aplicación de la Directiva 91/271/EEC, habiéndose destinado el 66,7% de ellos a usos agrícolas en 2007 (MARM, 2009). Sin embargo, los datos sobre monitorización ambiental existentes en nuestro país son todavía muy escasos. La información existente está orientada hacia el seguimiento de niveles de los fármacos de mayor consumo humano en efluentes de depuradora y aguas superficiales, tanto de concentraciones (Muñoz y col., 2009), como de resistencias bacterianas (Kümmerer, 2004; Baquero y col., 2008). Así mismo, determinados grupos españoles del CSIC han participado en el proyecto europeo UE Knappe que trata de conocer y va-

lorar su presencia en aguas. Estos estudios se centran en la zona de Cataluña, donde se está realizando la caracterización de efluentes de depuradoras, el desarrollo de mejoras de los métodos de detección y la aplicación de nuevas tecnologías de depuración para la eliminación de estos compuestos (Petrovic y col., 2007). Sin embargo, no existen estudios avalados por científicos españoles que realicen un seguimiento de estos residuos en los lodos, ni de su impacto tras su reutilización en suelos agrícolas.

Los datos en efluentes procedentes de depuradoras muestran una gran heterogeneidad asociada a numerosos factores como densidad de población, pautas de consumo, o tipo de sistema de tratamiento de las aguas residuales (Kümmerer, 2008). Los antimicrobianos que se detectan con mayor frecuencia en este tipo de efluentes y en lodos urbanos son los macrólidos: 36-2054 ng/L en efluentes y 32-195 µg/kg en lodos; las fluoroquinolonas: 27-167 ng/L en efluentes y 40-886 µg/kg en lodos y; las sulfonamidas: 12-860 ng/L en efluentes y 0-31 µg/kg en lodos (Golet y col., 2002; Göbel y col., 2005; Xu y col., 2007).

Los estudios de monitorización ambiental realizados en las últimas décadas, han demostrado que los antibióticos son bastante ubicuos. Se han detectado en suelos agrícolas a concentraciones máximas de 500 µg/kg (Martínez-Carballo y col., 2007; Karci y Bacioglu, 2009). Sirva como ejemplo el caso de las tetraciclinas, que han llegado a alcanzar valores de 86 -118 mg tetraciclina/Kg y 4,6-7,3 mg clortetraciclina/Kg (Hamscher y col., 2002; Jacobsen y col., 2004; Martínez Carballo y col., 2007; Hamscher y Hartung, 2008).

Uno de los principales problemas que genera la exposición crónica a los antimicrobianos, es que podrían estar induciendo la aparición de resistencias, bien dentro del propio sistema de tratamiento, bien una vez liberados en el medio receptor, entre las poblaciones bacterianas de origen humano o veterinario y las poblaciones naturales del ecosistema (Rodríguez y col., 2006). De esta forma, bacterias patógenas o no, pueden servir como reservorios de genes de resistencia y contribuir a la evolución y diseminación de estas resistencias en el medio acuático. A partir de aquí, las poblaciones bacterianas resistentes puede transmitir genes responsables de la resistencia, frecuentemente insertados en elementos móviles (plásmidos, transposones e integrones), de manera individual o agrupados dentro de estas estructuras (multi-resistencias), a otros microorganismos patógenos o no, que están compartiendo el mismo ambiente, de aquí a los animales y alimentos y de estos al hombre, creándose así una espiral que en cada ciclo aumenta su peligrosidad (Kim y Aga, 2007).

Así, se han encontrado bacterias resistentes a antimicrobianos en aguas superficiales (Watkinson y col., 2007) y en suelo (Schmit y col., 2008), y se ha visto la relación existente entre las bacterias resistentes en ríos y en efluentes de EDARs (Watkinson y col., 2007). Finalmente, se han descrito en la literatura casos y brotes de toxiinfección alimentaria en los que el vehículo de la intoxicación ha

sido un alimento contaminado por aguas depuradas (Muniesa y col., 2006). En la actualidad, los microorganismos resistentes están incluidos dentro de los principales problemas en salud pública (Mulvey and Simor, 2009).

Diferentes organismos internacionales han alertado sobre el incremento en la aparición de resistencias bacterianas a antimicrobianos (FAO/OIE/WHO, 2003, 2004 y 2007) y se han puesto en marcha numerosas iniciativas en los últimos 10 años, como la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (EARSS), la creación del Laboratorio Central de Referencia para la Resistencia a los Antimicrobianos (CRL-AR), el Grupo Científico Asesor en Resistencias Antimicrobianas (SAGAM-EMEA) o el Grupo de Trabajo sobre Resistencia Antimicrobiana (OIE, FAO, OMS). A nivel nacional, cabe destacar la creación de la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos. Los últimos avances en este campo han permitido priorizar los antimicrobianos que se consideran críticos para preservar la salud tanto de personas como de animales (cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, quinolonas y aminoglucósidos), detectándose la necesidad de poner en marcha medidas que permitan mitigar la diseminación de las resistencias frente a ellos y mantener así su eficacia terapéutica.

La vigilancia de la resistencia bacteriana se ha realizado, en la mayoría de los casos, con microorganismos aislados de muestras clínicas pero, sin embargo, es importante estudiar también las bacterias aisladas de muestras ambientales a fin de conocer su posible papel como reservorio de genes codificadores de resistencia (Watkinson y col., 2007). El mecanismo de aparición de resistencias en el medio ambiente todavía no está muy estudiado. Recientemente se ha detectado, en ríos contaminados con quinolonas, la presencia de bacterias con genes que confieren resistencia a las quinolonas (Cattoir et al., 2008).

3. OBJETO Y ALCANCE

El objetivo principal de este trabajo consiste en generar información relativa a los niveles ambientales de residuos de antibióticos y de resistencias bacterianas en lodos de depuradora. Para ello: a) se establecen los niveles de emisión en los lodos procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, como principal fuente emisora de residuos de antimicrobianos utilizados en clínica humana que alcanzan el medio ambiente de manera indirecta tras su reutilización agraria; como b) se realiza una caracterización del incremento o emergencia de resistencias en poblaciones bacterianas de los lodos de EDARs.

4. METODOLOGÍA

Selección de los antimicrobianos objeto de este estudio

Los antimicrobianos seleccionados inicialmente para este estudio lo fueron atendiendo a su grado de consumo en

medicina humana; a su capacidad de resistir a los tratamientos de depuración de las aguas residuales o persistencia; y atendiendo al nivel de resistencia bacteriana que presentan de acuerdo a los datos obtenidos por el grupo del Servicio de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología. Se seleccionaron inicialmente del grupo de las tetraciclinas, la tetraciclina; del grupo de las sulfonamidas, el sulfametoxazol; del grupo de las quinolonas, la ciprofloxacina y del grupo de los beta-lactámicos, la amoxicilina o en su defecto el ácido clavulánico (el anillo beta lactámico de la amoxicilina es fácilmente hidrolizable frente a beta lactamasas, y sin embargo el ácido clavulánico es resistente a la acción de estas enzimas).

Identificación y selección de los puntos de emisión

Se han identificado como fuentes de emisión, los lodos procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). El área de estudio ha sido la CC AA de Castilla y León. Se han obtenido muestras de 2 EDARs: 1 EDAR diseñada para servir un número de e-h >15.000, y una EDAR diseñada para servir un número de e-h <15.000. Las muestras se obtuvieron durante el mes de Julio de 2011.

Toma de Muestras

La planificación y el desarrollo de los planes de muestreo se realizó teniendo en cuenta la norma UNE EN de Calidad del Agua: UNE-EN ISO 5667-13: 1998.

Caracterización de las muestras

Se ha realizado una caracterización físico química de las muestras obtenidas en función de los parámetros físico químicos y procedimientos descritos a continuación: pH y conductividad a 20°C mediante potenciometría de ión específico (método ISO/DIS 11265), materia orgánica, humedad y materia seca (Norma EN:12880:2000).

Preparación de las muestras

Se han procesado siguiendo las recomendaciones indicadas en el método "EPA 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS" (EPA, 2007). Con la finalidad de realizar el estudio de recuperación del procedimiento empleado y valorar el efecto de posibles interferencias debidas a la elevada complejidad de la matriz de la muestra en la detección, identificación y cuantificación de cada antibiótico se realizó un dopaje de una muestra conocida. Se dopó una matriz de referencia similar en complejidad a los lodos obtenidos con cada uno de los antibióticos objeto de estudio (tetraciclina, ciprofloxacina y sulfametoxazol), a diferentes concentraciones en progresión geométrica y seleccionadas en función del rango de concentración esperada en condiciones ambientales (0,25 – 20 mg/Kg). Se consideró como matriz de referencia un lodo de depuradora

procedente del centro investigación donde se realizan estos estudios.

Análisis Cromatográfico

Se ha utilizado un Módulo de Separaciones Alliance 2695 (Waters) con horno de columnas, inyector automático y espectrómetro de masas 3100 MS (Waters). Se ha aplicado una cromatografía en fase reversa utilizando una columna Gemini-NX C18 (5 µm 110 150x4.6 mm) de Phenomenex. 15 µL de volumen de inyección y una temperatura en el horno de columnas de 40 +/- 5 °C. Las condiciones cromatográficas utilizadas se han basado en el método EPA 1694 (2007) para la separación de los antibióticos del grupo 1 (ciprofloxacina y sulfametoxazol) y 2 (tetraciclina).

Las condiciones del detector fueron las indicadas en el método EPA. La identificación de los antibióticos se ha realizado en base a sus tiempos de retención y en función del ión molecular. Los iones utilizados para la cuantificación y sus tiempos de retención aparecen en la Tabla 2.

Tabla 1. Antibióticos en estudio, iones utilizados para su cuantificación y sus tiempos de retención en la matriz utilizada.

| | m/z | t _R |
|----------------|-------|----------------|
| Tetraciclina | 445,2 | 13,75 |
| Ciprofloxacina | 332,2 | 15,14 |
| Sulfametoxazol | 254,2 | 19,36 |

La calibración del equipo para la cuantificación de los residuos se realizó mediante la realización de curvas de calibración para cada uno de los antibióticos en estudio mediante el método de adiciones en matriz dopada, a diferentes concentraciones en progresión geométrica y seleccionadas en función del rango de concentración esperada en condiciones ambientales (0,25 – 20 mg/Kg).

Screening genérico de resistencias / Caracterización ampliada y entorno genético de resistencias

Se han analizado las mismas dos muestras de lodos del objetivo anterior. Para ello, se preparó un homogeneizado de los lodos cogiendo cinco puntos del mismo y preparando diluciones 1:10 y 1:100. Se sembraron 200 µL de este homogeneizado en placas de MacConkey y MacConkey suplementado con antibiótico (ácido nalidixico, sulfonamidas, tetraciclina, y cloranfenicol). Antes de la lectura de resultados se mantuvieron en incubación a 37°C durante 24h.

Para la identificación de las colonias y dado que la morfología de las mismas era muy similar se optó por llevar a cabo la identificación de una colonia de cada una de las placas de MacConkey.

Se realizó una identificación molecular basada en la amplificación y secuenciación del ADN16S ribosomal empleando los cebadores 11F (50-GTTTGATCMTGGCT-CAG-30) y 1392R (50-ACGGGCGGTGTGTAC-30). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de

25 µL utilizando el sistema Redy-To-Go de GE Healthcare, 5 pmol de cada primer y 5 µL de un hervido de la bacteria que fue utilizado como ADN molde. La condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 min seguidos de 25 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 58 °C durante 30 seg, y 72 °C durante 50 seg. El ciclo final de extensión fue de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa (1-%) y purificados. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 377 DNA utilizando el kit Taq Dye Deoxy Terminator cycle. Una vez obtenida la secuencia se comprobó la identidad utilizando BLAST.

5. RESULTADOS

Caracterización general de las muestras

Se han obtenido los siguientes resultados en lo que se refiere a la caracterización físico química de las muestras de lodos recibidas (Tabla 2).

Cuantificación de residuos de antibióticos

Durante el desarrollo del proyecto se ha realizado una puesta a punto y una optimización del procedimiento de preparación de muestras para cada antibiótico objeto de estudio y para este tipo de matriz en concreto.

Se ha confirmado el efecto interferencia de la matriz en este tipo de procedimiento que afecta principalmente a la identificación y a la cuantificación de los compuestos y a los tiempos de retención, retrasándolos con respecto al mismo compuesto en solución patrón. No obstante, los tiempos de retención para cada uno de los antibióticos cumplen los criterios de calidad del método EPA 1694, que indica que las variaciones entre medidas deben estar comprendidas en un rango de +/- 15 segundos. La pro-

porción S/N en el punto de máximo nivel de pico para cada compuesto cumplía el requisito de ser $\geq 2,5$ para muestras establecidos en el método EPA 1694 (2007). La cuantificación de los antibióticos se ha realizado en base al pico del ión molecular para cada uno de los antibióticos (Tabla 1).

Se confirmó también el efecto del procedimiento de extracción empleado en los porcentajes de recuperación de cada uno de los antibióticos. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Finalmente, la amoxicilina no se ha incluido en el estudio, por la dificultad que entraña su rápida fotodegradación en el manejo de patrones y muestras y su rápida degradación en solución debido a la hidrólisis de su anillo beta lactámico. Hemos de recordar que este proyecto co-subvencionado forma parte de un proyecto del plan nacional de tres años, por lo que se espera poder abarcar el estudio de este antibiótico en los años próximos.

Se han obtenido rectas de calibrado para la tetraciclina, la ciprofloxacina y el sulfametoxazol con unos coeficientes de regresión $\geq 0,9989$ en matriz dopada, lineales en los rangos descritos en la Tabla 3 para cada antibiótico. En dicha tabla también se indican los Límites de Detección y de Cuantificación (mg/Kg) para el método analítico empleado.

Todas las muestras analizadas presentaron niveles por debajo del Límite de Detección del método analítico utilizado en este estudio (Tabla 4).

Screening genérico de resistencias. Caracterización ampliada y entorno genético de resistencias

A fin de una mayor comprensión de estos objetivos se describen de manera conjunta estos dos objetivos descritos inicialmente en la metodología por separado. Las acti-

Tabla 2. Resultados de los parámetros físico químicos de los lodos analizados.

| MUESTRA | Materia Seca (%) | Humedad Relativa (%) | Sólidos volátiles | Materia Orgánica | pH | Conductividad |
|---------|------------------|----------------------|-------------------|------------------|-----|---------------|
| Lodo 61 | 27,7 | 72,3 | 12,2% | 43,9% | 6,3 | 2,99 mS/cm |
| Lodo 62 | 15,8 | 84,2 | 9,6% | 60,8% | 7,6 | 1,491 mS/cm |

Tabla 3. Resultados de las rectas de calibración para cada antibiótico, límites de detección, límites de cuantificación y porcentajes de recuperación para cada antibiótico.

| ANTIBIÓTICO | LD (mg/Kg) | LQ (mg/Kg) | % Recuperación |
|----------------|------------|------------|----------------|
| Tetraciclina | 0,585 | 1,123 | 66 |
| Sulfametoxazol | 0,0033 | 0,011 | 100 |
| Ciprofloxacina | 0,567 | 1,888 | 85 |

Tabla 4. Resultados obtenidos tras el análisis de las muestras para cada uno de los antibióticos objeto de este estudio.

| MUESTRA | Tetraciclina (mg/Kg) | Sulfametoxazol (mg/Kg) | Ciprofloxacina (mg/Kg) |
|---------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Lodo 61 | < LD | < LD | < LD |
| Lodo 62 | < LD | < LD | < LD |

vidades realizadas en este objetivo se han llevado a cabo por la Unidad de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología.

- Lodo 61: No se obtuvo crecimiento de ningún microorganismo.
- Lodo 62: Se obtuvo crecimiento de colonias homogéneas en las placas de Agar MacConkey con y sin antibiótico. A continuación se llevó a cabo un recuento de colonias por placa y la identificación de las bacterias obtenidas. Se indicará el recuento del homogeneizado sin diluir, dilución 1:10 y dilución 1:100.
 - Recuento:
 - Agar MacConkey: 956 colonias de morfología similar. 27 colonias de morfología similar.
 - Agar MacConkey + Ácido Nalidíxico: 474 colonias de morfología similar.
 - Agar MacConkey + sulfametoxazol: 736 colonias de morfología similar.
 - Agar MacConkey + tetraciclina: 232 colonias de morfología similar.
 - Agar MacConkey + cloranfenicol: 228 colonias de morfología similar.

Identificación: dado que la morfología de las colonias era muy similar se optó por llevar a cabo la identificación de una colonia de cada una de las placas de MacConkey. Los primeros resultados (colonias no fermentadoras de lactosa, oxidasa positivas, catalasas positivas) nos indicaron que no se trataba de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* por lo que se llevó a cabo una identificación molecular basada en la amplificación y secuenciación del ADN16S ribosomal empleando los cebadores 11F (50-GTTTGATCMTGGCT-CAG-30) y 1392R (50-ACGGGCGGTGTGTAC-30).

La secuencia del ADN 16S ribosomal reveló que el crecimiento que habíamos obtenido en todas las placas correspondía a la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Esta especie bacteriana forma parte de los biofilms que se utilizan en los procesos biológicos de depuración de agua y su caracterización no forma parte de este proyecto por lo que no se llevaron a cabo estudios posteriores.

6. DISCUSIÓN

Los niveles presentes en los lodos considerados en este estudio, se encuentran por debajo del límite de detección del método analítico empleado para cada uno de los antibióticos en estudio.

Los tres antibióticos estudiados se encuentran referenciados por su fuerte afinidad por los lodos, constituyéndose esta vía como su principal ruta de eliminación de las aguas tratadas (Golet y col., 2002; Carballa y col., 2008; Radjenovic y col., 2008). Por ello, la ausencia de residuos de estos antibióticos podría ser debida a un descenso en los niveles de consumo de antibióticos en medicina humana durante los meses estivales (Castiglioni y col., 2006; Choi y col., 2008). Debemos recordar que las muestras estudiadas se correspondían con lodos procedentes del tratamiento de aguas residuales del mes de Julio.

El uso de antibióticos en España tiene un marcado carácter estacional presentando el máximo en los meses invernales. La estacionalidad afecta fundamentalmente a los antibióticos que se emplean para infecciones de las vías respiratorias, como las penicilinas, cefalosporinas y macrólidos (Lázaro Bengoa y col., 2010). En este estudio no se ha podido confirmar este descenso en el caso concreto de la amoxicilina. La ausencia de tetraciclina y sulfametoxazol en los lodos, aunque no se trate de antibióticos utilizados en clínica de vías respiratorias, podría responder a la diferencia en el consumo. En el año 2009, el 62,6 % (12,3 DHD) del consumo de antibióticos se concentra en el subgrupo de las penicilinas (Lázaro-Bengoa y col., 2010). Los subgrupos más utilizados después de las penicilinas son las quinolonas (12,2%), los macrólidos (9,7%) y las cefalosporinas (7,9%) (AEMPS, 2009). Por principio activo, la amoxicilina + inhibidor de la beta lactamasa (ácido clavulánico) se encuentra en primer lugar, seguido por la ciprofloxacina y la claritromicina y por último el sulfametoxazol (Figura 1).

Hasta el momento existen pocos estudios sobre la ocurrencia de la presencia de residuos de antibióticos en lodos procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales. Los estudios de monitoring se han desarrollado hasta el momento en los influentes y efluentes de EDARs, confirmando su ausencia o describiéndose sus niveles en dichos efluentes. Sin embargo en muchas ocasiones el hecho de que no se encuentren presentes en los efluentes, no descarta que hayan sido eliminados, si no que se encuentran en los lodos. Al nivel de conocimiento actual se ha visto que en función de sus propiedades físico químicas, solubilidad, potencial de ionización, coeficiente de distribución octanol agua (K_{ow}) y coeficiente de adsorción (K_d), pueden presentar una mayor o menor afinidad por la materia orgánica, cationes, metales, etc. Y en función a su vez de estas características los residuos de los medicamentos se van a distribuir a lo largo de las líneas de tratamiento de las estaciones depuradoras de aguas residuales bien en la línea de aguas o bien en la línea de lodos.

Dentro de los diferentes grupos de antibióticos, el grupo de las fluoroquinolonas presenta por regla general una elevada capacidad de adsorción a los lodos, constituyéndose esta vía como su principal ruta de eliminación de las aguas tratadas (Golet y col., 2002). Se han detectado niveles de fluoroquinolonas en lodos de 40-886 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y en concreto, la ciprofloxacina y la norfloxacina se han detectado a niveles de 1,4 – 3,1 mg/Kg peso seco. Las Fluoroquinolonas se han identificado como contaminantes persistentes en suelos tratados con lodos y sedimentos, por lo que radica su interés en estudios de monitorización (Golet y col., 2002). Los estudios llevados a cabo tras la aplicación de lodos en campo demuestran que parecen acumularse en las capas superficiales del suelo con una movilidad limitada y un reducido potencial de alcanzar las capas freáticas.

Las tetraciclinas también se eliminan principalmente de la línea de aguas, repartiéndose en mayor proporción en la línea de lodos, a los que presentan tendencia a adherirse debido a su elevado coeficiente de adsorción por

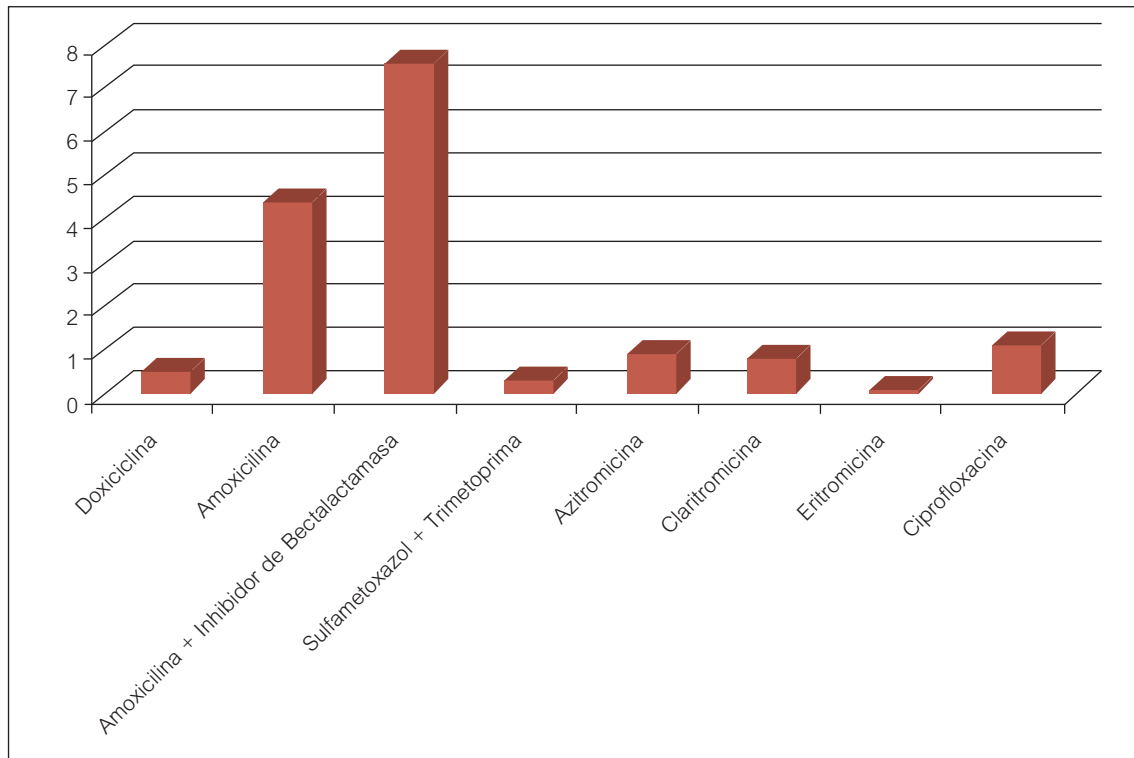


Figura 1. Consumo de antibióticos en España en el 2009 con cargo al S.N.S. expresado en Dosis Diarias Definidas por 1000 habitantes y día. Fuente: AEMPS, 2009.

la materia orgánica y en concreto tienden a formar complejos con los metales presentes en lodos (Kim y col., 2005). Se han detectado niveles de tetraciclinas en lodos de 86 -118 mg tetraciclina/Kg y 4,6-7,3 mg clortetraciclina/Kg peso seco (Hamscher y col., 2002; Jacobsen y col., 2004; Martínez Carballo y col., 2007).

Otros antibióticos como el sulfametoazol, la trimetoprima y la claritromicina han sido reportados más recientemente (Gobel y col., 2005) a concentraciones de 0,20 mg/Kg peso seco.

En el caso de las sulfonamidas se han llegado a detectar a niveles comprendidos entre los 0 y los 31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en lodos (Golet y col., 2003; Göbel y col., 2005; Xu y col., 2007), en otros estudios comparativos en los que se han estudiado los niveles de sulfametoazol en lodos en diferente estado de tratamiento, los rangos van desde 88 mg/Kg en lodos activados a niveles no detectados en lodos digeridos (Lapen y col., 2008).

En el caso de los antibióticos beta-lactámicos, los niveles que se han detectado hacen referencia a residuos presentes en influentes y efluentes procedentes de EDARs, que además se podrían considerar como reducidos (20-30 $\mu\text{g}/\text{L}$) si tenemos en cuenta que como vimos anteriormente son los antibióticos de mayor consumo en medicina humana. Además, resalta el hecho de la ausencia de referencias a este tipo de antibióticos en los estudios publicados. Se desconoce si es por su corta vida media en el medio, por la hidrólisis del anillo beta-lactámico, o a las dificultades analíticas que entraña su detección (Kümmerer, 2008).

Los resultados obtenidos en los estudios de resistencia han resultado negativos para las especies y grupos de antibióticos incluidos en esta investigación. Una de las causas podría ser el tratamiento a temperaturas de 500°C que sufren los lodos de depuradora para poder ser reutilizados cumpliendo los criterios sanitarios referentes a microorganismos (RD 1310/90).

Únicamente, se encontró crecimiento de colonias pertenecientes a la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, específica de los biofilms de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Existen pocos trabajos que reflexionen sobre el papel que puedan jugar estas bacterias una vez alcanzan el medio ambiente sobre todo sobre la resistencia a antibióticos y su dispersión. La resistencia fenotípica a los antibióticos en bacterias de biofilms sería positiva desde el punto de vista del funcionamiento del sistema de tratamiento que directamente podría en cierto modo proteger el medio receptor de eventos selectivos causados por la liberación de antibióticos (Baquero y col., 2008). Lo que sí es cierto es que las diversas poblaciones bacterianas presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (pertenecientes a biofilms, y aquellas excretadas por nuestro organismo) favorecen el intercambio genético entre poblaciones y la diseminación de plásmidos, transposones e integrones, hecho referenciado en trabajos de investigación en los que se ha recuperado plásmidos de multi-resistencia de amplio espectro en las aguas y lodos procedentes de EDARs (Schlüter y col., 2007).

No obstante, hasta el momento no se ha podido probar que las concentraciones extremadamente reducidas de antibióticos en el medio puedan o no puedan ejercer una presión sobre las poblaciones bacterianas ambientales ni sobre la dispersión de los genes de resistencia (Baquero y col., 2008).

7. CONCLUSIONES

Los trabajos realizados durante el desarrollo del presente proyecto de investigación han permitido poner a punto y mejorar en nuestras condiciones un procedimiento de preparación de muestras ambientales tan complejas como son los lodos de depuradora para conseguir un objetivo concreto: detectar, identificar y cuantificar antibióticos de consumo humano presentes a niveles traza en matrices complejas donde el efecto de interferencia de la propia matriz se ha corroborado como elevado en numerosos estudios (McArdell y col., 2006). Este hecho resulta muy relevante dentro de este pequeño mundo científico en concreto, donde la demanda de procedimientos de preparación de muestra y de métodos analíticos para este tipo de compuestos químicos fiables está a la orden del día. Vamos a entender por pequeño mundo científico, a grupos de investigación de experiencia ampliamente reconocida por sus publicaciones y a grupos de trabajo de evaluación de riesgo ambiental de medicamentos de consumo humano y veterinario que se enfrentan diariamente con el reto de conseguir una sensibilidad en sus métodos y unos límites de detección y/o cuantificación que les permitan determinar las concentraciones ambientales reales de los antibióticos en concreto y de los medicamentos en general. Muchas veces son estos estudios de campo los que pueden ayudar en la toma de decisión por las instituciones públicas para valorar algo tan importante como la autorización de comercialización de un medicamento atendiendo a su posible riesgo ambiental (Directiva 2001/83/EC), ya que allí donde en la estimación de su riesgo (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00) hay duda, en muchas ocasiones se recomienda un estudio de campo a llevar a cabo por la empresa farmacéutica.

Los resultados obtenidos, permiten incrementar la escasez de datos nacionales referentes a concentraciones de antibióticos en lodos de depuradora.

Este estudio supone un paso innovador en el campo de las resistencias bacterianas y en el de los residuos ambientales de antibióticos, pues es la primera vez que se intentan relacionar ambos hechos y rellenar un gap informativo allí donde, como hemos visto anteriormente, lo había.

8. BIBLIOGRAFÍA

AEMPS, 2009. Uso de antibióticos en España. On line: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antibioticos.pdf>

Baquero F, Martínez JL, Canton R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Environmental Biotechnology* 19(3):260-265.

Carballa, M. Fink, G., Omil,

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., y Zuccato, E. 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science and Technology*. 40: 357-363.

Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Nordmann. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis* 14, 231

Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park C.K., Kim.M., Kim., H.S., Kim.P. 2008. Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the Total Environment*. 405: 120-128

Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment.

Directive 2001/83/EC of the EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 6 NOVEMBER 2001 ON THE COMMUNITY CODE RELATING TO MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE.

Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. GUIDELINE ON THE ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. European Medicines Agency. Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use.

EPA 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS" (EPA, 2007).

FAO/OIE/WHO, 2003, 2004. Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial resistance: Scientific assessment / Management Options. Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Geneva, Switzerland. 1-5. 2003 and 2007.

Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Alder, A.C., Löffler, D. and Ternes, T. 2005. Extraction and determination of sulphonamide and macrolide antimicrobials and trimethoprim in sewage sludge. *J. Chromatogr.A*.1085: 179-189.

Golet, E.M.; Strehler, A., Alder, A.C.; Giger, W. 2002. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Anal.Chem.* 74:5455-5462

Golet, E.M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder., A.C., y Giger, W. 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol.* 37(15): 3243-3249.

Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74: 1509-1518.

Hamscher, G., y Hartung, J.2008. Veterinary antibiotics in dust: sources, environmental levels, and possible health hazards. In: *Pharmaceuticals in the Environment*. Ed.:K.Kümmerer. Springer. Berlin.

Jacobsen, A.M., Halling-Sorensen, b., Ingerslev., F., Hansen, S.H. 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulphonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1038:157-170.

Karci, A., y Balcioglu A. 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment*, 407 (16): 4652-4664.

Kim, S. y Aga, D. 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Environ. Health*, Vol. 10: 559-573.

- Kinney, C.A., Furlong, E.T., y Cahill, J.D. 2006. Presence and distribution of wastewater derived pharmaceuticals in soil irrigated with reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(2): 317-326.
- Kostich, M.S. y Lazorchak, J. 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci. Total Environ.* Vol. 389: 329-339.
- Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 54, 311-320.
- Kümmerer, K. 2008. *Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks*, 3rd edn. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lapen, D.R., Topp, E., Metcalfe, C.D., Li, H., Edwards, M., Gottschall, N., Bolton, P., Curnoe, W., Payne, M., y Beck, A. 2008. Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following land application of municipal biosolids. *Science of the total Environment*. 299: 50-65.
- Lázaro-Bengoa, E., de Abajo Iglesias, F.J., López-Navas, A., y Fernández-Cortizo, M.J. 2010. Uso de antibióticos en España y marco regulador para su desarrollo clínico en la Unión Europea. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*. 28(4):10-16.
- Lienert, J., Güdel, K., Escher, B.I. 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4471-4478.
- MARM, 2009. Producción y destino de lodos de instalaciones de depuración. In: *Perfil Ambiental de España 2007*. Ed. Ministerio de Medio Ambiental Rural y Marino.
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S. y Gans, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.* 147(2): 570-579.
- McArdell, C.S., Alder, A.C., Göbel, A., Löffler, D., Suter, M.J.F., Ternes, T.A. 2006. Analytical Methods. In: *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management*. Edited by: Ternes, T.A. y Joss, A. 2006.
- Muniesa, M., Jofre, J., García-Aljaro C, Blanch AR. 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli* in the environment. *Environ Sci Technol.* 40(23):7141-9.
- Mulvey, M., y Simor, A. 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? Review. *Canadian Medical Association Journal*. 180(4): 408-415.
- Petrovic M, Gros M, Barcelo D. 2006. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr* 1124 (1-2):68-81.
- Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendrog, K., García, F., y Lipski, A. 2006. Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline and gentamicin resistant bacteria. *App. Environ. Microbiol.* Vol. 72 (9): 5870-5876.
- Schmidt, T., Ebert, J., Lamshoft, M., Schumacher, R., Ji, R., Shcaffer, A. 2008. Fate in soil of ¹⁴C-sulfadiazine residues contained in the manure of young pigs treated with a veterinary antibiotic. *J. Environ. Sci. Health B*. 42: 8-20.
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Kurz, N., Schenker, S., Krahn, I., Pühler, A. 2007. Erythromycin resistance-conferring plasmid pRSB105, isolated from a sewage treatment plant, harbours a new macrolide resistance determinant, an integron-containing Tn402-like element, and large region of unknown function. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1952-1960.
- Watkinson, A.J., Micalizzi, G.B., Graham, G.M., Bates, J.B., y Costanzo, S.D. 2007. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *App Environ. Microbiol.* Vol 73(17): 5667-5670.
- Xu, W.H., Zhang, G., Zou, S.C., Li, X.D., Liu, Y.C. 2007. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 145: 672-679.