

Impacto de los antibióticos de uso veterinario sobre la diversidad microbiana presente en el tratamiento de efluentes porcinos.

Veterinary antibiotic impact on the microbial diversity present in the treatment of swine effluents

Andrea Reynoso-Varela¹, Rocío Alcántara-Hernández², Ulises Durán-Hinojosa³, Ruth Ulloa-Mercado⁴, Denisse Serrano-Palacios¹

¹Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora. Antonio Caso 2266, C.P. 85130 Villa ITSON, Cd. Obregón, Sonora, México. ²Instituto de Geología, UNAM, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Del. Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México ³Instituto De Ingeniería, UNAM, P.O. Box 70-186, Ciudad de México, México. ⁴Departamento De Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico De Sonora.

Palabras clave en español: antibióticos, arquea, agua residual porcina, bacteria, comunidad microbiana.

Key words: antibiotics, archaea, bacteria, swine wastewater, microbial community.

INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales porcinas, además de contener grandes concentraciones de materia orgánica y nutrientes (Zeng et al., 2019), se pueden encontrar antibióticos y hormonas (Cheng et al., 2018). Los antibióticos son suministrados principalmente para prevenir y tratar las infecciones en los cerdos (Brooks et al., 2014), pero también son efectivos para promover el crecimiento animal. Sin embargo, cerca del 70% son desechados en su fórmula original a través de las excretas y orina (Cheng et al., 2018). Los antibióticos no asimilados por los cerdos son una fuente de preocupación por su persistencia y tendencia a bioacumularse en el ambiente. Se han detectado concentraciones de antibióticos en las aguas residuales de granjas porcinas que van de 14.4 a 119.7 mg/kg en diferentes partes del mundo (Van Den Meersche et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2018), y de 8.6 a 72 µg/L en México (García-Sánchez et al., 2013). La presencia de antibióticos en los sistemas de tratamiento suele afectar la eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) y la producción de biogás de los sistemas anaerobios, ya que generan respuestas no previsibles en las bacterias de los sistemas de tratamiento biológicos (Cheng et al., 2018). García-Sánchez et al. (2016), comprobaron que la presencia de tilosina inhibía la producción de metano incluso a bajas concentraciones (0.01 mg/L). Con otros antibióticos como la oxitetraciclina y sulfametoxazol (frecuentemente encontrados en agua residual porcina), se ha observado que a concentraciones mayores a 0.5 mg/L disminuyen los rendimientos en la eliminación de amonio (Zhang et al., 2019).

Algunos autores se han enfocado en determinar la composición y dinámica de la microbiota en el tratamiento de agua residual para tener un mejor entendimiento de los cambios que se generan durante la operación del sistema de tratamiento (Ducey & Hunt, 2013; Liu et al., 2015). Sin embargo, el análisis de la filogenia ha sido enfocada solo a sistemas biológicos convencionales, en los cuales las eficiencias de eliminación en el tratamiento de agua residual no son del todo satisfactorias. Se requiere investigar la comunidad microbiana en sistemas de tratamiento más avanzados, los cuales proporcionen información útil para mejorar el diseño de los sistemas de tratamientos de efluentes porcinos.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar la comunidad microbiana de un

reactor híbrido escala laboratorio diseñado para el tratamiento de agua residual porcina y analizar el efecto de los antibióticos sobre la actividad bacteriana. El análisis se realizó a la biomasa aerobia y anaerobia del reactor antes y después de la adición de una mezcla de antibióticos, utilizando como herramienta la secuenciación masiva.

METODOLOGÍA

Descripción del reactor y toma de muestra

Se tomaron muestras de un reactor híbrido destinado al tratamiento de agua residual porcina, el cual contaba con un volumen útil de ~2.5 L conformado por dos secciones integradas. La primera sección se configuró como un UASB y se inoculó con 0.5-0.8 L de lodo granular anaerobio a ~37°C, y en la parte superior contó con una campana para liberar el biogás. La segunda sección constó de una etapa aerobia rellena de anillos de polietileno, previamente inoculados con biomasa aerobia, y un flujo constante de aire con una concentración de oxígeno de 3.35 mg/L, y a temperatura ambiente (~25°C).

Se tomó una muestra de lodo de ambas secciones del reactor, aerobia (AE1) y anaerobia (AN1). También se consideraron muestras de biomasa del reactor que se expusieron a una mezcla de oxitetraciclina, tetraciclina y tilosina durante tres días en ensayos en lote aeróbico (AE2) y anaeróbico (AN2). La exposición a antibióticos se dio en frascos de 250 mL con 200 mL de agua residual porcina cruda y 2.5 µg/mL de cada uno de los antibióticos tilosina, tetraciclina y oxitetraciclina.

Extracción y amplificación de DNA

La extracción de DNA total se realizó a partir de 0.1-0.12 g de lodo obtenido de cada tipo de muestra. Para la extracción se utilizó el kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se cuantificó en un fluorómetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific).

Se amplificó la región V4 con los iniciadores específicos 515F y 806R (Caporaso et al., 2011) que consideran los dominios Archaea y Eubacteria. Las reacciones de PCR de tipo punto final se realizaron en un volumen total de 25 µL, cuya concentración para cada reacción consistía en: ~10 ng de DNA, 1X Buffer de PCR (libre de Mg²⁺), 0.4 µM de cada oligonucleótido iniciador (primer), 800 µM de dNTP mix (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 5% de DMSO (dimetil sulfóxido), 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U de DNA polimerasa ExTaKaRa Taq (Takara Bio Inc.). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial del DNA a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos desnaturalización (95°C, 30 s), hibridación (52°C, 40 s) y extensión (72°C, 90 s), con una extensión final a 72°C durante 10 min. Los amplicones obtenidos se purificaron con perlas magnéticas empleando el kit Agencourt AMPure XP PCR Purification System (Beckman Coulter), y se enviaron a secuenciar en la plataforma Illumina MiSeq (Universidad de Yale, Estados Unidos).

Análisis bioinformático

Los datos de secuenciación fueron analizados usando la línea de comandos QIIME2 (<https://qiime2.org>). Las secuencias filtradas fueron clasificadas taxonómicamente empleando la base de datos Silva (<https://www.arb-silva.de/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un gráfico de abundancia de unidades taxonómicas operativas (OTUs) (Figura 1) en el cual se observó que el filo *Proteobacteria* dominaba en todas las muestras, sobre todo en las referentes a la biomasa aerobia, seguido de abundancias notables de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. La dominancia de estos taxones ha sido reportada anteriormente en sistemas anaerobios para el

tratamiento de agua residual porcina (Liu et al., 2015), así como en sistemas de lodos activados que reciben altas cargas de antibióticos (Marathe et al., 2016).

La biomasa aerobia se encontró dominada por la clase *Gammaproteobacteria* y el género *Pseudomonas*, las cuales aumentaron tras la adición de la mezcla de antibióticos. Estas bacterias son conocidas por ser un grupo versátil, que puede encontrarse en distintos ambientes como suelo, agua, heces y agua residual (Luján, 2019). Resultados similares fueron obtenidos por Marathe et al. (2016), quienes al evaluar dos sistemas de lodos activados que reciben antibióticos en sus influentes, encontraron que la comunidad estaba dominada por *Gammaproteobacteria*, y relacionaban esta estructuración de la comunidad microbiana a la resistencia mostrada por el filo *Proteobacteria* ante distintos fármacos.

En comparación con las bacterias, el grupo arquea fue menos abundante y no se observaron grandes cambios entre las poblaciones microbianas con (AE1, AN1) y sin antibióticos (AE2, AN2). Sin embargo, no es posible afirmar que no exista un efecto negativo en la actividad metanogénica de las arqueas por la acción de los antibióticos. Lo anterior se menciona ya que Aydin et al. (2015) encontraron una disminución en la producción de metano, llevándolo de 70 a <10 mL, esto por la adición de una mezcla de sulfametoxazol, eritromicina y tetraciclina.

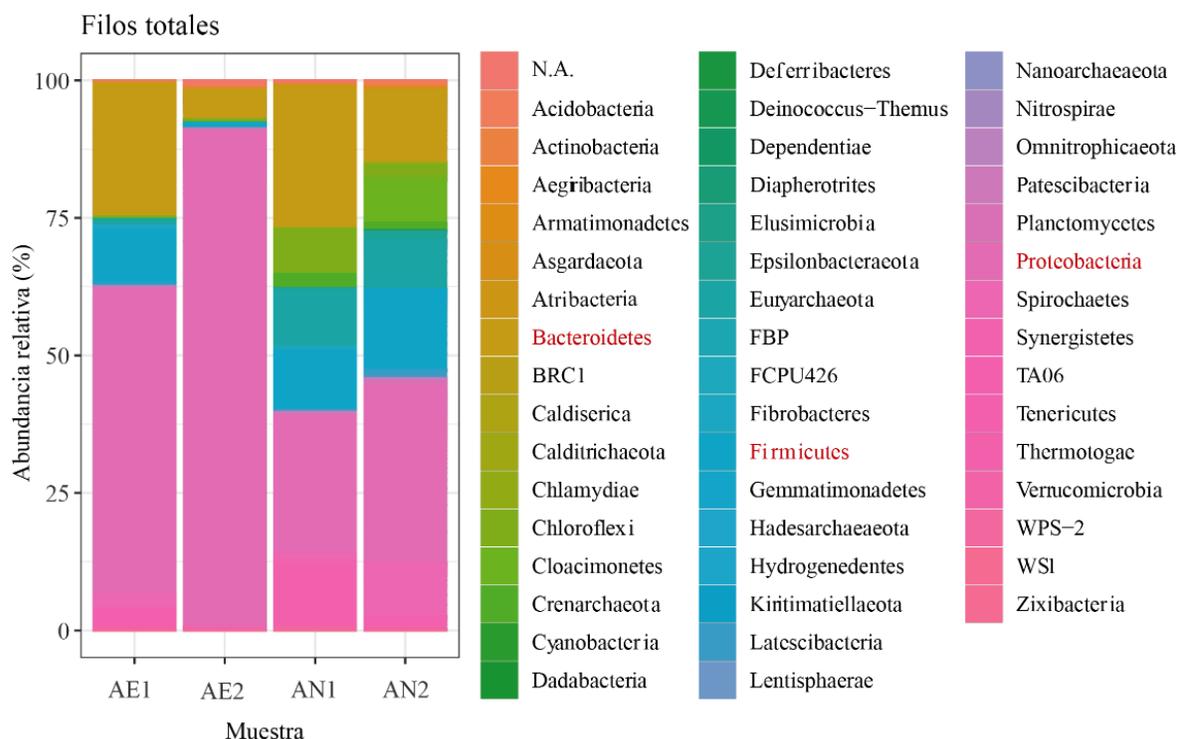


Figura 1. Abundancia relativa de filos presentes en las muestras estudiadas. En rojo se resaltan los taxones más abundantes de las muestras. N.A. indica los filos no asignados.

CONCLUSIONES

El impacto de una mezcla de antibióticos sobre las poblaciones microbianas de un reactor híbrido fue más notorio en la biomasa aerobia (AE2). El aumento del filo *Proteobacteria* podría indicar la capacidad de la biomasa aerobia de adaptarse y resistir a los compuestos antibióticos del agua residual. Por otro lado, la biomasa anaerobia del reactor fue menos alterada en su población microbiana tras la adición de antibióticos (AN2), lo que sugiere una estructura más resistente a los efluentes porcinos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto: “Evaluación del Impacto de los cambios metabólicos en la comunidad microbiana de un sistema híbrido por la eliminación de antibióticos presentes en agua residual porcícola” del fondo CONACYT_Proyectos de Investigación Científica Básica_2019-2021 con folio_ A1-S-43472.

BIBLIOGRAFIA

- Brooks, J. P., Adeli, A., & McLaughlin, M. R. (2014). Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. *Water Research*, 57, 96–103.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N. and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 4516-4522.
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Mathava Kumar, S., ... Wei, D. (2018). Problematic effects of antibiotics on anaerobic treatment of swine wastewater, 263, 642–653.
- Cheng, D. L., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y. W., Zhou, J. L., Chang, S. W., ... Zhang, X. B. (2018). Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. 621, 1664–1682.
- Ducey, T. F., & Hunt, P. G. (2013). Microbial community analysis of swine wastewater anaerobic lagoons by next-generation DNA sequencing. *Anaerobe*, 21, 50–57.
- García-Sánchez, L., Garzón-Zúñiga, M. A., Buelna, G., & Estrada-Arriaga, E. B. (2016). Tylosin effect on methanogenesis in an anaerobic biomass from swine wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 73(2), 445–452.
- García-Sánchez, L., Garzón-Zúñiga, M. A., Buelna, G., Moeller-Chávez, G. E., Noyola, A., Avilez-Flores, M., & Estrada-Arriaga, E. B. (2013). Occurrence of tylosin in swine wastewater in Mexico. *Water Science and Technology*, 68(4), 894–900.
- Liu, A. C., Chou, C. Y., Chen, L. L., & Kuo, C. H. (2015). Bacterial community dynamics in a swine wastewater anaerobic reactor revealed by 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Biotechnology*, 194, 124–131.
- Luján, D. (2019). Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación. *BioTecnología*, 23 (1), 32–42.
- Van Den Meersche, T., Rasschaert, G., Haesebrouck, F., Van Coillie, E., Herman, L., Van Weyenberg, S., ... Heyndrickx, M. (2019). Presence and fate of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria during biological swine manure treatment.
- Wang, R., Feng, F., Chai, Y., Meng, X., Sui, Q., Chen, M., ... Qi, K. (2019). Screening and quantitation of residual antibiotics in two different swine wastewater treatment systems during warm and cold seasons. *Science of the Total Environment*, 660, 1542–1552.
- Zeng, Z., Zhang, M., Kang, D., Li, Y., Yu, T., Li, W., ... Zheng, P. (2019). Enhanced anaerobic treatment of swine wastewater with exogenous granular sludge: Performance and mechanism. *Science of The Total Environment*, 697, 134180.
- Zhang, M., Liu, Y.-S., Zhao, J.-L., Liu, W.-R., He, L.-Y., Zhang, J.-N., ... Ying, G.-G. (2018). Occurrence, fate and mass loadings of antibiotics in two swine wastewater treatment systems. *Science of the Total Environment*, 639, 1421–1431.
- Zhang, Q. Q., Bai, Y. H., Wu, J., Xu, L. Z. J., Zhu, W. Q., Tian, G. M., ... Jin, R. C. (2019). Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes in anammox process under oxytetracycline and sulfamethoxazole stresses. *Bioresource Technology*, 293, 122096.