

PROYECTO EFA183/16 OUTBIOTICS

Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de
contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio
POCTEFA
(Programa Interreg-POCTEFA 2014-2020)

CONCLUSIONES FINALES

Documento elaborado por Francisco Laborda, coordinador del Proyecto (EFA 183/16/OUTBIOTICS “Tecnologías innovadoras para el diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA” (UNIÓN EUROPEA. Programa Interreg-POCTEFA 2014-2020).

Contacto: flaborda@unizar.es

El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

Proyecto cofinanciado por el FEDER

EL **objetivo general** del proyecto OUTBIOTICS es:

Eliminar o reducir los antibióticos en las aguas del territorio POCTEFA mediante el desarrollo de tecnologías innovadoras basadas en nano-micro materiales inertes, tanto para la prevención de su emisión como para su eliminación en las aguas.

Este objetivo general se ha desglosado en tres **acciones y objetivos específicos**:

1. **DIAGNÓSTICO**: Diagnosticar el nivel de contaminación por antibióticos y presencia de bacterias resistentes a antibióticos en las aguas del territorio POCTEFA.
2. **PREVENCIÓN**: Aplicar nuevos productos como aditivos alimentarios para reducir el uso de antibióticos en producción animal.
3. **ELIMINACIÓN**: Desarrollar nuevas tecnologías para la eliminación de antibióticos en aguas del territorio POCTEFA.

Los **socios del proyecto** involucran a tres universidades españolas, un centro de investigación francés y dos empresas:

- **Universidad de Zaragoza (UNIZAR)**
 - Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores
 - Grupo Agua y Salud Ambiental
 - Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos
- **Universidad de Navarra (UNAV)**
 - Departamento de Microbiología y Parasitología
 - Departamento de Farmacología y Toxicología
- **Universidad de Lleida (UdL)**
 - Grupo de Físicoquímica Ambiental
 - Departamento de Producción Animal
 - Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal
- **Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux (IPREM-CNRS)**
- **Laboratorios Enosán S.L.**
- **Navarra de Infraestructuras Locales S.A. (NILSA)**

1. DIAGNÓSTICO

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y BACTERIAS RESISTENTES EN EL ÁREA DE INFLUENCIA DE EXPLOTACIONES GANADERAS

UNIZAR, UNAV, IPREM-CNRS y NILSA han llevado a cabo los trabajos contenidos en la Acción: "Detección y cuantificación de antibióticos y bacterias resistentes en el área de influencia de explotaciones ganaderas".

En relación a la detección de antibióticos, el Grupo de Investigación Agua y Salud Ambiental, perteneciente a UNIZAR, ha diseñado la **red de muestreo** y ha tomado en el periodo 2018-2021 a lo largo de **6 campañas** un total de **240 muestras** en todo el territorio POCTEFA. Esta red ha abarcado en España la margen izquierda de la cuenca hidrográfica del **Ebro**, la cuenca hidrográfica del **Cantábrico** y en Francia la del **Adour-Garonne**. Las muestras han sido analizadas por el IPREM-CNRS, utilizando instrumentación analítica de última generación, lo que ha permitido detectar **antibióticos** a niveles de ultratrazas.

A la vista de los resultados obtenidos se han extraído las siguientes conclusiones:

- En las aguas superficiales se detecta ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, lincomicina, claritromicina, eritromicina, rifampicina, sulfametoxazol, sulfapiridina, dapsona, oxitetraciclina y especialmente amoxicilina, azitromicina, trimetoprima, **enrofloxacin** y **sulfadiazina**, detectándose estos dos últimos antibióticos de manera prácticamente **crónica**.
- Dentro del territorio POCTEFA, los ríos españoles muestreados presentan unas mayores concentraciones de antibióticos que los ríos franceses.
- Las mayores concentraciones de antibióticos se han detectado en zonas rurales de la cuenca del Ebro, en tramos medios o bajos de los ríos, donde predomina la actividad ganadera intensiva y agrícola como motor económico. Esto ocurre especialmente en las masas de agua próximas a **granjas intensivas de porcino y aves** en la subcuenca del Segre, Gállego y Cinca, donde se ha detectado especialmente **enrofloxacin**.
- En las **aguas residuales** procedentes de grandes núcleos de población, se ha detectado la presencia habitual de **azitromicina, enrofloxacin y trimetoprima** en los colectores de entrada a las depuradoras muestreadas. Estos antibióticos también se han detectado en el efluente del hospital muestreado.
- Aunque las **depuradoras** no están diseñadas con ese fin, son **capaces de reducir la carga de antibióticos** que se emite al medioambiente. Por ejemplo, el antibiótico sulfadiazina, presente en los colectores de entrada de aguas residuales, lo hace en menor concentración en los efluentes de salida y aún menor en los ríos receptores. Este comportamiento se asocia con la capacidad de eliminación de esta sustancia en las propias depuradoras.

Por otro lado, el Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAV, se ha encargado de estudiar la presencia de patógenos de prioridad alta y crítica incluidos en la lista de "patógenos prioritarios resistentes a antibióticos" (penicilinas, carbapenems y vancomicina) publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en **80 muestras de aguas** de la zona POCTEFA. Además, se incluyó la detección de Enterobacterias resistentes a colistina, por ser el antibiótico de elección para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes. La idea ha sido abordar el problema de las resistencias a antibióticos desde

la perspectiva "One Health", implementando la vigilancia de estos patógenos en entornos acuáticos para analizar su propagación y el riesgo potencial de transmisión de resistencias.

A la vista de los resultados obtenidos se han extraído las siguientes conclusiones:

- Las **bacterias resistentes** a las familias de antibióticos consideradas (penicilinas, carbapenems, vancomicina y colistina) están presentes en el **96% de los ríos** y el **100% de estaciones depuradoras** de aguas residuales y **colectores** de hospitales y mataderos estudiados.
- Se aislaron **55 cepas de la lista de patógenos prioritarios** de la OMS, de las cuales el 58% lo fueron en estaciones depuradoras de aguas residuales y colectores.
- La caracterización fenotípica y genotípica de las **cepas aisladas** demostró que el **96%** eran **multirresistentes** y que la resistencia a penicilinas fue la más prevalente.
- En resumen, la **presencia de bacterias multirresistentes clínicamente relevantes** en los ambientes acuáticos estudiados, demuestra la necesidad de mejorar la vigilancia y el tratamiento de las aguas residuales de mataderos, hospitales y estaciones depuradoras de aguas residuales, con el fin de minimizar la dispersión de resistencias a través de los efluentes de estas áreas.

2. PREVENCIÓN

NUEVOS BACTERICIDAS BASADOS EN NANOMATERIALES PARA SUSTITUIR O REDUCIR EL USO DE ANTIBIÓTICOS EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL TERRITORIO POCTEFA

LABORATORIOS ENOSAN S.L., UNIZAR, UNAV y UdL han llevado a cabo las actividades contenidas en la acción "Nuevos bactericidas basados en nanomateriales para sustituir o reducir el uso de antibióticos en explotaciones ganaderas del territorio POCTEFA".

El objetivo de esta acción ha sido evaluar un **nanomaterial a base de caolín-plata** desarrollado por LABORATORIOS ENOSAN S.L. para ser usado como **aditivo alimentario en piensos**, con el fin de reducir la incidencia de enfermedades infecciosas y el subsecuente uso de antibióticos en producción animal. Este nanomaterial ha sido distribuido entre UNIZAR, UNAV y UdL, para realizar distintos tipos de estudios:

- Caracterización fisicoquímica.
- Estudio de su actividad antibacteriana.
- Estudio de su bioseguridad.
- Evaluación de su uso en producción animal.
- Evaluación del impacto ambiental y microbiológico del uso de purines en agricultura.

El Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores de UNIZAR ha realizado la **caracterización** del nanomaterial, llegando a las siguientes conclusiones:

- El material consiste en micropartículas de caolín recubiertas de **nanopartículas de plata metálica** con un diámetro medio de 30 nm.
- El contenido en plata del nanomaterial es del 0,8% en masa.
- En medios acuosos, así como en ensayos *in vitro* de simulación de procesos digestivos realizados tanto en cerdos como en pollos, se ha comprobado que la **plata** se libera fundamentalmente **en formas disueltas**, sin que se liberen de forma apreciable nanopartículas.

El Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAV ha evaluado la **actividad antibacteriana** del nanomaterial a base de plata frente a un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas multirresistentes. Las conclusiones que se derivan de este estudio son:

- **El nanomaterial tiene actividad antibacteriana** frente a un amplio espectro de bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como frente a cepas sensibles y resistentes a antibióticos.
- Se ha observado mayor actividad del nanomaterial frente a bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella*, aunque fue necesario aumentar su concentración para eliminar completamente bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*.
- Se ha observado un efecto bactericida del nanomaterial más rápido frente a bacterias Gram negativas, mientras que se necesitó de al menos 24 horas para observar una

reducción en la viabilidad de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*.

- Los estudios de sinergia mostraron un efecto aditivo del uso combinado de antibiótico (amoxicilina) junto con el nanomaterial.

Por otro lado, el Departamento de Farmacología y Toxicología de la UNAV ha evaluado la **bioseguridad del nanomaterial a base de plata**. En concreto, ha realizado una evaluación completa de la genotoxicidad siguiendo la estrategia de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que contempla una batería de ensayos *in vitro* para poder detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, así como roturas en el ADN y daño oxidativo, seguida de una evaluación *in vivo* de su toxicidad.

Las conclusiones que se derivan de estos estudios son:

- Por lo que se refiere a la toxicidad en general, se ha determinado un nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) de 2000 mg de nanomaterial por kg de peso corporal por vía oral en ratas Wistar.
- Tanto los estudios realizados de genotoxicidad *in vitro* como *in vivo* permiten confirmar que el nanomaterial a base de plata se comporta como **no genotóxico**.

Por lo que se refiere a la **evaluación experimental del uso del nanomaterial en explotaciones ganaderas**, los Departamentos de Producción Animal de UdL y UNIZAR han realizado diferentes estudios con el objetivo de valorar y validar su uso como **aditivo alimentario en cerdos y pollos**. Los estudios que se realizaron son los siguientes:

1. Valoración del uso del nanomaterial para mantener el estado sanitario y mejorar los rendimientos productivos de cerdos en transición (UNIZAR).
2. Estudio de sensibilidad/tolerancia en lechones en transición (UNIZAR).
3. Efecto del nanomaterial sobre los rendimientos productivos y parámetros digestivos de pollos de cebo (UNIZAR).
4. Efecto de la sinergia entre el nanomaterial a base de plata y un antibiótico de referencia sobre los rendimientos productivos y parámetros digestivos de lechones en transición (UdL).

Los estudios se realizaron tanto en **granjas comerciales** (estudios 1 y 2) como en **granjas experimentales** (estudios 3 y 4), evaluándose los siguientes parámetros:

- rendimientos de producción.
- impacto en el proceso metabólico, digestivo y microbioma intestinal.
- mortalidad, morbilidad y tratamiento terapéutico.
- retención tisular de plata en tejidos.
- evaluación del efecto sinérgico (antibiótico/nanomaterial a base de plata).

Las principales conclusiones derivadas de los estudios realizados son las siguientes:

- Estudio 1. Aunque los estudios en granjas comerciales presentan mayores incertidumbres al trabajar en condiciones prácticas de producción, la incorporación del nanomaterial a base de plata en el pienso de **lechones** en fase de iniciación (2 g de nanomaterial por kg de pienso) promovió un **aumento de la eficacia en la utilización del alimento**.
- Estudio 2. A partir de los resultados de este experimento de tolerancia en **lechones** se ha comprobado que la incidencia del desafío sanitario en la granja comercial resultó en una **mortalidad inferior** cuando se administró el nanomaterial a base de plata como aditivo alimentario.
Por lo que se refiere a los resultados productivos, también se observó una respuesta positiva sobre el crecimiento durante la fase de iniciación.
No se observaron diferencias relevantes en cuanto a mortalidad y otros parámetros sanguíneos en los lechones que recibieron dosis 10 veces más elevadas a la pauta (2 g de nanomaterial por kg de pienso), lo que **se descarta un posible efecto tóxico** de la administración de dosis altas del aditivo.
- Estudio 3. La incorporación del nanomaterial a base de plata en el pienso promovió un mayor crecimiento de los **pollos**, lo que unido a una menor ingestión de pienso se tradujo en una **producción más eficiente**.
Las variaciones en la microbiota fecal asociada a la ingesta del nanomaterial a base de plata en el pienso no fueron significativas.
- Estudio 4. En el estudio combinado utilizando el nanomaterial a base de plata y/o un antibiótico convencional (amoxicilina), tanto el uso del nanomaterial como el de antibiótico permitieron mejorar los rendimientos con respecto al control sin nanomaterial ni antibiótico, aunque no se observaron diferencias significativas ni en las tasas de engorde ni en los índices de crecimiento entre los diferentes grupos.
Tampoco se observaron diferencias en prevalencia de enfermedades respiratorias y diarrea en los animales del estudio, ni en lesiones histopatológicas del lumen intestinal. El uso combinado del nanomaterial a base de plata y una dosis reducida de antibiótico (33% de la dosis completa) permitió obtener rendimientos semejantes que utilizando solamente la dosis completa de antibiótico.
Con respecto a la **microbiota digestiva**, el nanomaterial a base de plata **no modificó sustancialmente la población bacteriana del intestino delgado**, aunque promovió especies relacionadas con la salud intestinal e inhibió otras relacionadas con patologías digestivas, al contrario de lo que sucedió cuando se utilizó el antibiótico, que tuvo un marcado efecto antibacteriano. En intestino grueso el efecto del nanomaterial favoreció bacterias relacionadas con el uso de nutrientes e inhibió especies productoras de metano, con una mejora potencial del rendimiento del animal y un menor impacto al medio ambiente.
- En todos los estudios se realizó un seguimiento de la acumulación de plata en los tejidos animales. No se detectó plata en las muestras de tejido muscular, mientras que en tejido hepático se observó una ligera acumulación. Estos resultados indican un **bajo riesgo para la salud humana** derivado del consumo de carne de ganado suplementado con el nanomaterial a base de plata.

Por último, el Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal de la UdL ha llevado a cabo la **evaluación del impacto ambiental y microbiológico del purín procedentes de ganado porcino alimentado con piensos suplementados con el nanomaterial a base de plata**. Las posibles consecuencias de su uso como enmienda orgánica en cultivos agrícolas se han basado en los siguientes estudios:

- Caracterización fisicoquímica del suelo.
- Caracterización microbiológica del suelo.
- Evolución temporal a lo largo del ciclo de cultivo.
- Evolución a lo largo del perfil vertical del suelo.
- Contenido total y distribución de las diferentes especies de plata en el suelo.
- Caracterización agronómica del rendimiento del cultivo.
- Contenido total de plata en tejido vegetal foliar y en grano.

El estudio se ha realizado en una plantación experimental de maíz situada en Lleida. El experimento se realizó en 12 parcelas de maíz de ciclo corto sembrado en junio y cosechado en noviembre, en las que se aplicaron convenientemente los distintos purines obtenidos durante el ciclo de producción porcina correspondiente al anterior estudio 4 realizado en la UdL, y que incluían:

- Purín control.
- Purín procedente de alimentación con nanomaterial a base de plata.
- Purín procedente de alimentación con antibiótico.
- Purín procedente de alimentación con nanomaterial a base de plata y antibiótico.

Las principales conclusiones derivadas de los estudios realizados son las siguientes:

- No se han observado diferencias significativas en el contenido de plata en las muestras de suelo tratadas con los diferentes tipos de purines, con valores entre 45 y 100 µg/kg de plata.
- Dentro de cada tratamiento, no se han observado diferencias significativas en el contenido total de plata en las muestras de suelo a lo largo de la serie temporal de muestreos realizados a lo largo de los seis meses de cultivo. Los contenidos de plata no fueron estadísticamente diferentes de los medidos en los suelos antes de la aplicación de los purines.
- Los contenidos de plata de los tejidos vegetales (tallo/hojas) fueron muy bajos (1-3 µg/kg), cercanos a los límites de detección del método analítico. No se observaron diferencias significativas en los contenidos de plata entre los cuatro tratamientos. No se ha detectado plata en los granos de maíz en ninguno de los tratamientos. A la vista de estos resultados, no existe riesgo por la posible presencia de plata para la salud animal o humana derivado del consumo del maíz cultivado en las condiciones del estudio.
- No se han observado diferencias significativas para la biomasa total, el rendimiento de grano y los componentes del rendimiento entre los tratamientos estudiados. El rendimiento medio de grano del experimento fue de 13.126 kg/ha de materia seca y que es el habitual en la zona, no registrándose disminución del rendimiento por los

tratamientos utilizados.

- La aplicación de los purines no tuvo un impacto significativo sobre la diversidad ni la estructura microbiana del suelo.
- La evaluación de los diferentes indicadores de diversidad genética del microbioma de las muestras de suelo no indica diferencias significativas entre los cuatro tratamientos.
- La **ausencia de efectos significativos derivados de la aplicación de purines** procedentes de producción porcina suplementada con un nanomaterial a base de plata se justifica por los contenidos intrínsecos de plata en el suelo de cultivo utilizado, entre 46 y 230 µg/kg, que son habituales en los suelos agrícolas de la comarca del Segrià, debido a sus características geoquímicas naturales. En estas condiciones, la aportación de plata procedente del purín no es significativa frente a los niveles naturales, por lo que el **impacto ambiental** derivado de la plata en las condiciones del estudio es **mínimo**.

3. ELIMINACIÓN

DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS DE ELIMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES

UNIZAR, IPREM-CNRS y NILSA han llevado a cabo los trabajos contenidos en la acción "Desarrollo de nuevas tecnologías de eliminación de antibióticos en estaciones depuradoras de aguas residuales". En esta acción se han estudiado tres tecnologías a escala laboratorio y a escala piloto semi-industrial:

- Oxidación con Ferrato Potásico (IPREM-CNRS y NILSA)
- Carbón Activo en Polvo (UNIZAR y NILSA)
- Fotocatálisis con nanopartículas de dióxido de titanio (UNIZAR y NILSA)

Se han analizado los resultados obtenidos para la eliminación de los antibióticos seleccionados en el estudio (amoxicilina, azitromicina, sulfadiazina, enrofloxacina y trimetoprima) con cada una de las tecnologías individualmente y con la combinación de algunas de ellas.

A la vista de los resultados obtenidos a escala laboratorio, se han obtenido los parámetros de diseño para los procesos a escala real, y se han validado a escala piloto semi-industrial demostrativo. Se ha empleado tanto agua destilada fortificada con antibióticos, como agua residual real, para evaluar el efecto de la matriz.

Tras realizar un estudio técnico-económico se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La **oxidación con ferrato potásico** ha resultado ser efectiva para la eliminación de los antibióticos seleccionados en el proyecto. Sin embargo, la poca estabilidad del producto, junto con su precio, y la necesidad de corrección de pH durante el proceso, hace que este **tratamiento sea poco viable a escala real** como sistema de depuración.
- La **adsorción con carbón activo en polvo** es **capaz de eliminar los antibióticos** seleccionados, así como los subproductos de degradación de los antibióticos en aguas residuales. Este tratamiento permite la reutilización del carbón activo hasta su colmatación. El carbón activo se recupera de forma eficaz aplicando un tratamiento de coagulación-floculación-decantación con la adición del coagulante cloruro de hierro (III). De esta manera, se produce un residuo que hace necesaria su **regeneración**.
- La **fotocatálisis con dióxido de titanio** en suspensión permite **degradar los antibióticos** seleccionados en aguas residuales. Este tratamiento permite la reutilización del catalizador. Además de los antibióticos seleccionados, este proceso elimina otros antibióticos y productos farmacéuticos de uso común. El dióxido de titanio se recupera de forma eficaz de la suspensión mediante la aplicación de un tratamiento de coagulación-floculación-decantación. Esta recuperación hace posible la **reutilización** del catalizador.

Se ha empleado la patente de NILSA (ES2585087) del proceso de fotocatálisis con nanopartículas de dióxido de titanio y el reactor para llevarlo a cabo, que ha demostrado ser capaz de eliminar eficazmente los antibióticos seleccionados en aguas residuales (amoxicilina, azitromicina, sulfadiazina, enrofloxacina y trimetoprima).

La **fotocatálisis con nanopartículas de dióxido de titanio** ha sido **combinada** con una segunda etapa de **adsorción con carbón activo a escala piloto**. La combinación de estos

procesos consigue **mejorar los resultados de eliminación de antibióticos** obtenidos por separado. La planta de tratamiento de aguas, diseñada y construida en este proyecto, es capaz de **eliminar o reducir considerablemente la concentración de enrofloxacin, trimetoprima, azitromicina, sulfadiazina (eliminación superior al 80%) y los principales subproductos de degradación de amoxicilina** en una matriz compleja tal como efluente de estación depuradora de aguas residuales o agua residual de matadero. Se confirma que **no se emite titanio** en el efluente de la planta de tratamiento de aguas.

El proceso combinado tiene un coste por m³ tratado similar a otros tratamientos terciarios empleados para eliminar microorganismos patógenos y compuesto orgánicos lentamente biodegradables de las aguas residuales. Sin embargo, este coste es sensiblemente superior al de los procesos habitualmente utilizados en las estaciones depuradoras de aguas residuales para la eliminación biológica de materia orgánica. Por este motivo, resultará **más económico** y efectivo de aplicar este **tratamiento en el origen del vertido** como son hospitales, empresas farmacéuticas, mataderos etc..., en vez de como tratamiento terciario de una estación depuradora de aguas residuales. De esta forma, el caudal de tratamiento resulta inferior y los focos de emisión presentan una concentración superior de antibióticos que el agua tratada en una estación depuradora de aguas residuales, favoreciendo la cinética de la reacción de fotocátalisis.