

Capítulo 9

Uso de antibióticos en la producción de DDGS

Introducción

Uno de los desafíos constantes en las plantas de producción de etanol para combustible es el control de la contaminación bacteriana durante la fermentación. Las bacterias que producen ácido láctico (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*) son los contaminantes más comunes (Bischoff et al., 2009; Leja y Broda, 2009; Muthaiyan y Ricke, 2010; Skinner y Leathers, 2004). Entre otros contaminantes bacterianos se encuentran *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium granulosum* y *Clostridium aerotolerans*, que también presentan efectos nocivos sobre la producción del etanol (Leja and Broda, 2009; Skinner and Leathers, 2004). Las bacterias del ácido láctico son de preocupación porque compiten con la levadura (que produce almidón) por factores de crecimiento esenciales, además de que producen ácidos orgánicos, entre ellos el ácido láctico y el acético, que inhiben el crecimiento de las levaduras (Skinner and Leathers, 2004). De hecho, las concentraciones bajas de ácido láctico de 1 a 4% inhiben el crecimiento de las levaduras, mientras que el 0.3% de concentración de ácido acético detiene la fermentación (Hynes et al., 1997; Weigel et al., 1996). Las bacterias del ácido láctico son especialmente problemáticas porque pueden tolerar altas temperaturas, bajos pH y altas concentraciones de etanol que se encuentran en el proceso de producción del etanol para combustible. Además, las bacterias del ácido láctico crecen rápidamente y alcanzan cifras altas de células viables antes de terminar la fermentación de las levaduras (Bischoff et al., 2009; Hynes et al., 1997; Leja and Broda, 2009). El no poder identificar y controlar la contaminación bacteriana puede llevar a que se detenga la fermentación, en la que no todo el almidón se convierta a alcohol. El estancamiento de la fermentación resulta en que se detengan los fermentadores y en la pérdida del tiempo de producción, mientras que el sistema se limpia de los contaminantes y se re-inocula (Bischoff et al., 2009; Muthaiyan and Ricke, 2010).

La contaminación bacteriana reduce el rendimiento del etanol en 1 a 5% (Narendranath et al., 1997) y resulta en la producción de DDGS de menor calidad. Las bacterias pueden prosperar durante la producción del etanol para combustible debido a que el proceso no es estéril ni tiene condiciones de cultivo puras (Bischoff et al., 2009). Se pueden introducir las bacterias contaminantes al proceso a través de las materias primas que se utilizan para hacer el etanol (el tratamiento térmico de dichas materias primas no elimina todos los contaminantes), en el agua que se usa para bombear y los sellos del agitador, destilado residual mal almacenado, levaduras secas activas y suspensiones de levaduras que se usan como inóculos (Heist, 2009; Leja and Broda, 2009; Mäkinen et al., 1992; Muthaiyan and Ricke, 2010; Skinner-Nemec et al., 2007). Una limpieza inadecuada, especialmente de los recipientes y líneas de transferencia permite que las bacterias continúen prosperando en el equipo que se utiliza en el proceso de molienda en seco. Las bacterias forman biopelículas, que son colonias bacterianas activas y que posiblemente sean resistentes a los antibióticos y la limpieza (Rich et al., 2011; Skinner-Nemec et al., 2007). Los impedimentos para el flujo de procesos también pueden ser una fuente de colonización bacteriana (Heist, 2009).

Uso de antibióticos en la producción de etanol y DDGS

Durante muchos años se han usado antibióticos para controlar infecciones bacterianas durante la fermentación y la producción de etanol (Juranek y Duquette, 2007), de los cuales la virginiamicina y la penicilina han sido los que más comúnmente se han usado. Cuando se utilizan antibióticos, se añaden a los fermentadores en cantidades muy pequeñas con relación a las tasas de uso en alimentos para animales. Por ejemplo, cuando la virginiamicina (Lactrol) se añade a los fermentadores, generalmente es a niveles de 0.25 a 2.0 ppm, mientras que la virginiamicina (Stafac) se añade a los alimentos porcinos a niveles de 5.5 a 110 ppm. No se han publicado datos con respecto al grado del uso de antibióticos en la producción de etanol para combustible.

Hay dos preocupaciones importantes con el uso de los antibióticos en la producción de producción de etanol para combustible. En primer lugar, está el potencial de que las bacterias desarrollan resistencia, lo que daría como resultado antibióticos ineficaces para controlar infecciones (Muthaiyan and Ricke, 2010). En segundo lugar, existe la preocupación con respecto al potencial de los residuos de antibióticos que permanecen en los alimentos para animales (por ejemplo en los DDGS) y en tejidos animales que se usan para consumo humano (Benz, 2007). Se cree que se desarrolla resistencia a los antibióticos como resultado de un mal uso de éstos. Esto incluye la sobredosificación cuando no se observa efecto y la subdosificación cuando se observa un control eficiente. Por lo tanto, se han planteado preocupaciones de que el consumo de DDGS que contienen residuos de antibióticos por los animales pueda resultar en que animales y seres humanos que consuman productos de esos animales desarrollen resistencia a los antibióticos usados en la producción de etanol para combustible.

Autoridades reguladoras del uso de los antibióticos en la producción de etanol

La Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA) tiene autoridad reguladora para todos los medicamentos, aditivos e ingredientes que se utilizan en alimentos para animales, así como el establecimiento de límites de los contaminantes de éstos (Benjamin, 2009; de Alwis y Heller, 2012) correlacionados a productos alimenticios de origen animal que finalmente consumen los seres humanos. Esta autoridad reguladora también incluye a los aditivos que se usan en la producción de los DDGS (Benjamin, 2009).

En noviembre de 1993, el Centro de Medicina Veterinaria de la FDA emitió una "carta de no objeción" para el uso de la virginiamicina en concentraciones de dosis que van de 2 a 6 ppm en la fase de fermentación del etanol y producción de DDGS, y no tenía objeción a los posibles residuos de virginiamicina de 0.2 a 0.5 ppm en los DDGS. Esta declaración se basó con el cálculo de los residuos de virginiamicina que resultan de las concentraciones de inclusión en la producción de etanol, los residuos estimados en los DDGS y en la dieta del animal que no contenga más de 20% de DDGS. Además, se declaró que era poco probable que el CVM tomara medidas reguladoras contra los alimentos que contienen DDGS con concentraciones de

residuales de virginiamicina por debajo de 0.5 ppm. Las concentraciones de virginiamicina por debajo de 0.5 ppm no presentan riesgo para los pollos de engorda, pavos, cerdos o ganado que consume el alimento, ni para los humanos que consumen los alimentos derivados de estos animales (Benz, 2007). En esta carta de no objeción no se incluyó ningún otro antibiótico. Actualmente, hay lineamientos mínimos y no hay reglamentos que la FDA haga valer, ni se monitorean residuos antimicrobianos en los coproductos de destilería producidos por las plantas de etanol de combustible.

Debido al espectacular aumento en la producción de DDGS y en el uso en alimentos para animales durante los últimos años, la FDA ha expresado tres preocupaciones principales relacionadas con los residuos de antibióticos en los granos de destilería: 1) el potencial de transferir los residuos de antibióticos de los granos de destilería a tejidos animales, 2) el potencial de dañar al ser humano que coma estos tejidos animales que contienen residuos de antibióticos y 3) el potencial de dañar la salud animal si están presentes los residuos de antibióticos en los granos de destilería. Se desconoce la prevalencia del uso de antibióticos en la industria del etanol, el nivel de detección de residuos y la presencia de la actividad biológica en los residuos en los granos de destilería.

Debido a estas preocupaciones y a los datos limitados del grado y niveles del uso de antibióticos en la producción de etanol y de los granos de destilería, la FDA inició un estudio nacional en diciembre de 2007, y un método multianalito calibrado para solamente detectar residuos de virginiamicina, eritromicina y tilosina (National Grain and Feed Association 2010; Olmstead, 2009). Los resultados preliminares de este estudio se notificaron en enero de 2009. Los residuos de antibióticos se detectaron en 24 de 45 muestras (obtenidas de plantas de etanol en varios estados) que se habían analizado hasta ese momento, de las cuales, 15 de las 45 muestras contenían residuos de virginiamicina, 12 residuos de eritromicina y 5 residuos de tilosina. La FDA no ha publicado estos resultados, ni comentado sobre las implicaciones de la salud y la inocuidad, ni tampoco hasta la fecha ha implementado medidas reguladoras.

En 2012, la FDA realizó un segundo estudio mediante un método analítico descrito por Alwis y Heller (2010) para verificar 13 residuos de antibióticos. Del total de las 46 muestras analizadas, 3 muestras presentaban concentraciones detectables de eritromicina, virginiamicina y penicilina. La primera muestra contenía 0.58 ppm de eritromicina, la segunda contenía 0.24 ppm de penicilina y 0.15 ppm de virginiamicina, y la tercera muestra contenía 0.16 ppm de virginiamicina. La eritromicina tiene un límite de detección de 0.5 ppm, la penicilina de 1.0 ppm y la virginiamicina de 0.1 ppm (Luther, 2012).

Cabe notar que la FDA utilizó un método de detección de residuos multianalito no aprobado por la FDA capaz de detectar residuos de antibióticos de hasta 0.1 ppm (base materia seca) en coproductos de destilería (Heller y de Alwis, 2008). La precisión de este método va de 88 a 111% en un intervalo cuantitativo de 0.1 a 1.0 ppm (Heller y Hemakanthi de Alwis, 2008). El único método aprobado por la FDA para cuantificar los residuos de antibióticos en alimentos balanceados y sus ingredientes es para la virginiamicina. Este método aprobado es diferente al utilizado por la FDA (Heller y de Alwis, 2008) para cuantificar residuos de antibióticos en muestras de granos de destilería en su estudio reciente. El método aprobado es un bioensayo desarrollado por SmithKline Beecham (ahora propiedad de PhibroChem) y tiene un límite de

detección de residuos de virginiamicina de 0.1 ppm, muy por debajo del 0.5 ppm citado en la "carta de no objeción" de la FDA de 1993. Es de gran importancia utilizar metodología analítica adecuada cuando se intenta detectar residuos de antibióticos en los coproductos de destilería. PhibroChem notificó en julio de 2009 los resultados de las pruebas de 42 muestras de granos de destilería húmedos y secos y de DDGS, obtenidos de 11 plantas de etanol mediante un laboratorio independiente y el laboratorio de servicio técnico de Phibro. No se detectaron residuos de virginiamicina en ninguna de las muestras que utilizaron el procedimiento de bioensayo aprobado por la FDA.

En enero de 2009, en una Reunión Internacional de Reglamentación de Alimentos Balanceados en Atlanta, GA, el portavoz del Centro de Medicina Veterinaria de la FDA anunció que "el organismo está revisando lo adecuado de su "carta de no objeción" de noviembre de 1993 bajo la cual el organismo había ejercido discreción de la obligatoriedad que permite residuos de hasta 0.5 partes por millón (ppm) de virginiamicina en los productos de granos de destilería bajo el ambiente reglamentario actual".

Tipos de antibióticos que pueden usarse en la producción de etanol

Los antibióticos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos. Los antibióticos que eliminan bacterias *in vitro* son bactericidas, mientras que los bacteriostáticos disminuyen o detienen el crecimiento bacteriano (Merck Sharpe & Dohme, 2004).

Virginiamicina

La virginiamicina es un antibiótico macrólido que comprende de dos componentes: factores M y S (Vannuffel and Cocito, 1996). Los factores S y M interactúan de forma sinérgica para aumentar la actividad antimicrobiana del producto. La virginiamicina es bacteriostática cuando los factores S y M no están relacionados y es un antibiótico bactericida cuando se relacionan ambos componentes (Merck Sharpe & Dohme, 2004; Hynes et al., 1997; Vannuffel and Cocito, 1996). Los dos factores son más activos con una relación M a S es de 2:1 o 1:1, y el factor M es la primera actividad de antibiótico limitante (Cocito, 1979). En combinación, los dos factores funcionan sinérgicamente para reducir la capacidad de formación de colonias de las bacterias, pero por separado, cada factor sólo reduce la viabilidad de la mayoría de las bacterias después de un periodo de incubación excesivamente largo. De hecho, la actividad de los dos componentes junta es de 10 a 100 veces mayor que la actividad de cada uno de forma individual (Cocito, 1979).

La virginiamicina es un antibiótico eficaz de espectro limitado para controlar bacterias grampositivas, tales como la mayoría de las bacterias ácidolácticas (Cocito, 1979; Hynes et al., 1997; Islam et al., 1999). La eficacia de la virginiamicina contra las especies *Lactobacilli* depende de la cepa y la fase de crecimiento. Actualmente, se ha notificado algo de resistencia a la virginiamicina de varios géneros de bacterias grampositivas, así como la descomposición de la virginiamicina por las especies de *Lactobacilli* (Hynes et al., 1997). Además, existen informes de resistencia cruzada de los antibióticos macrólidos (por ejemplo, tilosina y eritromicina) y la virginiamicina para bacterias grampositivas (Cocito, 1979). Sin embargo, es menos común la resistencia a las estreptograminas, como la virginiamicina, que cualquier otro inhibidor de la síntesis de proteína (Vannuffel and Cocito, 1996).

En la fermentación del etanol, la virginiamicina normalmente se añade a los fermentadores a un nivel de 0.25 a 2.0 ppm, aunque la "carta de no objeción" de la FDA permite una tasa de uso máximo de 2 a 6 ppm. La virginiamicina es eficaz en el control de las bacterias ácidolácticas, que previenen reducciones del rendimiento de etanol hasta en un 11% en presencia de las especies de *Lactobacilli* (Hynes et al., 1997). La estabilidad de la virginiamicina no se ve muy afectada en las temperaturas que van de 25 a 35°C y en un pH de 3.8 a 4.8 durante 72 horas durante la fermentación (Islam et al., 1999). Sin embargo, el proceso de destilación (30 minutos a 100°C) ha mostrado que inactiva de manera significativa la virginiamicina donde se eliminó el 97.4% de la actividad de la virginiamicina original bajo estas condiciones (Hamdy et al. 1996). PhibroChem, el productor exclusivo de virginiamicina para la industria del etanol, indica que las operaciones de secado típicas a temperaturas de hasta 426.6°C (800° F) va a resultar en una descomposición rápida de los residuos de virginiamicina en los secadores de DDGS. De las referencias anteriores, se puede concluir que los residuos de virginiamicina se destruyen con facilidad si se experimentan temperaturas suficientemente altas durante las operaciones de destilación y de secado de los DDGS.

La virginiamicina ha sido aprobada por la FDA para su uso en alimentos balanceados. El consumo de DDGS que contienen residuos de virginiamicina por parte de los animales productores de alimentos representan poco o ningún daño sobre la salud de los animales o del ser humano (Juranek and Duquette, 2007). Hay varios factores que previenen que sea dañina

la virginiamicina en los coproductos de la producción del etanol de combustible para los animales y el ser humano. En primer lugar, la virginiamicina se inactiva durante el proceso de destilación del etanol (Hynes et al., 1997). Segundo, la virginiamicina no se absorbe en el intestino y no se ha encontrado en los riñones, hígado o músculos de pollos alimentados con virginiamicina (Butaye et al., 2003; Juranek and Duquette, 2007). Tercero, la virginiamicina se ha alimentado a animales en concentraciones mucho más altas que las aprobadas por la FDA sin efectos negativos sobre la salud de los animales. Finalmente, las concentraciones de virginiamicina en los DDGS (de 0.2 a 0.5 ppm) son mucho más bajas que las que están actualmente aprobadas por la FDA para uso en los alimentos para animales (FDA, 2010; Juranek and Duquette, 2007). Los resultados del estudio de SmithKline Beecham, que se proporcionaron a la FDA y a organismos reglamentadores extranjeros como parte del proceso de reprobación de la virginiamicina para que se usara de forma legal e inocua en alimentos para animales, se muestran en el **cuadro 1**. Dichos resultados muestran que incluso cuando se alimenta la virginiamicina a animales a niveles mucho mayores que los legalmente aprobados, no se detectaron residuos en los tejidos animales (Juranek y Duquette, 2007).

La FDA también realizó en 2004 una evaluación cuantitativa de riesgo de virginiamicina y salud humana, de la que concluyó que no representa ninguna amenaza para la salud humana. Algunos de los datos que apoyan esta conclusión se muestran en el **cuadro 2**. Por lo tanto, la virginiamicina es un antibiótico inocuo y eficaz para utilizarse en la industria del etanol para combustible.

Cuadro 1. Efecto de la alimentación de niveles altos de virginiamicina sobre los residuos tisulares en varias especies animales¹.

Especie	Dosificación, ppm	Período de retiro, días*	Músculo ppm	Hígado ppm	Riñón ppm	Grasa ppm
Cerdos	170.5 ppm de alimento (18 semanas)	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Terneritas	50 mg/kg peso corp., dosis oral	3	<0.1	<0.1	<0.2	<0.2
Trucha**	40 ppm de alimento (12 semanas)	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Conejos**	80 ppm de alimento (4 semanas)	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Pollos de engorda	110 ppm de alimento (4 semanas)	0	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Ponedoras - huevos**	80 ppm de alimento (6 meses)	0	Clara <0.02	Yema <0.05		

* El periodo de retiro se refiere al número de días en que se eliminó la virginiamicina del alimento antes de la recolección.

**La virginiamicina no está aprobada para usarse en truchas, conejos o ponedoras.

¹Juranek y Duquette, 2007.

Cuadro 2. Efectos del aumento de los niveles de alimentación de la virginiamicina y de exceder los niveles de uso aprobados sobre la salud y toxicidad de varias especies animales¹

Especie	Dosis	Efectos
Ganado	25, 75, 125 o 625 g/ton alimento balanceado, 500 ppm (23 semanas)	Sin efectos adversos sobre la salud o pruebas de toxicidad
Terberos	80 ppm de alimento (4 meses)	Sin efectos adversos
Pollos	2,000 ppm alimento (24 hr), 22, 66 o 110 ppm en alimento balanceado (7 sem.)	Sin pruebas de toxicidad
Cerdos	1,600 mg/kg peso corp. (2 sem.), 500 mg/kg peso corp. (3 meses)	Sin efectos adversos

¹Juranek y Duquette, 2007

Penicilina

La penicilina no está aprobada por la FDA para utilizarse en la producción de etanol y DDGS. Sin embargo, a menudo se añade a concentraciones por arriba de 1.5 mg/L en la producción de etanol para combustible, debido a la posibilidad de una degradación inducida enzimática del antibiótico (Hynes et al., 1997). Esta concentración es mucho más baja que las concentraciones aprobadas para uso en animales para consumo humano y presenta actividad tanto bacteriostática como bactericida sobre bacterias grampositivas y algunos cocos gramnegativos, así como *actinomyces* y *spirochaetes*. La estabilidad de la penicilina se ve directamente afectada por la temperatura y el pH. Las altas temperaturas (>35°C) y los valores de pH mayores a 8.0 y menores a 4.0 causan que la penicilina se haga inestable (Kheirloom et al., 1999). Islam et al. (1999) notificaron que a las 48 horas, la penicilina G (0.5 unidades/mL) se inactivó casi por completo a los 35°C y a un pH de 3.8, 4.0, 4.2, y 4.5 durante la fermentación del extracto de levadura de glucosa de malta estéril. También encontraron que la vida media biológica de la penicilina disminuyó espectacularmente de las 24 horas a 25°C a 4 horas a 35°C. Con base en estos resultados de investigación, es de esperarse que las condiciones de temperatura y pH durante la producción de etanol y DDGS vayan a inactivar a la penicilina. La fermentación se da en un periodo de 48 a 72 horas cuando disminuye el pH a menos de 4, y a una temperatura de aproximadamente 32°C. La destilación a temperaturas de más de 78°C por hasta 30 minutos también van a inactivar cualquier residuo de penicilina en la masa, y el secado de los DDGS a temperaturas entre 300 y 600 °C en los secadores de tambor rotatorios (Bothast y Schlicher, 2005), deben inactivar por completo los residuos de penicilina en los DDGS.

Eritromicina

La eritromicina no está aprobada por la FDA para utilizarse en la producción de etanol y DDGS. Es un antibiótico de anillo macrocíclico de lactona de 14 miembros que se usa en la producción del etanol para combustible (Petropoulos et al., 2008) porque es muy eficaz contra la mayoría de las bacterias gramnegativas y grampositivas (Chittum and Champney, 1995). Los antibióticos macrólidos son bacteriostáticos y se ligan a la subunidad 50S del ribosoma en una relación de una molécula por ribosoma (Merck Sharpe & Dohme, 2004; Petropoulos et al., 2008; Vannuffel and Cocito, 1996). La estabilidad de la eritromicina es dependiente del pH y la

temperatura, cuando es más estable en un intervalo de pH de 7.0 a 8.0 y temperaturas más bajas (Brisaert et al. 1996). Es soluble en alcohol y insoluble en agua, pero se hace más inestable con concentraciones más altas de alcohol. Al igual que la penicilina, la eritromicina muy probablemente sea inactiva con el pH bajo y altas temperaturas que se encuentran durante la fermentación y destilación del etanol. Una vez consumida, la eritromicina se difunde muy bien en los fluidos corporales, pero el consumo de alimentos disminuye su absorción (Merck Sharpe & Dohme, 2004). Actualmente está aprobada para usarse en animales para consumo humano. No obstante, es importante hacer notar que la eritromicina tiene un efecto antagonista cuando se combina con la virginiamicina o penicilina, y puede causar toxicidad de la monensina debido a una eliminación retrasada o alteración de la biotransformación de la monensina cuando se alimenta de forma concurrente (Basaraba et al., 1999; Cocito, 1979; Hof et al., 1997).

Tilosina

La tilosina no está aprobada por la FDA para utilizarse en la producción de etanol y de DDGS. Es un antibiótico macrólido eficaz de anillo de 16 miembros contra bacterias grampositivas y algunas gramnegativas, e inhibe la síntesis de proteína bacteriana (Omura et al., 1983; Petropoulos et al., 2008). La tilosina consiste de tilosina A, tilosina B, tilosina C y tilosina D, las cuales contribuyen a su potencia como antibiótico. La tilosina A es, por mucho, el principal componente (generalmente alrededor del 90% y no menos del 80%). Las soluciones de tilosina son estables alrededor de un pH 7 y temperaturas de 60 a 90°C. La tasa de descomposición de la tilosina depende mucho del pH, tipo y concentración de búfer, temperatura, así como de la fuerza iónica (Paesen et al. 1995). La tilosina es más estable en un pH de alrededor de 3.5 o de alrededor de 9.0. Fuera de estos dos intervalos de pH, no existe una activación importante de este antibiótico. Además, el aumento en las temperaturas o periodos de exposición puede conducir a la inactivación (Aksenova et al., 1984). Por lo tanto, es probable que se vaya a inactivar cualquier residuo en los DDGS debido a su baja estabilidad en el pH y temperaturas altas presentes en el proceso de producción del etanol para combustible. Actualmente, la tilosina está aprobada para usarse en el ganado.

Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un antibiótico bacteriostático inestable a pH bajos ($\text{pH} < 2$) y que forma anhidrotetraciclinas vía la pérdida de agua y transferencia de protones en condiciones ácidas fuertes (Wang et al., 2008). Además, las tetraciclinas se degradan muy rápido a pH bajos y temperaturas altas, disminuye su absorción con cationes metálicos (Al, Ca, Mg, Fe) y es antagonista cuando se administra en conjunto con penicilina (Merck Sharpe & Dohme, 2004). Las tetraciclinas actualmente están aprobadas para usarse en el ganado. En el organismo, penetra la mayoría de los tejidos y fluidos corporales. Los estudios previos han investigado la efectividad de la esterilización térmica de los ingredientes de alimentos para animales para poder reducir el nivel de los residuos de las tetraciclinas activas, y Hassani et al., (2008) notificaron que los tratamientos de bajas temperatura por tiempo largo con esterilización convencional (de 121°C durante 20 minutos) son los más eficaces en reducir los residuos activos a menos de uno por ciento.

Alternativas de antibióticos

Hay varias plantas de etanol que están evaluando alternativas de antibióticos para controlar las infecciones bacterianas. Los dos productos alternativos más comunes son el cloro estabilizado y una enzima derivada del lúpulo. El dióxido de cloro es un clorito de sodio tampón con propiedades antimicrobianas, que se activa a partir del clorito de sodio a dióxido de cloro mediante bacterias productoras de ácido. El clorito de sodio se degrada a cloruro no tóxico, además de iones de sodio. El extracto del lúpulo posee propiedades antimicrobianas y contiene enzimas que controlan bacterias, pero también mejora la capacidad de la levadura de convertir almidón a etanol. Hay pocos datos científicos publicados sobre estos productos, pero los resultados de unos cuantos estudios de campo indican que pueden haber alternativas eficaces en costos a los antibióticos para controlar las infecciones bacterianas en los fermentadores durante la producción de etanol.

Resultados recientes de investigaciones sobre la presencia y actividad biológica de los residuos de antibióticos en los DDGS

Recientemente, Paulus-Compart (2012) terminó un estudio en la University of Minnesota para determinar si los residuos de antibióticos están presentes en los granos de destilería con solubles secos y húmedos, y si es así, si presentan actividad biológica. Los objetivos de este estudio fueron: 1) recolectar y evaluar las muestras de coproductos de destilería húmedos y secos de diferentes lugares geográficos y plantas de etanol de molienda en seco en EUA para determinar la presencia de residuos de virginiamicina, penicilina, eritromicina, tetraciclina y tilosina, y 2) determinar el grado de cualquier actividad antimicrobiana en las muestras mediante cepas de bacterias centinelas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

Materiales y métodos

Consultores independientes en nutrición recolectaron aproximadamente 20 muestras de granos de destilería húmedos y 20 de granos de destilería secos de 43 plantas de etanol de molienda en seco ubicadas en 9 estados del Medio Oeste de EUA cada 3 meses durante un periodo de 12 meses. Las muestras se enviaron al Departamento de Ciencias Animales de la University of Minnesota e inmediatamente se congelaron (-21° C). Las muestras originales se subdividieron y se enviaron a SGS North America (Brookings, SD, EUA) para análisis proximal de nutrientes y detección de residuos de penicilina, eritromicina, tetraciclina y tilosina mediante procedimientos (de Alwis and Heller, 2010). Se hizo una extracción adicional mediante una solución de búfer de fosfato (PBS) para minimizar los daños de los residuos de los antibióticos durante el proceso de extracción. Los residuos recuperados mediante la extracción de PBS se analizaron contra las cepas bacterias centinelas de *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Listeria*

monocytogenes (ATCC 19115) para determinar la actividad biológica. Los umbrales bacterianos se determinaron para residuos de antibióticos mediante la visión de bacterias centinelas a concentraciones de 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 al extracto de antibióticos en el caldo de cultivo por 18 a 24 horas a 37°C y luego se examinaron las muestras en cuanto a crecimiento bacteriano. La inhibición bacteriana también se determinó mediante la colocación en placa de 10 mL de cada caldo o placa de agar de sangre. Después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C , se contaron y registraron las colonias bacterianas como unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Otro juego de submuestras trimestrales se envió al Laboratorio Phibro EPG (St. Paul, MN) para la detección de residuos de virginiamicina, mediante el procedimiento de bioensayo patentado y aprobado por la FDA.

Los datos se analizaron mediante el procedimiento Mixto de SAS con el periodo de muestra y la planta de origen del etanol como efectos al azar y los efectos fijos incluyeron el tipo de destilería (húmeda o seca) y las interacciones del tipo de destilería $\times$ planta de etanol y el tipo de destilería $\times$ periodo de muestra. Los efectos se consideraron significativos cuando los valores P eran ≤ 0.05 y las tendencias se consideraron cuando $0.05 > \text{valores } P \geq 0.10$.

Resultados

Se analizaron 159 muestras (79 húmedas y 80 secas) para determinar residuos de tetraciclina, tilosina, eritromicina y penicilina. Como se muestra en la **figura 1**, una muestra contenía concentraciones detectables de tetraciclina y otra contenía niveles detectables de penicilina, pero ninguna de las muestras contenía residuos de tilosina. La eritromicina se encontró en 16 de las muestras (10.1%). Solamente dos muestras presentaron concentraciones detectables de virginiamicina (> 0.3 ppm) mediante el bioensayo de Phibro aprobado por la FDA (**figura 2**). Una muestra contenía $0.6 \mu\text{g/g}$ y otra contenía $0.5 \mu\text{g/g}$ de virginiamicina.

Las concentraciones de residuos de todos los antibióticos determinados fueron sumamente bajas con concentraciones medias (con base en materia seca) en las muestras secas de menos de $0.8 \mu\text{g/g}$ de eritromicina, menos de $1.2 \mu\text{g/g}$ de tetraciclina y menos de $0.12 \mu\text{g/g}$ de penicilina. La distribución de la concentración de residuos entre muestras se ejemplifica en las **figuras 2, 3, 4 y 5** para la virginiamicina, tetraciclina, eritromicina y penicilina, respectivamente.

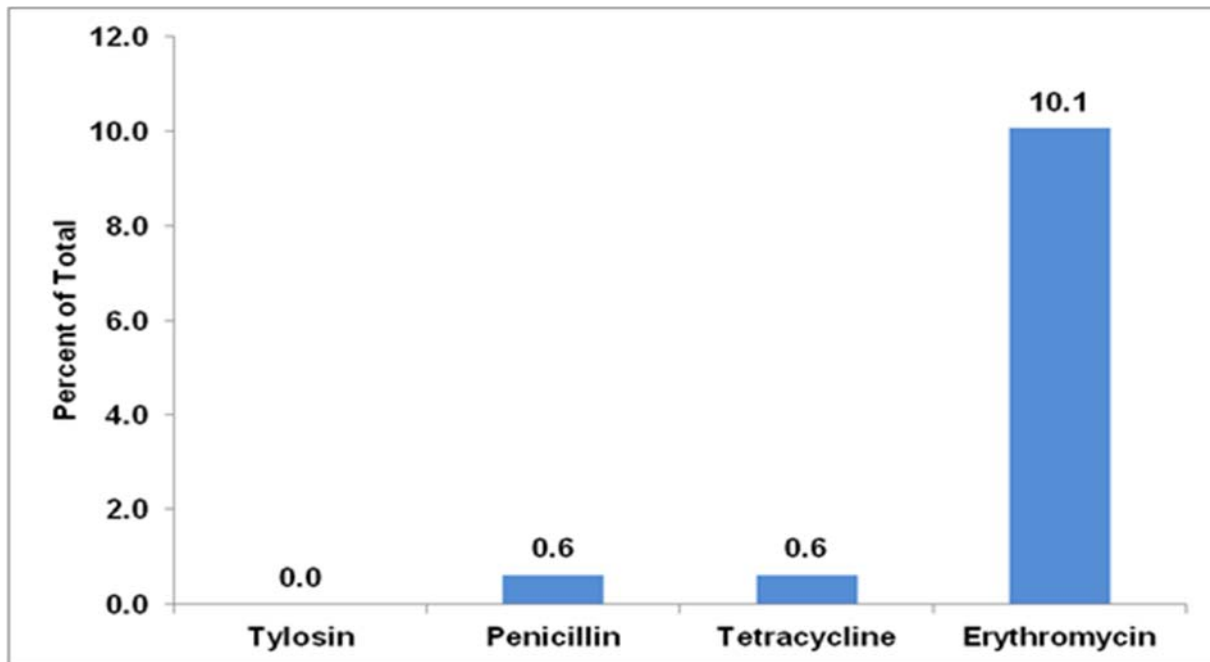


Figura 1. Porcentaje de muestras que contenían residuos de antibióticos

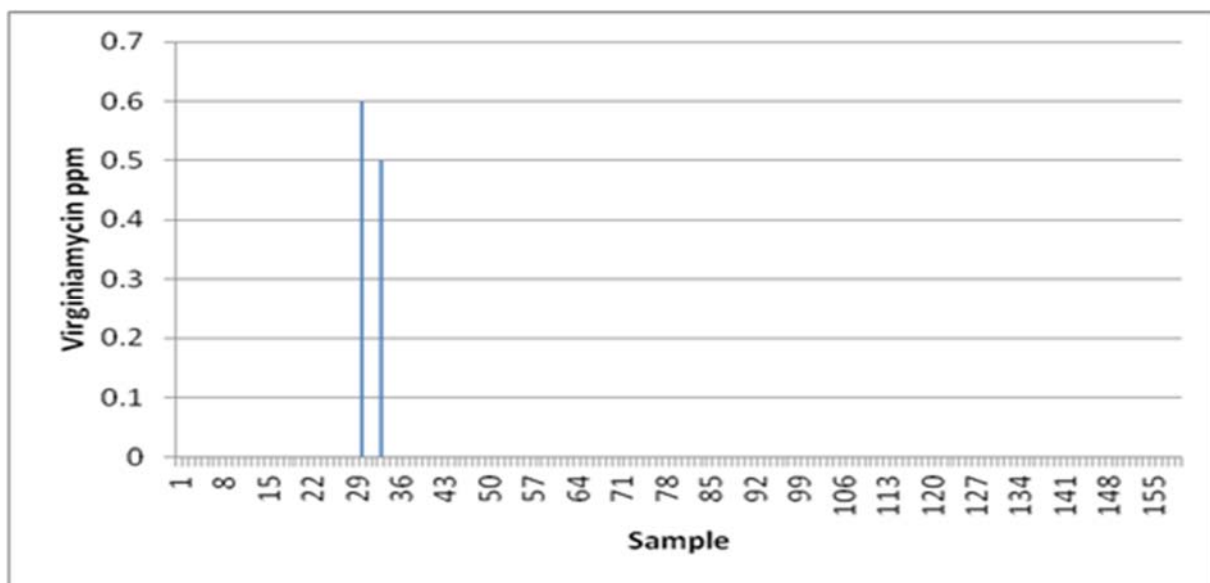


Figura 2. Concentraciones de residuos de virginiamicina de granos de destilería con solubles secos y húmedos (base MS)

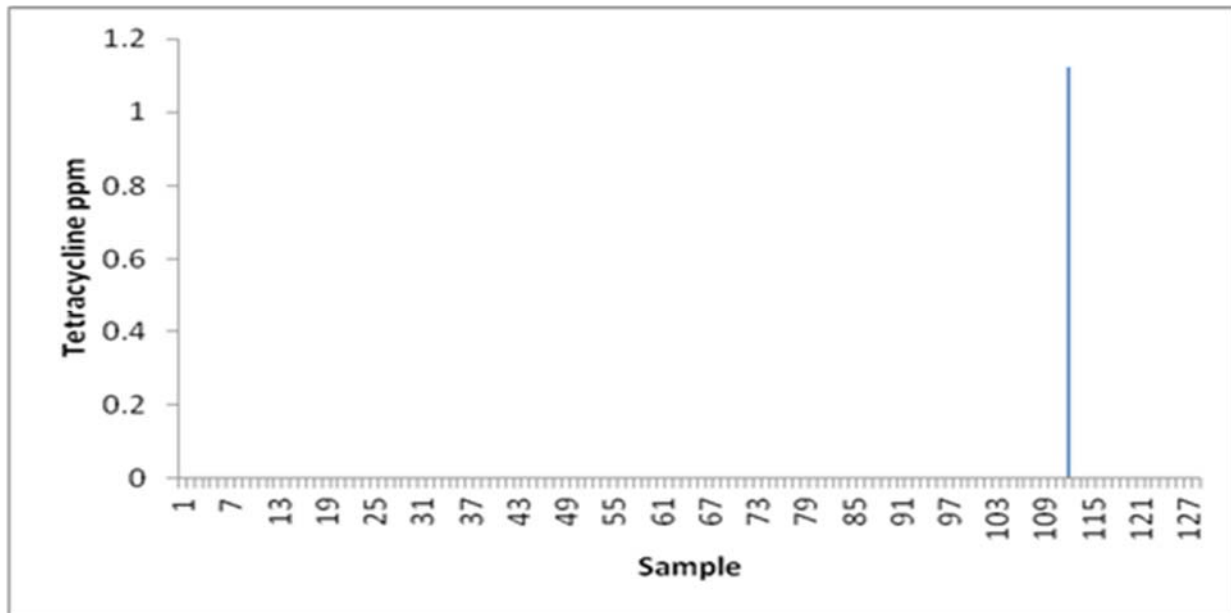


Figura 3. Concentraciones de residuos de tetraciclina de granos de destilería con solubles secos y húmedos (base MS)

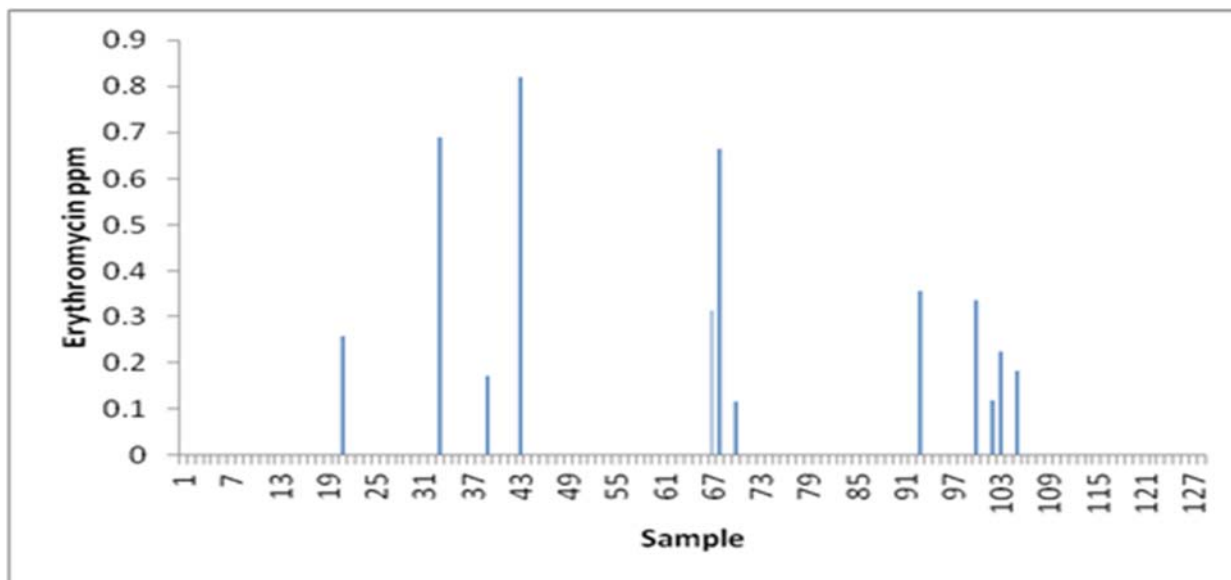


Figura 4. Concentraciones de residuos de eritromicina de granos de destilería con solubles secos y húmedos (base MS)

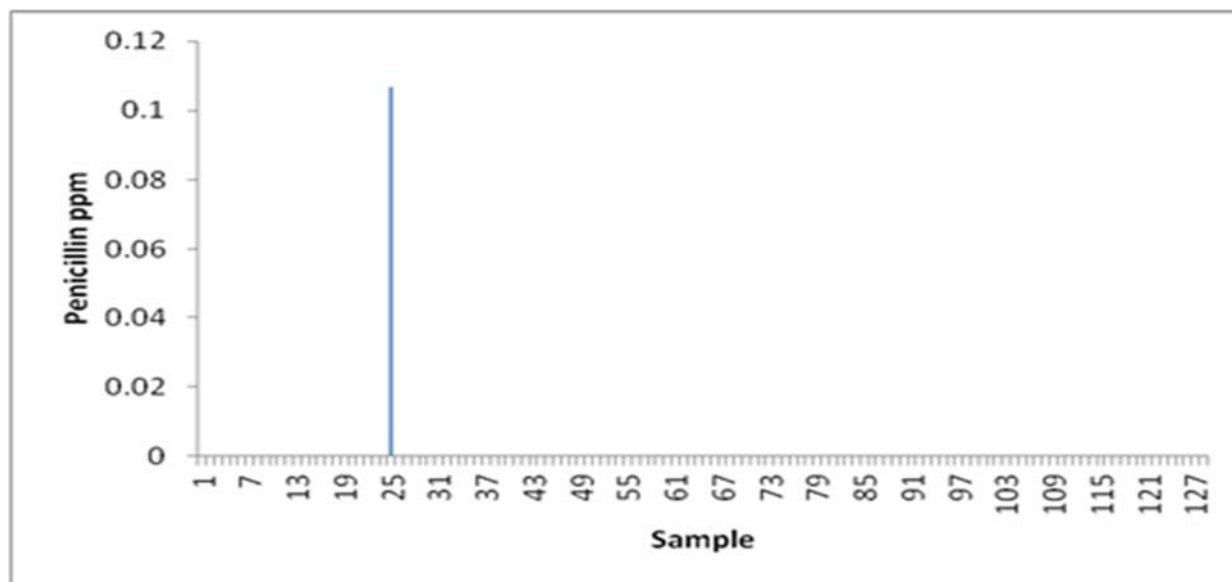


Figura 5. Concentraciones de residuos de penicilina de granos de destilería con solubles secos y húmedos (base MS)

El extracto de una sola muestra se encontró que no tenía propiedades inhibitorias para la *E. coli*, pero no para el crecimiento de la *L. monocytogenes*. El extracto inhibió *E. coli* (ATCC 8739) en concentraciones entre 10^4 y 10^5 . Sin embargo, no hubo concentraciones detectables de residuos de 5 antibióticos determinados en esta muestra. Por lo tanto, no queda clara la causa de inhibición bacteriana producida por esta muestra. Todas las otras muestras analizadas en cuanto a la actividad de residuos de antibióticos no mostraron inhibición bacteriana, y produjeron placas con muchas colonias para contar tanto para *E. coli* como de *L. monocytogenes* (ATCC 19115). Los resultados de este estudio indican que 20 de las 159 muestras (12.6%) analizadas en este estudio contenían niveles detectables de residuos de antibióticos. Además, las concentraciones de los residuos detectados en los coproductos de destilería secos y húmedos fueron sumamente bajas, y no se detectaron residuos de tilosina. Menos del 1.3% de las muestras analizadas contenían concentraciones bajas (de 0.5 a 0.6 $\mu\text{g/g}$), pero detectables de residuos de virginiamicina mediante el bioensayo aprobado por la FDA. No obstante, parece ser que no hay preocupación de que los residuos tengan propiedades inhibitorias cuando se usan en cepas sensibles de *E. coli* y *L. monocytogenes* como bacterias centinelas. Estos resultados indican que los residuos de antibióticos en los granos de destilería se ven inactivados durante el proceso de producción de éstos y los residuos de antibióticos detectables no tienen efecto sobre las bacterias centinelas escogidas para probar su actividad antimicrobiana.

Conclusiones

A menudo los antibióticos se usan para controlar las infecciones bacterianas en el proceso de producción de etanol para combustible de molienda seca, para mejorar el rendimiento de etanol y la calidad nutricional de los coproductos de destilería. La virginiamicina es el antibiótico más

ampliamente usado en la producción de etanol y es el que más se ha investigado y el que se entiende mejor. Todas las pruebas científicas hasta la fecha indican que el uso de virginiamicina en la producción de etanol no representa preocupación en cuanto a los residuos o riesgos para la salud animal y humana. Menos del 1.3% de las muestras analizadas contenían concentraciones bajas (de 0.5 a 0.6 µg/g), pero detectables de residuos de virginiamicina. Solamente 1 muestra contenía residuos de penicilina, 1 muestra de tetraciclina y ninguna de las muestras tenía residuos de tilosina. Se detectaron concentraciones sumamente bajas de penicilina, eritromicina y tetraciclina en coproductos de destilería húmedos y secos. Sin embargo, parece que no hay preocupaciones de que los residuos tengan propiedades inhibitorias cuando se usan cepas de *E. coli* (ATCC 8739) y el *L. monocytogenes* (ATCC 19115) como bacterias centinelas.

Bibliografía

- Aksenova, I. A., E. M. Ter-Sarkisian, R. D. Soifer, G. Florova, and L. S. Iustratova. 1984. [Effect of the pH of the medium and of temperature on tylosin stability]. *Antibiotiki* 29:179-182.
- Basaraba, R. J., F. W. Oehme, M. W. Vorhies, and G. L. Stokka. 1999. Toxicosis in cattle from concurrent feeding of monensin and dried distiller's grains contaminated with macrolide antibiotics. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 79-86.
- Benjamin, L. 2009. Biofuel co-products opportunities & challenges. U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD, p.2.
- Benz, S. A. 2007. In: J. A. Miller (ed.). Department of Health & Human Services, Rockville, MD, p.2.
- Bischoff, K.M., S. Liu, T.D. Leathers, R.E. Worthington, and J.O. Rich. 2009. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 103:117-122.
- Bothast, R.J., and M.A. Schlicher. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 19-25.
- Brisaert, M., M. Heylen and J. Plaizier-Vercammen. 1996. Investigation on the chemical stability of erythromycin solution using an optimizing system. *Pharm. World Sci.* 18:182-186.
- Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 175-188.
- Butler, M.N. and W. Weber, Jr. 2005. Accelerated transformation and deactivation of erythromycin in superheated water. 1. temperature effects, transformation rates, and the impacts of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 39:2294-2300.
- Chittum, H. S., and W. S. Champney. 1995. Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.* 30: 273-279.
- Cocito, C. 1979. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol. Rev.* 43: 145-192.
- Cocito, C., M. Di Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannuffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:7-13 (Suppl A).
- de Alwis, H., and Heller, D.M., 2010. Multiclass, multiresidue method for the detection of antibiotic residues in distillers grains by liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A* 1217:3076-3084.
- FDA. 2010. Animal drugs @FDA.gov.
- Hamdy, M.K. R.T. Tolew, C.J. Shieh, M.A. Fpannenstiel and R. Wang. 1996. Effects of virginiamycin on fermentation rate by yeast. *Biomass and Bioenergy* 11:1-9.

- Hassani, M., R. Lazaro, C. Perez, S. Condon, and R. Pagan. 2008. Thermostability of oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline at ultrahigh temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 56:2676-2680.
- Heist, P. 2009. Identifying, controlling the most common microbial contaminants Ethanol Producer Magazine. BBI International Media, Grand Forks, ND, p. 2.
- Heller, D.N. and G.K. Hemakanthi de Alwis. 2008. Analysis of antibiotics in distiller's grains using liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry. www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/.../UCM182280.pdf (accessed 10/8/09).
- Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol. Rev.* 10: 345-357.
- Hynes, S. H., D. M. Kjarsgaard, K. C. Thomas, and W. M. Ingledew. 1997. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 284-291.
- Islam, M., R. Toledo, and M.K. Hamdy. 1999. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. *Biomass and Bioenergy* 17 :369-376.
- Juranek, P. and P. Duquette. 2007. Antibiotic regulatory considerations for distiller's grains. *Distillers Grains Quarterly*, 4th Quarter.
- Kheirilomoom, A., A. Kazemi-Vaysri, M. Ardjmand, A. Baradar-Khoshfetrat. 1999. The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling. *Process Biochemistry* 35:205-211.
- Leja, K., and M. Broda. 2009. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. *ACTA Scientiarum Polonorum* 8:6.
- Luther, M. 2012. Report of FY 2010 nationwide survey of distillers products for antibiotic residues, Center for Veterinary Medicine, FDA, Silver Springs, MD.
- Makanjuola, D. B., A. Tymon, and D. G. Springham. 1992. Some effects of lactic-acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 350-357.
- Merck Sharp & Dohme Corp. 2004. The Merck Manuals online medical library. In R. S. Porter (ed.), Whitehouse Station, NJ.
- Muthaiyan, A., and S. C. Ricke. 2010. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. *Bioresour Technol* 101: 5033-5042.
- Narendranath, N.V., S.H. Hynes, K.C. Thomas, and M.W. Ingledew. 1997. *Applied Environmental Microbiology* 63:4158-4163.
- National Grain and Feed Association. 2010. FDA sampling distillers grains for presence of antibiotic residues. National Grain and Feed Association, Washington D. C., p.2.
- Olmstead, J. 2009. Fueling resistance? Antibiotics in ethanol production. Institute for Agricultural and Trade Policy, Minneapolis, MN, p.8.
- Omura, S., J. Inokoshi, H. Matsubara, and H. Tanaka. 1983. Ribosome-binding activities and antimicrobial activities of tylosin and its related compounds. *J. Antibiotics (Tokyo)* 36:1709-1712.
- Paesen, J., W. Cypers, K. Pauwels, E. Roets, and J. Hoogmartens. 1995. Study of the stability of tylosin a in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 13: 1153-1159.
- Paulus-Compart, D. 2012. Fate and Biological Activity of Antibiotics Used in Fuel Ethanol Production. M.S. Thesis, University of Minnesota.
- Petropoulos, A. D., E. C. Kouvela, G. P. Dinos, and D. L. Kalpaxis. 2008. Stepwise binding of tylosin and erythromycin to escherichia coli ribosomes, characterized by kinetic and footprinting analysis. *J. Biol. Chem.* 283: 4756-4765.
- Rich, J. O., T. D. Leathers, M. S. Nunnally, and K. M. Bischoff. 2011. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology* 102: 1124-1130.
- Skinner, K. A., and T. D. Leathers. 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 401-408.

- Skinner-Nemec, K. A., N. N. Nichols, and T. D. Leathers. 2007. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnol Lett* 29: 379-383.
- Susan, A.T. and K. Isadore. 1994. Stability of erythromycin and some of its esters in methanol and acetonitrile. *Int. J. Pharm.* 115:123-128.
- Vannuffel, P., and C. Cocito. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* 51: 20-30 (Suppl. 1).
- Van Egmond, H.J., J.F.M. Nouws, R. Schilt, W.D.M. van Lankveld-Driessen, E.P.M. Streutjens-van Neer, F.G.H. Simons. 2000. Stability of antibiotics in meat during a simulated high temperature destruction process. (http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions%20A-H/Egmond%20van%20430-437.pdf)
- Wang, L., H. Yang, C. Zhang, Y. Mo, and X. Lu. 2008. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 619: 54-58.
- Weigel, J. C., D. Loy, and L. Kilmer. 1996. Feed co-products of the dry corn milling process. p 16. Iowa State University.