



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**EFFECTO DEL RIEGO CON AGUA RESIDUAL Y DE LA ACUMULACIÓN DE  
ANTIBIÓTICOS EN LA DISPERSIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN  
DIFERENTES MICROAMBIENTES DEL SUELO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

**BIOL. KATHIA CONSTANCE LUENEBERG RODRÍGUEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CHRISTINA DESIREE SIEBE GRABACH  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL  
FACULTAD DE MEDICINA  
DRA. PILAR ORTEGA LARROCEA  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo administrativo durante mis estudios de maestría.

A CONACYT por el financiamiento otorgado para este trabajo mediante el proyecto I0110-193-10 y por la beca que me otorgó durante dos años en México y en el extranjero para conseguir el grado.

A la DFG por el financiamiento otorgado para este trabajo mediante los proyectos GR1792/4-1 y SI1106/5-1.

A PAEP y al Posgrado UNAM por el apoyo económico para la realización de mi estancia en Alemania.

A mi tutora Christina Siebe por su entusiasmo y paciencia durante la realización de todo el proyecto. Por la formación y enseñanza que me ha brindado, su apoyo y comprensión en momentos de duda.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Yolanda López Vidal y la Dra. Pilar Ortega Larrocea por sus observaciones y comentarios durante el desarrollo de este proyecto.

## Agradecimientos

A los doctores miembros de mi jurado de exámen por sus valiosas aportaciones para la mejora de la tesis, Yolanda López, Gonzalo Castillo, Blanca Prado, Irma Rosas y Horacio Riojas.

A la Dra. Blanca Prado por su alegría y su apoyo con todo lo relacionado a las columnas.

A Philipp Dalkmann y a Jan Siemens por su paciencia y apoyo durante mi estancia en Bonn y su contribución con el análisis de los antibióticos.

A Melanie Broszat, Elisabeth Grohmann y Johannes Huebner por su apoyo durante mi estadía en Freiburg y contribución para el análisis de los genes.

A la M. En C. Iris Suarez Quijada, por toda la asistencia técnica proporcionada para el mantenimiento óptimo de mi experimento en el invernadero.

A la Dra. Lucy Mora Palomino, M. En C. Kumiko Shimada Miyasaka y al Biol. Rene Alcalá Martínez por lo análisis físico-químicos del suelo y agua. Así como al M. en C. Jaime Díaz Ortega por su asesoría en la utilización del programa Image Pro.

Al señor Emilio y al rancho Las Palmas por permitirme tomar muestras dentro de sus parcelas.

A todos los miembros del laboratorio de edafología ambiental y de inmunología molecular microbiana por su apoyo técnico y amistad.

A mi familia, amigos y a todos los que participaron activamente en este proyecto, ya fuera recolectando las columnas, regando las alfalfas u obteniendo las muestras, Choky, mamá, Sofi, tía Ros, tía Lulú, tío Ar, Lucero, Faby, Mario, Caro, Melanie, Ania, Sara, Arturo, Narce, Horacio, Jorge e Ingrid.

Quiero agradecer todo el amor incondicional que he recibido de mi mamá, de mi hermana, de todos mis ti@s y prim@s, siempre apoyandome en los buenos y malos momentos, los quiero mucho.

A Chokito que ha hecho mi vida cada día más feliz con su amor, apoyo, comprensión, motivación y paciencia, te adoro. Y a la familia Sametz Alazraki por todo su cariño y apoyo en esta nueva etapa juntos.

A mis amig@s por la alegría, compañía y aventuras que hemos pasado juntos: Mon, Tatina, Manlio, Cesar, Pancho, Leori, Erika, Paty, Olga, Luz, Tania, Ania, Pau, Gaby, Sara, Karen, Ale y Dido, los quiero.

## Índice

	Página
Lista de figuras .....	1
Lista de cuadros.....	1
Resumen.....	2
Abstract .....	3
1. Introducción .....	4
1.1 Marco teórico.....	6
1.1.1 Antibióticos .....	6
1.1.2 Antibióticos en el ambiente .....	8
1.1.3 Antibióticos y suelo .....	9
1.1.4 Resistencia a antibióticos en el suelo.....	11
1.1.5 Consecuencia de coexistencia de contaminantes en el suelo .....	14
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivo general.....	18
3.1 Objetivos particulares .....	18
4. Materiales y métodos .....	19
4.1 Descripción del área de estudio .....	19
4.2 Muestreo y montaje de columnas .....	21
4.3 Irrigaciones (tratamientos).....	23
4.4 Muestreo selectivo en los monolitos .....	25
4.5 Extracción y cuantificación de antibióticos .....	26
4.6 Cuantificación de los genes 16S rDNA, sul y qnr.....	27
4.7 Estadística.....	29
5. Resultados .....	31
5.1 Infiltración del agua.....	31
5.2 Condiciones inalteradas del suelo.....	32
5.3 Comportamiento del sulfametoxazol y del ciprofloxacino en el suelo por efecto del riego con agua residual y la aplicación de antibióticos.....	35
5.4 Efecto del agua residual y la acumulación de antibióticos en la biomasa bacteriana y la dispersión de genes de resistencia .....	39
6. Discusión .....	43
6.1 Infiltración de agua.....	43
6.2 Condiciones inalteradas del suelo.....	44
6.3 Comportamiento del sulfametoxazol y del ciprofloxacino en el suelo por efecto del riego con agua residual y la aplicación de antibióticos.....	46
6.4 Efecto del agua residual y la acumulación de antibióticos en la biomasa y la dispersión de antibióticos.....	49

7. Conclusiones.....	53
8. Referencias.....	54
9. Anexos.....	58

## Lista de figuras

1. Mecanismos de resistencia de sulfamidas y quinolonas entre otros. Modificado de Peleg *et al.* (2010), 14
2. Diseminación de antibióticos, patógenos y genes de resistencia, 15
3. Mapa de localización de los puntos de muestreo en los municipios de Santiago Tezontlale y Tlahuelilpan, 21
4. Esquema del diseño experimental, 24
5. Infiltración de agua en monolitos de suelo, 32
6. Biomasa bacteriana en condiciones inalteradas, 33
7. Concentración del gen *sul1* en condiciones inalteradas, 34
8. Concentración del gen *sul2* en condiciones inalteradas, 35
9. Comportamiento del SMX, 36
10. Comportamiento del CIP, 37
11. Acumulación de SMX, 38
12. Acumulación de CIP, 39
13. Efecto de los tratamientos en la biomasa bacteriana, 40
14. Efecto de los tratamientos en la concentración de *sul1*, 41
15. Efecto de los tratamientos en la concentración de *sul2*, 42

## Lista de cuadros

1. Características físico-químicas de los suelos utilizados en el experimento, 22
2. Características físicas, químicas y biológicas del agua residual, 23
3. Volúmenes de agua aplicados en ambos riegos que corresponden a un volumen de poro para cada columna, 25
4. Cebadores y pruebas TaqMan utilizadas para la amplificación por PCR en tiempo real, 28

## Abreviaturas

SMX Sulfametoxazol

CIP Ciprofloxacino

AR Agua residual

DNA Ácido desoxiribonucleico

ASE Extracción acelerada con solventes

V<sub>o</sub> Volumen de poro

V<sub>t</sub> Volumen total

Θ Humedad volumétrica

pb Pares de bases

T<sub>a</sub> Temperatura de alineamiento

## Resumen

El riego con agua residual aporta a los suelos patógenos, antibióticos y genes de resistencia a antibióticos, y la coincidencia de estos contaminantes puede tener implicaciones en la salud humana al reducir la efectividad de tratamientos antimicrobianos, así como afectar los procesos microbianos asociados a la fertilidad del suelo. La infiltración del agua y contaminantes en el suelo se da en primera instancia a través de macroporos, los cuales pueden ser formados por raíces de plantas. La porción del suelo inmediata a las raíces se denomina rizósfera, es un sitio ideal para la proliferación y supervivencia bacteriana, por ello, es en éste microambiente donde se puede favorecer la diseminación de genes de resistencia. En el presente trabajo se determinó el efecto que tiene el agua residual y la acumulación de dos antibióticos (sulfametoxazol y ciprofloxacino) en la dispersión de genes de resistencia a éstos (*sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS*) diferenciando entre microambientes de infiltración de agua y matriz del suelo. Mediante cuantificación del gen *16S rDNA* se determinó la importancia de la biomasa bacteriana en la dispersión de los genes de resistencia. Lo anterior se hizo con el objeto de aportar información sobre la participación de estos microambientes del suelo en la diseminación de genes de resistencia.

Se realizó un experimento en monolitos inalterados de suelo, extraídos de un sitio que se riega con agua residual continuamente desde hace varios años y de un sitio de temporal (que se riega únicamente con agua de lluvia). A los monolitos se les aplicaron tratamientos con lluvia artificial ( $\text{CaCl}_2$  0.01M) o con agua residual, así como una o dos dosis de ambos antibióticos. Junto con el tratamiento se aplicó un colorante para trazar la infiltración del agua, verificar si ésta efectivamente ocurre de forma preferencial a través de bioporos de raíces, y muestrear en forma diferenciada el suelo cercano a las raíces (i.e. la rizósfera) o sitios de infiltración (coloreado) y la matriz del suelo (no coloreada).

Se encontró que efectivamente la rizósfera y el sistema poroso contienen una mayor biomasa bacteriana, y que a su vez ésta es más abundante en el suelo con varios años de riego con agua residual. El gen de resistencia a sulfametoxazol *sul1* es parte del resistoma de la comunidad bacteriana nativa del suelo y el gen *sul2* proviene del agua residual.

El aumento en la concentración de sulfametoxazol (SMX) promueve la dispersión del gen de resistencia *sul1* de manera más pronunciada en el suelo de temporal, pero la misma concentración de antibiótico no afecta en la misma magnitud la dispersión del gen *sul2*.

La concentración de SMX fue similar en los microambientes estudiados (rizósfera o sistema poroso y matriz del suelo), por lo que se concluye que la dispersión del gen de resistencia *sul1* depende de la diferencia en la biomasa bacteriana presente en estos microambientes y no de la concentración de SMX, por lo cual, la rizósfera del suelo de temporal y el sistema poroso del suelo de riego con agua residual se pueden considerar como sitios críticos ("hot spots") para la dispersión del gen de resistencia a sulfametoxazol *sul1*.

La concentración de ciprofloxacino aumentó únicamente en la rizósfera y en el sistema poroso pero su bioaccesibilidad fue tan limitada que no tuvo efecto en la dispersión de los genes de resistencia *qnrB* y *qnrS*.

## Abstract

The irrigation with wastewater provides pathogens, antibiotics and antibiotic resistance genes to the soil and the spatial coincidence of these contaminants can have a negative impact in human health by reducing the effectiveness of the antimicrobial treatments. The water infiltration occurs primarily along macropores that can be made by plant roots, the soil portion close to the roots is called rhizosphere and is known for an enhanced bacterial survival and proliferation. Therefore the rhizosphere would be an ideal site for the spread of antibiotic resistance genes. In the present work we determined the relationship between two antibiotics concentration (sulfamethoxazole y ciprofloxacin) and the spread of their resistance genes (*sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS*) differentiating between microenvironments of water infiltration and soil matrix. We estimate the bacterial biomass quantifying the *16S rDNA* gene to determine the importance of this factor in the spread of resistance genes in the studied microenvironments. The foregoing was made with the aim of providing a better understanding in the participation of these microenvironments in the spread of antibiotic resistant genes promoted by the effect of wastewater and antibiotic accumulation.

We perform an intact column experiment, to maintain the natural porosity of the soil of two different fields one with rain fed irrigation and another that has been irrigated with wastewater for several years. The columns were irrigated with artificial rain, wastewater and two different concentrations of the antibiotics sulfamethoxazole and ciprofloxacin, in the same irrigation a colorant was added to visualize the infiltration of the water and to be able to sample separately into the rhizospheric soil or infiltration sites (colored) and the soil matrix (non colored).

It was found that the rhizosphere and the porous system contained a greater bacterial biomass and this is also greater in the field with several years of wastewater irrigation. The sulfamethoxazole resistant gene *sul1* is part of the soil native bacterial community's resistome while the resistant gene *sul2* come from the wastewater.

The increased of sulfamethoxazole (SMX) concentration promotes the spread of the resistant gene *sul1* in a greater way in the rain fed soil and the same antibiotic concentration does not have the same impact in the spread of *sul2*.

As the SMX concentration was the same in the studied microenvironments (rhizosphere or porous system and soil matrix) we can conclude that the spread of *sul1* depends on the different quantity of bacterial biomass found in this microenvironments and not in the antibiotic concentration, for this reason, the rhizosphere and the porous system can be considered as hot spots for the multiplication of *sul1* resistant gene.

The concentration of ciprofloxacin increased only in the rhizosphere and the porous system but its bioavailability is so limited that it does not have an effect in the spread of the *qnrB* and *qnrS* resistance genes.

## 1. Introducción

La utilización de agua residual para el riego de suelos agrícolas es una práctica cada vez más común en países en desarrollo, donde el tratamiento de agua residual no es costeable o es insuficiente, esta práctica tiene como ventajas que evita la sobreexplotación de acuíferos para la agricultura y que incrementa la productividad agrícola, ya que el riego con agua residual provee también nitrógeno y fósforo (Siebe, 1998). Sin embargo, el riego con agua residual al mismo tiempo es una fuente potencial de contaminación por patógenos, antibióticos y genes de resistencia a antibióticos (Siebe, 1998; Siemens *et al.*, 2007; Dalkmann *et al.*, 2012), los genes de resistencia se conocen como contaminantes emergentes y no cuentan con ningún tipo de regulación sobre los límites permisibles. La presencia de los contaminantes antes mencionados en el suelo puede ser relevante para la futura evolución y diseminación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias nativas del suelo, lo cual afectaría la dinámica de las comunidades bacterianas que participan activamente en los ciclos biogeoquímicos (Siemens *et al.*, 2010) y en la fertilidad del suelo, lo cual podría tener implicaciones negativas en el ecosistema (Martínez, 2008). Así mismo, el contacto de los genes de resistencia con bacterias potencialmente patógenas implican un riesgo para la salud humana (Martínez, 2008).

En México se encuentra uno de los sistemas de riego de cultivos con agua residual más grande del mundo, el cual recibe el 70% de aguas negras que se producen en la Ciudad de México (Siemens *et al.*, 2007). El agua es descargada sin tratamiento previo y es utilizada para la irrigación de una gran variedad de cultivos (Jiménez *et al.*, 2004). En estudios previos se reportaron concentraciones de antibióticos en los efluentes con los que se riega el Valle del Mezquital (Gibson *et al.*, 2007), también se reportaron concentraciones de antibióticos y genes de resistencia en suelos del mismo sitio (Dalkmann *et al.*, 2012).

Los microorganismos potencialmente patógenos, antibióticos y genes de resistencia que no son retenidos por el suelo pueden llegar al agua subterránea transportados por la infiltración preferencial del agua, que suele darse a través de macroporos (Siemens *et al.*, 2007). Los macroporos generalmente están formados por grietas o por raíces de plantas. La rizósfera, es decir la porción del suelo inmediata a las raíces, es un sitio ideal para la proliferación y supervivencia bacteriana por las condiciones microambientales y fuentes de carbono presentes

en ella (Anderson *et al.*, 1993). Por ello en la rizósfera se puede favorecer la diseminación de genes de resistencia que eventualmente pueden transportarse al agua subterránea o absorberse a las plantas que se siembran en la región y entrar así a la cadena alimentaria. La presencia de antibióticos y la diseminación de genes de resistencia en el suelo puede también tener implicaciones ecológicas negativas al afectar a bacterias que participan en los ciclos biogeoquímicos (Siemens *et al.*, 2010).

En estudios previos se ha reportado que la aplicación de antibióticos en el suelo aumenta la presencia de genes de resistencia (Heuer *et al.*, 2008, 2011), pero ninguno de estos estudios se ha enfocado en diferentes microambientes del suelo ni en el transporte natural de antibióticos que en ellos ocurre, a pesar de que los estudios relacionados con el resistoma (i.e. genes de resistencia) bacteriano del suelo, deben ser dirigidos a microambientes con altas fuentes de carbono como la rizósfera (Brandt *et al.*, 2009).

Dos de los antibióticos más empleados en México son el sulfametoxazol y el ciprofloxacino, estos dos antibióticos tienen un comportamiento distinto en el suelo; el primero se lixivia con facilidad y el segundo se retiene fuertemente (Thiele-Bruhn, 2003), por ello se consideraron ideales para utilizarlos como los antimicrobianos tipo en esta investigación. Las bacterias hacen frente a la actividad de estos dos fármacos con varias estrategias, entre ellas la resistencia adquirida mediante los genes de resistencia a sulfonamidas (*sul*) que codifican para variantes de la enzima blanco del sulfametoxazol (Huovinen *et al.*, 1995) y la resistencia mediada por los genes de resistencia a fluoroquinolonas (*qnr*) que evitan la unión del ciprofloxacino al DNA (Arsène *et al.*, 2007).

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias naturales o sintéticas que detienen el crecimiento de bacterias o inducen su muerte. Desde su introducción en los años 20s se han producido millones de toneladas métricas de antibióticos (Davies *et al.*, 2010). Se estima que en el año 2006 se produjeron en el mundo 172 mil toneladas de antibióticos (Luo *et al.*, 2010).

Los antibióticos se utilizan para una gran variedad de propósitos, como es la medicina humana y veterinaria (industria pecuaria, acuicultura, animales domésticos), también se utilizan como control de plagas en la agricultura y como biocidas en productos de limpieza caseros e industriales (Davies *et al.*, 2010).

Los antibióticos incluyen a una gran cantidad de compuestos muy heterogéneos entre sí que son clasificados con base en su modo de acción, en sus diferentes estructuras moleculares y en diversas propiedades físicas y químicas. Los principales grupos son: tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, fluoroquinolonas, imidazoles, polipéptidos, poliéteres, glicopéptidos, entre otros. Con objeto de esta investigación sólo se abundará en el grupo de sulfonamidas y fluoroquinolonas.

#### Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron los primeros agentes antimicrobianos sintéticos utilizados como terapia, se patentaron e introdujeron al mercado entre los años 20 - 30 y en la actualidad se siguen utilizando (Huovinen *et al.*, 1995; Appelbaum *et al.*, 2000), éstas sustancias son análogas al ácido p-aminobenzoico que inhibe la enzima dihidrofolato sintasa (DHPS), que en la bacteria interfiere con el metabolismo del ácido fólico, esto evita que la bacterias se desarrollen y reproduzcan por lo que son considerados agentes bacteriostáticos (Huovinen *et al.*, 1995).

Las sulfonamidas se usan primordialmente en el tratamiento de los primeros episodios de infecciones urinarias agudas debidas a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus*

*faecalis*, así como para el tratamiento de enfermedades respiratorias provocadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, enfermedades de la piel por *Staphylococcus aureus* y para eliminar patógenos entéricos como *Shigella spp.* y *Salmonella spp.*, entre otros. Sin embargo, el incremento en la resistencia bacteriana limita su eficacia en los últimos años en una gran cantidad de especies bacterianas (Huovinen *et al.*, 1995).

### Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas pertenecen a un grupo de antibióticos sintéticos relacionados bioquímicamente al ácido nalidíxico, éste ácido y sus primeros análogos, oxolinico y cinoxacin, tienen aplicaciones clínicas limitadas por la aparición de resistencia bacteriana. A las nuevas quinolonas se les modificó el centro del quinolón original de dos anillos (o naftiridona) con diferentes sustituciones de grupos radicales. Estos nuevos agentes, conocidos como fluoroquinolonas, contienen un átomo de fluorina y fueron patentados en la década de los 70 (Appelbaum *et al.*, 2000).

El blanco principal de las quinolonas es la subunidad A de la DNA girasa, que es la enzima DNA topoisomerasa tipo II esencial para la replicación, recombinación y reparación del DNA en las bacterias gram-negativas. Las nuevas fluoroquinolonas también inhiben la DNA topoisomerasa IV en las bacterias gram-positivas (Appelbaum *et al.*, 2000). La inhibición de estas enzimas bacterianas produce el desenrollamiento del DNA, lo que interfiere con la replicación cromosómica. Al inhibir la síntesis de DNA, estos agentes son considerados bactericidas (Davies *et al.*, 2010).

Las fluoroquinolonas poseen una excelente actividad contra cocos grampositivos como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, muestran actividad contra patógenos atípicos como *H. influenzae*, *L. pneumophila*, varias especies del género *Chlamidia* y *Mycoplasma*, así como contra patógenos gramnegativos como *P. aeruginosa*, *E. coli*, varias especies de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* y algunos anaerobios como *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Clostridium* (Appelbaum *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Antibióticos en el ambiente

La cantidad de antibióticos naturales producidos *in situ* por microorganismos autóctonos del suelo es aproximadamente de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ , ya que más del 30 - 50% de actinomicetos son capaces de sintetizar antibióticos, estas concentraciones son encontradas especialmente en el suelo rizosférico (Thiele-Bruhn, 2003).

Las concentraciones naturales aumentan con la intervención humana, ya que la mayoría de los compuestos usados en medicina, son solo parcialmente metabolizados por los pacientes y son entonces descargados en el sistema de drenaje hospitalario o directamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Malik *et al.*, 2008). Hasta hoy, las plantas de tratamiento de aguas no están diseñadas para remover microcontaminantes, como son los antibióticos, los cuales han sido encontrados en los efluentes de los sistemas de tratamiento (Zorita *et al.*, 2009). Por consiguiente, los compuestos terminan en el ambiente, cuando se vierten en aguas superficiales o cuando se aplica lodo o agua residual al suelo (Siemens *et al.*, 2007).

Otra vía que tienen los antibióticos de llegar al suelo es por el uso de excremento como abono para los campos de cultivo, ya que hasta un alto porcentaje de la dosis administrada es excretada inalteradamente y persiste en el suelo después de su aplicación (Luo *et al.*, 2010). Una vez estando los antibióticos en el suelo, por el escurrimiento superficial y la lixiviación llegan a aguas superficiales y subterráneas, como reporta Thiele-Bruhn en su revisión del 2003.

Sin embargo, no existe regulación alguna sobre la concentración límite de los antibióticos en suelo y agua, en 1998 en la Unión Europea (EU) se realizó una evaluación de riesgo ambiental para los medicamentos veterinarios, en donde se calculaban concentraciones ambientales previstas (CAP) con ayuda de un modelo de balance. Primero se evaluaba la exposición y se comparaban las CAP con valores detonantes. Estos valores detonantes se establecieron en  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para el excremento de ganado de pastoreo,  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para estiércol y suelo y  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  para agua subterránea. Cuando las CAP exceden los valores detonantes, o se aplican directamente antibióticos a las aguas superficiales para el tratamiento de peces, es necesaria una segunda fase de pruebas experimentales (Thiele-Bruhn, 2003).

Thiele-Bruhn (2003) escribe en su revisión que varios autores alemanes reportaron elevadas concentraciones de antibióticos en abono porcino (sulfonamidas  $3.5 \text{ mg kg}^{-1}$  y tetraciclinas  $4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), que eventualmente llegarán al suelo, así como en suelos agrícolas (tetraciclinas de 450 a  $900 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ; macrólidos de 13 a  $67 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ; quinolonas de 6 a  $52 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  y sulfonamidas de  $11 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  en suelos fertilizados con estiércol y monitoreados por dos años).

### *1.1.3 Antibióticos y suelo*

Cuando los antibióticos llegan al suelo interaccionan con todas las fases sólidas y líquidas que ahí se encuentran, participando en una serie de procesos físicos, químicos y biológicos como es la sorción, el transporte y la degradación, lo que en algunas ocasiones provoca la transformación molecular del compuesto y afectar su bioactividad (Thiele-Bruhn, 2003).

Cuando los antibióticos están retenidos en el suelo pasan por procesos de sorción y difusión a las partes porosas de las partículas de suelo, éstos procesos están especialmente influenciados por el pH, la materia orgánica y los minerales del suelo, de igual importancia es la estructura molecular y las propiedades físico-químicas de cada uno de los antibióticos. Los antibióticos son hidrofóbicos o solubles en agua y se disocian a diferentes valores de pH, por lo que el coeficiente de adsorción ( $K_d$ ) de cada uno de los antibióticos encontrados en suelo y en sedimentos es muy variable; como ejemplo tenemos los valores pequeños de  $K_d$  para sulfonamidas que van de 0.6 a  $4.9 \text{ l kg}^{-1}$ , lo que implica una baja adsorción, en comparación a los altos valores de  $K_d$  para tetraciclinas de 290 a 1,620 y para quinolonas de 310 a  $6,310 \text{ l kg}^{-1}$  (Thiele-Bruhn, 2003).

Thiele-Bruhn (2003) escribe en su revisión que se ha encontrado que la adsorción de los antibióticos a la materia orgánica es más fuerte que la adsorción a la parte mineral del suelo y depende de la cantidad y la composición de ésta; a su vez la arcilla tiene una capacidad de adsorción más fuerte que las arenas. Cuando los compuestos no están retenidos se dice que se encuentran bioaccesibles o móviles, lo que les confiere un posible efecto ambiental.

Los procesos de retención reducen completa o parcialmente la actividad antimicrobiana de los compuestos, cuando los sitios de intercambio están asociados a la fracción bioactiva de éstos. Sí el

proceso se revierte, es decir que ocurre una desorción de los antibióticos del material del suelo se produce una reactivación de la potencia antimicrobiana (Thiele-Bruhn, 2003).

Para que los antibióticos lleguen a las aguas subterráneas deben de transportarse a lo largo del perfil de suelo, para los compuestos con valores de sorción bajos y altamente solubles en agua esto ocurre a través del movimiento de agua principalmente por gravedad, pero se postula que los antibióticos que normalmente son fuertemente retenidos en el suelo se transportan a través del mismo, por flujos preferenciales rápidos (grietas) o por el flujo a través de macroporos (raíces de las plantas) o que es facilitado por el cotransporte con materia orgánica disuelta (Thiele-Bruhn, 2003).

Thiele-Bruhn (2003) escribe en su revisión que la degradación de los antibióticos se lleva a cabo por tres procesos principales: 1) por fotodegradación, para antibióticos como las quinolonas, las sulfonamidas y las tetraciclinas, este proceso se restringe a la superficie del suelo ya que es difícil que penetre la luz conforme aumenta la profundidad; 2) por hidrólisis, algunos antibióticos al disolverse en agua pierden o ganan protones que cambian sus estructuras moleculares y 3) por biodegradación, la mayoría de los compuestos son susceptibles a la acción enzimática de las comunidades microbiana del suelo. Para que el metabolismo celular se lleve a cabo las condiciones de temperatura, humedad y aireación deben ser óptimas; si no es así, la biodegradación de los antibióticos es nula o muy lenta.

La degradación de los antibióticos puede o no reducir la actividad antimicrobiana de los compuestos, debido a que algunos de los metabolitos resultantes aún tiene actividad antibacteriana (Thiele-Bruhn, 2003).

La retención de los compuestos en las partículas de suelo juegan un papel importante como proceso de competencia contra la degradación, ya que cuando los antibióticos están fuertemente adsorbidos o difundidos a los espacios interlaminares de las partículas de suelo, la acción de cualquiera de los tres procesos de degradación se ve disminuida (Thiele-Bruhn, 2003).

#### 1.1.4 Resistencia a antibióticos en el suelo

Durante años de evolución las bacterias desarrollaron mecanismos que facilitan su competencia por recursos y espacio, una de ellas es la producción de sustancias que son capaces de lisar a otras bacterias. Sin embargo, la producción de estas sustancias también requiere de los medios para que las bacterias se protejan a sí mismas de sus propios mecanismos de competencia y esto se lleva a cabo confiriendo autoinmunidad o resistencia (Clewell, 2008). Cuando los antibióticos llegan al suelo debido a las actividades humanas y se encuentran de forma bioaccesible, uno de los efectos ambientales es la generación de resistencia en la población bacteriana con la que estén en contacto, al funcionar como una presión de selección. El abuso en la utilización y consumo de antibióticos por parte del hombre provocó que un sin número de especies bacterianas sean resistentes a la mayoría de los antibióticos que se han desarrollado (Martínez, 2008; Davies *et al.*, 2010).

La generación de resistencia en las bacterias se da por mutaciones en el genoma y su dispersión en la comunidad bacteriana se lleva a cabo por transferencia vertical o horizontal. Esto produce cambios en los blancos de los antibióticos, lo cual inhibe su efecto y posibilita la supervivencia y reproducción del organismo en presencia de los antibióticos (Livermore, 2003).

Los procesos mutagénicos son cambios en el material genético que suceden de manera espontánea y azarosa (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones e inversiones). Las mutaciones en bacterias en crecimiento resultan en una proporción de una en 300 por generación, sin embargo, en condiciones estresantes como el contacto constante con antibióticos, la falta de nutrientes, cambios de temperatura, aireación y humedad, la tasa de mutación aumenta temporalmente por lo menos 1,000 veces (Van Elsas *et al.*, 2007). La tasa de mutación de cepas comensales y patógenas de *E. coli* con resistencia a la rifampicina es de  $2.6 \times 10^{-7}$ . De igual forma pruebas hechas con cepas de *E. coli* mostraron un aumento en la tasa de mutación para la resistencia a ciprofloxacino, ya que en un periodo de 7 días las colonias en placas adicionada con este antibiótico aumentaron de 0.44 a 3.35, con una concentración doble a la concentración mínima inhibitoria (CMI;  $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Matic *et al.*, 1997; Riesenfeld *et al.*, 1997).

La transferencia vertical es la capacidad de transmisión de material genético de un ancestro a la prole. La transferencia horizontal ocurre por tres mecanismos básicos: transformación (liberación de DNA de una bacteria para ser tomada activamente por otra); transducción (transferencia de DNA usando como vectores a bacteriófagos) y conjugación (transferencia de DNA de una célula donadora a una receptora, mediante contacto directo; Clewell, 2008).

La transformación en el suelo está asociada a una gran cantidad de factores, siendo éste uno de los hábitats más complejos. Para que la transformación se lleve a cabo las condiciones ambientales en el espacio poroso del suelo, hábitat de la mayoría de bacterias, deben ser ideales con respecto a la temperatura, humedad y aireación, de esta manera se garantiza la supervivencia y multiplicación de células competentes (el término competente está asociado a la capacidad de las células de adquirir DNA libre del medio que depende de la actividad de ciertos genes). Por otro lado el DNA libre debe ser tomado por las bacterias, antes de que éste sea degradado por la gran cantidad de enzimas presentes en el suelo (el DNA tiene una vida media en diferentes tipos de suelo de 9.1 a 28.2 horas) y antes de que sea fuertemente adsorbido a los diferentes componentes del suelo (minerales y materia orgánica). A pesar de todos los inconvenientes se reportó que varios géneros bacterianos como son *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* toman el DNA mediante transformación natural en microcosmos de suelo. La frecuencia de transformación en diferentes ambientes varía con respecto a cada género bacteriano, el intervalo de algunas cepas nativas del suelo va desde  $1.9 \times 10^{-9}$  hasta  $1.2 \times 10^{-2}$  de transformantes marcadas por bacterias viables. Hasta la fecha no hay publicaciones de la importancia y ocurrencia de transformaciones naturales *in situ* (Lorenz *et al.*, 1994; Van Elsas *et al.*, 2007).

Davison (1999) escribe en su revisión que la mayoría de los reportes sobre transferencia genética bacteriana en el ambiente se refieren a la conjugación. Muchos elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones) tienen un amplio espectro de receptores, de distintas especies y géneros. Se sabe que este proceso ocurre en el suelo y que las frecuencias de conjugación se incrementan con la adición de fuentes de carbono. La adquisición de plásmidos o transposones posibilita la obtención de paquetes completos de genes que provea a las bacterias de resistencia a antibióticos y a metales pesados, a virulencia, a la posibilidad de utilizar nuevas fuentes de carbono y de nitrógeno, a sistemas de restricción de DNA y a la desensibilidad a la luz UV. Todo

esto es una gran ventaja para la supervivencia bacteriana en ambientes específicos, que resulta en la colonización de un nuevo nicho (Van Elsas *et al.*, 2007).

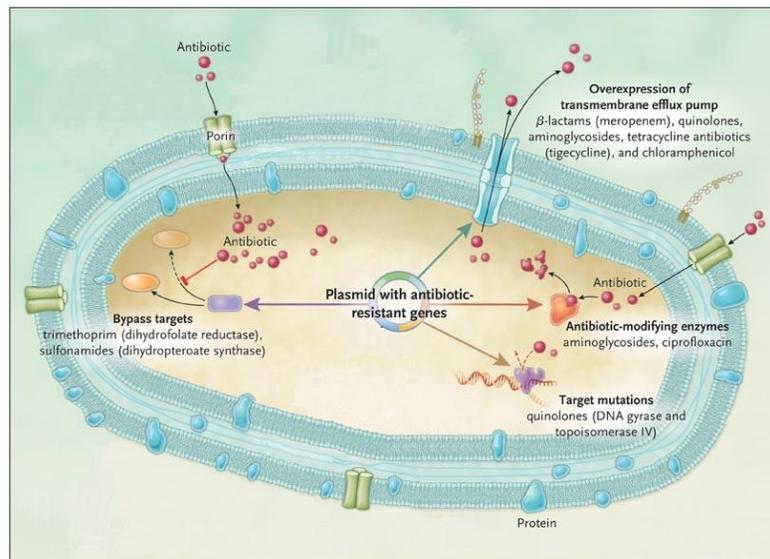
La transducción entre bacterias es mediada por bacteriófagos, proceso mediante el cual, el DNA bacteriano de una célula previamente infectada por un bacteriófago es encapsulado en nuevas partículas fágicas, que posteriormente serán introducidas a otra bacteria al momento de la infección. Se podría pensar que este proceso ocurre con poca probabilidad en el ambiente porque los bacteriófagos tienen receptores restringidos, a veces sólo para una especie bacteriana, y ésta podría ser resistente a la infección, pero se demostró que la transducción ocurre naturalmente en el suelo, probablemente porque la gran cantidad de bacteriófagos que existen en el suelo son bastante estables, recientemente se demostró que un mismo bacteriofago es capaz de infectar grupos bacterianos taxonómicamente diversos (Davison, 1999; Van Elsas *et al.*, 2007).

Los fragmentos de DNA que confieren resistencia a antibióticos se conocen específicamente como genes de resistencia. Existen muchos diversos genes de resistencia que están ampliamente distribuidos no sólo en el sector clínico, sino también en matrices ambientales con actividad humana como es el suelo, aguas subterráneas, aguas superficiales y sedimentos (Storteboom *et al.*, 2010).

Con objeto de esta investigación sólo abundaré en los mecanismos de resistencia bacteriana que se conocen hasta el momento a sulfonamidas y fluoroquinolonas. La resistencia a sulfonamidas resulta de la mutación del gen de la enzima dihidroterato sintetasa (*dhps* o *folP*), o está mediada por la transferencia horizontal de genes *folP* foráneos o partes de éste (Sköld, 2000). La resistencia también es adquirida mediante los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* que codifican para variantes de la enzima DHPS, esta enzima tiene cambios puntuales o es hasta 10% diferente en la secuencia de aminoácidos. Los genes *sul* se localizan comúnmente en transposones o en cassetes de genes, integrados en plásmidos que utilizan una amplia gama de hospederos (Figura 1; Huovinen *et al.*, 1995).

La resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas ocurre por uno o varios de los siguientes mecanismos: mutaciones cromosómicas en los genes estructurales de la DNA girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), mutaciones en los genes regulatorios que gobiernan la

permeabilidad del antimicrobiano en la membrana plasmática y expresión o sobreexpresión de bombas dependientes de ATP que son capaces de expulsar el antibiótico de la bacteria (*NorA*, *NorB* and *NorC*) (Oyamada *et al.*, 2006). A finales de los años 90 se describió por primera vez un plásmido que contenía un gen de resistencia a quinolonas (*qnrA*) que protege a la DNA girasa y la topoisomerasa IV de la acción de las fluoroquinolonas, reduciendo su capacidad de unión al DNA. A partir de ese momento se encontraron a otros dos genes que son transferidos por plásmidos que también confieren resistencia a antibióticos, *qnrB* y *qnrS*. Los genes *qnr* se caracterizan por la repetición en tándem de nucleótidos organizados en la secuencia consenso (Arsène *et al.*, 2007; Figura 1).



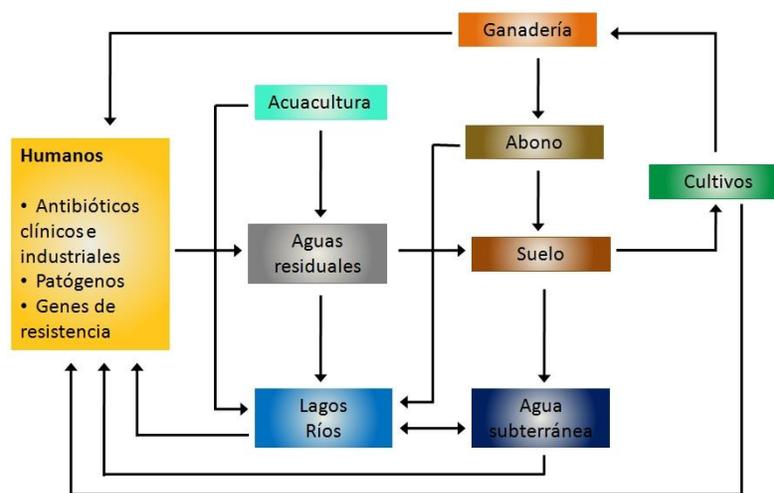
**Figura 1.** Mecanismos de resistencia de sulfamidas y quinolonas entre otros. Modificado de Peleg et al. (2010).

### 1.1.5 Consecuencia de coexistencia de contaminantes en el suelo

Además de la contaminación del suelo con antibióticos y los genes de resistencia asociados a éstos que se hayan generado por su presencia, los suelos sometidos a la aplicación de biosólidos, estiércol o agua residual también están sujetos a la introducción de bacterias patógenas multiresistentes y genes de resistencia libres en el medio. Se sabe que la tasa de sobrevivencia de los microorganismos con el cambio brusco de condiciones es baja, pero ha sido posible aislar

especies de *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* entre otras, de matrices de suelo contaminado (Flores-Tena *et al.*, 2007).

Al igual que los antibióticos, las bacterias patógenas multiresistentes y los genes de resistencia llegan a aguas superficiales y subterráneas por escorrentía y lixiviación, respectivamente (Tallon *et al.*, 2007), y pueden también ser traslocados a los cultivos (Chelius *et al.*, 2000), que eventualmente llegarán al ganado y/o al hombre. El contacto con estos patógenos multiresistentes y sus genes de resistencia implican un riesgo para la salud humana (Figura 2; Martínez, 2008).



**Figura 2.** Diseminación de antibióticos, patógenos y genes de resistencia

Además de los problemas de salud que los antibióticos, patógenos y genes de resistencia ocasionan, pueden también ser relevantes para la futura evolución y diseminación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias nativas del suelo, lo cual afectaría la dinámica de las comunidades bacterianas que participan activamente en los ciclos biogeoquímicos (Siemens *et al.*, 2010) y en la fertilidad del suelo, esto podría tener implicaciones negativas en el ecosistema (Martínez, 2008).

Se ha reportado que las sulfonamidas afectan la estructura bacteriana y modifican la tasa a la que ocurren los procesos de nitrificación y desnitrificación, éstos efectos dependen de la adición de fuentes de carbono que promuevan el crecimiento bacteriano (Hammesfahr *et al.*, 2008). Los suelos regados con agua residual son suelos ricos en fuentes de carbono ya que presentan altos

contenidos de materia orgánica y nutrientes (Siebe, 1998; Friedel *et al.*, 2000), por lo que son excelentes hábitats para la proliferación bacteriana.

En el suelo existen diferentes microambientes que se distinguen por sus parámetros bióticos y abióticos, entre ellos se encuentran la matriz del suelo y la rizósfera, particularmente distintos entre sí. La rizósfera es la porción de suelo influenciado por el metabolismo de las raíces de plantas y se caracteriza por ser rico en nutrientes como resultado de los exudados de las raíces, éste microambiente se describe como un sitio crítico donde la biomasa y la actividad bacteriana es mayor que en la matriz del suelo. Una mayor actividad bacteriana en la rizósfera explica que este microambiente sea preferencial para la transferencia de genes (Berg *et al.*, 2005).

Las raíces de las plantas forman bioporos durante su crecimiento, que se caracterizan por ser bastante estables ya que permanecen hasta después del decaimiento de la raíz (Paul, 2007), se sabe que estos bioporos participan de forma importante en el transporte del agua, así como de antibióticos y patógenos, ya que forman flujos preferenciales en el suelo (Tallon *et al.*, 2007; Siemens *et al.*, 2010; Ghestem *et al.*, 2011). Cuando estos contaminantes coexisten en un nicho donde los genomas bacterianos pueden cambiar rápidamente como es la rizósfera, la dispersión de genes de resistencia a antibióticos puede incrementarse.

En el presente trabajo se realizó un experimento en monolitos inalterados de suelo, es decir, bloques de suelo que conservan la porosidad natural en forma de grietas y bioporos de raíces, de un sitio que ha sido regado con agua residual durante varios años y un sitio que no ha estado en contacto con este tipo de agua. A los monolitos se les aplicaron irrigaciones con lluvia artificial ( $\text{CaCl}_2$ ) o agua residual, así como una o dos dosis de sulfametoxazol y ciprofloxacino, junto con la irrigación se aplicó un colorante para poder trazar la infiltración del agua, verificar si ésta efectivamente ocurre preferencialmente a través de bioporos de raíces, y poder muestrear en forma diferenciada el suelo cercano a las raíces (i.e. la rizósfera) o sitios de infiltración (coloreado) y la matriz del suelo (no coloreada).

## 2. Hipótesis

(i) El efecto del sulfametoxazol en la dispersión de genes de resistencia será mayor que el efecto del ciprofloxacino. (ii) La dispersión de genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul1* y *sul2*) y a ciprofloxacino (*qnrB* y *qnrS*) será mayor en la rizósfera o en sitios de infiltración que en la matriz del suelo. (iii) La dispersión de estos genes de resistencia será mayor en un suelo con una mayor biomasa bacteriana que ha estado expuesta a concentraciones subletales de estos antibióticos como es el sitio que se ha regado con agua residual durante varios años que en el suelo del sitio de temporal.

### 3. Objetivo general

Analizar la relación que existe entre la acumulación de los antibióticos sulfametoxazol y ciprofloxacino y la dispersión de genes de resistencia a éstos (*sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS*) tanto en la rizosfera como en la matriz del suelo de un sitio que nunca se ha regado con agua residual y un sitio que lleva varios años bajo este tipo de riego.

#### 3.1 Objetivos particulares

- Visualizar el trayecto de infiltración del agua en columnas de suelo.
- Verificar que la infiltración se lleve a cabo principalmente a lo largo de bioporos formados por raíces.
- Cuantificar el gen *16S rDNA*, como indicador de biomasa bacteriana en la rizósfera y en la matriz del suelo de los sitios con diferente régimen de riego.
- Determinar la concentración de antibióticos (sulfametoxazol y ciprofloxacino) retenidos en la rizósfera y en la matriz del suelo de los sitios con diferente régimen de riego.
- Determinar la concentración de genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul1* y *sul2*) y ciprofloxacino (*qnrB* y *qnrS*) en relación al gen *16S rDNA* en la rizósfera y en la matriz del suelo de los sitios con diferente régimen de riego.

## **4. Materiales y métodos**

### *4.1 Descripción del área de estudio*

El Valle del Mezquital se localiza en el suroeste del estado de Hidalgo, entre la sierra de Actopan y la sierra de Xinthe, se encuentra entre 60 y 100 km al norte de la Ciudad de México, tiene una altitud cercana a los 2 mil msnm, su extensión es aproximadamente de 90 mil ha (CNA, 2002) que se distribuyen en 27 municipios (IDRC – OPS/HEP/CEPIS, 2002).

La región tiene un clima semiárido con temperaturas de 16 a 18°C, con estación de lluvias en verano (junio-septiembre) y precipitaciones anuales que varían de 400 mm en la parte norte del valle a 700 mm en el sur (BGS-CNA, 1998). La evapotranspiración media anual es de 2,087 mm (CNA, 2002).

La vegetación natural del lugar se encuentra únicamente en las partes altas y pertenece a la clasificación de matorral xerófilo, hay varias especies de agaves y encinares arbustivos (Rzedowski, 1978), así como especies de mezquites y huizaches. Las partes bajas están dedicadas principalmente a la agricultura, donde los cultivos más importantes son el maíz y la alfalfa, ésta última permanece sembrada de dos a tres años continuos, seguido de dos años de cultivo alternado de maíz o legumbres en el ciclo primavera-verano, y pasto, avena o cebada en el ciclo otoño-invierno (BGS-CNA, 1998).

Según el reporte del British Geological Survey y de la Comisión Nacional de Agua (1998) el material parental del Valle del Mezquital se caracteriza por rocas de diferentes edades y composiciones. Las rocas sedimentarias, calizas y sedimentos marinos se distribuyen mayormente en la zona norte del Valle, y pertenecen a las formaciones el Doctor, Mezcala y Soyatal, respectivamente. A lo largo de todo el valle se encuentra la depositación de materiales clásticos de ceniza y derrames de lava que formaron tobas de diferente clasificación que pertenecen a la formación Tarango y el grupo San Juan. En la parte noreste y suroeste del valle en las zonas de transición entre las montañas y el valle hay presencia de aluvión, constituido por gravas, arena-limos y suelo residual.

A partir de estos materiales se formaron los suelos característicos del Valle del Mezquital clasificados como leptosoles eútricos y réndzicos, feozems háplicos y cálcicos y vertisoles eútricos (Friedel *et al.*, 2000). Los leptosoles se caracterizan por ser muy someros (de 0-25 cm), lo cual no es muy propicio para el desarrollo vegetal. Los feozems son ricos en materia orgánica, su profundidad es media y tienen un buen desarrollo vegetal. Los vertisoles son suelos con grandes cantidades de arcilla (más de 30%), también ricos en materia orgánica, y son más profundos, por lo que son los suelos más productivos. El patrón de distribución característico de los piedemontes del Valle del Mezquital se caracteriza por la predominancia de los leptosoles en las partes altas, los feozems en las partes medias y los vertisoles se encuentran mayormente en las partes bajas del piedemonte (Siebe, 2010).

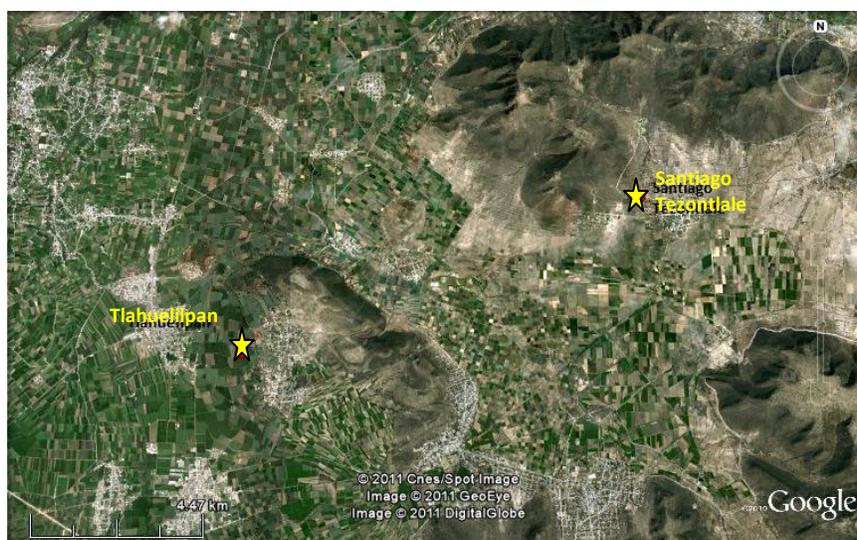
De acuerdo a los reportes del British Geological Survey y de la Comisión Nacional de Agua (1998 y 2002) el cauce principal en la zona es el río Tula, el cual recibe el efluente del río el Salto, el cual a su vez es la continuación del Tajo de Nochistongo que sirve para dar salida a las aguas residuales del emisor poniente y del emisor profundo provenientes de la Ciudad de México. Río abajo recibe el efluente del río Salado, en el cual a su vez desembocan las aguas residuales del gran canal del desagüe provenientes también de la Ciudad de México. Finalmente, el río Tula desemboca en el río Moctezuma que sigue su curso con dirección al norte pasando por los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz donde cambia su nombre a río Pánuco, el cual llega hasta Tamaulipas donde desemboca en el Golfo de México.

El Valle del Mezquital recibe aproximadamente  $40 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  de aguas residuales no tratadas que se utilizan parcialmente mezcladas con los  $12 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  de escurrimiento natural del río Tula durante la época de lluvias, para regar alrededor de 90,000 ha mediante una red de canales (CNA, 2002; Siebe *et al.*, 2010), por lo que se considera al Valle del Mezquital el sistema de irrigación agrícola con aguas residuales más extenso del mundo (Jiménez *et al.*, 2004). El uso de agua residual para riego comenzó oficialmente en esta zona en el año de 1912, aunque existen parcelas que ya se irrigaban con agua residual antes de esta fecha (Siebe *et al.*, 1994).

El riego se hace por inundación (efecto de gravedad). Las láminas de riego medias anuales varían entre 680 y 3,300 mm al año, dependiendo de la especie cultivada, de la estación del año y del tipo de suelo (Siebe *et al.*, 1994).

#### 4.2 Muestreo y montaje de columnas

Se eligieron dos campos de cultivo para extraer cuatro monolitos de cada uno de ellos. Ambos campos son representativos del tipo dominante de suelo en la zona, que corresponde a Phaeozem (IUSS, 2007); uno tiene una textura franco-limosa en su horizonte superficial y tiene un régimen de riego de temporal y nunca ha sido regado con agua residual (AR) en el municipio de Santiago Tezontlale (477919 m E, 2225262 m N), el otro tiene una textura arcillosa y tiene un régimen de riego aproximadamente mensual con agua residual desde hace 80 años en la localidad de Tlahuelilpan (488793 m E, 2229528 m N; Figura 3).



**Figura 3.** Mapa de localización de los puntos de muestreo en los municipios de Santiago Tezontlale y Tlahuelilpan

Se esculpieron monolitos columnares no perturbados de los 30 cm superficiales del suelo, mediante la eliminación del suelo adyacente para que posteriormente cupiera en un cilindro de acero de 15 cm de diámetro y 20 cm de longitud. El cilindro se deslizó sobre el monolito y se cortó cuidadosamente la parte inferior con un cuchillo para recuperarlo. También se obtuvo una muestra perturbada de cada suelo adyacente a los monolitos, para conocer sus características físicas, lo cual se llevó a cabo en el laboratorio de física de suelos del Instituto de Geología, UNAM. Los datos se muestran en el cuadro 1.

En este estudio se decidió utilizar monolitos intactos, dado que en ellos se preservan la porosidad, estructura y textura del suelo, características que afectan el transporte de agua y solutos (Prado et al., 2009).

**Cuadro 1.** Características físico-químicas de los suelos utilizados en el estudio.

Parámetro	Temporal	Riego
Arcilla (%)	62	42
Limo (%)	19	38
Arena (%)	19	20
Carbono orgánico total (%)	0.92	2.1
Nitrógeno total (%)	0.22	0.07
pH	7.2	8.01
Conductividad hidráulica (cm h <sup>-1</sup> )	1.14	1.44
SMX total (µg kg <sup>-1</sup> ; Dalkmann <i>et al.</i> , 2012)	0.043	5.96
CIP total (µg kg <sup>-1</sup> ; Dalkmann <i>et al.</i> , 2012)	0.54	1.22

Una vez trasportadas al invernadero, se eliminó el suelo compactado de la parte inferior y se colocaron sobre dispositivos de plástico rígido en forma de embudo. Estos dispositivos tenían una placa porosa en la que previamente se colocó un filtro de celulosa con una apertura de 0.5 µm (Millipore) y una capa de arena de cuarzo lavada (0.2 mm) para asegurar el contacto hidráulico y facilitar el drenado del agua contenida en los macroporos (30 µm de diámetro); los embudos estaban conectados a un sistema de vacío con una succión de 10 kPa (pF2).

Los monolitos fueron sembrados con alfalfa (25 semillas por monolito) para simular la densidad encontrada en campo, éstas permanecieron en el invernadero del Instituto de Geología de la UNAM bajo condiciones ambientales controladas (20.5±2.5°C, 40-80% humedad y 13-40 W/m<sup>2</sup> de intensidad luminosa) por 6 meses, durante los cuales la alfalfa se cosechó dos veces para estimular el desarrollo del sistema radical dentro del monolito. El suelo de los monolitos se mantuvo húmedo para evitar la formación de grietas que participaran en la infiltración preferencial, al igual que en Siemens *et al.*, (2010) ésta es una importante diferencia entre nuestro estudio y la situación en el campo.

### 4.3 Irrigaciones (tratamientos)

Tres monolitos de cada sitio se irrigaron con agua residual derivada del canal que se utiliza para regar el campo de riego (Canal Tlamaco-Juandhó). En el cuadro 2 se enumeran algunas de las características físicas, químicas y biológicas del agua residual utilizada para la irrigación, las determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de física de suelos, Bonn y Freiburg.

**Cuadro 2.** Características físicas, químicas y biológicas del agua residual.

Parámetro	
pH	7.2
Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	1040
Sólidos totales disueltos (ppm)	520
Sulfametoxazol ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.41
Ciprofloxacino ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.16
Genes de resistencia (copias/100 mL)	
<i>sul1</i>	$1.58 \times 10^9$
<i>sul2</i>	$1.28 \times 10^7$
<i>qnrB</i>	$3.40 \times 10^6$
<i>qnrS</i>	$5.43 \times 10^6$

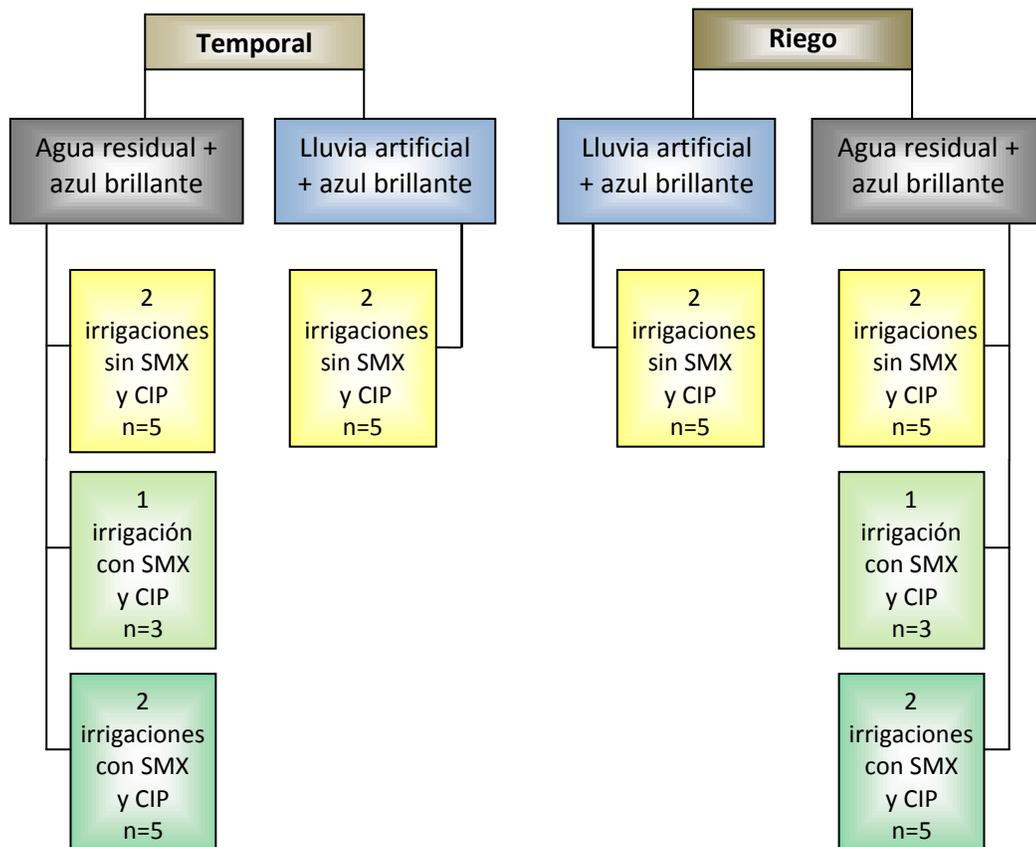
(Siebe et al., en preparación)

Al agua residual se le añadió el colorante azul brillante (eriglaucina,  $2 \text{ g l}^{-1}$ ; Sigma Aldrich), este colorante se distingue fácilmente en los suelos utilizados, tiene baja toxicidad y una movilidad en el suelo parecida a la del agua (Ketelsen *et al.*, 1999). El colorante permite visualizar las zonas de infiltración del agua para realizar posteriormente muestreos selectivos de la matriz del suelo (zonas no coloreadas) y de las zonas de infiltración (zonas coloreadas), así como medir la cobertura del colorante y hacer un análisis semi-cuantitativo de la dispersión del trazador (Forrer *et al.*, 2000) mediante el programa de computo Image Pro (Media Cybernetics Inc., EUA).

Dos de los monolitos de cada sitio que se irrigaron con agua residual, se le añadieron adicionalmente los antibióticos sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacino (CIP) con una concentración de  $200 \text{ mg l}^{-1}$  de cada uno (Sigma Aldrich). Un monolito de cada tipo de suelo se irrigó una vez, mientras otro monolito tuvo dos irrigaciones con esta solución de antibióticos. El tercer monolito se irrigó sólo con agua residual adicionada con el colorante, pero sin antibióticos. El cuarto

monolito se regó con una solución de lluvia artificial ( $\text{CaCl}_2$  0.01 M) que contenía sólo el colorante. La figura 4 muestra un esquema del diseño experimental.

Se eligieron estos antibióticos con base en los datos disponibles sobre su consumo en la República Mexicana (IMS Health, 2008) y la información sobre su persistencia y movilidad en el suelo, donde el SMX es más móvil y menos persistente que el CIP (Thiele-Bruhn, 2003). La concentración aplicada con cada irrigación fue de  $250 \text{ mg l}^{-1}$ .



**Figura 4.** Esquema del diseño experimental

Las irrigaciones se realizaron con un volumen de poro ( $V_o$ ) de las soluciones correspondientes. El volumen de poro se obtiene multiplicando el volumen total del monolito de suelo por el contenido volumétrico de agua en el mismo (cuadro 3). Las irrigaciones se llevaron a cabo en un solo evento con el fin de producir un efecto de infiltración preferencial por macroporos, tal como ocurre en campo. Entre la primera y la segunda irrigación hubo una semana de diferencia.

**Cuadro 3.** Volúmenes de agua aplicados en ambos riegos que corresponden a un volumen de poro para cada columna.

Tratamiento	Temporal		Riego	
	$V_o = V_t * \theta$ (mL)	Volumen Aplicado (mL)	$V_o = V_t * \theta$ (mL)	Volumen Aplicado (mL)
Lluvia artificial	799.87	800	861.05	861
Agua residual (AR)	910.37	910	814.28	820
1 irrigación AR + antibióticos	823.45	830	725.27	730
2 irrigaciones AR + antibióticos	912.14	910	789.44	790

Vo: volumen de poro, Vt: volumen total,  $\theta$ : humedad volumétrica ( $\text{cm}^3/\text{m}^3$ ), AR: agua residual Siebe y Siemens, comunicación personal<sup>1</sup>

#### 4.4 Muestreo selectivo en los monolitos

Una semana después del último evento de riego los monolitos se cortaron verticalmente en tres capas de aproximadamente 5 cm de espesor y se tomaron fotografías con una cámara Canon Power Shot SX230 HS. Lo anterior se hizo para verificar que las zonas de infiltración preferencial coincidían con la presencia de las raíces. Se muestreó selectivamente distinguiendo las zonas coloreadas y no coloreadas. Los monolitos que recibieron una irrigación se muestrearon a dos profundidades: los primeros 2 cm (superficial), y la parte intermedia y del fondo del monolito se muestrearon conjuntamente, esto es porque con una irrigación la parte del fondo del monolito no presentaba zonas coloreadas. Los monolitos que recibieron 2 irrigaciones se dividieron en 3 profundidades, la parte superficial (2 cm), parte intermedia (2 – 11 cm) y la parte del fondo del monolito (11 – 20 cm). En cada profundidad se muestreó o bien la zona coloreada o la no coloreada y de cada zona se colectaron 3 muestras y se mezclaron en una muestra compuesta.

<sup>1</sup> Datos generados en el marco del proyecto DFG-CONACyT (I0110-193-10, GR1792/4-1, SI1106/5-1)

En las muestras de suelo se cuantificaron tanto el contenido residual de los antibióticos SMX y CIP, así como los genes que confieren resistencia a los antimicrobianos SMX (*sul1* y *sul2*) y CIP (*qnrB* y *qnrS*) en el suelo. Se realizó la determinación de la densidad bacteriana en cada muestra mediante el uso del gen *16s rDNA*.

#### 4.5 Extracción y cuantificación de antibióticos

Se analizaron únicamente las muestras de los monolitos regados con agua residual de ambos sitios (n=26) por duplicado, como control de calidad en el proceso de extracción y cuantificación de los antibióticos, por lo que se obtuvieron 52 mediciones. En las muestras de los monolitos regados con lluvia artificial no se determinó la concentración de antibióticos.

Se distribuyeron 10 g de peso seco (PS) de cada una de las muestras en vasos de centrifuga de borosilicato. La extracción de la fracción bioaccesible del suelo se realizó con 25 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, la suspensión permaneció en agitación durante 48 h, seguido de una centrifugación por 20 min a 2500 x g. Se colectaron 950  $\mu\text{L}$  del supernadante y se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de una mezcla de los antibióticos marcados isotópicamente con una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se almacenó hasta su medición a una temperatura de  $-21^\circ\text{C}$ , (sulfametoxazol, ring- $^{13}\text{C}_6$ ,  $\geq 98\%$  puro; ciprofloxacino, carboxyl- $^{13}\text{C}_3$ , quinoline- $^{15}\text{N}$ ,  $\geq 98\%$  puro; Sigma-Aldrich).

Para extraer la fracción fuertemente adsorbida al suelo se utilizó una extracción acelerada con solventes (ASE). Se utilizaron 2 diferentes solventes para cada uno de los antibióticos, para el sulfametoxazol fue una solución 1:1 de metanol:agua (v/v) de acuerdo a Göbel *et al.*, (2005) y para el ciprofloxacino fue una solución 1:1 de ácido fosfórico acuoso:acetonitrilo 50 mM (v/v) de acuerdo a Golet *et al.*, 2001. Nuevamente, se colectaron 950  $\mu\text{L}$  del extracto y se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de una mezcla de los antibióticos marcados isotópicamente con una concentración final de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

La cuantificación de los antibióticos en los extractos de suelo se realizó mediante cromatografía líquida en tándem con espectroscopía de masas (LC-MS/MS). Ambos antibióticos fueron analizados en la misma corrida bajo las siguientes especificaciones: la separación de los antibióticos se hizo con una columna HPLC XBridge C18 (Waters, Milford, MA, USA) protegiéndola

con una columna guardia (Sentry 2.1x10 mm, Waters, Milford, MA, USA). Los eluyentes fueron metanol y agua Millipore, ambos acidificados con 0.1% de ácido fórmico. El caudal fue de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . El gradiente de elución empezó con una solución de metanol al 5%, incrementando después de 5 min a 60%, elevándose de 60 a 80% después de 15 min, una elevación posterior de 80 a 95% después de 16 min, manteniendo 95% por 30 seg para después regresar a las condiciones iniciales en 30 seg. Las condiciones iniciales se mantuvieron hasta que el método terminó después de 25 min. La cuantificación se realizó con un sistema ThermoFinnigan compuesto por un automuestreador Surveyor, una bomba Surveyor MS plus y un espectrómetro TSQ Quantum Ultra tandem equipado con una fuente de iones en electrospray (HESI) operando de forma positiva (Thermo Finnigan, Dreieich, Alemania). Para los extractos de  $\text{CaCl}_2$  y ASE, 10  $\mu\text{L}$  de la muestra se inyectaron en el sistema utilizando un loop de inyección parcial. Los parámetros de ionización fueron: corriente de descarga 4.0 kV, temperatura de vaporización 390°C y temperatura capilar de 217°C. Como gas auxiliar se utilizó nitrógeno y se utilizó helio como gas colisionador con una presión de 1.5 mTorr. El espectrofotometro de masas se operó en forma de monitoreo de reacción selecta (SRM) y se midieron por lo menos dos transiciones para cada antibiótico (Dalkmann et al., 2012).

#### 4.6 Cuantificación de los genes 16S rDNA, sul y qnr

Se analizaron las muestras de los monolitos regados tanto con agua residual como con lluvia artificial de ambos sitios (n=36) las muestras se analizaron técnicamente por triplicado, como control de calidad en el proceso de extracción de DNA y cuantificación de los genes (Pfaffl *et al.*, 2009), por lo que se hicieron 108 mediciones.

La extracción de DNA genómico se realizó de 400 mg de suelo con el kit NucleoSpin Soil (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del proveedor y se eluyó en 50  $\mu\text{L}$  de buffer. El DNA genómico fue utilizado subsecuentemente como templado para el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tiempo real utilizando una dilución 1:5 para la cuantificación de los genes de resistencia *sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS* y para la cuantificación del gen *16S rDNA* se utilizó una dilución 1:50.

Los métodos fueron optimizados para el termociclador LightCycler 480 (Roche) y la utilización de reactivos de esta misma marca, LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I y LightCycler®

TaqMan® Master, las pruebas Taqman fueron marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5´ y quenched con tetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3´. Los cebadores y pruebas para *16S rDNA*, *sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS* se describen en el cuadro 4. Los templados para generar las curvas de calibración fueron diluciones seriadas de productos de PCR purificados de geles de agarosa. El volumen final de reacción se ajustó a 10 µL, tal como se describe en Dalkmann *et al.*, (2012).

Para la cuantificación del gen bacteriano *16S rDNA* se utilizaron 2 µL TaqMan Master (Roche), 0.5 µM de cada cebador, 0.15 µM de prueba TaqMan y 0.875 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95°C para conseguir una completa desnaturalización y activación de la enzima, seguido de 45 ciclos de 10s de desnaturalización a 95°C, 40s de alineamiento a 50°C y 1s de elongación a 72°C. La cuantificación de *sul1* contenía 2 µL TaqMan Master (Roche), 0.4 µM de cada cebador, 0.15 µM de prueba TaqMan y 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95°C y 45 ciclos de 10s a 95°C, 30s a 58°C y 1s a 72°C. Para el gen *sul2* se utilizaron 2 µL de TaqMan Master (Roche), 0.7 µM de cada cebador, 0.15 µM de prueba TaqMan y 0.75 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95°C y 45 ciclos de 10s a 95°C, 40s a 51°C y 1s a 72°C. Para los genes *qnrB* y *qnrS* se utilizaron 1 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 0.5 µM de cada cebador y 4 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron las mismas para ambos genes, 10 min a 95°C y 30 ciclos de 10s a 95°C, 5s a 56°C y 30s a 72°C.

**Cuadro 4.** Cebadores y pruebas TaqMan utilizadas para la amplificación por PCR en tiempo real.

Gen	Amplificación (pb)	Cebadores y prueba TaqMan	Secuencia (5´- 3´)	Ta (°C)	Referencia
<i>16S rDNA</i>	439	Bact348f Bact786r tpBact	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACRDAG GGACTACYVGGGTATCTAAT AGGCAGCAGTDRGGAAT	50	Takai <i>et al.</i> , 2000
<i>sul1</i>	67	qSUL653f qSUL719r tpSUL1	CCGTTGGCCTTCTGTAAAG CAGCGAGCCTTGC GGCGG TTGCCGATCGCGTGAAGT	58	Heuer <i>et al.</i> , 2007
<i>sul2</i>	60	qsul2-595f qsul2-654r tpsul2-614	CGGCTGCGCTTCGATTT CGCGCGCAGAAAGGATT CGGTGCTTCTGTCTGTTTCGCGC	51	Heuer <i>et al.</i> , 2008
<i>qnrB</i>	497	qnrB-F qnrB-R	AGCGGCACTGAATTTAT GTTTGCTGCTCGCCAGTC	56	Guillard <i>et al.</i> , 2009

<i>qnrS</i>	600	qnrS-F qnrS-R	GGAAACCTACAATCATACATA GTCAGGATAAACAACAATACC	56	Guillard <i>et al.</i> , 2009
-------------	-----	------------------	--	----	-------------------------------

pb: pares de bases, Ta: temperatura de alineamiento.

#### 4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico inició con la prueba de distribución normal (D'Agostino & Pearson omnibus) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett) a las variables: biomasa bacteriana (*16s rDNA*), concentración de antibióticos SMX (CaCl<sub>2</sub>, ASE total) y CIP (CaCl<sub>2</sub>, ASE total) y cantidad de genes de resistencia *sul1* y *sul2*. Los datos que no superaron los supuestos para estadística paramétrica fueron transformados mediante log<sub>10</sub>. Para comparar dos grupos, se utilizó la prueba *t* de Student del paquete estadístico Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc. USA).

Para comparar las concentraciones de antibióticos y genes en los suelos estudiados se elaboró un diseño en parcelas subdivididas. Para ello se desarrollo un modelo que contempló tres factores y un bloque; la parcela grande consistió en el sitio (factor A), la subparcela fue el tratamiento (factor B), la subdivisión de la subparcela (sub-subparcela) consistió en el microambiente (factor C) y el bloque se realizó con la profundidad de la muestra. El modelo estadístico se presenta a continuación:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \chi_k + \delta_{ij} + \phi_{ik} + \gamma_{jk} + \eta_{ijk} + b_l + p_{il} + sp_{jil} + ssp_{kjl} + \varepsilon_{ijkl}$$

En la expresión anterior *y* es la variable dependiente,  $\mu$  representa la media general,  $\alpha_i$  el *i*-ésimo nivel del factor asociado a las parcelas principales,  $\beta_j$  el *j*-ésimo nivel del factor asociado a las subparcelas dentro de las parcelas principales,  $\chi_k$  el *k*-ésimo nivel del factor asociado a las subdivisión de la subparcela y  $\delta_{ij}$ ,  $\phi_{ik}$ ,  $\gamma_{jk}$  y  $\eta_{ijk}$  las correspondientes interacciones. Los términos aleatorios de éste modelo corresponden a los efectos de bloques (*b*), los efectos de parcelas (*p*), los efectos de subparcelas (*sp*), los efectos de sub-subparcelas (*ssp*) y el error experimental ( $\varepsilon_{ijkl}$ ). Para realizar el análisis se utilizó el procedimiento GLM de SAS 9.0 (SAS nstitute Inc). En caso de resultar significativo cualquiera de los efectos principales o las interacciones, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Las figuras se realizaron con el programa estadístico Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc.). En todos los casos se presentan los valores promedio  $\pm$  error estándar de la media y se consideró un nivel de  $p < 0.05$  como significativo.

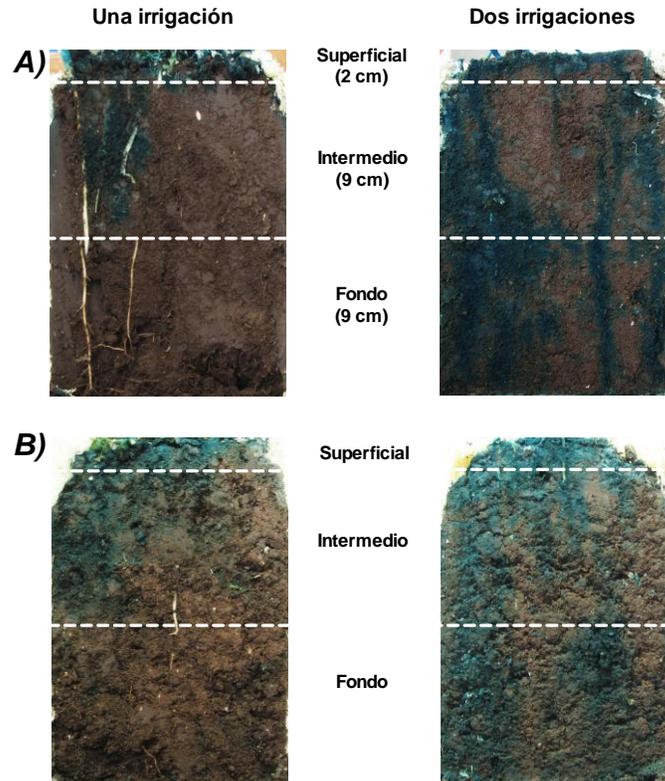
## 5. Resultados

### 5.1 Infiltración del agua

La ruta de infiltración del agua se visualizó al agregar azul brillante a la mezcla de cada tratamiento, ya que las zonas por donde se infiltró el agua quedaron coloreadas en azul mientras que las zonas por donde no se infiltró el agua permanecieron del color natural del suelo, es decir, no se colorearon. En la figura 5 se muestran imágenes representativas de dos monolitos de suelo de cada sitio. En las imágenes se hizo evidente la distribución del colorante; el 100% de los monolitos presentaron la parte superficial completamente coloreada (2 cm). En los monolitos con una sólo irrigación el colorante se infiltró hasta la parte intermedia (aproximadamente 11 cm desde la superficie), y al irrigar los monolitos en dos ocasiones el colorante se infiltró hasta el fondo del monolito.

El suelo del sitio de temporal fue más denso y estuvo más compactado que el del sitio de riego, el cual se apreció más estructurado y poroso. Los límites entre las zonas coloreadas y no coloreadas del sitio de temporal fueron más definidos que en el sitio de riego.

En el sitio de temporal los bioporos hechos por las raíces de las plantas fueron la principal trayectoria de infiltración de agua, sin embargo, en el sitio de riego la infiltración de agua se llevo a cabo por todo el sistema poroso del suelo, ya fuera rizosférico o por la matriz del suelo. Al medir la cobertura del colorante en los monolitos que experimentaron dos irrigaciones encontramos que en el sitio de temporal éste cubrió alrededor del 50% de la superficie y en el sitio de riego cerca del 80%.



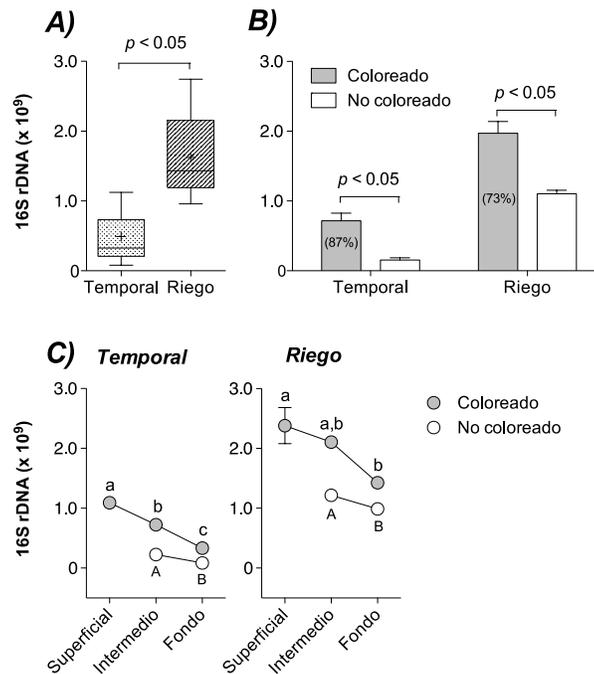
**Figura 5.** Infiltración de agua en los monolitos del sitio de temporal (A) y del sitio de riego (B). Con una y dos irrigaciones, distinguiendo entre las tres profundidades muestreadas.

## 5.2 Condiciones inalteradas del suelo

El número de copias de los genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul1* y *sul2*) y a ciprofloxacino (*qnrB* y *qnrS*), así como del gen bacteriano *16S rDNA* detectados en un gramo de suelo (peso seco) se concentraron en el anexo 3.

Para determinar las características iniciales de los terrenos se utilizaron los datos obtenidos del tratamiento con lluvia artificial ( $\text{CaCl}_2$  0.01M) debido a que éste tratamiento representa la condición inalterada del suelo, de esta forma se evaluó la biomasa bacteriana y la concentración de genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul1* y *sul2*) previos al tratamiento con agua residual y antibióticos. En la Figura 6 se presenta la cuantificación de la biomasa bacteriana del suelo, para lo cual se utilizó como estimador a la concentración del gen *16S rDNA*; el sitio de riego presentó una biomasa bacteriana mayor que el sitio de temporal (Figura 6A,  $p < 0.05$ ). Con respecto a los microambientes, en ambos sitios la concentración del gen *16S* resultó mayor en la zona coloreada

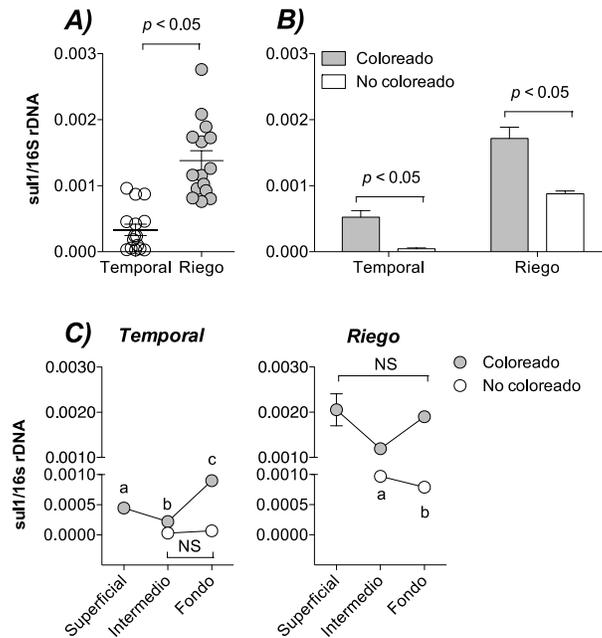
(Figura 6B,  $p < 0.05$ ). El porcentaje de distribución de la biomasa total dentro de la zona coloreada fue de 87 y 73 % para el sitio de temporal y riego, respectivamente. Por otra parte, se presentaron diferencias significativas cuando se considero la profundidad (Figura 6C). Para ambos sitios la biomasa disminuyó ( $p < 0.05$ ) conforme se incrementó la profundidad.



**Figura 6.** Biomasa bacteriana detectada en los monolitos de suelo de temporal y de riego tratados con lluvia artificial (promedio y error estándar). A) Contenido de *16s rDNA* en el sitio de temporal y en el sitio de riego, B) Biomasa bacteriana detectada en las zonas coloreadas y no coloreadas y C) Biomasa bacteriana encontrada a diferentes profundidades de acuerdo a la zona coloreada y no coloreada. En B se presenta el porcentaje de biomasa perteneciente a la zona coloreada. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

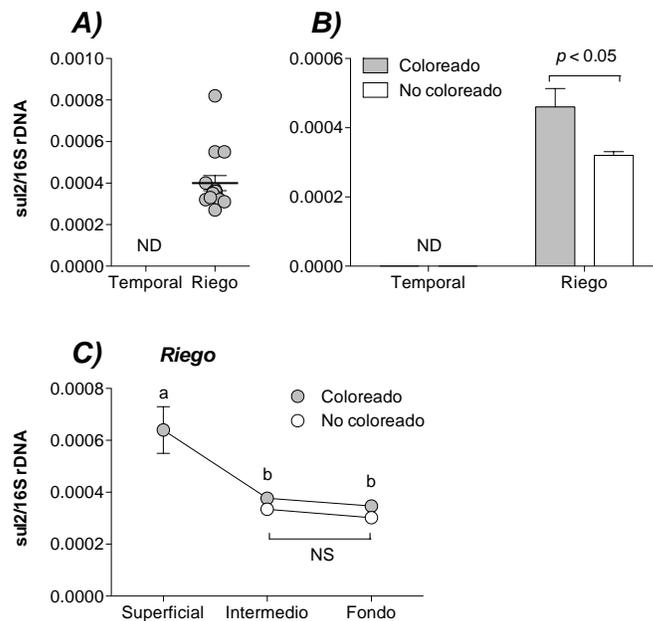
En la Figura 7 se presenta la cuantificación del gen de resistencia a sulfametoxazol *sul1* en el suelo, para lo cual se normalizó con la concentración del gen *16S rDNA*, para disminuir la variabilidad ocasionada por la cantidad de DNA extractable y amplificable; el sitio de riego presentó una concentración del gen *sul1* mayor que el sitio de temporal (Figura 7A,  $p < 0.05$ ). Con respecto a los microambientes, en ambos sitios la concentración de este gen de resistencia resultó mayor en la zona coloreada (Figura 7B,  $p < 0.05$ ). En lo referente a la profundidad (Figura 7C), en la zona coloreada del sitio de temporal la concentración de *sul1* disminuyó y posteriormente se incrementó conforme aumentó la profundidad ( $p < 0.05$ ), en la zona no coloreada del mismo sitio

no se observó ningún cambio entre la parte intermedia y el fondo del monolito; por otro lado, en la zona coloreada del sitio de riego no se encontró diferencia con respecto a la profundidad, pero en la zona no coloreada la concentración de *sul1* es mayor en la parte intermedia que en el fondo del monolito ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Concentración del gen *sul1* en los monolitos de suelo de temporal y de riego tratados con lluvia artificial (promedio y error estándar). A) Contenido de *sul1* en el sitio de temporal y en el sitio de riego, B) Concentración de *sul1* detectada en las zonas coloreadas y no coloreadas y C) Concentración de *sul1* encontrada a diferentes profundidades de acuerdo a la zona coloreada y no coloreada. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ . NS = no significativo.

En la Figura 8 se presenta la cuantificación del gen de resistencia a sulfametoxazol *sul2* en el suelo, para lo cual se normalizó con la concentración del gen *16S rDNA*, para disminuir la variabilidad ocasionada por la cantidad de DNA extractable y amplificable; la concentración de este gen estuvo bajo el límite de detección en el suelo de temporal (Figura 8A). Con respecto a los microambientes, la concentración del gen *sul2* resultó mayor en la zona coloreada (Figura 8B,  $p < 0.05$ ). En lo referente a la profundidad (Figura 8C), en la zona coloreada la concentración de este gen disminuyó conforme aumentó la profundidad ( $p < 0.05$ ), y en la zona no coloreada no se observó ningún cambio entre la parte intermedia y el fondo del monolito.



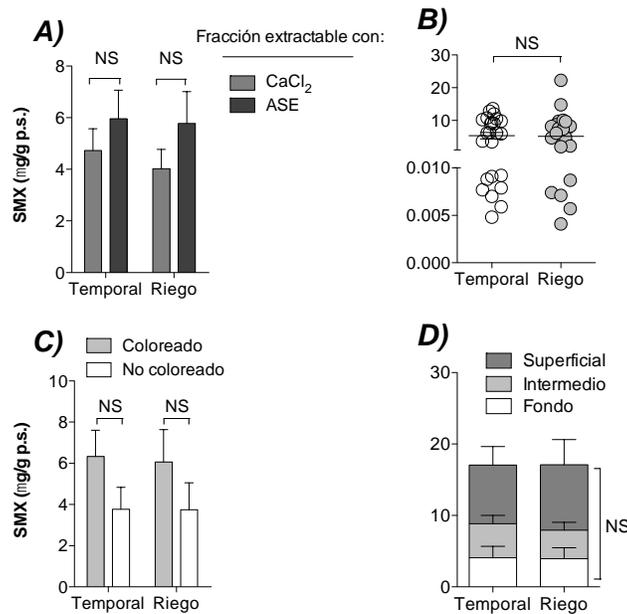
**Figura 8.** Concentración del gen *sul2* en los monolitos de suelo de temporal y de riego regados con lluvia artificial (promedio y error estándar). A) Contenido de *sul2* en el sitio de temporal y en el sitio de riego, B) Concentración de *sul2* detectada en las zonas coloreadas y no coloreadas y C) Concentración de *sul2* encontrada a diferentes profundidades de acuerdo a la zona coloreada y no coloreada. ND = no detectado. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ , ND= no detectado, NS = no significativo.

### 5.3 Comportamiento del sulfametoxazol y del ciprofloxacino en el suelo por efecto del riego con agua residual y la aplicación de antibióticos.

Las concentraciones de los antibióticos sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacino (CIP) se reportan en el anexo 2. De las 52 mediciones obtenidas, 5 valores se consideraron atípicos por tener uno o dos órdenes de magnitud más que el resto de las muestras del mismo monolito y se descartaron para la representación gráfica y el análisis estadístico.

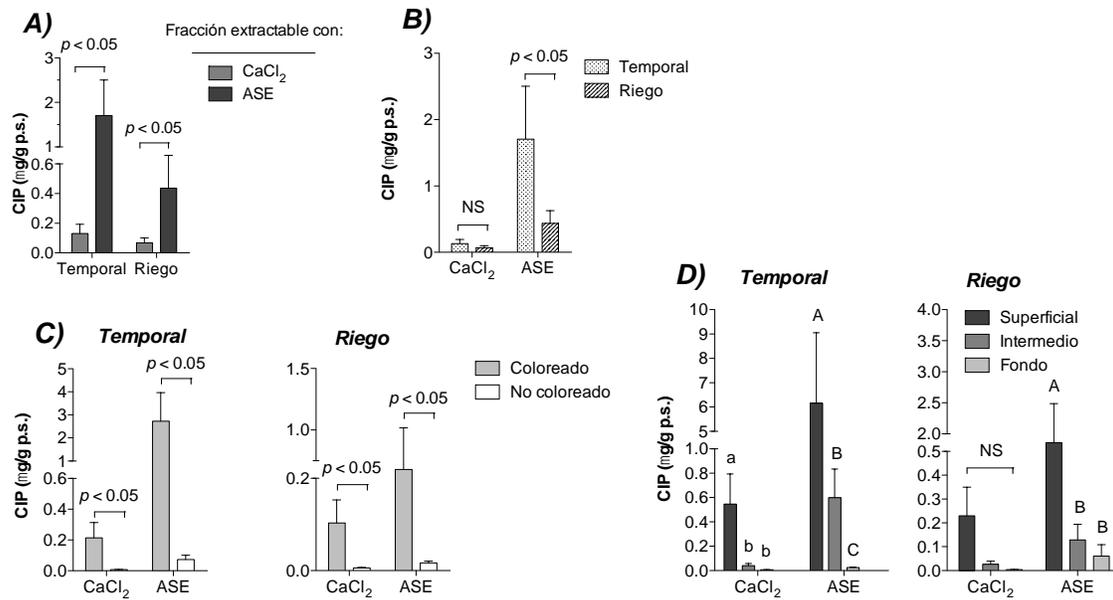
Para determinar el comportamiento general del sulfametoxazol (SMX) y el ciprofloxacino (CIP) en el suelo se utilizaron los datos obtenidos en los tres tratamientos aplicados. En la Figura 9 se presenta la cuantificación de SMX; no se encontraron diferencias entre las fracciones extractable con ASE y  $\text{CaCl}_2$  tanto en el sitio de temporal como en el sitio de riego (Figura 9A,  $p < 0.05$ ), por lo

cual los análisis posteriores se realizaron con el promedio de ambas fracciones. La concentración de SMX fue igual en el sitio de temporal que en el sitio de riego (Figura 9A,  $p < 0.05$ ). Tampoco se encontraron diferencias en la concentración de SMX en los microambientes analizados, ni en las tres profundidades tomadas en cuenta (Figura 9C, 9D,  $p < 0.05$ ).



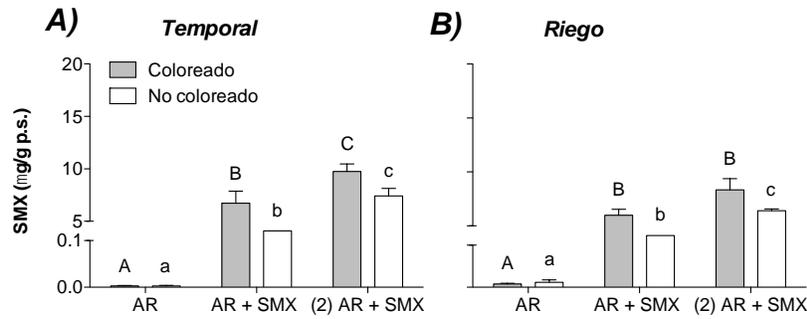
**Figura 9.** Concentración de SMX (promedio y error estándar). A) En la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub> y con ASE de ambos sitios de estudio, B) SMX detectado en el sitio de temporal y de riego, C) SMX encontrado en los diferentes microambientes analizados, D) Concentración de SMX en diferentes profundidades. NS=no significativo.

En la Figura 10 se presenta la cuantificación de CIP; la fracción extractable con ASE tuvo una concentración mayor que la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub> en los dos sitios estudiados (temporal 93%, riego 86%; Figura 10A,  $p < 0.05$ ). En la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub> no se encontraron diferencias entre el sitio de temporal y el de riego, mientras que en la fracción extractable con ASE la concentración de CIP fue menor en el sitio de riego (Figura 10B,  $p < 0.05$ ). En ambas fracciones y en ambos sitios la concentración de este antibiótico fue mayor en la zona coloreada (Figura 10C,  $p < 0.05$ ). Con respecto a la profundidad, la concentración de CIP fue disminuyendo conforme aumentó la profundidad en ambas fracciones del sitio de temporal, así como en la fracción extractable con ASE del sitio de riego (Figura 10D,  $p < 0.05$ ).



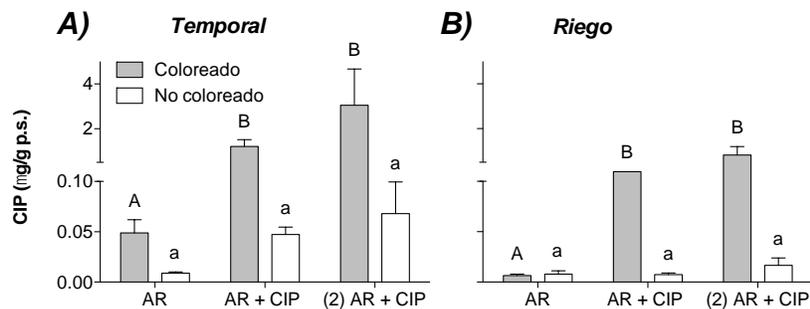
**Figura 10.** Concentración de CIP (romedio y error estándar). A) En la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub> y ASE de ambos sitios de estudio, B) CIP detectado en el sitio de temporal y de riego en cada una de las fracciones analizadas, C) CIP encontrado en los diferentes microambientes analizados, D) Concentración de CIP en diferentes profundidades. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ . NS=no significativo.

Para determinar el efecto que tuvo el riego con agua residual y la adición de distintas dosis de antibióticos en el suelo, se comparó la concentración de SMX y CIP en los dos microambientes estudiados. En la Figura 11 se presenta la cuantificación de SMX de la zona coloreada y no coloreada de los diferentes tratamientos de cada sitio de estudio; en ambos microambientes del sitio de temporal la concentración se incrementó continuamente con la aplicación de los tratamientos siendo la el tratamientos con dos dosis de SMX el que presenta la concentración más alta (Figura 11A,  $p < 0.05$ ). En la zona coloreada del sitio de riego también se encontró que la concentración fue mayor en los monolitos a los cuales se les adicionó el antibiótico, pero no hubo diferencia entre una o dos dosis del mismo, sin embargo en la zona no coloreada la concentración del antibiotico se incrementa consecurtivamente con la aplicación de los tratamientos (Figura 11B,  $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Acumulación de SMX por efecto de los tratamientos en los dos microambientes de estudio (promedio y error estándar). A) Contenido de SMX en el sitio de temporal, B) y en el sitio de riego. AR=agua residual. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

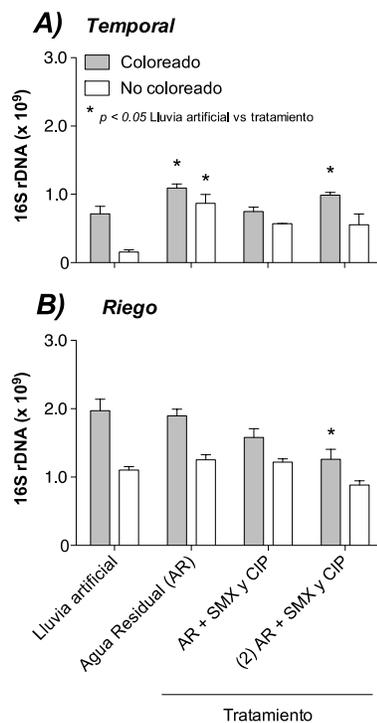
En la Figura 12 se presenta la cuantificación de CIP de la zona coloreada y no coloreada de los diferentes tratamientos de cada sitio de estudio; en la zona coloreada de ambos sitios la concentración de este antibiótico fue mayor en los monolitos a los cuales se les adicionó el antibiótico, pero no hubo diferencia entre una o dos dosis del mismo, en la zona no coloreada también de ambos sitios no se observó diferencias a pesar de la adición de una y dos dosis de CIP (Figura 12A, 12B,  $p < 0.05$ ).



**Figura 12.** Acumulación de CIP por efecto de los tratamientos en los dos microambientes de estudio (promedio y error estándar). A) Contenido de CIP en el sitio de temporal, B) y en el sitio de riego. AR=agua residual. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

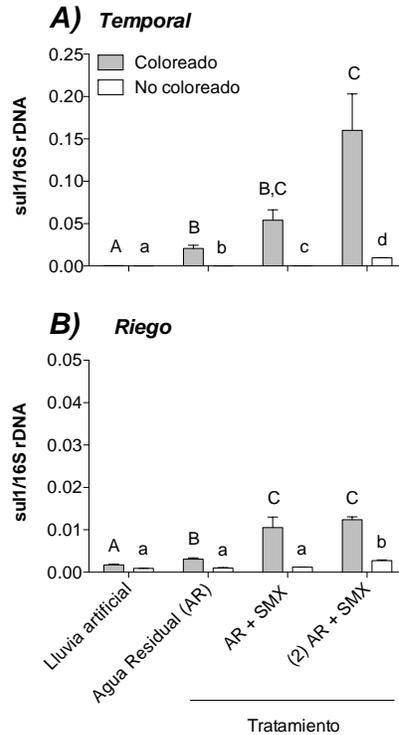
#### 5.4 Efecto del agua residual y la acumulación de antibióticos en la biomasa bacteriana y la dispersión de genes de resistencia

Para determinar el efecto que tuvieron los tratamientos con agua residual y antibióticos en la biomasa bacteriana se comparó la concentración del gen *16S rDNA* en los dos microambientes, contra la condición inalterada (lluvia artificial). En la Figura 13 se presenta la cuantificación de la biomasa bacteriana de la zona coloreada y no coloreada de los diferentes tratamientos de cada sitio de estudio; en el sitio de temporal la biomasa bacteriana de la zona coloreada se incrementó en los tratamientos con agua residual y con dos riegos de agua residual mas SMX y CIP, y la biomasa de la zona no coloreada se incrementó únicamente con el tratamiento con agua residual (Figura 13A,  $p < 0.05$ ). En el sitio de riego la concentración del gen *16S* de la zona coloreada disminuyó con el tratamiento de dos riegos con agua residual mas SMX y CIP, y en la zona no coloreada los tratamientos no tuvieron ningún efecto (Figura 13B,  $p < 0.05$ ).



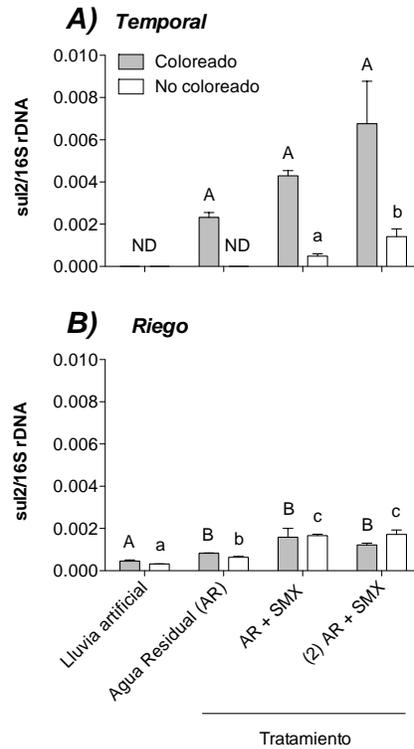
**Figura 13.** Efecto de los tratamientos sobre la biomasa bacteriana en los dos microambientes estudiados (promedio y error estándar). A) Contenido de *16s rDNA* en el sitio de temporal, B) y en el sitio de riego. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

Para determinar el efecto que tuvieron los tratamientos con agua residual y SMX en la concentración de los genes de resistencia *sul1* y *sul2* en el suelo se hizo una comparación múltiple entre los diferentes microambientes de cada uno de los tratamientos en ambos sitios. En la Figura 14 se presenta la cuantificación de *sul1* en las zonas coloreada y no coloreada de los sitios de temporal y de riego; la concentración de este gen fue mayor en las zonas coloreadas ( $p < 0.05$ ) de todos los tratamientos de ambos sitios; en el sitio de temporal la aplicación de los tratamientos incrementó tan fuertemente la concentración de *sul1* que en cada tratamiento ésta resultó menor en el sitio de riego. Con respecto a la zona coloreada del sitio de temporal se observó un incremento en la concentración de *sul1* cuando se irrigó el monolito con agua residual, sin embargo, el tratamiento con una irrigación de SMX no aumentó la concentración de *sul1*, es el tratamiento con dos dosis de SMX en el que se presentó nuevamente un incremento en la concentración de este gen; en la zona no coloreada de este mismo sitio la concentración de *sul1* se incrementó cada vez más con cada uno de los tratamientos (Figura 14A,  $p < 0.05$ ). En relación al sitio de riego, se observó que en la zona coloreada la concentración de *sul1* aumenta consecutivamente con los tratamientos con agua residual y con una dosis de SMX, sin embargo una doble dosis de este antibiótico no incrementó la concentración del gen; en la zona no coloreada únicamente en el tratamiento con doble dosis de SMX incrementa se incrementó la concentración de *sul1* (Figura 14B,  $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de *sul1* en los dos microambientes estudiados (promedio y error estándar). A) Contenido de *sul1* en el sitio de temporal, B) y en el sitio de riego. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

En la Figura 15 se presenta la cuantificación de *sul2* en las zonas coloreada y no coloreada de los sitios de temporal y de riego; la concentración de este gen fue mayor en las zonas coloreadas de todos los tratamientos del sitio de temporal ( $p < 0.05$ ), mientras que en el sitio de riego no se observan diferencias entre ambas zonas en la mayoría de los tratamientos; en el sitio de temporal la aplicación de los tratamientos incrementó tan fuertemente la concentración de *sul2* que en cada tratamiento ésta resultó menor en el sitio de riego. Con respecto a la zona coloreada del sitio de temporal lo que pareció un incremento consecutivo con la aplicación de los tratamientos no fue significativo; de las zonas no coloreadas del mismo sitio el gen *sul2* se volvió detectable hasta el tratamiento con una dosis de SMX y se incrementó con la aplicación de una segunda dosis del mismo antibiótico (Figura 15A,  $p < 0.05$ ). En las zonas coloreadas del sitio de riego los tres tratamientos produjeron el mismo incremento de *sul2* con respecto a la condición inalterada ( $p < 0.05$ ), y en las zonas no coloreadas se observó un incremento consecutivo con la aplicación de los tratamientos, pero no hay diferencia entre la aplicación de una o dos dosis de SMX en la concentración de éste gen (Figura 15B,  $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de *sul2* en los dos microambientes estudiados (promedio y error estándar). A) Contenido de *sul2* en el sitio de temporal, B) y en el sitio de riego. Literales diferentes indican valores de  $p < 0.05$ .

La cantidad del gen *qnrB* en todas las muestras de suelo estuvo bajo el límite de detección, a pesar del tratamiento con agua residual y la adición de ciprofloxacino. El gen *qnrS* mostró una señal positiva únicamente en una muestra (ver anexo 3).

## 6. Discusión

### 6.1 Infiltración de agua

Fue posible visualizar la infiltración del agua con la adición del colorante azul brillante, ya que las zonas por donde se infiltró el agua quedaron coloreadas en azul mientras que las zonas por donde no se infiltró el agua permanecieron del color natural del suelo, es decir, no se colorearon. A partir de la distribución del colorante fue posible identificar que en el sitio de temporal las zonas coloreadas coincidían con el microambiente rizosférico del suelo o rizósfera, esto quiere decir que en este sitio en particular los bioporos hechos por las raíces de las plantas favorecen la infiltración del agua, como se postuló al inicio del experimento y como se ha reportado por otros autores (Ghestem *et al.*, 2011). Sin embargo, en el sitio de riego los poros formados por las raíces no fueron la principal trayectoria de infiltración de agua, sino que ésta se distribuye indistintamente por todo el sistema poroso, no obstante, es posible afirmar que las zonas coloreadas claramente muestran las zonas por donde se infiltraron los diferentes tratamientos, lo que permite hacer una distinción entre el microambiente de la matriz del suelo que no estuvo en contacto con ellos.

La diferencia en la infiltración del agua en los dos tipos de suelo está relacionada con la estructura de los mismos ya que esta característica influye de manera importante en la conductividad hidráulica (Hillel, 1998). La ruta de infiltración más fácil de seguir para el agua es a través de los bioporos hechos por raíces cuando el suelo está compactado y es denso como se observó en el sitio de temporal, pero si el suelo es más poroso y está mejor estructurado con agregados en bloques estables la infiltración puede darse fácilmente por todo el sistema poroso, como lo que se observó para en el sitio de riego.

El suelo del sitio de temporal presentó límites más definidos entre las zonas coloreadas y no coloreadas que el sitio de riego, esto también puede ser consecuencia de la estructura del suelo o bien, puede ser que en el sitio de riego el colorante se haya lixiviado con mayor facilidad que en el sitio de temporal, ya que la sorción del azul brillante tiene una correlación negativa con el carbono orgánico (German-Heins *et al.*, 2000) y en el suelo de riego el porcentaje de este componente es mayor (2.6%).

## 6.2 Condiciones inalteradas del suelo

Para tener una idea más clara sobre el efecto que tiene el riego con agua residual y la acumulación de los antibióticos en la biomasa bacteriana y, en la dispersión de los genes de resistencia a sulfametoxazol y ciprofloxacino, primero se analizó el estado inalterado del suelo de ambos sitios, aquel regado únicamente con lluvia artificial ( $\text{CaCl}_2$ ), de esta manera pudimos evaluar también la participación de la biomasa en la dispersión de los genes de resistencia.

La cuantificación del gen *16S rDNA* puede ser un estimado de la abundancia bacteriana ya que es un gen universal del dominio bacteria, pero debe tomarse en consideración las desventajas que puede tener la utilización de esta técnica para estimar la riqueza de la comunidad bacteriana: el gen *16S rDNA* no siempre se presenta en una sola copia; ya que dependiendo de la especie, ésta puede albergar de 1 a 15 copias del gen en el genoma bacteriano, por lo que no puede establecerse una relación 1:1 entre el número de copias encontradas y el número de bacterias metabólicamente activas (von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Se encontró una mayor biomasa en el sitio de riego que en el sitio de temporal lo cual puede ser la consecuencia del riego con agua residual durante varios años, el agua residual aporta materia orgánica, nutrientes y biomasa bacteriana al suelo (Siebe, 1998; Friedel *et al.*, 2000), lo cual influye en la supervivencia y proliferación bacteriana. Coincidentemente el porcentaje de carbono orgánico encontrado en el sitio de riego (2.6%) es mayor al porcentaje encontrado en el sitio de temporal (0.7%). Se encontró una biomasa bacteriana mayor en la rizósfera (sitio temporal) y en el sistema poroso (sitio de riego) que en la matriz del suelo, como se postuló al inicio del experimento y como se ha reportado por otros autores (Berg *et al.*, 2005). Con respecto a la profundidad, se encontró que la biomasa disminuye conforme aumenta la profundidad, probablemente porque la aereación disminuye.

La concentración de los genes de resistencia a sulfametoxazol *sul1* y *sul2* se analizó en relación a la cantidad de genes *16S rDNA*, para normalizar la variación de los datos por la cantidad de DNA bacteriano extraíble y detectable por la amplificación por PCR (Heuer *et al.*, 2007). Un número significativo de genes *sul1* fueron encontrados en el sitio de temporal, esto probablemente se deba a que la comunidad bacteriana autóctona del suelo adquirió el gen de resistencia de alguna

manera, que puede ser a través de la transferencia horizontal de bacterias patógenas provenientes del excremento de animales de pastoreo o personas que habitan en los alrededores de la parcela, o bien puede ser que este gen fuera parte ya del resistoma nativo de la comunidad bacteriana del suelo (Dalkmann *et al.*, 2012).

Con respecto a *sul1*, se encontró una concentración mayor en el sitio de riego, lo cual puede deberse a que parte de la biomasa bacteriana proveniente del agua residual incluye a bacterias patógenas (Siebe, 1998; Jiménez *et al.*, 2004 ), que pueden llegar a los suelos con el riego y que probablemente contenían en su resistoma al gen *sul1*. La concentración del gen fue mayor en la rizósfera y en el sistema poroso que en la matriz del suelo, ésto probablemente se deba, como se mencionó anteriormente, a que en estos microambientes la biomasa bacteriana es mayor, esto aumenta las probabilidades del contacto bacteria-bacteria y la transferencia horizontal puede ocurrir más frecuentemente (Berg *et al.*, 2005; Van Elsas *et al.*, 2007). En lo referente a la profundidad, únicamente en la matriz del suelo del sitio de riego disminuye conforme aumenta la profundidad, lo cual indica que este gen de resistencia no tiene un patrón de distribución con respecto a este factor.

No se detectó ninguna copia del gen *sul2* en el sitio de temporal, lo cual sugiere que el gen *sul2* no forma parte del resistoma de la comunidad bacteriana nativa del suelo sino que probablemente provino del agua residual, éste hallazgo coincide con lo reportado por Heuer *et al.* (2011), donde en un suelo nunca antes fertilizado con estiércol, si se encontraron copias del gen *sul1* pero no del gen *sul2*. Con respecto a los dos microambientes del sitio de riego, se encontró una concentración mayor en el sistema poroso que en la matriz del suelo, lo cual puede deberse a que en este microambiente hay una mayor biomasa bacteriana y por consiguiente una mayor probabilidad de que ocurra la transferencia horizontal de genes (Berg *et al.*, 2005; Van Elsas *et al.*, 2007). En lo referente a la profundidad, se observó una disminución en la concentración de *sul2* conforme aumentó la profundidad del sistema poroso, lo cual indica que este gen de resistencia tienen un patrón de distribución con respecto a este factor.

El número de copias de los genes de resistencia a ciprofloxacino *qnrB* y *qnrS* estuvieron bajo e límite de detección en ambos sitios, esto puede deberse a que provienen del agua residual y no son muy estables en el suelo.

### 6.3 Comportamiento del sulfametoxazol y del ciprofloxacino en el suelo por efecto del riego con agua residual y la aplicación de antibióticos.

El suelo tiene dos formas de retener compuestos, de manera bioaccesible y de manera retenida, que comúnmente se suman y se reportan como una concentración total (Hammesfahr *et al.*, 2008). El término bioaccesible se refiere a todas aquellas sustancias que espacialmente se encuentran en la superficie de las partículas de suelo donde coexisten con los organismos y que por ende pueden tener algún efecto positivo o negativo en su forma de vida (Alexander, 2000), cuando se requiere analizar los compuestos bioaccesibles del suelo es suficiente extraerlos con  $\text{CaCl}_2$  y agitación. Cuando los compuestos están fuertemente retenidos por las partículas de suelo por procesos de sorción o intrusión, los organismos no pueden acceder a ellos y para su análisis es necesario extraerlos con solventes como es el caso del ASE. Generalmente los efectos ambientales de los contaminantes dependen más de la fracción bioaccesible que del total (Rosendahl *et al.*, 2012).

En el caso del sulfametoxazol la concentración encontrada de forma bioaccesible y de forma retenida fue igual, cuando casi la mitad del antibiótico encontrado está disponible, éste puede representar una presión de selección para la comunidad bacteriana tanto en la rizósfera o el sistema poroso, así como en la matriz del suelo, ya que tampoco se encontraron diferencias en la concentración de sulfametoxazol en estos microambientes, ni en las diferentes profundidades muestreadas. Probablemente el sulfametoxazol se transportó por difusión hacia la matriz del suelo y hasta el fondo del monolito, dado su bajo coeficiente de adsorción (Thiele-Bruhn, 2003), el cual le confiere una alta movilidad, aun mayor que la del azul brillante.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de sulfametoxazol entre los dos sitios estudiados después de irrigarlos con agua residual y el antibiótico, pero probablemente en condiciones inalteradas hubiéramos encontrado concentraciones mayores de este antibiótico en el sitio de riego, como lo reportado por Dalkmann *et al.*, (2012). Es importante destacar las diferencias en la concentración total de sulfametoxazol encontrada en esta investigación y lo reportado por Dalkmann *et al.*, (2012). La concentración total de sulfametoxazol encontrada en el suelo tratado únicamente con agua residual del sitio de riego fue de alrededor de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , esta concentración es mayor a lo reportado por Dalkmann *et al.*, (2012), en donde se encontraron

concentraciones totales de sulfametoxazol de  $5.14 \mu\text{g kg}^{-1}$  en suelos del valle del Mezquital con 85 años de riego con agua residual. La diferencia puede ser atribuida a varios factores: el primero es la diferencia en el intervalo de tiempo entre el último riego que recibió el suelo y la toma de la muestra. El intervalo de tiempo en esta investigación fue de 7 días, sin embargo en la investigación de Dalkmann *et al.*, (2012) esto no se tomó en cuenta, por lo que pudo haber sido desde el doble hasta el cuádruple de días en los cuales el antibiótico estuvo sometido a diferentes formas de degradación. El segundo factor que puede explicar la diferencia de concentración son las condiciones bajo las cuales se encontraban los suelos al momento del muestreo. La temperatura media del Valle del Mezquital varía entre  $16$  y  $18^\circ\text{C}$  y la temperatura controlada bajo la cual estuvieron los suelos en este estudio es de  $2$  a  $4^\circ\text{C}$  mayor, esta diferencia de temperatura acelera la degradación de la materia orgánica del suelo, y cuando ésta se degrada, los antibióticos secuestrados por ella son liberados al suelo, lo que aumentaría la concentración de antibiótico encontrado. El tercer factor es la diferencia en la metodología de extracción: en la investigación de Dalkmann *et al.*, (2012) después de la extracción acelerada con solventes, el extracto fue filtrado y concentrado, mientras que en esta investigación no se llevó a cabo la filtración y concentración del extracto, lo cual pudo haber retenido parte de la concentración total del antibiótico. Finalmente existe también la posibilidad de un problema de contaminación durante la extracción de los antibióticos, ya que al usar las mismas celdas de extracción para todas las muestras, aquellas con grandes cantidades de antibiótico pudieron haber dejado concentraciones traza que no se eliminaron con la limpieza convencional a la cual se someten las celdas, pudiendo así contaminar la muestra siguiente.

La aplicación de sulfametoxazol fue efectiva para aumentar la concentración del antibiótico en el suelo de ambos sitios, como era de suponerse dada la baja sorción del sulfametoxazol (Thiele-Bruhn, 2003), el aumento se observó en ambos microambientes; en la rizósfera del sitio de temporal no hubo diferencias entre una y dos dosis del antibiótico lo cual indica que éste no se acumuló en el suelo, probablemente por su alta movilidad se lixivió, pero en la matriz del suelo donde la infiltración no está facilitada por las raíces se observó un aumento continuo con cada tratamiento. En el sistema poroso del sitio de riego tampoco se acumuló el antibiótico ya que no hubo diferencia en la concentración de sulfametoxazol con la aplicación de una y dos dosis de éste, y en la matriz del suelo la concentración se incrementó hasta la aplicación de la segunda dosis de antibiótico.

Por otro lado, la concentración retenida de ciprofloxacino fue significativamente mayor (aproximadamente 90%) que la concentración bioaccesible en ambos sitios, esto puede deberse a la fuerte sorción del ciprofloxacino a las partículas de suelo (Thiele-Bruhn, 2003), lo que indica que el ciprofloxacino podría no tener efecto en la dispersión de genes de resistencia. En la fracción bioaccesible no se encontraron diferencias entre el sitio de temporal y el sitio de riego después de la adición de los tratamientos, probablemente en condiciones inalteradas del suelo de riego hubiera tenido una concentración mayor de ciprofloxacino; sin embargo, en la fracción retenida, el sitio de riego tuvo una concentración cuatro veces menor que la encontrada en el sitio de temporal. Esto puede deberse a varias causas: a) que el pH del suelo es mayor en el sitio de riego (8.0) que en el sitio de temporal (7.2). Se ha reportado que los valores de  $K_d$  para las quinolonas disminuyen considerablemente cuando el pH se incrementa (Vasudevan *et al.*, 2009). b) que en el sitio de riego el suelo tenga partículas fuertemente adsorbidas que compitan por los espacios de intercambio y que no permitan que principalmente el ciprofloxacino se adsorba a las partículas de suelo. c) que en el sitio de riego los altos porcentajes de materia orgánica (2.1 %) hayan diezmado la eficiencia de la extracción del antibiótico, incluso con ASE (Rosendahl *et al.*, 2012).

En el caso de los microambientes, tanto en la fracción bioaccesible como en la fracción retenida se encontró una concentración mayor en la rizósfera o sistema poroso que en la matriz del suelo, esto probablemente también se debe a que el ciprofloxacino presenta valores de sorción tan altos (Thiele-Bruhn, 2003), que su movilidad se restringe a los microambientes que estuvieron en contacto con los tratamientos, es decir, que su movilidad es menor que la del colorante. Con respecto a la profundidad se encontró que la concentración de la parte superficial es mayor que en las partes intermedia y del fondo, esto puede explicarse porque la parte superficial es el primer contacto que tiene el agua residual y los antibióticos con las partículas de suelo, por lo cual, es ahí donde el suelo adsorbe la mayor cantidad de moléculas del antibiótico y el antibiótico disponible va disminuyendo al ir ocupando los espacios de intercambio en las partículas de suelo con las que está en contacto más directo, lo cual también puede explicar el nulo aumento en la concentración de ciprofloxacino en el fondo de los monolitos y en las zonas no coloreadas, ya que el ciprofloxacino al tener baja movilidad se mantiene y acumula únicamente en los sitios por donde pasó el tratamiento. Esto nos da evidencia que indica que si las bajas concentraciones de

ciprofloxacino tuvieron algún efecto en la dispersión de genes de resistencia, este sería únicamente en las zonas de infiltración.

La aplicación de ciprofloxacino fue efectiva para aumentar la concentración del antibiótico en el suelo de ambos sitios, pero a diferencia del sulfametoxazol, la concentración de este antibiótico en la matriz del suelo no se incrementó, esto puede deberse a los altos valores de sorción (Thiele-Bruhn, 2003) que como se mencionó anteriormente limitan la movilidad del compuesto y restringen su presencia a la zonas por donde pasó el tratamiento. Tampoco se observaron diferencias en la concentración de ciprofloxacino con una y dos aplicaciones, lo cual puede ser consecuencia de una extracción deficiente del antibiótico ya que éste una vez adsorbido a las partículas de suelo es muy difícil de obtener (Rosendahl et al., 2012).

#### *6.4 Efecto del agua residual y la acumulación de antibióticos en la biomasa y la dispersión de antibióticos*

Los tratamientos con agua residual y antibióticos tuvieron diferentes efectos sobre la biomasa bacteriana de ambos sitios, en el sitio de temporal se observó un incremento con la aplicación de los tratamientos con agua residual y con dos dosis de sulfametoxazol, esto puede deberse a que el contacto con agua residual por primera vez implica la introducción de muchas nuevas comunidades bacterianas y fuentes de carbono (Siebe, 1998; Friedel *et al.*, 2000). En el sitio de riego la biomasa no se ve afectada con los tratamientos con agua residual y una dosis de SMX y CIP, pero el tratamiento con una segunda dosis disminuyó la biomasa, esto puede ser porque a pesar de que esta comunidad bacteriana ha estado expuesta a concentraciones traza de los antibióticos, la dosis aplicada fue alta.

La concentración del gen *sul1* aumenta gradualmente con la aplicación de los tratamientos en el sitio de temporal, tanto en la rizósfera como en la matriz del suelo, lo cual probablemente se deba en primera instancia que el agua residual contiene una gran cantidad de bacterias patógenas, muchas de ellas multiresistentes (Jiménez *et al.*, 2004) y genes de resistencia libres, entre los cuales puede estar *sul1* y en segunda instancia pero no menos importante al aumento de la

concentración de sulfametoxazol en ambos microambientes, esto nos da evidencia que indica que la concentración de este antibiótico en el suelo funciona como una presión de selección para la comunidad bacteriana, lo que probablemente potencia la transferencia horizontal del gen *sul1* (Brandt *et al.*, 2009), a través de la estabilidad del mobiloma (fragmentos de DNA móviles como los plásmidos y transpososnes). Estos resultados son similares a lo reportado por Heuer *et al.*, (2011), quienes encontraron que los genes de resistencia se acumulan con el tiempo en suelos tratados con repetidas aplicaciones de estiércol adicionado con sulfadiazina.

Por otro lado, en el sistema poroso del sitio de riego los tratamientos con agua residual y de una dosis de sulfametoxazol aumentan gradualmente la concentración del gen *sul1*, la segunda dosis del antibiótico no tiene ningún efecto, probablemente porque el tratamiento con una segunda dosis de sulfametoxazol tampoco aumentó la concentración del antibiótico en este microambiente. En la matriz del suelo a pesar de que la concentración del antibiótico se incrementó con cada tratamiento, la cantidad del gen *sul1* no tuvo ningun cambio hasta que se aplicó una doble dosis de sulfametoxazol, esto podría deberse a que como la mayoría de la comunidad bacteriana ya es resistente a este antibiótico porque ha estado en contacto con él durante varios años, para que este antibiótico ejerza una presión de selección se necesita una concentración más alta, también podría deberse a que en la matriz del suelo hay una menor actividad microbiana y tienen menos fuentes de carbono, y los efectos que provoca el antibiotico no son tan evidentes, como se ha reportado anteriormente (Berg *et al.*, 2005; Hammesfahr *et al.*, 2008).

La concentración del gen *sul1* fue mayor en la rizósfera y en el sistema poroso en todos los tratamientos de ambos sitios, probablemente ésto se deba a que estos microambientes además de tener una biomasa bacteriana mayor como se mencionó anteriormente, también son los sitios en donde se acumulan las bacterias resistentes y los genes de resistencia que provienen del agua residual (Berg *et al.*, 2005), si aunado a esto la concentración de sulfametoxazol aumenta con la aplicación de los tratamientos, podemos considerar a estos microambientes como sitios críticos (“hot spots”) para la dispersión de éste gen de resistencia (Brandt *et al.*, 2009).

Con la aplicación de los tratamientos la concentración del gen *sul1* fue mayor en el sitio de temporal que en el sitio de riego, contrario a lo que ocurre en la condición inalterada del suelo;

esto podría deberse a que la comunidad bacteriana que nunca había recibido agua residual hasta el momento del experimento respondió más bruscamente al tratamiento, probablemente por la adición de materia orgánica, nutrientes y biomasa bacteriana que al llegar a un nuevo nicho con menor competencia es colonizado más fácilmente; este comportamiento también se observó en suelos tratados con estiércol y sulfadiazina (Heuer *et al.*, 2011).

En el caso del gen *sul2*, su concentración en la rizósfera del sitio de temporal fue detectable hasta que se aplicó el tratamiento con agua residual, esto nos da evidencia que indica que este gen no forma parte del resistoma de la comunidad bacteriana nativa de este sitio, sino que proviene del agua residual, y que su movilidad se restringe a los microambientes por donde pasó el agua. No se observó ningún incremento en la cantidad de genes *sul2* a pesar de la adición de sulfametoxazol probablemente el mobiloma al cual pertenece el gen *sul2* no es tan exitosamente transferible o necesita más tiempo para que se lleve a cabo. En la matriz del suelo este gen no fue detectable hasta la aplicación de una dosis de sulfametoxazol, probablemente este aumento se deba al sulfametoxazol que se movió por difusión hacia esta zona y provocó una presión de selección sobre la comunidad nativa y cuando la concentración de sulfametoxazol aumentó con la aplicación de la segunda dosis, la cantidad de *sul2* también se incrementó.

En el sistema poroso del sitio de riego la concentración del gen *sul2* se incrementó cuando se aplicó el tratamiento con agua residual pero la adición de sulfametoxazol no tuvo ningún efecto en la multiplicación de este gen; en la matriz del suelo tanto el tratamiento con agua residual como el tratamiento con una dosis de sulfametoxazol incrementaron la cantidad de genes *sul2*, pero la segunda dosis del antibiótico no tuvo ningún efecto sobre la dispersión de *sul2*, por lo que parece que la comunidad bacteriana se adaptó rápidamente a la nueva condición ambiental, probablemente a través de la transferencia horizontal de este gen, el cual ya se encontraba presente en el resistoma bacteriano (Davies *et al.*, 2010).

En general la concentración del gen *sul2* es menor que la concentración del gen *sul1*, lo cual coincide con lo reportado por Dalkmann *et al.*, (2012), esto podría deberse a que el mobiloma al cual pertenece el gen *sul2* no es tan exitosamente transferible o necesita más tiempo para que se lleve a cabo.

La falta de señal de los genes *qnrB* y *qnrS* en la mayoría de las muestras de suelo puede deberse a la baja bioaccesibilidad del ciprofloxacino en todos los tratamientos de ambos sitios. Se ha reportado con anterioridad que en suelos tratados con fluoroquinolonas se observa poco o ningún efecto en parámetros microbianos (Kotzerke *et al.*, 2011); por lo tanto, si las bacterias no tenían acceso al compuesto es posible que no necesitaran desarrollar mecanismos de resistencia hacia el mismo. En caso de haber bacterias tolerantes al compuesto provenientes del agua residual, es posible que tuvieran un mecanismo de resistencia diferente a los genes *qnr* (Oyamada *et al.*, 2006), que no se midieron en este estudio.

## 7. Conclusiones

En la rizósfera y en el sistema poroso es donde hubo una mayor biomasa bacteriana y en el sitio de riego la biomasa fue aun mayor.

El agua residual incrementó la biomasa bacteriana en el sitio de temporal, pero no en en el sitio de riego.

El gen de resistencia *sul1* es parte del resistoma de la comunidad bacteriana nativa del suelo y el gen *sul2* no, éste proviene del agua residual.

El agua residual incrementó la concentración de los genes *sul1* y *sul2* en ambos sitios de estudio.

El sulfametoxazol se distribuye de forma homogénea en los monolitos de ambos sitios de estudio y tiene una proporción bioaccesible muy alta.

El incremento de la concentración de sulfametoxazol en los suelos promovió la dispersión del gen *sul1*, este incremento fue más pronunciado en el sitio de temporal que en el sitio de riego.

La dispersión de los genes *sul1* y *sul2* en la rizosfera se debió a una mayor biomasa bacteriana.

La rizósfera y el sistema poroso de los suelos utilizados en este estudio se pueden considerar como sitios críticos (“hot spots”) para la dispersión del gen *sul1*.

En todos los tratamientos la concentración de gen *sul1* fue mayor que la concentración del gen *sul2*.

El ciprofloxacino se concentró en la rizósfera y en el sistema poroso, pero la proporción bioaccesible fue muy baja por lo que no tuvo efecto en la dispersión de los genes de resistencia *qnrB* y *qnrS*.

## 8. Referencias

- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental science of technology*. 27: 2630-2636.
- Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental science and technology*. 27(13): 2630-2636.
- Appelbaum, P.C., Hunter, P.A. 2000. The fluoroquinolones antibacterials: past, present and future perspectives. *International journals of antimicrobial agents*. 16(1): 5-15.
- Arsène, S., Leclercq, R. 2007. Role of qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51(9): 3254-3258.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. 2005. The rizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental microbiology*. 7(11): 1673-1685.
- Brandt, K., Sjöholm, O., Krogh, K., Halling-Sorensen, B., Nybroe, O. 2009. Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environmental science and technology*. 43(8): 2963-2967.
- British Geological Survey, 1998. Impact of wastewater reuse on groundwater in the Mezquital Valley, Hidalgo State, Mexico. Final Report.
- Chelius, M., Triplett, E. 2000. Immunolocalization of dinotrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Applied and environmental microbiology*. 66(2): 783-787.
- Clewell D. 2008. Antibiotic resistance in bacteria: Origins and emergence. *Scientific topics*.
- CNA. 2002. Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero Valle del Mezquital, estado de Hidalgo.
- IDRC – OPS/HEP/CEPIS 2000 – 2002. Estudio complementario del caso Mezquital, Estado de Hidalgo, México. *Sistemas Integrados de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales en América Latina: Realidad y Potencial*.
- Dalkmann, P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., Amelung, W., Grohmann, E., Siemens, J. 2012. Accumulation of pharmaceuticals, *Enterococcus*, and resistance genes in soils irrigated wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *Plos One*. 7(9): e45397.
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 74(3): 417-433.
- Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*. 42: 73-91.
- Forrer, I., Papritz, A., Kasteel, R., Flüher, H., Luca, D. 2000. Quantifying dye tracers in soil profiles by image processing. *European journal of soil science*. 51: 313-322.
- Flores-Tena, F.J., Guerrero-Barrera, A.L., Avelar-González, F.J., Ramírez-López, E.M., Martínez-Saldaña, M.C. 2007. Pathogenic and opportunistic Gram-negative bacteria in soil, leachate and air in San Nicolás landfill at Aguascalientes, Mexico. *Revista latinoamericana de microbiología*. 49: 25-30.
- Friedel, J.K., Langer, T., Siebe, C., Stahr, K. 2000. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and fertility of soils*. 31: 414-421.

German-Heins, J., Flury, M. 2000. Sorption of brilliant blue FCF in soils as affected by pH and ionic strength. *Geoderma*. 97: 87-101.

Ghestem, M., Sidle, R., Stokes, A. The Influence of Plant Root Systems on Subsurface Flow: Implications for Slope Stability. *BioScience*. 61(11): 869-879.

Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro V., Jiménez, B., 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewater and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*. 1169: 31-39.

Golet, E.M., Alder, A.C., Hartman, A., Ternes, T.A., Giger, W. 2001. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical chemistry*. 73(15): 3632-3638.

Guillard, T., Cavallo, J.D., Cambau, E., Duval, V., Bajolet, O., Brasme, L., de Champs, C., Vernet-Garnier, V. 2009. Mise au point d'une technique de PCR en temps réel pour la detection rapide des genes qnr chez des entérobactéries productrices de beta-lactamases à spectre étendu. *Pathologie-Biologie*. 58(6): 430-433.

Göbel, A., Thomsen, A., McArde, C.S., Alder, A.C., Giger, W., Theiss, N., Löffler, D., Ternes, T.A. 2005. Extraction and determination of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in sewage sludge. *Journal of chromatography A*. 1085(2): 179-189.

Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla, K., Thiele-Bruhn, S. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil biology and biochemistry*. 40: 1583-1591.

Heuer, H., Smalla, K. 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental microbiology*. 9(3): 657-666.

Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M. 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil biology and biochemistry*. 40(7): 1892-1900.

Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleinedam, K., Schloter, M., Müller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K. 2011. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Applied and environmental microbiology*. 77(7): 2527-2530.

Hillel, D. 1998. *Environmental soil physics*. Academic Press, USA.

Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., Sköld, O. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. 1995. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39(2): 279-289.

IMS Health, 2008. IMS chemical country profile Mexico. Database. IMS Health Incorporated, London.

IUSS, ISRIC, FAO. 2007. Base referencial mundial del recurso suelo. Primera actualización.

Jiménez, B., Chávez, A. 2004. Quality assessment of an aquifer recharged with wastewater for its potential use as drinking source: "The Mezquital Valley" case. *Water science technology* 50 (2): 269-276.

Ketelsen, H., Meyer-Windel, S. 1999. Adsorption of brilliant blue FCF by soils. *Geoderma*. 90: 131-145.

Kotzerke, A., Hammesfahr, U., Kleineidam, M., Lamshöft, S., Thiele-Bruhn, M., Schloter, M., Wilke, B.M. 2011. Influence of difloxacin-contaminated manure on microbial community structure and function in soil. *Biological fertility soils*. 47: 177-186.

Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impacts. *Clinical Infectious disease*. 36 (supl 1): 11-23.

Lorenz, M.G., Wackernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews*. 58(3): 563-602.

Luo, Y., Daqing, M., Michal, R., Qixing, Z., Hongjie, Z., Lin, X., Alvarez, P.J.J. 2010. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental science technology*. 44: 7220-7225.

Malik, A., Celik, E-K., Bohn, C., Böckelmann, U., Knobel, K., Grohmann, E. 2007. Detection of conjugative plasmids and antibiotic resistance genes in anthropogenic soils from Germany and India. *FEMS Microbiology letters*. 279: 207-216.

Martínez, J.L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*. 321: 365-367.

Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E., Elion, J. 1997. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 277(5333): 1833-4.

Oyamada, Y., Ito, H., Inoue, M. 2006. Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of medical microbiology*. 55: 1395-1401.

Paul, E.A. 2007. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier, 3<sup>rd</sup> edition. USA.

Peleg, A.Y., Hooper, D.C. 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England journal of medicine*. 362: 1804-1813.

Prado, B., Duwig, C., Márquez, J., Delmas, P., Morales, P., James, J., Etchevers, J. 2009. Agricultural water management. 96: 1377-1386.

Riesenfeld, C., Everett, M., Piddock, L.J., Hall, B.G. 1997. Adaptive mutation produce resistance to ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41(9): 2059-2060.

Rosendahl, I., Siemens, J., Kindler, R., Groeneweg, J., Zimmermann, J., Czerwinski, S., Lamshöft, M., Laabs, V., Wilke, B.M., Vereecken, H., Amelung, W. 2012. Persistence of a fluoroquinolone antibiotic difloxacin in soil and lacking effects on nitrogen turnover. *Journal of environmental quality*. 41(4): 1275-1283.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa S.A. México

Siebe, C. 1994. Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residual en el distrito 03, Tula, Hidalgo, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 10(1): 15-21.

Siebe, C. 1998. Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil use manage*. 14: 119-122.

Siebe, C., Cram, S. 2010. *Degradación y Contaminación del Suelo*. Asignatura del Posgrado en Ciencias de la Tierra, UNAM.

- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., Kaupenjohann, M. 2007. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water research*. 42: 2124-2134.
- Siemens J, Huschek G, Walshe G, Siebe C, Kasteel R, Wulf, S., Clemens, J., Kaupenjohann, M. 2010. Transport of pharmaceuticals in columns of a wastewater-irrigated Mexican clay soil. *Journal of environmental quality* 39: 1201-1210.
- Sköld, O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates*. 3(3): 155-160.
- Takai, K., Horikoshi, K., Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66(11): 5066-5072.
- Tallon, L.K., Si, B.C., Korber, D., Guo, X. 2007. Soil wetting state and preferential transport of *Escherichia coli* in clay soils. *Canadian journal of soil science*. 87: 61-72.
- Thiele-Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soil-a review. *Journal of plant nutrition and soil science*. 166: 145-167.
- Van Elsas, J.D., Jansson, J.K., Trevors, J.T. 2007. *Modern soil microbiology*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press. USA.
- Vasudevan, D., Bruland, G., Torrance, B.S., Upchurch, V.G., Mackay, A.A. 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factor influencing sorption. *Geoderma*. 151: 68-76.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rDNA analysis. *FEMS Microbiology reviews*. 21(3): 213-29.
- Zorita, S., Martensson, L., Mathiasson, L. 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of total environment*. 407: 2760-2770.



--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

6.2049

0.0042

6.3308

0.0223

6.2668

0.0053

13.0793

0.0257

\*Probablemente atípico

**Anexo 2.** Concentración en el suelo de los genes *16S rDNA*, *sul1*, *sul2*, *qnrB* y *qnrS*. [Número de copias g<sup>-1</sup> (peso seco)]

Solución de riego	Condición del suelo	Posición en la columna	Temporal					Riego				
			Copias del gen <i>16S rDNA</i>	Copias del gen <i>sul1</i>	Copias del gen <i>sul2</i>	Copias del gen <i>qnrB</i>	Copias del gen <i>qnrS</i>	Copias del gen <i>16S rDNA</i>	Copias del gen <i>sul1</i>	Copias del gen <i>sul2</i>	Copias del gen <i>qnrB</i>	Copias del gen <i>qnrS</i>
Lluvia artificial (CaCl <sub>2</sub> 0.01 M)	Coloreado (azul brillante)	Superficial	1.12E+09	4.73E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.78E+09	4.92E+06	1.46E+06	n.d.	n.d.
			1.05E+09	4.78E+05	n.d.	n.d.	n.d.	2.74E+09	4.57E+06	1.52E+06	n.d.	n.d.
			1.10E+09	5.07E+05	n.d.	n.d.	n.d.	2.62E+09	4.54E+06	1.43E+06	n.d.	n.d.
		Intermedio	7.30E+08	1.75E+05	n.d.	n.d.	n.d.	2.15E+09	2.49E+06	7.99E+05	n.d.	n.d.
			7.13E+08	1.69E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.98E+09	2.49E+06	7.15E+05	n.d.	n.d.
			7.30E+08	1.33E+05	n.d.	n.d.	n.d.	2.19E+09	2.54E+06	8.70E+05	n.d.	n.d.
	Final	3.44E+08	3.00E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.46E+09	2.52E+06	5.22E+05	n.d.	n.d.	
		3.24E+08	3.11E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.43E+09	2.72E+06	4.66E+05	n.d.	n.d.	
		3.27E+08	2.85E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.39E+09	2.90E+06	5.05E+05	n.d.	n.d.	
	No coloreado	Intermedio	2.24E+08	6.18E+03	n.d.	n.d.	n.d.	1.24E+09	1.18E+06	4.10E+05	n.d.	n.d.
			2.10E+08	5.54E+03	n.d.	n.d.	n.d.	1.19E+09	1.22E+06	4.20E+05	n.d.	n.d.
			2.45E+08	7.46E+03	n.d.	n.d.	n.d.	1.22E+09	1.13E+06	3.92E+05	n.d.	n.d.
Final		8.24E+07	3.77E+03	n.d.	n.d.	n.d.	9.89E+08	7.95E+05	2.70E+05	n.d.	n.d.	
		8.13E+07	4.52E+03	n.d.	n.d.	n.d.	9.59E+08	7.29E+05	3.13E+05	n.d.	n.d.	
		8.71E+07	8.57E+03	n.d.	n.d.	n.d.	1.02E+09	8.29E+05	3.14E+05	n.d.	n.d.	
Agua residual	Coloreado (azul brillante)	Superficial	8.72E+08	9.14E+06	1.47E+06	n.d.	n.d.	2.04E+09	8.30E+06	1.58E+06	n.d.	n.d.
			8.91E+08	9.20E+06	1.11E+06	n.d.	n.d.	2.11E+09	8.89E+06	1.61E+06	n.d.	n.d.
			9.31E+08	9.87E+06	1.37E+06	n.d.	n.d.	2.01E+09	8.74E+06	1.70E+06	n.d.	n.d.
		Intermedio	1.34E+09	4.61E+07	4.05E+06	n.d.	n.d.	2.11E+09	5.73E+06	1.65E+06	n.d.	n.d.
			1.30E+09	4.66E+07	4.06E+06	n.d.	n.d.	2.17E+09	6.04E+06	1.82E+06	n.d.	n.d.
			1.27E+09	4.47E+07	3.89E+06	n.d.	n.d.	2.08E+09	6.24E+06	1.84E+06	n.d.	n.d.
	Final	1.07E+09	1.59E+07	2.54E+06	n.d.	n.d.	1.60E+09	3.17E+06	1.39E+06	n.d.	n.d.	
		1.14E+09	1.93E+07	2.69E+06	n.d.	n.d.	1.48E+09	3.25E+06	1.28E+06	n.d.	n.d.	
		1.01E+09	1.85E+07	2.58E+06	n.d.	n.d.	1.46E+09	3.41E+06	1.26E+06	n.d.	n.d.	
	No coloreado	Intermedio	1.25E+09	1.05E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.14E+09	9.05E+05	8.14E+05	n.d.	n.d.
			1.02E+09	1.11E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.10E+09	8.78E+05	7.88E+05	n.d.	n.d.
			1.18E+09	1.10E+05	n.d.	n.d.	n.d.	1.05E+09	8.19E+05	7.80E+05	n.d.	n.d.
Final		5.44E+08	4.54E+04	n.d.	n.d.	n.d.	1.36E+09	1.67E+06	7.72E+05	n.d.	n.d.	
		5.90E+08	3.48E+04	n.d.	n.d.	n.d.	1.44E+09	1.60E+06	7.86E+05	n.d.	n.d.	

			6.25E+08	4.34E+04	n.d.	n.d.	n.d.	1.44E+09	1.82E+06	8.02E+05	n.d.	n.d.
Un riego con agua residual + 200 mg l <sup>-1</sup> de SMX y CIP	Coloreado (azul brillante)	Superficial	6.15E+08	1.60E+07	2.19E+06	n.d.	n.d.	1.90E+09	2.98E+07	1.27E+06	n.d.	n.d.
			6.08E+08	1.58E+07	2.32E+06	n.d.	n.d.	1.88E+09	3.05E+07	1.18E+06	n.d.	n.d.
			5.94E+08	1.60E+07	2.34E+06	n.d.	n.d.	1.83E+09	3.01E+07	1.21E+06	n.d.	n.d.
		Intermedio/ Final	8.73E+08	7.30E+07	4.27E+06	n.d.	1.92E+04	1.30E+09	6.18E+06	3.33E+06	n.d.	n.d.
			8.98E+08	7.37E+07	4.12E+06	n.d.	1.62E+04	1.29E+09	6.48E+06	3.17E+06	n.d.	n.d.
			8.99E+08	7.12E+07	4.47E+06	n.d.	1.77E+04	1.29E+09	6.31E+06	3.26E+06	n.d.	n.d.
	No coloreado	Intermedio/ Final	5.72E+08	1.36E+05	3.67E+05	n.d.	n.d.	1.14E+09	1.37E+06	2.01E+06	n.d.	n.d.
			5.60E+08	1.20E+05	3.03E+05	n.d.	n.d.	1.30E+09	1.44E+06	2.01E+06	n.d.	n.d.
			5.74E+08	1.16E+05	1.60E+05	n.d.	n.d.	1.21E+09	1.48E+06	2.03E+06	n.d.	n.d.
Dos riegos con agua residual + 200 mg l <sup>-1</sup> de SMX y CIP	Coloreado (azul brillante)	Superficial	9.78E+08	2.99E+08	1.41E+07	n.d.	6.36E+04	1.00E+09	1.56E+07	1.16E+06	n.d.	n.d.
			9.56E+08	3.47E+08	1.46E+07	n.d.	7.70E+04	1.02E+09	1.48E+07	1.20E+06	n.d.	n.d.
			9.64E+08	3.02E+08	1.41E+07	n.d.	4.88E+04	1.02E+09	1.45E+07	1.07E+06	n.d.	n.d.
		Intermedio	1.16E+09	1.17E+08	3.96E+06	n.d.	n.d.	1.85E+09	2.04E+07	1.85E+06	n.d.	n.d.
			1.10E+09	1.14E+08	3.73E+06	n.d.	n.d.	1.82E+09	2.11E+07	1.77E+06	n.d.	n.d.
			1.13E+09	1.16E+08	3.88E+06	n.d.	n.d.	1.85E+09	1.82E+07	1.91E+06	n.d.	n.d.
		Final	9.40E+08	4.40E+07	1.81E+06	n.d.	n.d.	1.00E+09	1.06E+07	1.39E+06	n.d.	n.d.
			8.22E+08	4.20E+07	1.81E+06	n.d.	n.d.	9.23E+08	1.07E+07	1.45E+06	n.d.	n.d.
			8.28E+08	4.47E+07	1.78E+06	n.d.	n.d.	8.61E+08	1.10E+07	1.43E+06	n.d.	n.d.
	No coloreado	Intermedio	9.03E+08	8.36E+06	5.36E+05	n.d.	n.d.	1.11E+09	2.45E+06	2.14E+06	n.d.	n.d.
			9.65E+08	8.64E+06	5.62E+05	n.d.	n.d.	8.69E+08	2.40E+06	2.11E+06	n.d.	n.d.
			8.52E+08	9.01E+06	5.34E+05	n.d.	n.d.	1.03E+09	2.46E+06	2.19E+06	n.d.	n.d.
Final	1.99E+08	2.02E+06	4.46E+05	n.d.	n.d.	7.41E+08	2.26E+06	9.78E+05	n.d.	n.d.		
	2.02E+08	1.98E+06	4.71E+05	n.d.	n.d.	7.64E+08	2.26E+06	1.03E+06	n.d.	n.d.		
	2.09E+08	2.02E+06	4.40E+05	n.d.	n.d.	7.86E+08	2.42E+06	9.15E+05	n.d.	n.d.		

n.d.=No detectado