



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TRANSFERENCIA DE DOS ANTIBIÓTICOS DEL SUELO A PLANTAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**FABIOLA RODRÍGUEZ EVANGELISTA**

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

**COMITÉ TUTOR: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH**  
**INSTITUTO DE GEOGRAFÍA**  
**DRA MARISA MAZARI HIRIART**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**MÉXICO, D.F.**

**JUNIO, 2014**



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.

---

## CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>6</b>
2.1. ANTIBIÓTICOS EN EL AMBIENTE.....	6
2.2. FLUOROQUINOLONAS .....	7
2.3. SULFONAMIDAS.....	8
2.4. TRANSPORTE DE ANTIBIÓTICOS DEL SUELO A LAS PLANTAS .....	10
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	<b>16</b>
5.1. MUESTREO .....	16
5.2. PRUEBA DE GERMINACIÓN .....	17
5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	17
5.4. CONTAMINACIÓN DE LOS SUELOS .....	18
5.5. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.....	19
5.6. COSECHA DE LAS PLANTAS.....	19
5.7. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN PLANTAS .....	20
5.8. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	21
5.9. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN SUELO CON $\text{CaCl}_2$ .....	22
5.10. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN SUELO MEDIANTE EXTRACCIÓN ACCELERADA CON DISOLVENTE (ASE) .....	23
5.11. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC-MS/MS) .....	24
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS EVALUADOS.....	26
6.2. CONCENTRACIÓN DE CIPROFLOXACINO (CIP) EN EL SUELO.....	26
6.3. CONCENTRACIÓN DE CIPROFLOXACINO EN PLANTAS .....	28
6.4. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA ALFALFA EN SUELOS CONTAMINADOS CON CIPROFLOXACINO .....	29
6.5. CONCENTRACIÓN DE SULFAMETOXAZOL (SMX) EN EL SUELO .....	32
6.6. CONCENTRACIÓN DE SULFAMETOXAZOL EN PLANTAS.....	34
6.8. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA ALFALFA EN SUELOS CONTAMINADOS CON SULFAMETOXAZOL.....	37
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
7.1. TRANSFERENCIA DE FLUOROQUINOLONAS Y SULFONAMIDAS DEL SUELO A LA BIOMASA AÉREA DE LAS ALFALFAS .....	40
7.2. DISPONIBILIDAD DE CIP EN EL SUELO .....	41
7.3. TRANSFERENCIA DE CIP DEL SUELO A LAS ALFALFAS.....	42
7.4. DISPONIBILIDAD DEL SMX EN SUELO Y SU DINÁMICA EN EL TIEMPO .....	44
7.5. TRANSFERENCIA DE SMX DEL SUELO A LA ALFALFA .....	47
7.6. INFLUENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS.....	48

---

VIII.	CONCLUSIONES .....	52
IX.	RECOMENDACIONES .....	53
X.	LITERATURA CITADA.....	54
XI.	ANEXO.....	59

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por su apoyo durante mis estudios de Maestría.

A CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo mediante el financiamiento del proyecto IO110-193-10 y por la beca que me otorgó durante mi investigación tanto en México como en Alemania.

A PAEP y al Posgrado UNAM por el apoyo económico que me otorgaron durante mi estancia de investigación en Alemania.

A mi tutora Christina D. Siebe Grabach por su paciencia, su apoyo y guía durante la realización de este trabajo. Este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo constante. Muchas gracias.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Silke Cram Heydrich y la Dra. Marisa Mazari Hiriart. Muchas gracias por su guía y por todos sus comentarios durante el desarrollo de este proyecto.

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi querida UNAM por todo su apoyo durante mi formación como científica.

Al instituto de Geología por todo su apoyo durante estos dos años.

A los miembros de mi jurado de examen por todas sus valiosas aportaciones y apoyo para la realización de este trabajo. Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dra. Silke Cram Heydrich, Dra. Claudia Ponce de León Hill, Dra. Blanca Prado Pano y Dra. María del Pilar Ortega Larrocea. Muchas gracias.

A Philipp Dalkmann y a Jan Siemens por todo su apoyo y su paciencia durante mi estancia en la Universidad de Bonn. Vielen Dank!

A Katharina Prost, por tu amistad y por todas tus enseñanzas en las extracciones ASE. Gracias por esperarme y hacerme compañía todas esas veces en las que no terminaba mis experimentos. Herzlichen Dank für Ihre wertvolle Unterstützung!!!

A la M. en C. Iris Suárez Quijada por toda su asistencia y apoyo proporcionados durante el montaje y desarrollo de mi experimento realizado en las Instalaciones del Invernadero de Departamento de Edafología. Muchas gracias por toda la ayuda que nos brindas a todos los estudiantes.

Al Técnico Académico Jorge René Alcalá Martínez, M. en C. Kumiko Shimada Miyasaka, Dra. Olivia Zamora Martínez, Dra. Lucy Mora y Aurelio Samuel Hernández Olvera, por su apoyo en los análisis físico-químicos del suelo.

A todos los miembros del laboratorio de Edafología Ambiental por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y al M. en C. Héctor Alexander Valdés por su apoyo en la extracción ASE de muestras de suelo y plantas.

A la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB) y al M. en C. Manuel Hernández Quiroz, por su asistencia en las extracciones de antibióticos en suelos. Por su apoyo en mi formación científica desde la licenciatura. Manuelito, Capi, muchas gracias por todo y sobre todo por la amistad que me has brindado durante tantos años.

A Gabriela Diego por todo su apoyo y sobre todo por su paciencia durante la realización de este trabajo.

A mi familia, mamá, papá y hermana muchas gracias por el apoyo que siempre me han brindado. A mis tí@s y primos, muchas gracias por su apoyo.

A Rodrigo Gutiérrez por todo el cariño y comprensión que me has brindado durante todo el tiempo que hemos compartido juntos. Has sido una parte muy importante en mi vida y en el desarrollo de este proyecto. Gracias, sin ti esto no hubiera sido posible.

A mis amigos que me han brindado su amistad y apoyo durante todo este tiempo: Arturo Atilano (Negas), Mario Cayetano, Horacio, Kathia, Melanie Broszat, Mo, Yonping Li, Manuel, Naye, Ady, Edgar, Xchel, Clarita, , Ana Lilia, , Alimta, Ise, Rak, Lucero, Nacho, Lalo Iepo, D-Juanito a mis compañeritos del cubo, Armando, Sonia y Rosario .

---

*“Para seguir el camino del conocimiento,  
uno tiene que ser muy imaginativo.  
En el camino del conocimiento nada es  
tan claro como nos gustaría que fuera”.*

*Carlos Castaneda  
(El fuego interno)*

*“La impecabilidad comienza con un solo acto, que tiene que  
ser premeditado, preciso y sostenido. Si este acto se repite  
durante el tiempo suficiente, uno adquiere un sentido de  
**intento** inflexible que puede aplicarse a cualquier cosa. Si esto  
se logra, el camino queda despejado. Así, una cosa lleva a la otra,  
hasta que al fin el guerrero desarrolla todo su potencial”.*

*Carlos Castaneda  
(El fuego interno)*

## LISTA DE TABLAS

- 2.1. Características del Ciprofloxacino y sulfametoxazol.
- 2.2. Concentración de fármacos en suelos y su acumulación en plantas.
- 5.1. Condiciones de la extracción acelerada con disolvente (ASE) para ciprofloxacino y sulfametoxazol basadas en los métodos descritos por Golet *et al.* (2001) y Göbel *et al.* (2005) respectivamente.
- 5.2. Condiciones de la extracción acelerada con disolvente (ASE) para extraer ciprofloxacino y sulfametoxazol Simultáneamente. Basados en los métodos descritos por Golet *et al.* (2001) y Göbel *et al.* (2005) respectivamente.
- 6.1. Contenido de arena, limo y arcilla en suelos irrigados con aguas residuales por más de 80 años (Juandhó y Ulapa) y en suelos de temporal (Santiago y El Tigre).

## LISTA DE FIGURAS

- 5.1. Diseño experimental
- 5.2. Acoplamiento de Cartuchos Chromabond y HLB para la extracción en fase sólida de los extractos de plantas obtenidos en el ASE..
- 5.3. Línea del tiempo de los análisis realizados. El círculo verde con una paloma indica que los análisis fueron realizados y el círculo rojo con un tache indica que los análisis no fueron realizados.
- 6.1. Valores de pH y porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno en suelos de temporal y riego provenientes del Valle del Mezquital.
- 6.2. Concentración de CIP extractable en  $\text{CaCl}_2$  en suelos del Valle del Mezquital adicionados con  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  desde el inicio del experimento hasta cinco meses después (NS: no significativo;  $p < 0.05$  diferencias significativas).
- 6.3. Concentración de ciprofloxacino en la biomasa aérea de alfalfas cultivadas durante tres meses (primera cosecha) en suelos adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  PS.
- 6.4. Porcentaje de germinación de alfalfa sembrada en suelos irrigados y de temporal del Valle del Mezquital sin antibiótico y adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  CIP.
- 6.5. Plantas de alfalfa 3 meses después de su siembra. Las dos macetas del lado izquierdo corresponden a alfalfa sembrada en suelos de temporal mientras que las dos macetas de la derecha corresponden a suelos irrigados.
- 6.6. Crecimiento de alfalfa cultivada en suelos irrigados y de temporal provenientes del Valle del Mezquital sin antibiótico y adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  CIP. A altura de las plantas dos meses después de haber sido sembradas; B biomasa aérea de las alfalfas al tercer y al quinto mes después de haber sido sembradas distinguiendo entre suelos de temporal y de riego y C biomasa radicular de las plantas cinco meses después de haber sido sembradas. NS: no significativo;  $p < 0.05$  diferencias significativas.
- 6.7. Concentración total de sulfametoxazol ( $\text{CaCl}_2$  + ASE) extraída en suelos de riego y de temporal (izquierda) y sus respectivos porcentajes de por tipo de extracción (derecha). **A** indica las concentraciones de SMX al inicio del experimento y **B** las concentraciones tres meses después. Con fines de visualización se utilizan diferentes escalas. NS: no significativo  $p < 0.05$ : diferencia significativa.
- 6.8. Concentración de sulfametoxazol en la biomasa aérea de alfalfas cultivadas durante tres meses (primera cosecha) en suelos adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  PS.
- 6.9. Porcentaje de concentración de SMX en plantas y suelos de Valle del Mezquital adicionados con  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  PS. **A** señala SMX extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total (ASE) al inicio del experimento y **B** el porcentaje de SMX en plantas y en suelo (extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total ASE) tres meses después del inicio de experimento. NS: no significativo,  $p < 0.05$ : diferencias significativas.
- 6.10. Porcentaje de concentración de SMX en plantas y suelos de Valle del Mezquital contaminados con  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  PS. **A** señala SMX extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total (ASE) al inicio del experimento y **B** el porcentaje de SMX en plantas y en suelo (extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total ASE).
- 6.11. Porcentaje de germinación de alfalfa sembrada en suelos irrigados y de temporal del Valle del Mezquital adicionados con 1 y  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  SMX. NS: no significativo,  $p < 0.05$ : diferencias significativas.
- 6.12. Crecimiento de alfalfa cultivada en suelos irrigados y de temporal provenientes del Valle del Mezquital adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  SMX **A** altura de las plantas dos meses después de haber sido sembradas; **B** biomasa aérea de las alfalfas al tercero y al quinto mes después de haber sido sembradas, distinguiendo entre suelos de temporal y de riego y **C** biomasa radicular de las plantas cinco meses después de haber sido sembradas. NS: no significativo,  $p < 0.05$ : diferencias significativas.



## RESUMEN

Los fármacos son sustancias ampliamente utilizadas en el tratamiento y prevención de enfermedades en humanos, animales y plantas. Debido a su importancia, este tipo de compuestos son consumidos y posteriormente liberados en grandes cantidades al ambiente. Si bien los fármacos han sido detectados en distintas matrices ambientales (*i.e.* suelo, sedimentos, aguas superficiales, aguas subterráneas y organismos), aún no se conocen los efectos que pueden tener en los ecosistemas ni tampoco se sabe cuáles son los posibles riesgos en la salud humana que conlleva su potencial introducción en los distintos niveles tróficos. En el presente estudio se evaluó la transferencia de dos antibióticos, el ciprofloxacino y el sulfametoxazol a alfalfa (*Medicago sativa*) cultivada en suelos provenientes del Valle del Mezquital, una zona agrícola expuesta a este tipo de contaminantes a través del riego con agua residual de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. La transferencia de ambos antibióticos fue evaluada en dos tipos de suelo: regados con aguas residuales por más de 80 años, y en suelos de temporal que no habían sido expuestos a este tipo de contaminantes. Los suelos fueron contaminados con los antibióticos por separado en dos dosis, 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>, posteriormente se sembraron semillas de alfalfa y se cultivaron durante tres meses bajo condiciones controladas de invernadero. Durante el experimento se evaluaron las concentraciones de los antibióticos en la biomasa aérea de las plantas y en los suelos. Los resultados obtenidos mostraron que ambos antibióticos fueron transferidos a la biomasa aérea de las plantas (0.2- 2093 ng g<sup>-1</sup>). El sulfametoxazol mostró una mayor transferencia a las plantas en comparación con el ciprofloxacino. La capacidad de adsorción del suelo fue el factor relevante en la transferencia del sulfametoxazol a las alfalfas, pues las mayores concentraciones de este antibiótico se encontraron en las plantas sembradas en suelos de temporal, con menor contenido de materia orgánica. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la materia orgánica en el proceso de adsorción del sulfametoxazol al suelo. En contraste el tipo de suelo no fue un factor relevante en la adsorción del ciprofloxacino. Si bien los antibióticos se transfirieron del suelo a las plantas, su porcentaje de transferencia respecto a la dosis inicial fue muy bajo poniendo de manifiesto un riesgo potencial muy bajo para la salud humana.

Se plantea un posible efecto hormético de ambos antibióticos en el crecimiento de las plantas. No obstante, el diseño del presente experimento no permite distinguir si los efectos en el crecimiento de las alfalfas se deben a un efecto directo de los antibióticos en la planta, a un efecto indirecto ocasionado por una alteración en las comunidades microbianas del suelo o a un efecto sinérgico de los dos anteriores.

Palabras clave: contaminantes emergentes, antibióticos, transferencia, *Medicago sativa*, ciprofloxacino, sulfametoxazol, Valle del Mezquital, aguas residuales.

**ABSTRACT**

Pharmaceuticals are widely used in the treatment and prevention of human, animal and plant diseases. Due to their importance, these compounds are consumed in large quantities and then released into the environment. Even though pharmaceuticals have been detected in different environmental compartments (i.e. soils, sediments, surface water, groundwater and organisms) there is still a lack of understanding about the effects that these compounds may have on ecosystems and human health due to their possible introduction into the trofic levels. This study was performed to assess the potential uptake of ciprofloxacin and sulfamethoxazole from soils by alfalfa (*Medicago sativa*). The soils used in this study came from the Mezquital Valley, a region that receives the untreated wastewaters from Mexico City. In the experimental setup two kinds of soils were used: soils under wastewater irrigation for more than 80 years and rainfed soils (which have never been exposed to irrigation and therefore to this kind of compounds). The soils were contaminated using two doses, 1 and 10 mg Kg<sup>-1</sup>. Then alfalfa was sown and cultivated under controlled conditions in a greenhouse for three months. During the experiment, concentrations of both antibiotics were evaluated in the aerial biomass and soil. Plant analysis indicate that both antibiotics are able to be taken up by alfalfa plants (0.2- 2093 ng g<sup>-1</sup>). Sulfamethoxazole showed higher plant uptake in comparison to ciprofloxacin. The largest amounts of sulfamethoxazole were found in the aboveground biomass of rainfed soils, which have small organic matter contents. This effect emphasizes the importance of soil organic mater in the sorption proceses of this antibiotic. In contrast ciprofloxacin did not show the same behavior. Although both antibiotics were able to be taken up by plants their transfer percentages from the initial dose were quite low, supporting very little evidence of a human or animal healt risk.

A possible hormetic effect of both pharmaceuticals in alfalfa plants is discussed. However the experimental design does not allow to distinguish whether this effect is caused directly by the interaction of the antibiotic within the plant, or if it is a result of the disturbance of soil microbiological comunidades that influence plant growth, or if it is a synergistic reaction between both of these possibilities.

Key words: emerging pollutants, antibiotics, uptake, *Medicago sativa*, ciprofloxacin, sulfamethoxazole, Mezquital Valley, wastewater

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de aguas residuales para la irrigación de zonas agrícolas está aumentando considerablemente. Una de las principales razones del incremento de estas prácticas es que la agricultura requiere de una gran cantidad de agua, y el riego con aguas residuales permite adjudicar una mayor proporción del agua de buena calidad para el consumo humano (USEPA, 1992; Siebe, 1998; Siemens 2010; Fatta-Kassinou *et al.*, 2011). En países industrializados el uso de aguas residuales con un tratamiento secundario o incluso terciario, representa una buena opción para cubrir las demandas de los recursos hídricos ante la escasez de agua (USEPA, 1992; Fatta-Kassinou *et al.*, 2011). En contraste, en países en desarrollo como México, la mayor parte del agua residual es descargada a los campos de cultivo sin tratamiento previo (Siebe, 1998). Tal es el caso del Valle del Mezquital, que recibe las aguas residuales generadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y cuya área abarca más de 800 km<sup>2</sup>, colocándola como la zona agrícola más grande a nivel mundial (Siebe, 1998; Siemens *et al.*, 2008, 2010).

Aunque las aguas residuales contienen nutrimentos que permiten mejorar los rendimientos de los cultivos, también representan un riesgo para la salud humana, ya que contienen patógenos y diversos contaminantes como metales y compuestos orgánicos. Además Investigaciones recientes señalan la presencia de contaminantes emergentes como los fármacos (Boxal *et al.*, 2006; Siemens *et al.*, 2008, 2010; Du y Liu, 2012; Goldstein *et al.*, 2014).

El término “contaminantes emergentes” se utiliza para nombrar a los compuestos que han sido sintetizados recientemente o bien para denominar a aquellos compuestos que se han detectado en el ambiente (debido al avance de los métodos analíticos), pero que se sabe poco o nada de su impacto en los ecosistemas y en humanos. De hecho la presencia de la mayoría de estos compuestos en el ambiente no es nueva, pero si la preocupación acerca de su presencia, persistencia y posibles efectos que pudieran ocasionar en el ambiente (Lapworth *et al.*, 2012). Los contaminantes emergentes incluyen una gran cantidad de compuestos utilizados por la sociedad, con la peculiaridad de que se son consumidos en grandes cantidades y de manera constante. Entre estos compuestos podemos incluir a sustancias que se utilizan en la industria, en la preservación de

alimentos, productos de cuidado personal, nanomateriales y fármacos empleados para uso veterinario y terapéutico (Lapworth *et al.*, 2012).

Los fármacos son moléculas complejas que en condiciones ambientales pueden tener carga neutral, ser catiónicos, aniónicos o zwitteriones. Se pueden clasificar de acuerdo con la función terapéutica que realizan en analgésicos, antineoplásicos, antiinflamatorios, antiepilépticos, antihistamínicos, estatinas, antidepresivos,  $\beta$  bloqueadores, medios de contraste y antibióticos (Kümmerer, 2004).

En particular los antibióticos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades en humanos y en animales; sin embargo, sólo hasta hace unas décadas estos compuestos comenzaron a ser considerados como contaminantes (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Daughton y Ternes, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Boxal *et al.*, 2006). Se ha estimado que el consumo de antibióticos a nivel mundial es aproximadamente de 100 000-200 000 toneladas por año (Wise, 2002).

En diversos estudios se ha reportado la presencia de antibióticos en aguas residuales, aguas superficiales (ríos, estuarios y lagos), agua subterránea, sedimentos y organismos (*i.e.* peces, medusas y crustáceos; Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Boxal *et al.*, 2006; Siemens *et al.*, 2008; Fatta-Kassinos, *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Clarke y Smith, 2011). Los antibióticos son consumidos y posteriormente excretados con la orina y las heces (Cooper *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009). Se estima que de la dosis total de un antibiótico administrado en un ser humano, entre el 30 y el 90% se excreta en su forma activa (Rang *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2008). Además es importante resaltar que más del 90% de los fármacos permanecen en el agua residual incluso después de haber sido tratada (Cooper *et al.*, 2008; Lin y Gan, 2011). De esta manera las descargas provenientes de las plantas de tratamiento son una de las principales vías de liberación de fármacos (y entre éstos de antibióticos) al ambiente (Heberer, 2002; Boxal *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009; Santos *et al.*, 2010; Clarke y Smith, 2011).

Actualmente se cuenta con pocos estudios realizados acerca de la transferencia de antibióticos a través de los niveles tróficos. Si bien la mayoría de los estudios se han enfocado a otros contaminantes, es necesario realizar investigaciones enfocadas a la transferencia de antibióticos y los posibles riesgos que esto representa para la salud humana.

Bajo este escenario, un grupo de investigadores de diferentes dependencias de la UNAM (Instituto de Ecología, Facultad de Medicina, Instituto de Ingeniería e Instituto de Geología) realizaron un proyecto multidisciplinario en colaboración con científicos alemanes de las universidades de Bonn y Freiburg para estudiar la diseminación de antibióticos y genes de resistencia a éstos en el Valle del Mezquital. Dentro del marco de este proyecto también se evaluó la transferencia de dos antibióticos del suelo a las plantas a través de la presente tesis de maestría. De manera particular se evaluó la transferencia del sulfametoxazol (de la familia de las sulfonamidas) y el ciprofloxacina (de la familia de las fluoroquinolonas) en la alfalfa, *Medicago sativa*, uno de los cultivos dominantes en la zona.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Antibióticos en el ambiente

Un antibiótico puede ser definido como un agente quimioterapéutico que se emplea en el tratamiento de enfermedades con la finalidad de inhibir o suprimir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos o protozoarios (Kümmerer, 2009). De manera particular los antibióticos se clasifican en fluoroquinolonas, sulfonamidas, penicilinas, cefalosporinas, nitromidazoles, tetraciclinas y macrólidos, y aunque varían mucho tanto en sus propiedades químicas como en su estructura, generalmente contienen un grupo no polar y un núcleo unido a un grupo funcional (Thiele-Bruhn, 2003; Clarke y Smith 2011).

Los antibióticos son consumidos en grandes cantidades a nivel mundial y su uso no solamente se restringe a la profilaxis o al tratamiento de enfermedades en humanos, ya que son muy utilizados en la crianza de animales (ganadería y acuicultura) y en la agricultura (Clarke y Smith 2011; Lapworth *et al.*, 2012).

Debido a que los fármacos son liberados en grandes cantidades al ambiente, durante los últimos años se ha comenzado a investigar el destino y los posibles efectos que pudieran causar en los ecosistemas (Kümmerer, 2004; Siemens, 2008). Si bien la mayor parte de estas investigaciones son llevadas a cabo en Europa, Estados Unidos y Canadá; en México se están realizando los primeros estudios al respecto. Específicamente en el Valle del Mezquital (zona receptora de las aguas residuales provenientes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ZMCM). Siemens *et al.*

(2008) reportan la presencia de diversos fármacos como claritromicina, metoprolol, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, sulfasalazina, bezafibrato y gemfibrozilo en el orden de  $\mu\text{g/L}$  en aguas residuales que son utilizadas para la irrigación de los campos agrícolas de la zona.

Aunque aún no se tiene claro cuáles son los efectos que los antibióticos pueden tener en los organismos en los distintos niveles tróficos (Halling-Sorensen *et al.*, 1998); Du y Liu (2012) sugirieron que los impactos de los antibióticos se pueden clasificar en: a) incremento de microorganismos patógenos resistentes y diseminación de genes de resistencia (Siemens *et al.*, 2008, 2010; Hu *et al.*, 2010; Dalkmann *et al.*, 2012); b) efectos ecotoxicológicos en organismos acuáticos, terrestres y en particular, cambios en las poblaciones microbianas e impactos ecológicos en los ecosistemas agrícolas debido a la introducción continua de antibióticos mediante la aplicación de abonos de animales previamente medicados, por la fertilización con biosólidos o bien mediante la irrigación con aguas residuales; y c) posibles impactos en la salud humana por la ingestión de alimentos y agua potable que contengan residuos de antibióticos ya que diversos estudios han reportado tanto la transferencia como la translocación de diversos antibióticos del suelo a las plantas (Kumar *et al.*, 2005; Boxall *et al.*, 2006; Dolliver *et al.*, 2007; Herklotz *et al.*, 2010; Kipper *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Shenker *et al.*, 2011). Además se ha reportado la presencia de antibióticos en cuerpos de agua potable en el orden de  $\text{ng L}^{-1}$  (Lapworth *et al.*, 2012).

Bajo este escenario, es importante considerar a las plantas como una potencial ruta de exposición, ya que diversos estudios han demostrado la transferencia de antibióticos a las plantas, en especial la familia de las fluoroquinolonas y las sulfonamidas (Kumar *et al.*, 2005; Boxal *et al.*, 2006; Herklotz, *et al.*, 2010; Clarke y Smith, 2011).

## **2.2. Fluoroquinolonas**

Las fluoroquinolonas o también conocidas como quinolonas, son agentes antimicrobianos muy utilizados en enfermedades ocasionadas por bacterias grampositivas y gramnegativas. Su espectro de acción es amplio y depende de la generación, además cabe destacar que conforme van avanzando las generaciones va aumentando su espectro de acción (Sánchez *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de estos antibióticos se basa en el bloqueo de la subunidad A de la DNA girasa, lo que ocasiona la inhibición de la síntesis de DNA bacteriano. Se utilizan principalmente ante infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, en ciertos casos de otitis, osteomielitis crónica, gonorrea, infecciones de la próstata e infecciones cervicales. Se clasifican de acuerdo a su generación y respecto al espectro bacteriano sobre el cual son eficaces en: quinolonas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Cabe destacar que la quinolona que más se utiliza actualmente es el ciprofloxacino (Tabla 2.1; Leyva *et al.*, 1999).

Las fluoroquinolonas presentan una gran estabilidad química, ya que resisten altas temperaturas e hidrólisis, pero se degradan por luz UV (Kümmerer, 2004). En los suelos, estos compuestos presentan vidas medias de más de 60 días (Leal *et al.*; 2013; Boxal *et al.*, 2006.).

Las fluoroquinolonas poseen distintos grupos ionizables, sin embargo algunas fluoroquinolonas como la fluomequina solamente posee un grupo ionizable, el 3-carboxilo. En contraste tenemos otras quinolonas como el ofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino y ciprofloxacino entre otras, que presentan dos grupos funcionales capaces de ionizarse (Picó y Andreu, 2007). Estos grupos 3-carboxilo y N-4 (proveniente del anillo de piperazina<sup>1</sup>) pueden ocasionar que estas quinolonas se comporten como ácido o bien como base. De hecho, la actividad de estos compuestos depende del pH ya que tienen como finalidad inhibir la DNA girasa bacteriana, proceso que depende del pH y de la concentración de ácido (Picó y Andreu, 2007).

### 2.3. Sulfonamidas

Las sulfonamidas son antibióticos bacteriostáticos derivados de la sulfanilamida. Su estructura química consta de un grupo sulfuro unido a un anillo de benceno y grupos amino. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, interfiriendo con la síntesis de ácido fólico. Este grupo de antibióticos tiene un espectro de acción amplio y comprende especialmente a las bacterias gramnegativas pero también es eficaz ante bacterias grampositivas (Brugueras y Morejón, 1999).

---

<sup>1</sup> Piperazina es un compuesto orgánico con propiedades farmacológicas. Se compone de un anillo de cuatro carbonos y dos nitrógenos.

Las sulfonamidas también son ampliamente utilizadas en combinación con otros antibióticos para obtener un mejor resultado en los tratamientos, o bien, en pacientes a los que no se les puede suministrar algún antibiótico en específico. Generalmente se utiliza la combinación de sulfametoxazol y trimetoprima, pero también la trimetoprima se puede combinar con otras sulfonamidas como la sulfadiazina, sulfamoxol y sulfametopiridazinam, entre otras. Pueden ser clasificadas de acuerdo al tiempo de absorción y excreción en sulfonamidas de acción corta, media, larga y ultra larga (Brugueras y Morejón, 1999; Sánchez *et al.*, 2004).

Las sulfonamidas, de manera similar a otros fármacos como las fluoroquinolonas, se caracterizan por ser compuestos capaces de protonarse y desprotonarse bajo condiciones específicas de pH. Poseen un grupo amino capaz de ganar un protón y un grupo amida capaz de liberar un protón (Quiang y Adams 2004; Wu *et al.*, 2012). Por otra parte las sulfonamidas y en especial el sulfametoxazol (Tabla 2.1), se caracterizan por ser antibióticos muy móviles pues poseen una alta solubilidad en agua (Chen *et al.*, 2011). Además de la alta movilidad en el suelo, se ha estimado que este grupo de antibióticos es poco persistente ya que presenta vidas medias de aproximadamente 8 a 21 días en suelos no esterilizados (Marques *et al.*, 2013).

Tabla 2.1. Características del ciprofloxacino y sulfametoxazol.

Antibiótico	Estructura molecular y pKa	Características
Ciprofloxacino <sup>a</sup>		Número CAS <sup>b</sup> : 085721-33-1 Peso molecular <sup>b</sup> : 331.35 Solubilidad en agua (20° C) <sup>b</sup> : 3E+004 mg L <sup>-1</sup> Presión de vapor <sup>b</sup> : 1.65E-012 mm Hg Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> : 1.32 K <sub>oc</sub> (L kg <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup> : 3487
Sulfametoxazol <sup>a</sup>		Número CAS <sup>b</sup> : 000723-46-6 Peso molecular <sup>b</sup> : 253.28 Solubilidad en agua (37° C) <sup>b</sup> : 610mg L <sup>-1</sup> Presión de vapor (25° C) <sup>b</sup> : 6.93E-008 mm Hg Log K <sub>ow</sub> <sup>b</sup> : 0.89 K <sub>oc</sub> (L kg <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup> : 219

<sup>a</sup>Chen *et al.*, 2011 y autores ahí citados

<sup>b</sup>Base de datos: The Physical Properties Database, PHYSPROP (<http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>)

<sup>c</sup>Cooper *et al.*, 2008

<sup>d</sup>Figuroa-Diva *et al.*, 2010

<sup>e</sup>Barron *et al.*, 2009



## 2.4. Transporte de antibióticos del suelo a las plantas

Posterior a la administración y excreción de un antibiótico, éste puede entrar al ambiente mediante distintas vías. En el caso de antibióticos empleados en humanos, la principal vía de entrada es mediante las aguas residuales, las cuales generalmente son vertidas en los campos de cultivo (Hamscher *et al.*, 2004). Una vez en el suelo, el antibiótico puede estar sujeto a procesos de transporte, sorción y degradación en donde sus propiedades fisicoquímicas y las características del suelo determinarán su movilidad, persistencia y biodisponibilidad (Yanzheng *et al.*, 2005; Siemens *et al.*, 2010; Clarke y Smith, 2011).

Kumar *et al.* (2005) sugirieron que los factores más importantes para la absorción de un antibiótico por las plantas son su tamaño, su solubilidad en el agua y su disponibilidad en el suelo, la cual depende de su contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico y pH (Tolls 2001; O'Connor y Aga, 2007).

Aunque la información acerca de los mecanismos de transferencia de antibióticos a las plantas es escasa, los modelos establecidos para diversos contaminantes orgánicos (*i.e.* plaguicidas) son una herramienta muy valiosa para poder entender el comportamiento de los antibióticos en el ambiente. De manera particular Collins *et al.* (2006) sugieren que las plantas pueden incorporar diversos compuestos orgánicos por las siguientes vías:

- Transporte pasivo (no requiere de energía y depende de gradientes de concentración) y transporte activo (requiere energía) del suelo a las raíces: en esta vía los contaminantes son absorbidos por las raíces a partir de la fase gaseosa o acuosa del suelo. En este proceso, la absorción de los compuestos mediante transporte activo o pasivo va a estar determinada por las características del compuesto (*i.e.* si está ionizado, de su coeficiente octanol-agua ( $K_{ow}$ )) y de la cantidad de lípidos en las raíces de la planta.
- Transporte de la raíz al tallo: para que un compuesto sea transportado de las raíces a otras partes de la planta, éste debe entrar al xilema, y para esto tiene que atravesar diversas membranas como la epidermis, el cortex, la endodermis y el periciclo. Es importante notar

que para que este proceso se lleve a cabo se debe tomar en cuenta la solubilidad de los contaminantes en el agua y en las membranas celulares, pues esto va a determinar la movilidad del compuesto.

- Deposición de partículas en la superficie de las plantas: los compuestos orgánicos pueden ser adsorbidos a las partículas de suelo y cuando éstas son depositadas en la superficie de las plantas los compuestos que transportan pueden ser removidos, degradados o bien pueden difundirse a través de la cutícula y ser adsorbidos en los tejidos lipofílicos, para así ingresar a las hojas. Es interesante notar que la permeabilidad de la cutícula a los compuestos orgánicos en solución tiene una relación lineal con el coeficiente octanol-agua ( $K_{ow}$ ). Esta vía es muy compleja y diversos factores como el tiempo de contacto hoja-partícula, área de la hoja y el tipo de compuesto determinan la relevancia de ésta.

Otro factor que es importante tomar en cuenta respecto a la acumulación de contaminantes en las plantas es el metabolismo, pues una vez dentro de la planta, estos compuestos pueden ser metabolizados, reduciendo así su concentración dentro del tejido (Colins *et al.*, 2006). Por otra parte la fisiología de la planta también juega un papel muy importante pues el contenido de agua, lípidos y su tasa de transpiración influyen considerablemente en la transferencia y concentración de contaminantes (Yanzheng *et al.*, 2005).

La mayor parte de los estudios realizados acerca de la exposición de plantas a antibióticos se han enfocado a determinar fitotoxicidad y existen pocos estudios de bioacumulación en plantas, los cuales se muestran en la Tabla 2.2 (Kumar *et al.*, 2005; Boxall *et al.*, 2006).

Uno de los estudios pioneros en los que se evaluó la acumulación de antibióticos en plantas fue realizado por Kumar *et al.* (2005); en el que midieron la transferencia de clortetraciclina y tilosina en col (*Brassica oleraceae* L.), cebolla (*Allium cepa* L.) y maíz (*Zea mays* L.). De estos dos fármacos, únicamente la clortetraciclina fue transferida a las plantas, cuyos tejidos presentaron concentraciones de 2-17  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  PH (peso húmedo). En contraste, la tilosina no fue transferida a las plantas. Ante este comportamiento, los autores sugieren que tal vez no pudo ser absorbida debido a que es una molécula muy grande y por tanto no pudo ser transportada a las plantas durante la transpiración. Por otra parte, Boxall *et al.* (2006) evaluaron la transferencia de fármacos

frecuentemente utilizados en medicina veterinaria (tilosina, diazinon, florfenicol, sulfadiazina, fenilbutazona, oxitetraciclina, amoxicilina, trimetoprim, enrofloxacin) en cultivos de zanahoria y lechuga. Sus resultados demostraron que no todos los fármacos fueron transferidos, entre ellos la tilosina cuyo comportamiento fue similar al estudio realizado por Kumar *et al.* (2005). En el caso de las zanahorias solo el diazinón (plaguicida, en este caso de uso veterinario), enrofloxacin, flornenicol y trimetoprim fueron transferidos ( $2.8-13 \mu\text{g Kg}^{-1}$  PH), asociándose las mayores concentraciones a la cáscara de las zanahorias. Por otra parte, en las lechugas solo se detectaron florfenicol, levamisol y trimetroprim ( $6$  a  $170 \mu\text{g Kg}^{-1}$  PH). Los autores concluyen que los máximos de traslocación se asocian a compuestos con un  $\log K_{ow} \sim 1.8$ .

En el estudio realizado por Dolliver *et al.* (2007), en el que analizaron la transferencia de la sulfametazina en maíz (*Zea mays* L.), lechuga (*Latuca sativa* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.), los autores señalaron que la sulfametazina sí se transfiere a las plantas ( $0.1$  a  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$  PS) y que su contenido se incrementó en los tejidos vegetales conforme incrementaba su concentración en el suelo.

El estudio realizado por Kipper *et al.* (2010), se enfocó en evaluar la transferencia de antibióticos pertenecientes a la familia de las fluoroquinolonas y las sulfonamidas (ciprofloxacino, norfloxacina, ofloxacina, sulfadimetoxina y sulfametoxazol) en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Obtuvieron que ambas familias de antibióticos fueron transferidas del suelo a las plantas ( $33$  a  $3900 \mu\text{g kg}^{-1}$ ); sin embargo, las sulfonamidas y en particular el sulfametoxazol fue el antibiótico que se encontró en mayores concentraciones en los tejidos vegetales. Los autores plantearon que este comportamiento pudo deberse a que las sulfonamidas no son fuertemente adsorbidas al suelo y por tanto se encuentran disponibles para ser transportadas a las plantas.

En el estudio realizado por Wu *et al.* (2010), en el que se evaluó la transferencia de fármacos y productos de cuidado personal (PCPs; carbamacepina, fluoxetina, triclosan y triclocarbón) en soya (*Glycine max* (L.) Merr.), se observó que estos compuestos tienen una mayor disponibilidad en el suelo cuando ingresan mediante la irrigación con aguas residuales en contraste con la fertilización mediante biosólidos. Además señalaron que todos los fármacos y PCPs evaluados pueden transferirse a la planta e incluso a las semillas ( $0.6-156 \text{ ng g}^{-1}$ ).

Uno de los estudios más interesantes fue el realizado por Shenker *et al.* (2011) en el cual cultivaron pepino (*Cucumis sativus* L., cv. *Safi*) en macetas e hidropónicamente. En ambos experimentos la carbamazepina fue transferida a las hojas y a los frutos de las plantas de pepino (18.5-39.1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  PH y 1 -2.1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  PH respectivamente). Los autores señalaron que la carbamazepina se transfirió a las plantas principalmente por la transpiración, acumulándose en mayores cantidades en las hojas maduras. También determinaron que dicho fármaco puede ser transferido a las plantas cuando se encuentra en el suelo a concentraciones de 1 a 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , razón por la cual sugirieron realizar monitoreos constante del suelo y las aguas residuales que se vierten en éste.

De manera similar a Shenker *et al.* (2011), Herklotz *et al.* (2010) realizaron experimentos hidropónicos con carbamacepina, salbutamol, sulfametoxazol y trimetoprim en plantas de col (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) y de nabo (*Brassica rapa* var. *pekinensis*). Sus resultados fueron similares a los obtenidos por Boxall *et al.* (2006), encontrando que los fármacos se acumularon en ambas especies de plantas (11.34-138.26  $\text{ng g}^{-1}$  PH). Cabe destacar que el sulfametoxazol fue el fármaco que más se acumuló en los tejidos de las plantas analizadas; resultados que coinciden con los reportados por Kipper *et al.* (2010). Es importante señalar que en este estudio se confirmó que todos los fármacos analizados se transfirieron a todos los tejidos de la planta, destacando la raíz por ser el tejido que presentó la mayor acumulación.

Tabla 2.2 Concentración de fármacos en suelos y su acumulación en plantas.

Fármaco	Concentración en suelo	Características del suelo	Especie analizada y parte de la planta	Concentración en planta	Método de cuantificación	Autor
Clortetraciclina Tilosina	1000-1587 <sup>a</sup>	Suelo arcillo-arenoso (no caracterizado)	<i>Brassica oleraceae</i> L. (col) <i>Allium cepa</i> L. (cebolla) y <i>Zea mays</i> L. (maíz) Parte aérea de la planta.	2-17 <sup>e</sup>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	Kumar <i>et al.</i> (2005)
Tilosina, diazinon, florfenicol, sulfadiazina, fenilbutazona, oxitetraciclina, amoxicilina, trimetoprim y enrofloxacin	130- 900 <sup>a</sup>	Suelo arcillo-arenoso (no caracterizado)	<i>Daucus carota</i> (zanahoria) y <i>Latuca sativa</i> L. (lechuga). Parte aérea de la planta; en el caso de las zanahorias se analizaron las raíces y se separó la cáscara en los análisis.	2.8- 170 <sup>f</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS)	Boxall <i>et al.</i> (2006)
Sulfametazina	2400-3600 <sup>b</sup>	Suelo mezclado (33% capa superficial de suelo, 33% arena, 28% musgos de turbera y 6% composta)	<i>Zea mays</i> L. (maíz), <i>Latuca sativa</i> L. y <i>Solanum tuberosum</i> L.(papa). Parte aérea de la planta, en el caso de las papas se analizaron los tubérculos.	100- 1200 <sup>f</sup>	HPLC	Dolliver <i>et al.</i> (2007)
Carbamacepina, salbutamol, sulfametoxazol y trimetoprim	232.5 <sup>d</sup>	Experimento hidropónico	<i>Brassica rapa var. pekinensis</i> (col) y <i>Brassica rapa var. pekinensis</i> (nabo) Parte aérea y raíces.	11.34-138.26 <sup>e</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas cuadrupolar en tándem	Herklotz <i>et al.</i> (2010)
Ciprofloxacino, norfloxacina, ofloxacina, sulfadimetoxina y sulfametoxazol	NA. Concentración añadida: 1000 y 10 000	Suelo arenoso (no caracterizado).	<i>Solanum tuberosum</i> L. Se analizaron los tubérculos.	33 a 3900 <sup>f</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)	Kipper <i>et al.</i> (2010)
Carbamacepina, fluoxetina, triclosan y triclocarbón	0.7-73.9	Suelo arenoso (9.7% arcilla, 3.2% limo y 87.1 % arena y 2.7% materia orgánica).	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (soya) Raíz, tallo, hojas y vainas.	0.6- 156 <sup>e</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS)	Wu <i>et al.</i> (2010)
Carbamazepina	Solución del suelo: 0.57-13.98 <sup>c</sup>	3 tipos de suelo: arenoso (9% arcilla, 6% limo y 85% arena), arcilloso (43% arcilla; 25% limo y 32% arena) y musgos de turbera.	<i>Cucumis sativus</i> L., cv. <i>Safi</i> (pepino). Parte aérea de la planta, xilema y frutos.	1-39.1 <sup>e</sup>	LC-MS	Shenker <i>et al.</i> (2011)
Carbamazepina, sulfametoxazol, salbutamol, trimetoprim y triclosan (este último solo lo evaluaron en suelo + biosólidos)	Suelo + turba: 2.6, 3.1, 5.4 y 0.5 Suelo + biosólidos: 93.1, 67.4, 30.3, 24.7 y 433.7	Suelo + turba: 45% suelo (41% arena, 46% limo y 13% arcilla), 45% <i>Sphagnum</i> y 10% perlita. Suelo + biosólidos: 98% suelo descrito arriba y 2% biosólidos	<i>Brassica campestris</i> (col china). Parte aérea y raíces	Parte aérea: 20.6-317 <sup>e</sup> Raíz: 53.7- 1220.1 <sup>e</sup>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas cuadrupolar en tándem	Holling <i>et al.</i> (2012)

a. Concentración total de antibióticos en suelo (ng g<sup>-1</sup>); b. Concentración extractable en agua (ng g<sup>-1</sup>); c. Concentración en la solución del suelo (µg L<sup>-1</sup>); d. solución hidropónica (µg L<sup>-1</sup>); e. Concentración en planta en peso húmedo (ng g<sup>-1</sup>); f. Concentración en planta en peso seco (ng g<sup>-1</sup>).

### III. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la transferencia de ciprofloxacino y sulfametoxazol a alfalfa (*Medicago sativa*) cultivada bajo condiciones controladas de invernadero en función de la dosis aplicada (1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> CIP, SMX), el tiempo transcurrido a partir de la aplicación y considerando dos suelos distintos: uno regado con aguas residuales por más de 80 años con mayor contenido de materia orgánica, y otro de temporal (no regados con aguas residuales) con menor contenido de materia orgánica.

Objetivos particulares:

- Determinar cuál de los antibióticos presenta la mayor translocación a las plantas.
- Determinar la concentración total (extractable mediante extracción acelerada con disolvente, ASE) y disponible (=fácilmente extractable) de los antibióticos sulfametoxazol y ciprofloxacino, en suelos regados y no regados con agua residual.
- Evaluar si la transferencia de los antibióticos suelo-planta se relaciona con su concentración en el suelo (1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>), distinguiendo entre concentraciones fácilmente extractables (con CaCl<sub>2</sub> 0.01 M) y concentraciones totales o extractables vía ASE.
- Evaluar el crecimiento de la alfalfa: altura y biomasa aérea y subterránea en todos los tratamientos.

### IV. HIPÓTESIS

La materia orgánica (MO) aumenta la capacidad de los suelos de adsorber compuestos *i.e.* contaminantes (Alexander, 1995; Tolls, 2001 Vasudevan *et al.*, 2009). Por consiguiente, se espera que la transferencia de los antibióticos del suelo a las plantas sea distinta entre suelos regados y no

regados con aguas residuales. En el caso de los suelos regados con aguas residuales (cuyo contenido de materia orgánica es mayor), se espera que los antibióticos presenten una menor disponibilidad en el suelo y por lo tanto su transferencia a las plantas sea menor en comparación con los suelos de temporal (con menor contenido de materia orgánica), en los que se espera que los antibióticos tengan una mayor disponibilidad en el suelo y por lo tanto su transferencia a las plantas sea mayor.

De los dos antibióticos estudiados, el ciprofloxacino presentará una mayor tendencia a adsorberse al suelo ya que posee un coeficiente de adsorción suelo/agua ( $K_{oc}$ ) mayor que el del sulfametoxazol. De esta manera, se espera que el ciprofloxacino se adsorba al suelo y no sea transferido a las plantas y que el sulfametoxazol esté disponible y sí se transfiera a las alfalfas.

En caso de que los antibióticos se transfieran a las plantas, su transferencia estará influenciada por la dosis aplicada en todos los tratamientos (mayor absorción de antibióticos en la dosis mayor).

La sorción de un compuesto orgánico al suelo depende del tiempo (Alexander, 1995), por lo tanto se espera que las mayores concentraciones de los antibióticos al inicio del experimento se obtengan en la fracción disponible o extractable con  $CaCl_2$ , pues el lapso de tiempo de interacción entre el antibiótico y suelo al momento de ser contaminado es muy corto. Por otra parte, tres meses después se espera obtener las mayores concentraciones de ambos antibióticos en la fracción extractable mediante ASE, ya que el paso del tiempo favorece los procesos de adsorción de los compuestos orgánicos en el suelo.

## **V. MATERIALES Y MÉTODO**

### **5.1. Muestreo**

Se recolectaron muestras de suelo en ocho sitios: cuatro de ellos con 100 años de irrigación (Ulapa 1, Ulapa 2, Juandhó 1 y Juandhó 2) y cuatro con cero años de irrigación, es decir que se cultivan con el temporal en la época de lluvias (Santiago Tezontlale 1, Santiago Tezontlale 2, El Tigre 1 y El Tigre 2). En cada sitio se recolectó suelo a una profundidad de 0 a 30 cm que corresponde a la zona arable una parcela.

A continuación los suelos se tamizaron con un tamiz de 0.5 cm de diámetro y se almacenaron a temperatura ambiente en un costal en el cuarto de Preparación de Muestras del Instituto de Geología para su posterior adición con los dos antibióticos.

## 5.2. Prueba de germinación

Las semillas de *M.sativa* utilizadas en el presente estudio fueron obsequiadas por el Ing. Antonio Maya administrador del Rancho las Palmas, propiedad de la familia Cornejo.

Con la finalidad de evaluar si los antibióticos interferían en la germinación de las alfalfas se realizó una prueba de germinación utilizando la dosis más alta: 10 mg Kg<sup>-1</sup>. La prueba de germinación se realizó con una muestra compuesta de todos los tipos de suelo a utilizar (previamente tamizados). Por cada tipo de suelo se tomaron aproximadamente 20 gramos. Posteriormente, se preparó una solución de 0.1 mg L<sup>-1</sup> para cada antibiótico, disolviendo el CIP en metanol y el SMX en acetona. A 50 g de suelo (PS) se le añadieron 5 mL de la solución de 0.1 mg L<sup>-1</sup> CIP o SMX. Una vez contaminado el suelo, se homogenizó y se esperó a que los solventes se evaporaran. A continuación, en una caja de Petri, se colocaron 12 gr de suelo previamente contaminado. Para cada antibiótico se utilizaron un total de cuatro réplicas (o cajas de Petri) mas un grupo testigo con el mismo número de réplicas. Posteriormente se humedeció el suelo con un aspersor y se sembraron 25 semillas por caja. Las alfalfas se cultivaron durante 20 días bajo condiciones controladas de invernadero (temperatura promedio: 20.2°C; humedad relativa promedio: 34.9%).

Se determinó que en promedio el porcentaje de germinación de la alfalfa fue del 67% y que los antibióticos no tenían un efecto en la germinación de las semillas.

## 5.3. Diseño experimental

Con la finalidad de evaluar la transferencia del sulfametoxazol y del ciprofloxacina de los suelos del Valle del Mezquital a la alfalfa (*M. sativa*), se utilizaron los suelos con 100 años de irrigación (Ulupa 1, Ulupa 2, Juandhó 1 y Juandhó 2) y suelos de temporal (Santiago Tezontlale 1, Santiago Tezontlale 2, El Tigre 1 y El Tigre 2). Se evaluaron dos concentraciones por fármaco (1 mg Kg<sup>-1</sup> y 10 mg Kg<sup>-1</sup>) con dos réplicas por tratamiento y un grupo testigo (sin antibiótico); dando un total de 80 macetas



(Figura 5.1). Si bien las concentraciones que se utilizaron en el presente estudio son mayores a las que encontró Dalkmann *et al.* (2009) en suelos del Valle del Mezquital regados con aguas residuales (CIP 0.35-2.62  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; SMX: 0.98-5.96  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ); en el presente experimento se pretendió establecer la relevancia de la transferencia de ambos antibióticos a las plantas. Aunado a la necesidad realizar un estudio cuyas concentraciones pudieran ser comparadas con los estudios previos realizados por Boxall *et al.* (2006); Kipper *et al.* (2010); Lillenberg *et al.* (2010); Herklotz *et al.* (2010) y Eggen *et al.* (2011).

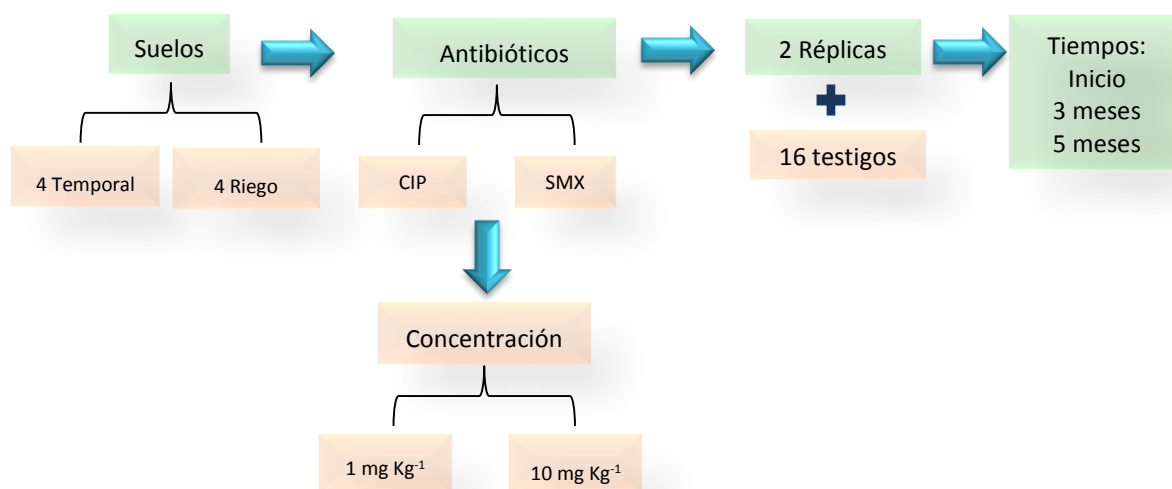


Figura 5.1. Diseño experimental

Se colocaron 2 Kg de suelo (peso seco (PS), previamente adicionado con el antibiótico) en una maceta y posteriormente se sembraron 37 semillas de alfalfa (*M. sativa*) para asegurar que cada maceta tuviera una densidad final de 25 plantas (similar a la encontrada en campo).

#### 5.4. Contaminación de los suelos

Con el propósito de adicionar los suelos con el sulfametoxazol se preparó una solución de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  en acetona (grado HPLC) y posteriormente se añadieron 2 y 20 mL por cada 2 Kg de suelo (PS) y así obtener las concentraciones finales de 1 y 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  de suelo (PS), respectivamente. En cuanto al ciprofloxacina, se preparó una solución de 50  $\text{mg L}^{-1}$  en metanol (grado HPLC) y se añadieron 40 y 400 mL a 2 Kg de suelo para tener las concentraciones finales de 1 y 10  $\text{mg Kg}^{-1}$ .

Para garantizar que los antibióticos se distribuyeran homogéneamente en los 2 Kg de suelo, al finalizar la adición del fármaco se tamizaron por segunda vez con un tamiz de 0.2 cm. Una vez tamizado el suelo, se tomó una muestra y se almacenó a -21°C para su posterior análisis en el Instituto de Ciencia de los Cultivos y Conservación de Recursos de la Universidad de Bonn, Alemania.

### **5.5. Crecimiento de las plantas**

Una vez adicionados los suelos con los antibióticos, éstos se humedecieron con agua destilada al 50% de su capacidad de retención de agua, calculada previamente con el procedimiento indicado en el “Manual de procedimientos analíticos” del laboratorio de Física de Suelos del Instituto de Geología. El agua se añadió poco a poco para no tener infiltración afuera de la maceta. Posteriormente se sembraron semillas de *M. sativa* y se obtuvo una densidad final de 25 semillas por maceta.

Las plantas crecieron bajo condiciones controladas de invernadero: temperatura promedio de 20.8°C y humedad relativa promedio de 57.5%. Los suelos fueron mantenidos al 50% de su capacidad de retención de agua y cada maceta fue regada con agua destilada. Las plantas fueron cultivadas durante cinco meses, durante los cuales se realizaron dos cosechas; la primera a los tres meses de cultivo y la segunda a los cinco meses. También se monitoreó el crecimiento de las plantas durante el experimento, registrando su altura a los 2 meses de crecimiento.

### **5.6. Cosecha de las plantas**

El primer corte de alfalfa se llevó a cabo a los 3 meses de la siembra. Con unas tijeras podadoras se cortó la alfalfa, se pesó para registrar el peso fresco, y posteriormente las hojas fueron lavadas tres veces en agua destilada. Se lavaron las muestras para remover partículas de suelo que pudieran encontrarse sobre las hojas, dado que el objetivo del experimento fue cuantificar a los antibióticos que fueron absorbidos por las raíces y translocados a la parte aérea de la planta. En seguida, las hojas se secaron con papel absorbente y se colocaron inmediatamente en una estufa a 40°C durante tres días, de acuerdo con el método descrito por Eggen *et al.* (2011). Cuando las muestras estuvieron secas se pesaron, para registrar el peso seco y se molieron en un Molino Fritsch Pluverisette 14. En seguida éstas fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis en el Instituto de Ciencia de los Cultivos y Conservación de Recursos de la Universidad de Bonn, Alemania.

Las muestras de suelo fueron tomadas con un barreno de ½ pulgada de diámetro y 15 cm de altura. Para cada maceta se tomó una muestra compuesta de aproximadamente 45 g de suelo en peso húmedo (PH), introduciendo tres veces el cortador en distintos sitios de la maceta. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis en la Universidad de Bonn. Para realizar la segunda cosecha a los cinco meses de crecimiento, se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Una semana después de haber realizado el segundo corte de la parte aérea de las alfalfas (a los cinco meses de crecimiento), y de haber recolectado la última muestra de suelo, de la misma forma descrita anteriormente, se procedió a cosechar sus raíces. Las macetas fueron colocadas en un contenedor con agua de la llave, con la finalidad de humedecer el suelo y así poder extraer la raíz. Una vez que las raíces fueron extraídas se lavaron con agua de la llave y posteriormente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada, secadas con papel absorbente, pesadas y colocadas en una estufa a 40°C durante cinco días. Al término de los cinco días las raíces estuvieron secas, se molieron y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis en la Universidad de Bonn.

### **5.7. Extracción de antibióticos en plantas**

La extracción de los antibióticos en plantas se realizó conforme al método estandarizado del Instituto de Ciencia de los Cultivos y Conservación de Recursos de la Universidad de Bonn. Se pesaron 2 g de la muestra de alfalfa previamente seca y molida y se mezclaron con ~10 g de arena de mar con la finalidad de promover una distribución homogénea del solvente en la muestra y evitar la formación de agregados. Posteriormente se realizó la extracción acelerada con disolvente (ASE; Dionex 350). En la Tabla 4.1 se señalan las condiciones bajo las cuales se extrajeron los antibióticos de las muestras de plantas, pues debido a que cada uno posee distintas características físico-químicas, se utilizó un método de extracción distinto. En las extracciones realizadas para CIP se utilizó una solución acuosa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50mM: acetonitrilo (1:1) y para SMX se utilizó una solución de metanol: agua desionizada (1:1).

Tabla 5.1. Condiciones de la extracción acelerada con disolvente (ASE) para ciprofloxacino y sulfametoxazol basadas en los métodos descritos por Golet *et al.* (2001) y Göbel *et al.* (2005) respectivamente.

Condición	Ciprofloxacino	Sulfametoxazol
Presión (bar)	100	100
Temperatura (°C)	100	100
Tiempo de calentamiento (min)	5	5
Tiempo de estática <sup>1</sup> (min)	5	15
Número de ciclos	6	3
Volumen de lavado (%)	150	60
Flujo de nitrógeno (segundos)	300	60
Extractante	Solución acuosa H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 50mM: acetonitrilo	Metanol: agua (1:1)

<sup>1</sup> El tiempo de estática se refiere al tiempo en que el solvente permanece en la celda de extracción del ASE

Para realizar las extracciones del grupo testigo, la muestra de alfalfa se dividió en dos y se realizó la extracción utilizando el método correspondiente para CIP y para SMX.

Una vez extraída la muestra se centrifugó a 2500g durante 40 min, desechando la pastilla y guardando 40 mL del sobrenadante a -21°C para su posterior extracción en fase sólida.

### 5.8. Extracción en fase sólida

Para limpiar los extractos ASE de las plantas y evitar interferencias en la cuantificación de los antibióticos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), se realizó una extracción en fase sólida, utilizando una combinación de cartuchos Chromabond SB (SAX, Macherey & Nagel con 1 g de columna de polipropileno) de intercambio aniónico y cartuchos HLB (sorbente de fase reversa con 200 mg de sorbente por cartucho, Waters; Imagen 1). Los cartuchos Chromabond fueron utilizados con la finalidad de limpiar la muestra y los HLB con la finalidad de retener el antibiótico.

Al sobrenadante obtenido en las extracciones con el ASE se le añadieron 50 µL del estándar interno<sup>2</sup> de CIP (ciprofloxacino marcado isotópicamente, carboxyl-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, quinoline-<sup>15</sup>N, >98% puro, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Alemania) o bien de SMX (sulfametoxazol marcado isotópicamente, anillo-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, >98% puro; Sigma Aldrich, Schnelldorf, Alemania) dependiendo de cuál antibiótico se deseaba

<sup>2</sup> El estándar interno se utiliza para disminuir el efecto matriz y para cuantificar el analito en una muestra, por tanto se le añade tanto a la muestra como a la curva de calibración.

cuantificar. A continuación, la muestra se centrifugó a 1200 g durante 20 min y posteriormente se diluyó el sobrenadante en 300 mL de agua desionizada ajustando su pH a 2.4 con una solución de HCl 3%.

Una vez ajustado el pH de las muestras se procedió a acondicionar y equilibrar los cartuchos añadiendo 5 mL de metanol (grado HPLC) y después adicionando 5 mL de agua desionizada ajustada a pH 2.4 con HCl 3%. Al terminar de equilibrar los cartuchos, se añadieron 4 mL de agua desionizada ajustada a pH 2.4 y se procedió a realizar el acople de los cartuchos (Figura 5.2) para posteriormente llenar los viales de la parte superior con las muestras. Al eluir las muestras en los cartuchos se utilizó una bomba de vacío, cuidando de que la velocidad de paso de la muestra a través de los cartuchos no superara los 5 mL/minuto.

Posterior a la extracción, los cartuchos fueron eluidos utilizando primero 5 mL de metanol (grado HPLC), después 5 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y por último una solución de acetonitrilo con HCl al 0.1%. Después se procedió a concentrar la muestra en un rotavapor evaporándola hasta casi sequedad. A continuación, la muestra se diluyó utilizando 1 mL de solución acuosa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50mM-acetonitrilo (20:80), se colocó en un vial y se congeló a -21°C hasta su lectura por LC-MS/MS.

### **5.9. Extracción de antibióticos en suelo con CaCl<sub>2</sub>**

Los antibióticos en suelo fueron extraídos utilizando el método estandarizado y descrito por Dalkmann *et al.* (2012). Las muestras de suelo fueron liofilizadas y posteriormente molidas en un mortero de porcelana. Se colocaron 10 g de suelo en un tubo de centrifuga y se le añadieron 25 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.01 M. Posteriormente se agitó el tubo de centrifuga durante 24 h, se centrifugó la muestra a 2500 g durante 20 min y el sobrenadante fue decantado filtrado con filtros de papel Macherey-Nagel -6. Para determinar la concentración de los antibióticos se tomó una alícuota de 950 µL del extracto de CaCl<sub>2</sub> y se le añadieron 50 µL del estándar interno (referido anteriormente). Los viales listos fueron almacenados a -21°C hasta su posterior análisis por LC-MS/MS. Por último la muestra de suelo restante fue liofilizada y almacenada a -21°C para posteriormente realizar la extracción en el ASE de antibiótico.

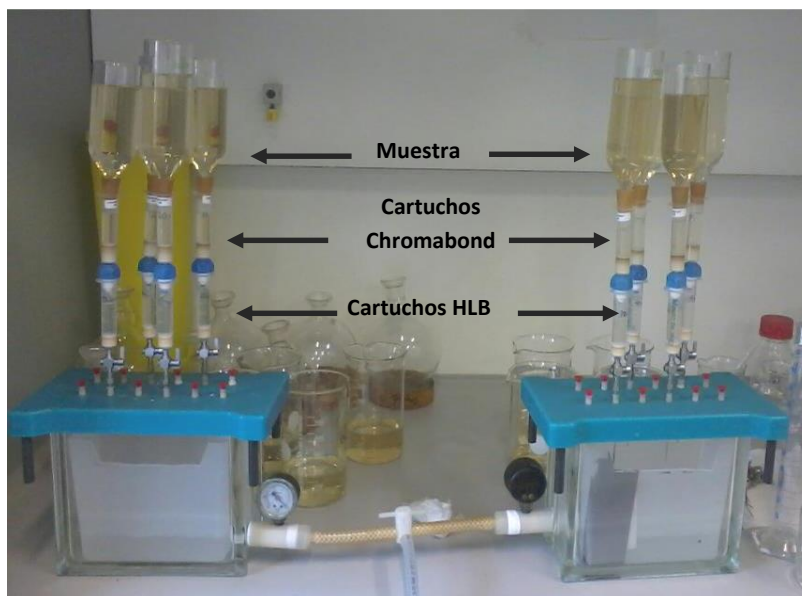


Figura 5.2. Acoplamiento de Cartuchos Chromabond y HLB para la extracción en fase sólida de los extractos de plantas obtenidos en el ASE.

#### 5.10. Extracción de antibióticos en suelo mediante extracción acelerada con disolvente (ASE)

Los antibióticos en suelo fueron extraídos utilizando el método descrito por Dalkmann *et al.* (2012). Los 10 g de la muestra de suelo previamente extraída con  $\text{CaCl}_2$  y liofilizada se mezclaron con  $\sim 6$  g de arena de mar (para evitar la agregación de la muestra). Posteriormente se realizó la extracción acelerada con disolvente (ASE; Dionex 350). Para realizar las extracciones de ambos antibióticos se utilizó el método ya descrito para extraer los antibióticos en las alfalfas (Tabla 5.1).

Inicialmente se tenía planeado determinar las concentraciones de CIP en suelo mediante dos métodos de extracción,  $\text{CaCl}_2$  y ASE desde el inicio del experimento, tres meses después y a los cinco meses. Sin embargo, debido a problemas técnicos con el equipo (descompostura de la bomba de solvente, fugas en las líneas de nitrógeno y de solvente y presencia de material vegetal en el horno y líneas del equipo) no se pudieron realizar las extracciones ASE y únicamente se realizaron las extracciones con  $\text{CaCl}_2$  (Figura 5.3).

El grupo testigo de las muestras de suelo fue extraído mediante una combinación de los métodos para extraer simultáneamente CIP y SMX. Las condiciones de la secuencia se describen en la Tabla 5.2. Posterior a su extracción, las muestras fueron centrifugadas a 1500 g durante 20 min. Después

se tomó una alícuota de 950  $\mu\text{L}$  del extracto, se le añadió 50  $\mu\text{L}$  del estándar interno para su lectura mediante LC-MS/MS.

Tabla 5.2. Condiciones de la extracción acelerada con disolvente (ASE) para extraer ciprofloxacino y sulfametoxazol simultáneamente. Métodos basados en Golet *et al.* (2001) y Göbel *et al.* (2005) respectivamente.

Condición	Solvente 1 CIP	Solvente 2 SMX
Presión (bar)	100	100
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	100	100
Tiempo de pre calentamiento (min)	5	5
Tiempo de estática (min)	10	5
Número de ciclos	3	2
Volumen de lavado (%)	90	60
Flujo de nitrógeno (segundos)	180	60

### 5.11. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Las muestras de los extractos de plantas y de  $\text{CaCl}_2$  fueron cuantificadas utilizando el método descrito por Dalkmann *et al.* (2012) que a continuación se describe.

La separación del CIP y del SMX se realizó utilizando una columna HPLC XBridge C18 3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1x150 mm (Waters, Milford, MA, USA) acoplada a una columna de protección (Sentry 2.1x10 mm, Waters, Milford, MA, USA). El volumen de inyección de la muestra fue de 10  $\mu\text{L}$ . Los eluyentes que se utilizaron fueron metanol y agua acidificados con ácido fórmico al 0.1%. La velocidad del flujo fue de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El gradiente de elución comenzó con el 5% de la solución de metanol acidificado con ácido fórmico al 0.1%, posteriormente en el minuto cinco se fue incrementando hasta al 60% y al llegar al minuto 15 se incrementó a 80% para posteriormente ir aumentando hasta un 95% y después de 16 minutos se mantuvo al 95% por 0.5 min. Posteriormente se regresó a las condiciones iniciales en un tiempo de 0.5 min. Para ionizar la muestra la temperatura del vaporizador fue de 390 $^{\circ}\text{C}$ , la del capilar de 217 $^{\circ}\text{C}$  y la corriente de descarga fue de 4 kV.

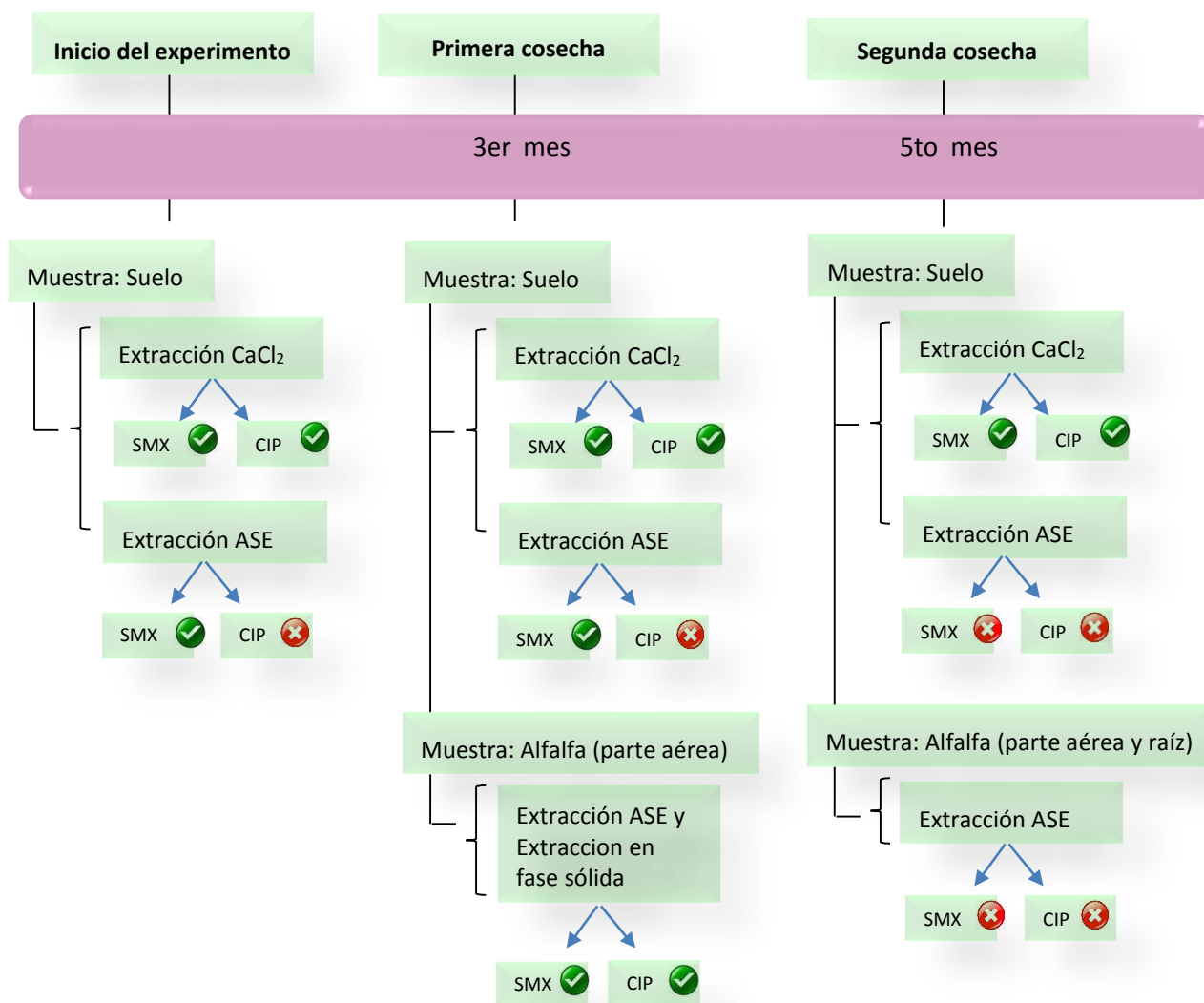


Figura 5.3. Línea del tiempo de los análisis realizados. El círculo verde con una paloma indica que los análisis fueron realizados y el círculo rojo con un tache indica que los análisis no fueron realizados.



## VI. RESULTADOS

### 6.1. Características de los suelos evaluados.

En la Figura 6.1 se pueden observar las características de los suelos que se evaluaron en el presente experimento. En cuanto al pH, no hubo diferencias significativas entre suelos irrigados y suelos de temporal, mientras que los porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno total fueron mayores en los suelos irrigados.

En cuanto a la textura; todos los suelos tuvieron contenidos de arcilla mayores al 38% y fueron clasificados como Vertisoles de acuerdo a su contenido de arcilla. Los sitios que mostraron los menores contenidos de arena y limo y mayores contenidos de arcilla fueron El Tigre y Ulapa (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Contenido de arena, limo y arcilla en suelos irrigados con aguas residuales por más de 80 años (Juandhó y Ulapa) y en suelos de temporal (Santiago y El Tigre).

Parámetro	Sitio			
	Temporal	El Tigre	Juandhó	Riego
% Arena	12.3	9.2	19.8	10
% Limo	46.7	32.4	41.8	41
% Arcilla	41	58.4	38.4	49

### 6.2. Concentración de ciprofloxacino (CIP) en el suelo

Las concentraciones de CIP en los extractos de  $\text{CaCl}_2$  se muestran en la Figura 6.2 y en la Tabla 10.1 del anexo. En los suelos contaminados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  de CIP no se detectó el antibiótico, ni siquiera en las muestras que fueron tomadas inmediatamente después de contaminar el suelo (inicio del experimento).

Las concentraciones de CIP en los extractos de  $\text{CaCl}_2$  son muy bajas ( $<1 \text{ ng g}^{-1}$ ) considerando la concentración con la que se contaminó el suelo, además no se encontraron diferencias en las

concentraciones de CIP entre los suelos irrigados y los suelos de temporal. Además al parecer las concentraciones del antibiótico se mantuvieron similares a lo largo del tiempo ( $p < 0.05$ ).

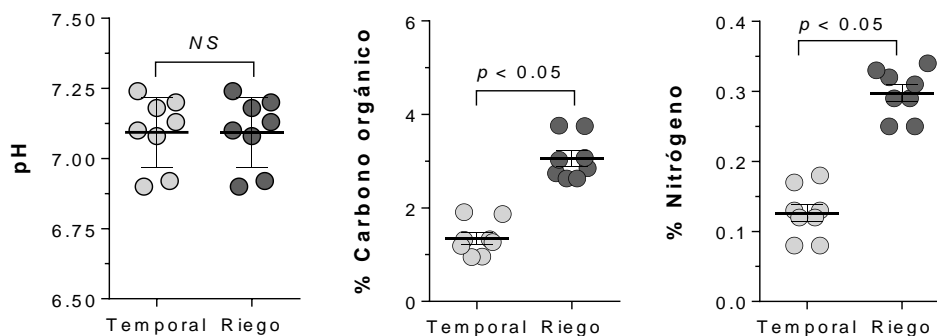


Figura 6.1. Valores de pH y porcentajes de carbono orgánico y nitrógeno en suelos de temporal y riego provenientes del Valle del Mezquital.

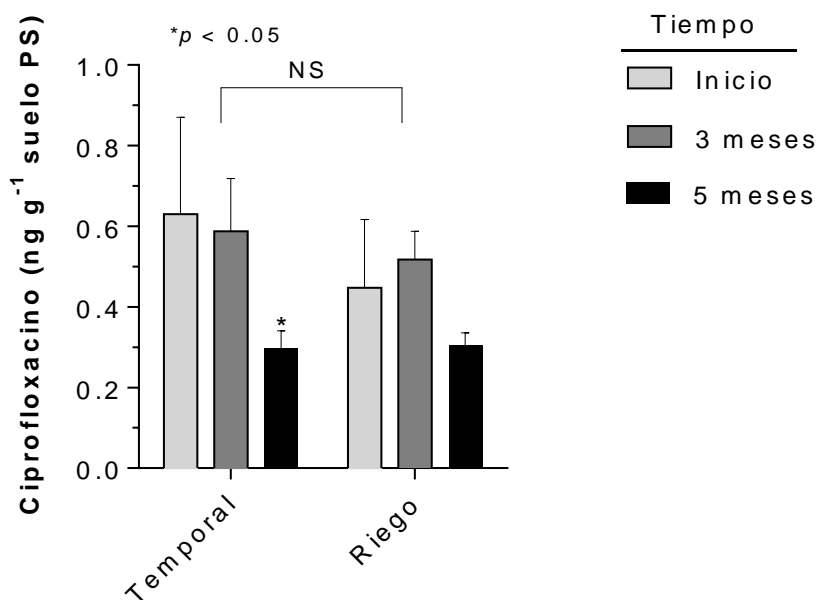


Figura 6.2. Concentración de CIP extractable en  $\text{CaCl}_2$  en suelos del Valle del Mezquital adicionados con  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  desde el inicio del experimento hasta cinco meses después (NS: no significativo;  $p < 0.05$  diferencias significativas).

### 6.3. Concentración de ciprofloxacino en plantas

Aunque la extracción ASE de CIP en la biomasa aérea de las plantas se tenía contemplada para las dos cosechas de alfalfa (tres y cinco meses después de su siembra), no se pudieron realizar las extracciones de las plantas de la segunda cosecha debido a los distintos problemas técnicos (anteriormente señalados) con el equipo.

En la Tabla 10.2 (Anexo) se muestran las concentraciones encontradas en la biomasa aérea de las alfalfas cultivadas en suelos contaminados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  de ciprofloxacino tres meses después de su siembra. Se puede observar que las alfalfas cultivadas en los suelos contaminados con ambas dosis mostraron acumulación de CIP en la biomasa aérea. A pesar de que en los suelos contaminados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  no se detectó el antibiótico en la fracción disponible ( $\text{CaCl}_2$ ), sí hubo transferencia del CIP del suelo a las plantas.

En los suelos que fueron contaminados con la dosis de  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ , solamente hubo transferencia del antibiótico a las alfalfas en los suelos de El Tigre 2 y Juandhó 2 (Tabla 10.2, Anexo). En los suelos contaminados con la dosis de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  sólo se encontró el antibiótico en las alfalfas cultivadas en Santiago Tezontlale 1, 2 y Ulapa 2.

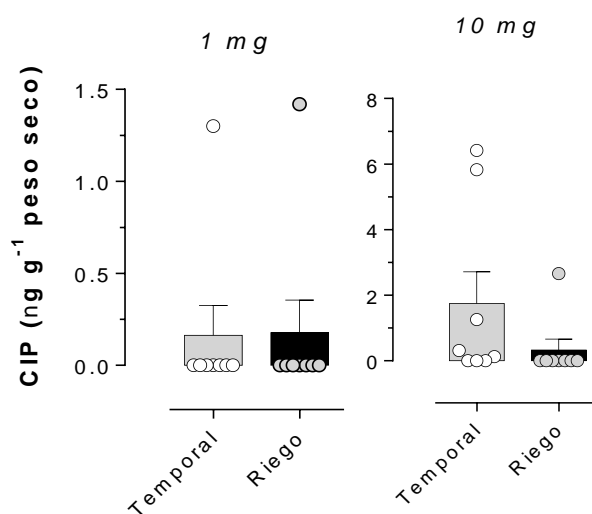


Figura 6.3. Concentración de ciprofloxacino en la biomasa aérea de alfalfas cultivadas durante tres meses (primera cosecha) en suelos adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ PS.

#### 6.4. Germinación y crecimiento de la alfalfa en suelos contaminados con ciprofloxacino

##### a) Germinación

La germinación de las plantas se midió 10 días después de haber sembrado las semillas de las alfalfas. En la Figura 6.4 se observan los porcentajes de germinación. Los resultados mostraron una disminución de la germinación en los suelos adicionados con la dosis más alta ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ); sin embargo estos resultados no son claros pues en las pruebas previas no se registró este comportamiento, por lo cual no se le puede atribuir un efecto al antibiótico.

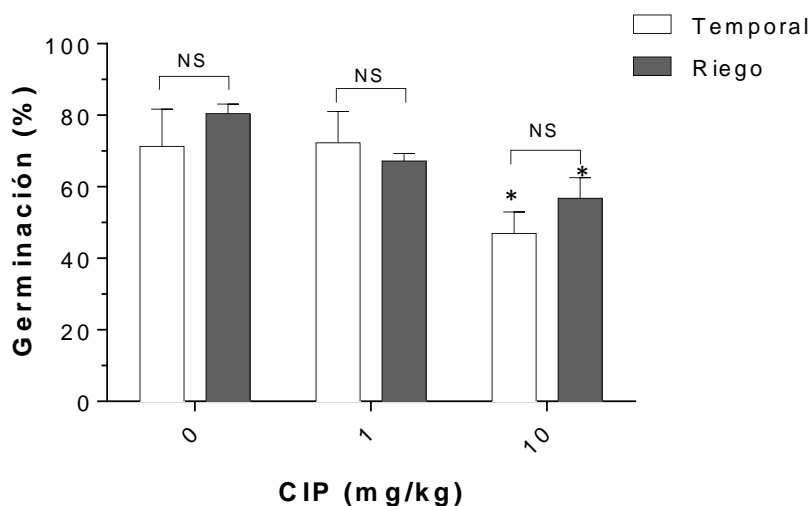


Figura 6.4. Porcentaje de germinación de alfalfa sembrada en suelos irrigados y de temporal del Valle del Mezquital sin antibiótico y adicionados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  CIP.

##### b) Altura

La altura de las plantas se midió dos meses después de la siembra de éstas. En las Figuras 6.5 y 6.6 se puede observar que en los suelos irrigados las plantas tienen un mayor crecimiento ( $p < 0.05$ ). Se observó además una disminución en la altura de las plantas para ambas dosis (1 y  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  CIP) en los suelos de temporal del 13 al 39%, mientras que en los suelos irrigados hay una clara disminución de la altura en las plantas cultivadas solo en la dosis de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  que va del 18 al 22% (respecto al control;  $p < 0.05$ ).

c) *Biomasa*

Las plantas sembradas en suelos contaminados con CIP, no presentaron una reducción significativa de su biomasa, pese a que este comportamiento si fue observado en la altura (Figuras 6.5 y 6.6).

Se encontró un incremento en la biomasa aérea de las plantas solamente en las alfalfas cultivadas en los suelos regados contaminados con la dosis más alta ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $p < 0.05$ ). También es importante señalar que este comportamiento se extiende hasta el quinto mes (segunda cosecha, Figuras 6.5 y 6.6).



Figura 6.5. Plantas de alfalfa 3 meses después de su siembra. Las dos macetas del lado izquierdo corresponden a alfalfa sembrada en suelos de temporal mientras que las dos macetas de la derecha corresponden a suelos irrigados.

Respecto a la biomasa subterránea (raíces), se observa en la Figura 6.6 que en suelos de temporal se registró una disminución de la biomasa radicular de las alfalfas, la cual fue mayor en las alfalfas cultivadas con la mayor dosis ( $p < 0.05$ ). Cabe destacar que el comportamiento de la biomasa de las raíces fue similar al de la altura de las plantas cultivadas en suelos de temporal.

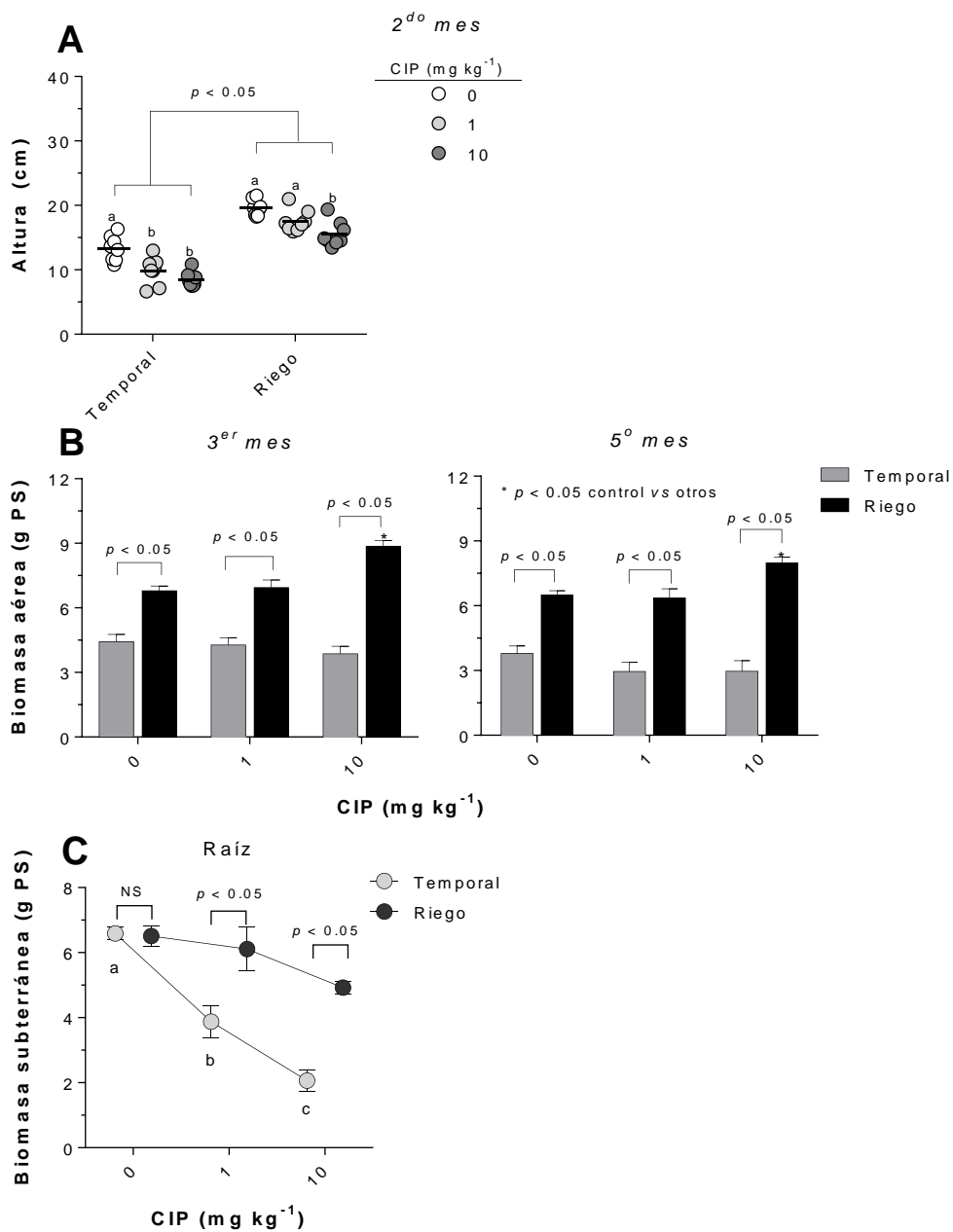


Figura 6.6. Crecimiento de alfalfa cultivada en suelos irrigados y de temporal provenientes del Valle del Mezquital sin antibiótico y adicionados con 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> CIP. **A** altura de las plantas dos meses después de haber sido sembradas; **B** biomasa aérea de las alfalfas al tercer y al quinto mes después de haber sido sembradas distinguiendo entre suelos de temporal y de riego y **C** biomasa radicular de las plantas cinco meses después de haber sido sembradas. NS: no significativo;  $p < 0.05$  diferencias significativas.

## 6.5. Concentración de sulfametoxazol (SMX) en el suelo

En el caso del sulfametoxazol se tienen datos completos de dos tiempos: del inicio del experimento y tres meses después. Por problemas con las extracciones ASE ya señalados anteriormente, se descartó analizar los suelos procedentes de la segunda cosecha (5<sup>to</sup> mes).

Las concentraciones de sulfametoxazol (SMX) en la fracción de suelo extractable con  $\text{CaCl}_2$  se muestran en las Tablas 10.3 y 10.4 para las dosis de 1 y 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  respectivamente. Adicionalmente, se calcularon los porcentajes de extracción tomando como el 100% la dosis que se le añadió a cada suelo al inicio del experimento (1 y 10  $\text{mg Kg}^{-1}$ ). Los resultados de estos cálculos se muestran en la Figura 6.8.

Se puede observar que al inicio del experimento el SMX presentó una mayor disponibilidad en la fracción extractable con  $\text{CaCl}_2$ , tanto en suelos irrigados como en suelos de temporal en ambas dosis. En contraste, las concentraciones obtenidas para la fracción ASE fueron muy bajas en ambos tipos de suelo (Figura 6.7).

De los suelos contaminados con la dosis de 1  $\text{mg Kg}^{-1}$  al inicio del experimento los suelos de temporal presentaron las mayores concentraciones del antibiótico (912 a 265  $\text{ng g}^{-1}$  PS). Las concentraciones de los otros suelos oscilaron entre los 379 y los 334  $\text{ng g}^{-1}$  (Figura 6.7).

En cuanto a los suelos contaminados con 10  $\text{mg Kg}^{-1}$ , se observa que los suelos de temporal fueron los que presentaron las mayores concentraciones de SMX (Figura 6.7) en la fracción extractable con  $\text{CaCl}_2$ . Además, las concentraciones de estos tres sitios fueron aproximadamente 30% mayores respecto a las encontradas en los suelos de riego.

Si bien la mayor parte del antibiótico al inicio del experimento se encontró en la fracción disponible, en los suelos de temporal se tuvo una mayor facilidad para extraer el SMX, mientras que los suelos irrigados mostraron una tendencia a retener el antibiótico (Figura 6.7).

La concentración del SMX en los extractos de  $\text{CaCl}_2$  del inicio del experimento hasta la primera cosecha (tres meses después) se redujo aproximadamente un 99% para ambos tratamientos (1 y 10

mg Kg<sup>-1</sup>; Figura 10.1 Anexo). Además, para la segunda cosecha (cinco meses después) solamente se detectó SMX en suelos contaminados con 10 mg Kg<sup>-1</sup>, en donde los suelos de Santiago Tezontlale 1 y 2 fueron los que presentaron las mayores concentraciones del antibiótico.

Tres meses después del inicio del experimento, las concentraciones del SMX en los extractos ASE fueron mayores que las encontradas en los extractos de CaCl<sub>2</sub> en ambos tipos de suelo y en ambas dosis. Es decir, en el inicio del experimento la mayor proporción del antibiótico se encontraba en la fracción disponible, sin embargo, después de tres meses la dinámica cambió y las mayores concentraciones de SMX se encontraron en la fracción extractable mediante ASE (Figura 6.7).

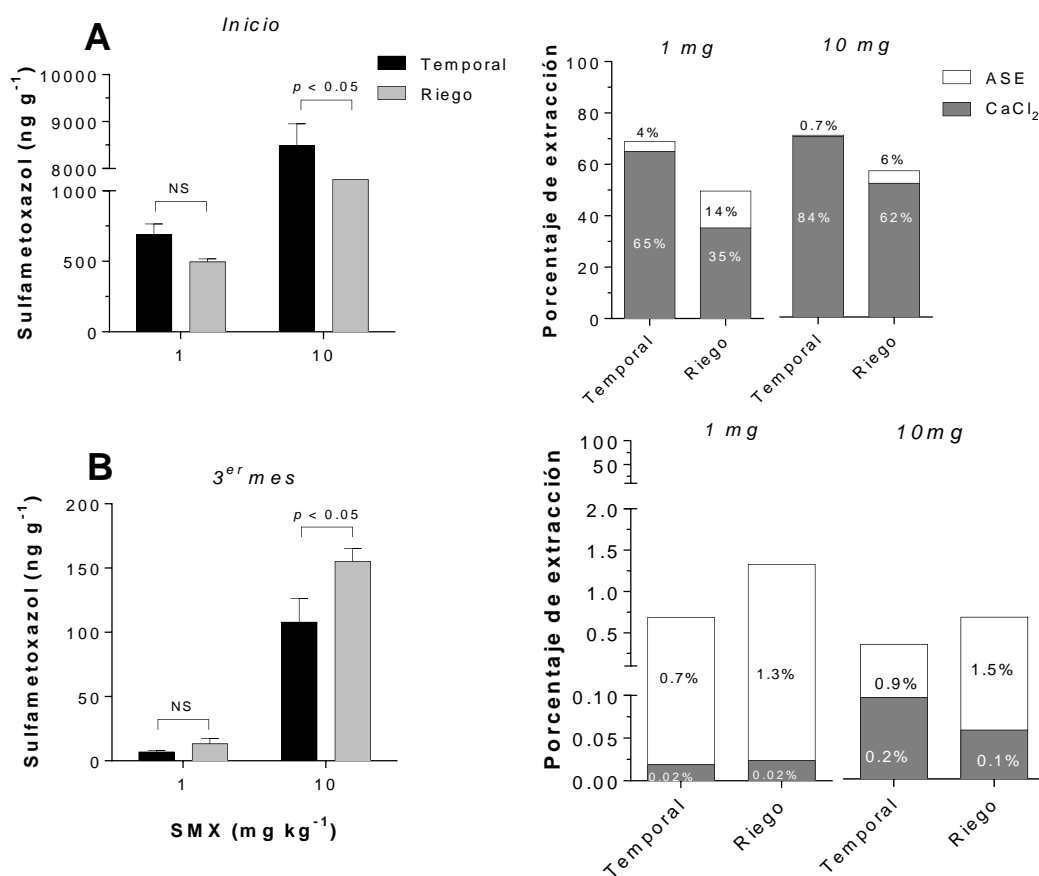


Figura 6.7. Concentración total de sulfametoxazol (CaCl<sub>2</sub> +ASE) extraída en suelos de riego y de temporal (izquierda) y sus respectivos porcentajes de por tipo de extracción (derecha). **A** indica las concentraciones de SMX al inicio del experimento y **B** las concentraciones tres meses después. Con fines de visualización se utilizan diferentes escalas; NS: no significativo p<0.05: diferencia significativa.



## 6.6. Concentración de sulfametoxazol en plantas

En la Tabla 10.5 del Anexo se muestran las concentraciones encontradas en la biomasa aérea de alfalfas cultivadas en suelos contaminados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  de SMX. Se puede observar que las alfalfas cultivadas en los suelos de temporal de Santiago Tezontlale 1 y 2 mostraron una mayor acumulación del antibiótico en ambas concentraciones, en comparación con las alfalfas cultivadas en los suelos de los otros sitios (Anexo, Tabla 10.5).

De entre las dos dosis de SMX aplicadas, las alfalfas cultivadas en los suelos de temporal contaminados con  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , fueron las que presentaron las mayores concentraciones del antibiótico en la biomasa aérea ( $39.7 - 2093.8 \text{ ng g}^{-1}$  PS). En contraste, de las alfalfas cultivadas en suelos contaminados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ , solo las cultivadas en los suelos de temporal de Santiago Tezontlale 1, 2 y en los suelos irrigados de Ulapa 1 y 2 acumularon SMX. Sin embargo, al comparar la acumulación del SMX entre ambos suelos, las plantas sembradas en los suelos de temporal presentaron las mayores concentraciones del antibiótico ( $p < 0.05$ ; Figura 6.8).

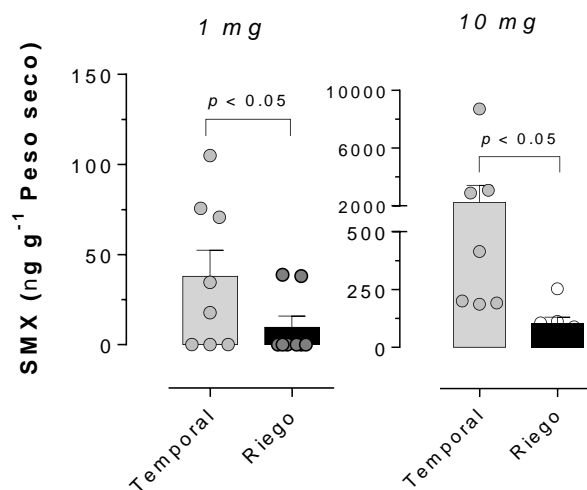


Figura 6.8. Concentración de sulfametoxazol en la biomasa aérea de alfalfas cultivadas durante tres meses (primera cosecha) en suelos adicionados con  $1$  y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  PS.

### 6.7. Dinámica del SMX a través del tiempo en suelo y plantas

Con la finalidad de observar la dinámica del SMX a lo largo del tiempo en el suelo y en las plantas, se graficaron los porcentajes de SMX encontrados en los dos extractos de suelo y en la biomasa aérea (Figuras 6.9 y 6.10). Para realizar estas gráficas se tomó como el 100% el valor que corresponde a la concentración que fue añadida al inicio del experimento (es decir 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> PS, respectivamente). A partir de este valor se obtuvieron los porcentajes que corresponden a la concentración de SMX presente en los extractos de CaCl<sub>2</sub> y ASE. Tomando como base el valor del antibiótico al inicio del experimento, se determinó en la primera cosecha (tres meses después) cuál era el porcentaje del antibiótico cuantificado en el suelo (extractos de CaCl<sub>2</sub> y ASE) y en las plantas. Para realizar estos porcentajes en plantas se tomaron en cuenta los datos de la acumulación total de toda la biomasa aérea de la planta.

En la figuras 6.9 y 6.10 se puede observar la dinámica del SMX en el inicio del experimento y tres meses después en los suelos contaminados con 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> de SMX. Al inicio del experimento las mayores concentraciones del SMX se encontraron en la fracción extractable con CaCl<sub>2</sub>. Es importante señalar que a pesar de que las muestras fueron extraídas mediante ASE con la finalidad de extraer la mayor cantidad de antibiótico fuertemente adsorbido al suelo, en todos los suelos una fracción importante del antibiótico no se pudo extraer. Para los suelos de temporal, la fracción que no pudo ser extraída fue en promedio del 31% para la dosis de 1 mg Kg<sup>-1</sup>, mientras que para la dosis más alta este porcentaje se redujo al 15%. En cuanto a los suelos regados con aguas residuales se obtuvieron mayores porcentajes. En el caso de la dosis más baja se obtuvo que 51% del SMX añadido no se detectó, mientras que para la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> este porcentaje fue del 32%.

Tres meses después del inicio del experimento, del 95 al 97% del antibiótico no fue detectado ni en suelo ni en la biomasa aérea para los suelos contaminados con la dosis más baja. Este comportamiento fué similar únicamente en los suelos regados con aguas residuales que se contaminaron con 10 mg Kg<sup>-1</sup>. Este porcentaje fue distinto en los suelos de temporal debido a que el 20% del SMX se encontró en la biomasa aérea las alfalfas (Figuras 6.9 y 6.10).

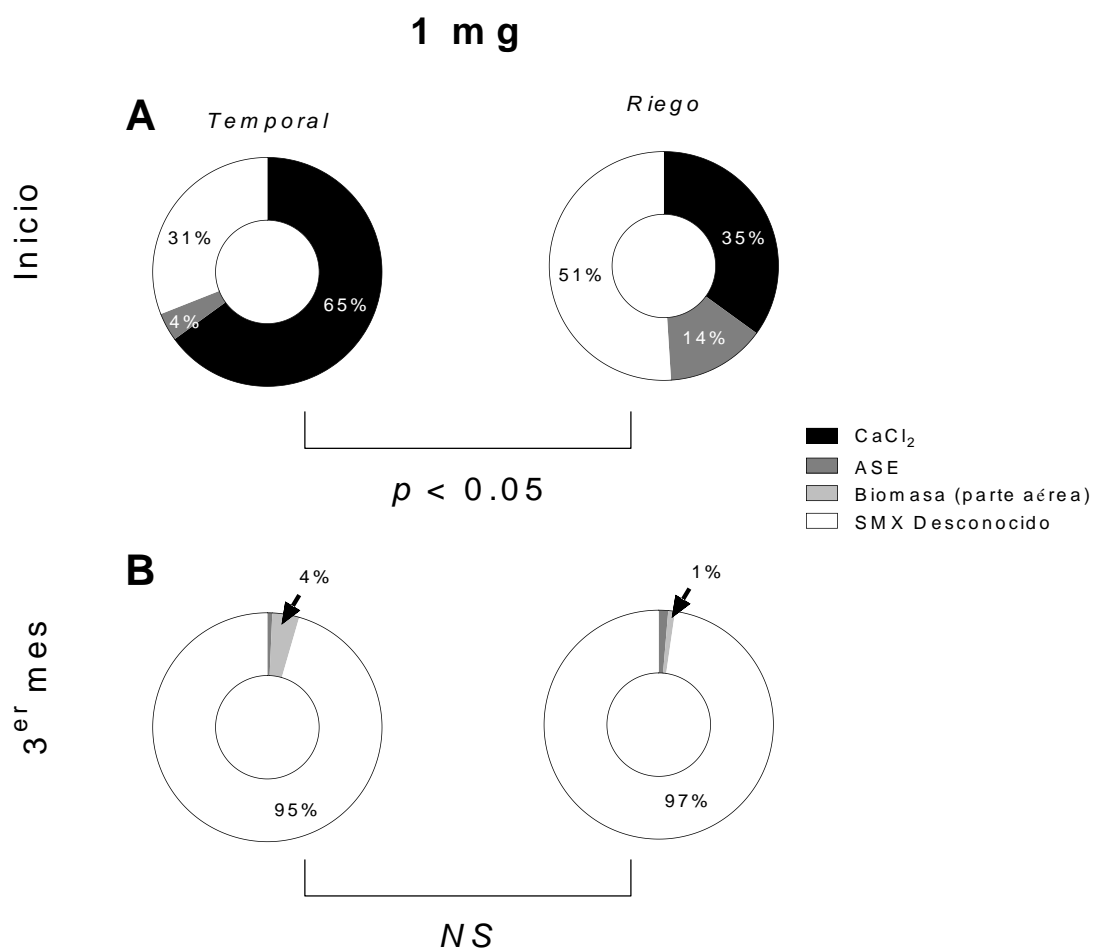


Figura 6.9. Porcentaje de concentración de SMX en plantas y suelos de Valle del Mezquital adicionados con 1 mg Kg<sup>-1</sup> PS. **A** señala SMX extractable con CaCl<sub>2</sub> y total (ASE) en suelo al inicio del experimento y **B** porcentaje de SMX en plantas y en suelo (extractable con CaCl<sub>2</sub> y total ASE) tres meses después del inicio de experimento. NS: no significativo, p<0.05: diferencias significativas.

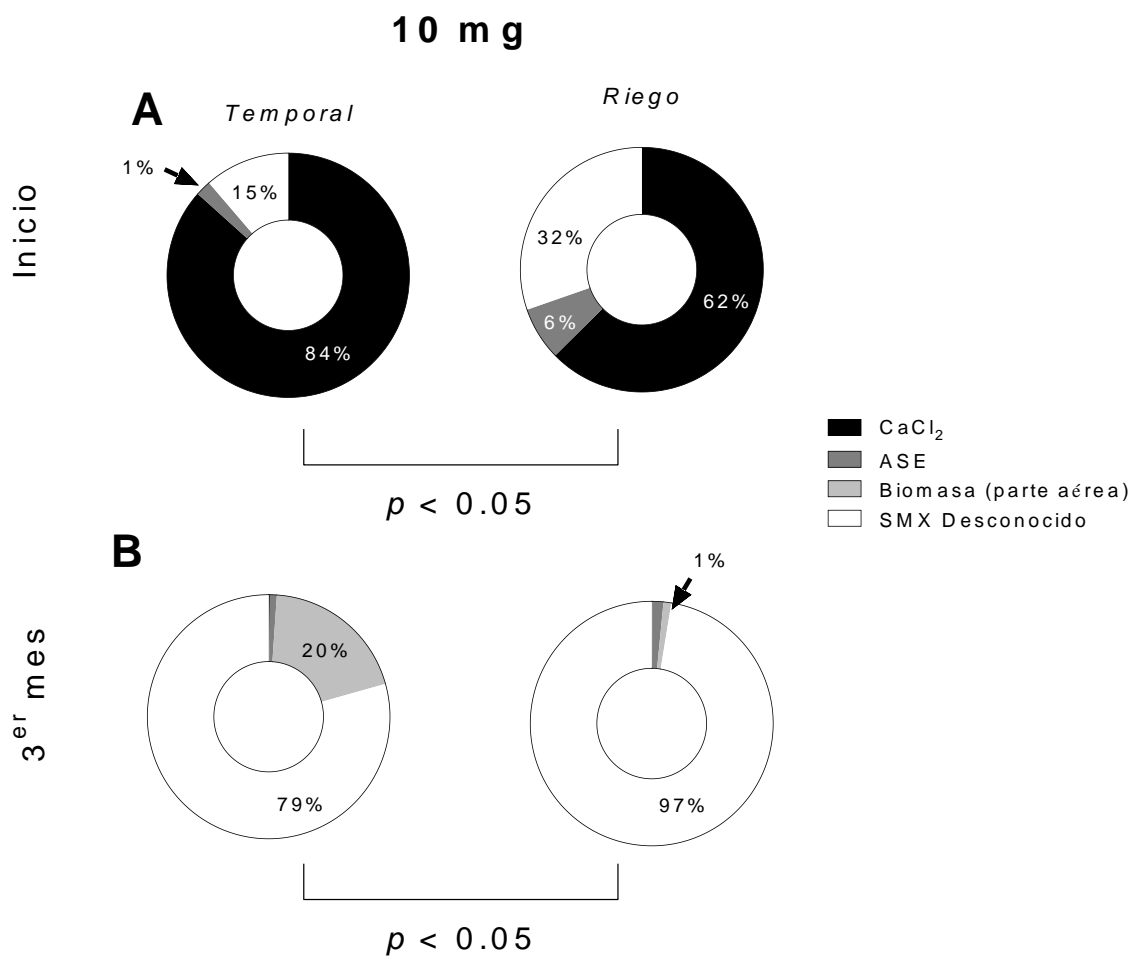


Figura 6.10. Porcentaje de concentración de SMX en plantas y suelos de Valle del Mezquital adicionados con  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  PS. **A** señala SMX extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total (ASE) al inicio del experimento y **B** el porcentaje de SMX en plantas y en suelo (extractable con  $\text{CaCl}_2$  y total ASE) tres meses después del inicio de experimento. NS: no significativo,  $p < 0.05$ : diferencias significativas.

## 6.8. Germinación y crecimiento de la alfalfa en suelos contaminados con sulfametoxazol

### a) Germinación

En la Figura 6.11 se pueden observar los porcentajes de germinación de las alfalfas sembradas. No se pudo observar un efecto claro del SMX en la germinación de la alfalfa, sin embargo se registró una disminución en los suelos de El Tigre, Juandhó y Ulapa. Cabe señalar que los porcentajes no se van reduciendo conforme aumenta la dosis del antibiótico, por lo que no se le puede atribuir el efecto

observado a éste, además en las pruebas de germinación previas no se registró ningún efecto en la germinación.

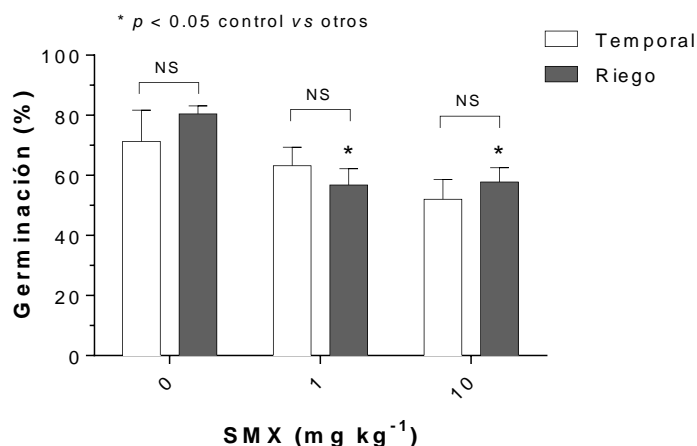


Figura 6.11. Porcentaje de germinación de alfalfa sembrada en suelos irrigados y de temporal del Valle del Mezquital sin antibiótico y adicionados con 1 y 10 mg kg<sup>-1</sup> SMX. NS: no significativo, p<0.05: diferencias significativas.

#### b) Altura

De manera similar que en el experimento de CIP (Figura 6.5), en las alfalfas cultivadas en suelos contaminados con SMX, el principal factor que influyó en su crecimiento fue el tipo de suelo. Si bien el CIP influyó en el crecimiento de las plantas en ambos tipos de suelo, en el caso del SMX este decremento en la altura de las plantas se registró únicamente en los suelos de temporal y fue del 12 al 46% para ambas dosis (Figura 6.12).

#### c) Biomasa

Un mes después de haber medido la altura de las plantas, se midió la biomasa de la parte aérea de éstas. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el experimento de CIP, pues las plantas no presentaron una reducción significativa de su biomasa (Figura 6.12).

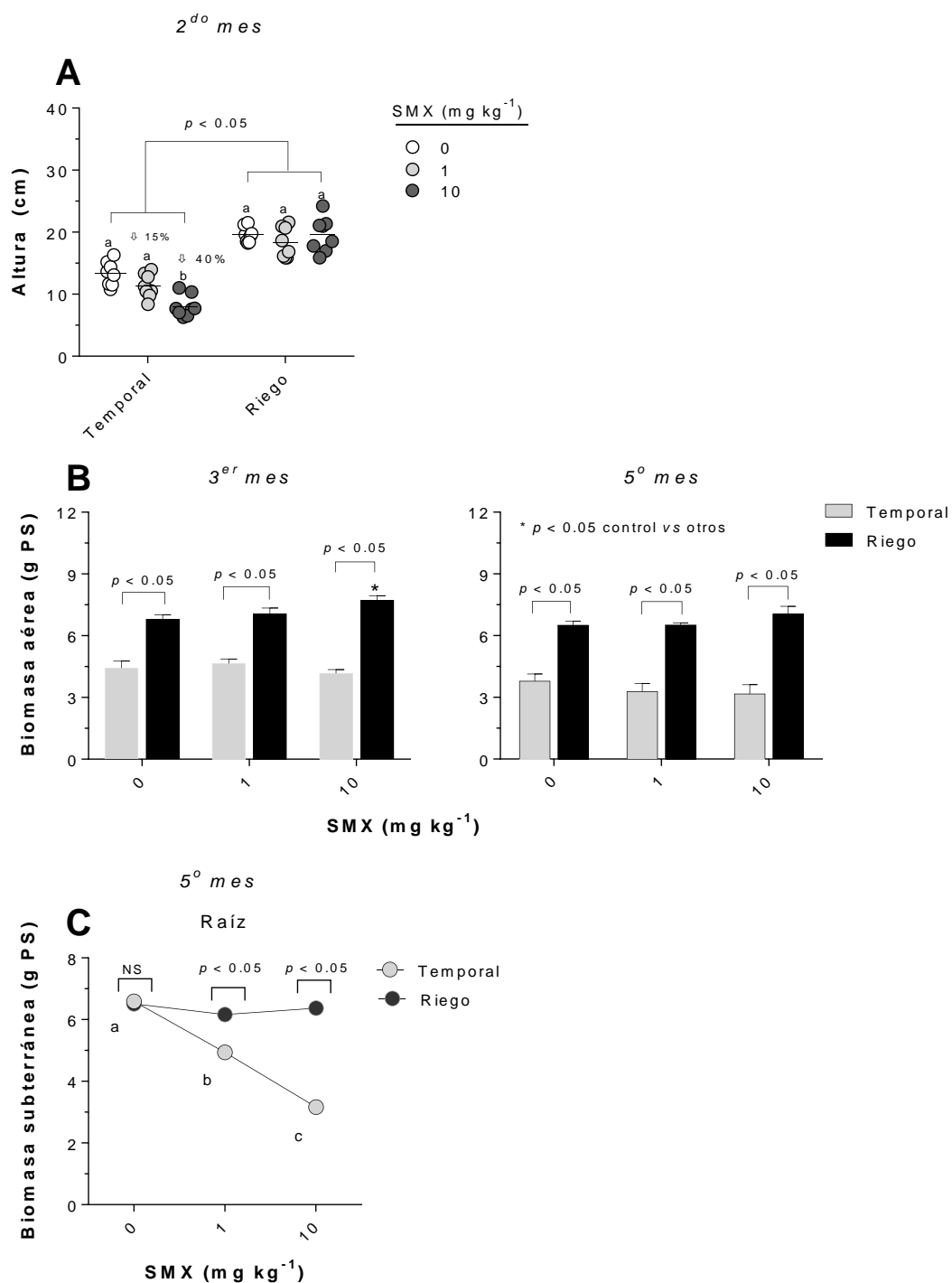


Figura 6.12. Crecimiento de alfalfa cultivada en suelos irrigados y de temporal provenientes del Valle del Mezquital adicionados con 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> SMX **A** altura de las plantas dos meses después de haber sido sembradas; **B** biomasa aérea de las alfalfas al tercero y al quinto mes después de haber sido sembradas, distinguiendo entre suelos de temporal y de riego y **C** biomasa radicular de las plantas cinco meses después de haber sido sembradas. NS:no significativo,  $p < 0.05$ : diferencias significativas.

Si bien no se registró ningún decremento, cabe destacar que las alfalfas cultivadas en suelos irrigados con la dosis más alta de SMX ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ;  $p < 0.05$ ) incrementaron su biomasa, comportamiento observado en el experimento con suelos contaminados con CIP (Figuras 6.6 y 6.12); sin embargo este comportamiento solamente se registra en el tercer mes y no se extiende hasta el quinto mes de cultivo como sucedió en el experimento de CIP.

Por otra parte es interesante notar que la biomasa de las raíces (cosechadas al 5to mes de cultivo), se redujo conforme aumentaba la concentración del SMX en el suelo. Cabe destacar que este comportamiento únicamente se registró en los suelos de temporal y fue similar al registrado para las alfalfas cultivadas en suelos contaminados con CIP (Figura 6.6 y 6.13).

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. *Transferencia de fluoroquinolonas y sulfonamidas del suelo a la biomasa aérea de las alfalfas*

La transferencia de contaminantes del suelo a las plantas ha sido estudiada ampliamente. Si bien las investigaciones se han centrado en el estudio de metales y otros contaminantes orgánicos, durante los últimos años los contaminantes emergentes han tenido un creciente interés, ya que también pueden ser transferidos a las plantas (Collins *et al.* 2006; Environment Agency, 2006; Boxall *et al.*, 2006; Russo y Verdiani, 2012).

Como se esperaba dada su alta solubilidad en agua y movilidad en el suelo el SMX ( $\log K_{ow}=0.89$ ), presentó una mayor transferencia del suelo a la parte aérea de las plantas, en comparación con el CIP ( $\log K_{ow}=1.34$ ). Pese a que estos resultados coinciden con diversos estudios en los que se evaluó la transferencia de sulfonamidas y de fluoroquinolonas (Herklotz *et al.*, 2010; Kipper *et al.*, 2010 y Lillenberg *et al.*, 2010), en este estudio no se esperaba que el CIP se transfiriera a las plantas, ya que a diferencia de los suelos utilizados en otros experimentos (i.e. arenosos y limosos; Boxall *et al.*, 2006); los suelos utilizados en este estudio fueron arcillosos, los cuales se caracterizan por poseer una alta capacidad de sorción, aunado a que el CIP es un antibiótico que se adsorbe fuertemente al suelo (Tolls, 2001; Vasudevan *et al.*, 2009). Los estudios de Behausse (2004) sostienen que cuando una fluoroquinolona como el ciprofloxacino y el ofloxacino se añade al suelo, aproximadamente el 90% o más se adsorbe a éste. Teniendo en cuenta estos factores se esperaba que el CIP no se transfiriera a las alfalfas, pues se planteó que su movilidad estaría muy limitada por el alto contenido

de materia orgánica de los suelos utilizados; reduciéndose así en gran medida su disponibilidad y por consiguiente su absorción por las plantas (Boxall *et al.*, 2006; Beausse, 2004; Kipper *et al.*, 2010).

No obstante, diversos estudios de transferencia de antibióticos realizados en lechuga, maíz, papa y zanahoria con concentraciones similares a éste (1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>), coincidieron en que los porcentajes de transferencia fueron bajos respecto a la dosis inicial para la mayoría de los suelos (~1%). De esta manera se propone que este grupo de fármacos no representa un riesgo para la salud humana por la ingestión de alimentos contaminados ya que su acumulación en las plantas respecto al suelo es baja (Boxall *et al.*, 2006; Dolliver *et al.*, 2007; Lillenberg *et al.*, 2010; Kipper *et al.*, 2010; Eggen *et al.*, 2011). Por otra parte, si se considera que las concentraciones de ambos antibióticos que encontraron Dalkmann *et al.* (2012) en los suelos del Valle del Mezquital fueron del orden de µg Kg<sup>-1</sup>, la transferencia de ambos antibióticos a las plantas sería aún más baja (~4 mg por cada 100 Kg de alfalfa PS); sin embargo, se desconoce si estas pequeñas dosis pudieran tener algún efecto en la salud humana.

## 7.2. Disponibilidad de CIP en el suelo

Se ha establecido que la transferencia de un contaminante del suelo a las plantas depende en gran medida de su concentración en la solución del suelo ya que durante el proceso de transpiración, la planta absorbe el agua del suelo mediante las raíces (Collins *et al.* 2006; Environmental Agency 2006); por ello en el presente experimento se realizaron extracciones con CaCl<sub>2</sub>, utilizado para determinar las concentraciones equivalentes a las disponibles para las plantas.

La disponibilidad de CIP en el suelo se evaluó mediante la extracción con CaCl<sub>2</sub> durante todo el experimento. Los resultados obtenidos muestran la presencia de CIP en la fracción “disponible” de los suelos contaminados con la dosis más alta (10 mg Kg<sup>-1</sup>), ya que el antibiótico se detectó desde el inicio hasta el final del experimento (cinco meses después). Si bien las concentraciones observadas en el presente experimento no pueden ser comparadas con las obtenidas por otros autores (Kipper *et al.*, 2010; Lillenberg *et al.*, 2010; Eggen *et al.*, 2011) debido a la falta de datos (falta de las extracciones ASE o totales), o bien, a las diferencias entre antibióticos evaluados y a los métodos de extracción, como es el caso de Boxall *et al.* (2006), en el que se evalúa la fracción total en suelo de enrofloxacino, una fluoroquinolona similar al CIP; los experimentos referidos y el presente estudio



ponen de manifiesto persistencia de las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y enrofloxacino) en los suelos durante varios meses.

Una de las principales diferencias entre los suelos utilizados fue su contenido de carbono orgánico total. Debido a estas diferencias entre suelos irrigados y de temporal se planteó que los primeros, por su alto contenido de materia orgánica, podrían tener una mayor capacidad de reducir la disponibilidad de CIP. Contrario a lo esperado, las concentraciones de CIP detectadas en los extractos de  $\text{CaCl}_2$  fueron similares en ambos tipos de suelo (temporal y riego). Estos resultados coinciden con los reportados por Vasudevan *et al.* (2009), en los que se pone de manifiesto la baja relevancia del carbono orgánico en la adsorción de CIP y sugirió que su adsorción al suelo ocurre principalmente mediante intercambio catiónico.

En cuanto a las extracciones de CIP en los extractos de  $\text{CaCl}_2$ , sobresale que no se detectó la presencia del antibiótico en la fase disponible en el tratamiento con la dosis más baja ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), incluso inmediatamente después de que los suelos fueron contaminados. Estos resultados ponen de manifiesto una interrogante, pues aunque no se detectó el antibiótico en la fase disponible del suelo, si hubo transferencia de CIP a las alfalfas. El comportamiento observado se puede deber a la mínima solubilidad de las fluoroquinolonas en agua a pH neutro (Picó y Andreu; 2007), factor que podría estar limitando la confiabilidad del método utilizado para evaluar las concentraciones de CIP disponibles en el suelo. Si bien la mayoría de los métodos para la cuantificación de CIP en suelos no son robustos debido a los bajos porcentajes de recuperación y precisión, Golet *et al.* (2002) sugieren que el método de extracción mediante ASE es el más robusto, sin embargo este método evalúa la fracción total del antibiótico en el suelo y no la disponible.

### 7.3. Transferencia de CIP del suelo a las alfalfas

A pesar de que no se esperaba que el CIP se transfiriera a la alfalfa, las concentraciones encontradas fueron muy bajas ( $0.2\text{-}3.8 \text{ ng g}^{-1}$ ). En el estudio realizado por Kipper *et al.* (2010) con papa en suelos arenosos y limosos contaminados con 1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , las concentraciones de CIP en los tubérculos expuestos a la dosis más alta superaron a las obtenidas en el presente estudio por hasta dos órdenes de magnitud; sin embargo los autores señalaron que no se registró el antibiótico dosis más baja

pese a que la raíz es la parte de la planta expuesta a este fármaco. Cabe destacar que en su estudio, Kipper *et al.* (2010), no reportaron los análisis de la parte aérea de la papa y en el presente trabajo no se realizaron los análisis de las raíces de alfalfa. Pese a las discrepancias entre las plantas utilizadas en ambos estudios se realizó la comparación, pues actualmente son muy pocos los trabajos que evalúan la transferencia de antibióticos. Cabe destacar que todas las comparaciones realizadas en este trabajo fueron realizadas bajo el supuesto de que el antibiótico ingresó a la planta, sin haber tomado en cuenta su fisiología, por este motivo todas las comparaciones realizadas deben tomarse con prudencia.

En el estudio realizado por Lillenberg *et al.* (2010), con lechugas expuestas a CIP ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), las concentraciones en las hojas son dos órdenes de magnitud mayores a las reportadas en este estudio. Cabe señalar que los autores no proporcionan las características del suelo. Pese a las discrepancias entre los estudios anteriormente señalados, Boxall *et al.* (2006) reportó en zanahoria (raíz) una acumulación de la fluoroquinolona enrofloxacin ( $2.8 \text{ ng g}^{-1}$ ) similar a la encontrada en este trabajo en la biomasa aérea de alfalfa.

Además de la transferencia del CIP a la biomasa aérea de la alfalfa, se encontró que su acumulación en las plantas fue similar en los dos suelos evaluados (temporal y riego). Un comportamiento similar fue documentado por Kipper *et al.* (2010) en suelos arenosos y limosos, en donde se sugiere que el tipo de suelo fue factor con poca relevancia en la movilidad de este antibiótico. Si bien estos resultados coinciden con los obtenidos en este experimento, cabe destacar que Kipper *et al.* (2010) no reportaron la transferencia del antibiótico a los tubérculos de papa en la dosis más baja ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Por el contrario, en alfalfa sí se reportó transferencia de CIP en una dosis similar. Estos resultados son sobresalientes ya que no se esperaba la transferencia del antibiótico a las plantas, pues los suelos utilizados en este experimento se caracterizan por poseer una mayor capacidad de amortiguamiento en comparación con los suelos arenosos y limosos utilizados por Kipper *et al.* (2010).

La adsorción del CIP y en general de las quinolonas a los suelos ha sido estudiada y se postula que está influenciada principalmente por la capacidad de intercambio catiónico de los suelos y en menor medida por el contenido de óxidos y carbono orgánico (Tolls, 2001; Figueroa-Diva *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Si bien estos factores son importantes, no hay que perder de vista que las

fluoroquinolonas son antibióticos que poseen la capacidad de ionizarse y que están sujetas a procesos de protonación/deprotonación, los cuales dependen del pH de la solución del suelo (Vasudevan *et al.*, 2009). En este caso y tomando en cuenta el primer  $pK_{a1}$  del CIP ( $\sim 6.1$ ), se puede decir que en suelos con un  $pH \leq 5$ , el CIP se encuentra como catión, lo cual incrementa su capacidad de adsorción a las superficies de las partículas del suelo, que presentan predominantemente carga negativa. En el caso de que el pH sea mayor, como es el caso de los suelos que se utilizaron en el presente estudio ( $pH \sim 7$ ), el CIP se encuentra en su forma neutra o también denominada zwitterión. Vasudevan *et al.* (2009) señalan que si bien los vertisoles tienen una gran capacidad de intercambio catiónico a  $pH \geq 6$ , su capacidad para adsorber el CIP disminuye considerablemente debido a que esta forma neutra disminuye su interacción con las superficies de las partículas de los suelos. Esto podría explicar por qué sí hubo transferencia de CIP en las alfalfas pese a que se esperaba lo contrario debido a la baja solubilidad del CIP y a su alto  $K_{oc}$  ( $3487 \text{ L Kg}^{-1}$ ).

#### 7.4. Disponibilidad del SMX en suelo y su dinámica en el tiempo

Además de la relevancia de conocer las concentraciones de un contaminante en la fracción disponible del suelo (Environmental Agency, 2006), Alexander (2000) advirtió que evaluar también la fracción total ofrece información valiosa acerca de la persistencia de estas sustancias en el suelo. En el presente experimento, se evaluaron distintos factores que influyen en la transferencia del SMX del suelo a las plantas. De este modo el diseño del experimento tomó en cuenta tres factores que intervienen en su disponibilidad en el suelo: el contenido de MO (temporal y riego), la dosis (1 y  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y el tiempo.

Como se esperaba el contenido de MO en el suelo, la dosis y el tiempo fueron factores que influyeron en la disponibilidad del SMX. Después de contaminar los suelos, se tomaron muestras para conocer la distribución del antibiótico en la fracción disponible y total del suelo. Los resultados mostraron diferencias en la disponibilidad del antibiótico dependiendo del suelo utilizado (temporal y riego); donde los suelos de temporal presentaron los mayores porcentajes de esta sulfonamida en la fracción disponible en ambas dosis. En cuanto a la fracción total (extractable mediante ASE) y de acuerdo con las hipótesis planteadas, los suelos irrigados presentaron las mayores concentraciones del antibiótico.

Cuando un contaminante orgánico como los antibióticos está presente en el suelo, tiende a sorberse o a unirse a sus componentes *i.e.* arcillas, óxidos de hierro y materia orgánica. Entre estos componentes del suelo, se ha observado que la materia orgánica ejerce la mayor influencia en la concentración del contaminante en el agua de los poros del suelo (fracción disponible; Tolls, 2001; Gao *et al.*, 2005; Environmental Agency, 2006). Son numerosos los estudios que reportaron una relación entre la lipofilicidad de un compuesto y su capacidad para sorberse a la materia orgánica. Así, se ha establecido que cuando el contenido de materia orgánica aumenta, la proporción del contaminante en la fracción disponible del suelo disminuye (Vasudevan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). Este comportamiento se ve reflejado claramente en los resultados, pues los suelos irrigados cuyo contenido de materia orgánica es mayor que en los suelos de temporal, presentaron los menores porcentajes del antibiótico en su fracción disponible. Esta baja disponibilidad del SMX en los suelos irrigados se vio reflejada en la baja transferencia del antibiótico a la alfalfa.

Si bien estos resultados coinciden con las hipótesis de que la MO es un factor que interviene en la disponibilidad de los antibióticos en el suelo, destaca que en ambas dosis existe una fracción considerable de entre el 15 y el 51% (para ambos tipos de suelo y ambas dosis), que no pudo ser extraída, incluso mediante ASE, que es una técnica que se caracteriza por mejorar los porcentajes de extracción de los analitos mediante el uso de altas temperaturas.

La sorción de un compuesto orgánico a los suelos conlleva un proceso rápido y reversible seguido de un proceso lento de sorción, en donde una pequeña fracción del compuesto ya no puede ser desorbida. A este último proceso lento se le denomina envejecimiento (Harzinger y Alexander, 1995). Debido al tiempo transcurrido entre la contaminación y la toma de la muestra se descarta un proceso de envejecimiento. Si bien el SMX presenta una baja sorción en el suelo, Lui *et al.* (2010) en sus experimentos de incubación con SMX reportaron una pérdida de aproximadamente el 10% del antibiótico al inicio de su experimento. Este es un porcentaje similar al que se obtuvo en el presente experimento y probablemente se deba al error normal del método de extracción. Por otra parte en los suelos irrigados se obtuvo un porcentaje de aproximadamente el 51%. Aunque este porcentaje fue muy alto, cabe destacar que este tipo de suelos presenta un mayor porcentaje de materia orgánica, la cual podría dificultar considerablemente la extracción del antibiótico debido a su alta afinidad con éste.

Si bien la materia orgánica tiene un papel muy importante en la sorción de diversos contaminantes al suelo, es importante tener en cuenta que en este proceso también intervienen otros factores cuya relevancia va a estar determinada por el tipo de suelo y por las características del contaminante (Vasudevan *et al.*, 2009). Por ejemplo, una de las diferencias entre los dos antibióticos evaluados fue que el contenido de carbono orgánico no fue relevante en el proceso de sorción para el CIP, sin embargo, esta misma variable es de suma importancia en el proceso de sorción del SMX al suelo (Chen *et al.* 2011 y Wu *et al.*, 2012).

Otro factor que afecta la sorción de un compuesto al suelo es el pH. Aunque las sulfonamidas y en especial el SMX se caracterizan por su alta solubilidad y movilidad, es importante tomar en cuenta que de manera similar a las fluoroquinolonas, las sulfonamidas poseen dos grupos funcionales (un grupo amino básico  $-NH_2$  y un grupo amida ácido  $-NH^-$ ) que les proporciona la capacidad de ganar o liberar un protón bajo condiciones específicas de pH. Por lo tanto, dependiendo del pH del suelo se pueden encontrar en tres especies: como catión, anión o zwitterión. En el presente estudio y de acuerdo con el  $pK_a$  ( $pK_{a,1}= 1.8$ ;  $pK_{a,2}= 5.6$ ), se plantea que el SMX se encontraba principalmente con carga negativa (Picó y Andreu; 2007; Vasudevan *et al.* 2009; Wu *et al.*, 2012). Aunque esta especie cargada negativamente es más soluble que sus otras especies (catión y zwitterión), y a diferencia del CIP (cuya especie si interviene considerablemente en su adsorción al suelo), este incremento en solubilidad no es tan significativo en su comportamiento en el suelo como sí lo es el contenido de materia orgánica (Chen *et al.*, 2011).

Al comparar las concentraciones del SMX añadido al inicio del experimento y tres meses después, se encontró que al cabo de este periodo de tiempo en los suelos contaminados con la dosis más baja ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), alrededor del 95 al 97% del antibiótico no fué detectado ni en el suelo ni en la biomasa aérea de las plantas. Por otra parte, un comportamiento similar ocurrió con los suelos contaminados con la dosis más alta ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), sin embargo los porcentajes de SMX no detectado variaron del 79 al 97% del SMX debido a que en los suelos de temporal aproximadamente el 20% del SMX se encontró en la biomasa aérea de las alfalfas.

La degradación de un antibiótico es ocasionada por distintos factores como las características fisicoquímicas de la sustancia y las condiciones ambientales. Se ha reportado que la vida media de

algunas sulfonamidas en el suelo varía de entre 8 y 21 días. En el caso del SMX, se ha estimado que su vida media es tan solo de ocho días bajo condiciones aeróbicas y en suelos no esterilizados (Lui *et al.*, 2010). Este corto tiempo supone una interrogante, ya que el SMX con una vida media tan reducida se habría degradado totalmente en aproximadamente 16 días, por lo que no estaría disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas. Sin embargo, esto no sucedió así pues las plantas sí absorbieron el antibiótico y éste se detectó tres meses después tanto en la fracción disponible como en la total. Aunque la biodegradación es el principal factor que interviene en la degradación del SMX (Lui *et al.*, 2010), es importante tomar en cuenta que cuando un compuesto se sorbe en el suelo presenta una mayor persistencia, pues no se encuentra accesible a los microorganismos (Harzinger y Alexander, 1995; Alexander, 2000; Gao y Pedersen, 2005; Lui *et al.*, 2010). De esta manera se plantea que la degradación del SMX pudo haber disminuido debido a los procesos de sorción del antibiótico en el suelo y que posteriormente a causa de los procesos de desorción el antibiótico se detectó en el suelo tres meses después.

#### 7.5. *Transferencia de SMX del suelo a la alfalfa*

Las concentraciones de SMX en la biomasa aérea fueron variables (6 a 2093 ng g<sup>-1</sup> PS); sin embargo y pese a estas variaciones, las concentraciones coincidieron con las reportadas en estudios realizados en papa, lechuga y col (Kipper *et al.*, 2010; Lillenberg *et al.*, 2010; Herklotz *et al.*, 2010).

En este experimento se evaluó la transferencia del SMX en dos tipos de suelo adicionados con dos dosis. Como se esperaba se registraron diferencias en la transferencia de SMX dependiendo de la dosis y del tipo de suelo. En las alfalfas cultivadas con la dosis más alta se obtuvieron las concentraciones más altas de SMX en la biomasa aérea. Por otra parte, las alfalfas sembradas en suelos de temporal presentaron las mayores concentraciones de SMX, en comparación con las alfalfas sembradas en suelos irrigados. Si bien el SMX se caracteriza por ser un antibiótico muy móvil debido a su alta solubilidad; Wu *et al.* (2012) sugieren que la materia orgánica del suelo tiene una gran capacidad de adsorber sulfonamidas. Es por esto que se propone que la disponibilidad del SMX se redujo en los suelos irrigados (con mayor contenido de MO) y como consecuencia hubo una menor transferencia del antibiótico a las alfalfas.

Aunque las concentraciones de SMX coinciden con los valores reportados en otros experimentos (Kipper *et al.*, 2010; Lillenberg *et al.*, 2010; Herklotz *et al.*, 2010) las comparaciones con estos estudios se deben tomar con cautela ya que en algunos casos solamente se analizan las raíces de las plantas y no la parte aérea. En el caso de los estudios realizados en tubérculos de papa (Kipper *et al.*, 2010), las concentraciones que se reportadas fueron muy similares a las obtenidas en las alfalfas cultivadas en suelos de temporal y un orden de magnitud más bajas respecto a las alfalfas cultivadas en suelos irrigados. Por otra parte, Lillenberg *et al.* (2010) analizaron la raíz y las hojas de lechuga en suelos contaminados con SMX ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y reportaron que las raíces presentaron las concentraciones altas del antibiótico, del mismo orden de magnitud que la concentración más alta obtenida para la parte aérea de la alfalfa cultivada en suelos de temporal. Cabe señalar que en la parte aérea de la lechuga no se detectó el antibiótico. Como ya se señaló anteriormente estas comparaciones deben tomarse con cautela pues en el presente experimento no fueron analizadas las raíces de la alfalfa. Además se debe considerar que en la mayoría de las plantas los contaminantes se acumulan predominantemente en las raíces (Krämer, 2010). Por otra parte, se debe tomar en cuenta la fisiología de la planta en la transferencia y traslocación de xenobióticos, ya que factores como el contenido de agua, lípidos y la tasa de transpiración intervienen de manera importante en el transporte de contaminantes entre los distintos compartimentos de la planta (Gao *et al.*, 2005; Yanzheng *et al.*, 2005)

#### 7.6. *Influencia de los antibióticos en el crecimiento de las plantas.*

En el presente experimento hubo un decremento significativo en la altura de las plantas (medida a los dos meses de cultivo) cultivadas en los suelos de temporal contaminados con CIP y SMX. Esta reducción en el crecimiento no se vio reflejada al tercer mes de cultivo cuando se midió biomasa aérea. En contraste, las plantas cultivadas en los suelos regados con aguas residuales contaminados con las mayores dosis de CIP y SMX incrementaron significativamente su biomasa (respecto al control). Este mismo comportamiento se repitió el quinto mes de cultivo únicamente en las alfalfas sembradas en suelos contaminados con CIP.

Un decremento similar al observado en la altura de las alfalfas cultivadas en suelos de temporal fue reportado por Boxall *et al.* (2006) en plantas cultivadas con suelos contaminados con fenilbutazona, oxitetraciclina y enrofloxacino ( $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ); sin embargo los autores señalaron que éste pudo deberse

al diseño del experimento y no a un efecto de los antibióticos. En contraste Eggen *et al.* (2011) reportaron un efecto negativo en el crecimiento de la zanahoria (*Daucus carota* ssp. *sativus* cvs. Napoli) y cebada (*Hordeum vulgare*) cultivadas en presencia de narasina, ciprofloxacino y metmorfina con dosis similares a las que se utilizan en el presente experimento (1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>). Kipper *et al.* (2010) reportaron un decremento en el crecimiento de papa (*Solanum tuberosum*) cultivada en presencia de ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, sulfametoxazol y sulfadimetoxina (1 y 10mg Kg<sup>-1</sup>); sin embargo no discutieron al respecto. Por otra parte Calderón *et al.* (2012) reportaron un mayor crecimiento en plantas de *Spathiphyllum* spp., cultivadas en medio contaminado con triclosan, ácido hidrocinámico, tonalide, ibuprofeno, naproxeno y ácido clorhídrico. Si bien estos fármacos no son antibióticos, es importante destacar que este tipo de sustancias pueden ocasionar un aumento en el crecimiento de las plantas.

Se sabe muy poco acerca de la respuesta de las plantas a la exposición a contaminantes emergentes. Aunque los primeros estudios se enfocaron en evaluar los efectos de fármacos en otros organismos (*i.e* bacterias invertebrados y macrofitas), Migliore *et al.* (1995) fueron de los pioneros en evaluar la toxicidad de antibióticos en plantas como como maíz (*Zea mays*), mijo (*Panicum miliaceum*) y chícharo (*Pisum sativum*) (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Hillis *et al.*, 2011). Estudios posteriores a éste han reportado que antibióticos como el levofloxacino, ciprofloxacino, enrofloxacino, tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, tilosina, sulfametazina, lincomicina y amoxicilina pueden ejercer un efecto tóxico en las plantas expuestas a dosis que van desde los 3.9 hasta los 10 000 µg L<sup>-1</sup> (Migliore *et al.*, 1995, 2003 2010a; Kong *et al.*, 2007; Hillis *et al.*, 2011; Khadra *et al.*, 2012).

Además de los efectos tóxicos que pueden causar los antibióticos en las plantas, también se ha encontrado que la exposición a bajas concentraciones de este tipo de contaminantes puede ocasionar un efecto hormético (Migliore *et al.*, 1995, 2003 2010a, 2010b; Kong *et al.*, 2007; Hillis *et al.*, 2011; Khadra *et al.*, 2012). Hormesis se define como una respuesta bifásica de los sistemas fisiológicos producida por un agente estresante, caracterizada por ocasionar una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas, por ejemplo el crecimiento (Calabrese y Baldwin 2002, 2003).



Actualmente no se tiene muy en claro la respuesta hormética de las plantas expuestas a fármacos. Por ejemplo, Migliore *et al.* (2010a) reportaron el efecto hormético en maíz expuesto a oxitetraciclina, sin embargo, esta respuesta no fue comprobada por los datos de acumulación en las plantas ni en el suelo, sin embargo los autores señalan que sus datos apoyan la hipótesis de que las tetraciclinas influyen en el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones. Por otra parte, Kong *et al.* (2007) señalaron un decremento considerable en la biomasa aérea y radicular de alfalfa cultivada con dosis altas de oxitetraciclina. A dosis bajas (0.002 mM) advirtieron un decremento en la raíz, sin embargo la parte aérea se mantiene similar al control. Ante este comportamiento los autores sugieren que la raíz es mucho más sensible debido a que es la parte de la planta que está expuesta a estas sustancias.

El comportamiento descrito para alfalfa por Kong *et al.* (2007) fue muy similar al observado en este experimento, pues la biomasa radicular de las alfalfas se vio significativamente reducida en las plantas cultivadas en suelos de temporal contaminados con CIP y SMX al incrementarse la dosis del antibiótico, sin embargo la biomasa aérea no mostró efectos significativos.

Por otra parte, el incremento en el crecimiento de las plantas cultivadas en suelos irrigados pone de manifiesto un posible efecto del SMX y CIP en la alfalfa. Como ya se señaló anteriormente, dosis bajas de un antibiótico ocasionan un incremento en el crecimiento. Se plantea que este comportamiento particular de los suelos irrigados se debe a que su contenido de MO podría reducir la disponibilidad del antibiótico a concentraciones en las que se favorece el crecimiento de la alfalfa. Por el contrario los suelos de temporal no poseen esta capacidad y por lo tanto la biomasa aérea se mantiene similar al control.

Pese a que las concentraciones de CIP en la fracción disponible del suelo fueron similares en suelos irrigados y no irrigados, únicamente hubo una reducción en la biomasa de las raíces en suelos de temporal. Este comportamiento refuerza la hipótesis de que los extractos de  $\text{CaCl}_2$  no son un buen indicador de la disponibilidad de este antibiótico en el suelo. Además Migliore *et al.* (2010a) reportaron un efecto en maíz cultivado con oxitetraciclina, sin embargo, de manera similar a este experimento no se puede comprobar una causalidad clara.

A pesar de que el CIP tiene como blanco la subunidad A de la DNA girasa bacteriana, también puede tener efectos en la topoisomerasa II de las plantas, cuya función es la misma que la enzima bacteriana. Por esta razón el CIP también interviene en la replicación del DNA en plantas (Migliore *et al.*, 2003; Khadra *et al.* 2012). En cuanto al SMX, Hillis *et al.* (2012) señalan que las sulfonamidas son fármacos capaces de inhibir la síntesis de folatos (ácido fólico) en las plantas mediante un proceso muy similar al de los microorganismos. Aunque los antibióticos tienen como blanco inhibir el crecimiento de los microorganismos (Kümmerer, 2004), tanto el CIP como el SMX pueden interferir con el metabolismo de las plantas e incluso ocasionar efectos tóxicos. Por ejemplo, Khadra *et al.* 2012 reportaron que el CIP ocasionó efectos genotóxicos en raíces de haba (*Vicia faba*) a concentraciones a partir de 0.5 mg kg<sup>-1</sup>.

Aunque se ha demostrado que las fluoroquinolonas y las sulfonamidas son capaces de producir efectos horméticos en plantas como en la alfalfa, zanahoria y lechuga (Migliore *et al.*, 1995, 2003 2010a, 2010b; Kong *et al.*, 2007; Hillis *et al.*, 2011), y aunque se tiene documentado que también pueden interferir en el metabolismo de las plantas (Migliore *et al.*, 2003; Hillis *et al.*, 2012; Khadra *et al.* 2012) hay muy poca información al respecto, ya que no se tienen estudios suficientes acerca de cómo estas sustancias pueden afectar el crecimiento y el ciclo biológico de las plantas (Migliore *et al.*, 2010b). Si bien los datos de crecimiento de las alfalfas del presente estudio ponen de manifiesto un posible efecto hormético de ambos antibióticos en la alfalfa, es importante señalar que no se tienen evidencias robustas de este comportamiento ya que estos efectos en el crecimiento pueden deberse a una respuesta indirecta ocasionada por una alteración en las comunidades bacterianas del suelo (muy susceptibles debido a que los antibióticos están diseñados para inhibirlas), por un efecto tóxico causado por los antibióticos en la planta, o bien, por un efecto conjunto de estas dos posibilidades.

## VIII. CONCLUSIONES

### *Antibióticos en suelo*

#### *CIP*

La concentración de CIP en la fracción biodisponible fue muy baja y similar en los suelos de temporal y en los suelos irrigados y se mantuvo constante durante los cinco meses de experimento.

#### *SMX*

Al inicio del experimento y en comparación con la fracción ASE, la mayor proporción del SMX se encontró en la fracción biodisponible en ambos suelos (temporal y riego).

Los suelos de temporal presentaron las mayores cantidades de SMX disponible. Estos suelos contienen menos carbono orgánico, por lo que se plantea que el contenido de carbono orgánico es el factor principal que influye en la adsorción del SMX al suelo y por lo tanto limita su disponibilidad.

Tres meses después del inicio del experimento las mayores concentraciones de SMX se encontraron en la fracción ASE.

Pese a que la vida media de las sulfonamidas se calcula en 16 días, se plantea que el SMX está sujeto a procesos de sorción-desorción. Debido a estos procesos fue posible cuantificar una pequeña fracción tres meses después de haberlo añadido.

Al final del experimento, ~92% del SMX no se encontró ni en el suelo ni en la biomasa aérea, siendo imposible discernir qué porcentaje corresponde a degradación, envejecimiento, o bien, se encuentre en las raíces de las plantas (no analizadas).

### *Transferencia de los antibióticos del suelo a las plantas*

El SMX fue el antibiótico que presentó una transferencia más alta del suelo a las plantas en comparación con el CIP.

Se propone que el contenido de MO de los suelos influyó en la transferencia del SMX a las plantas, siendo las plantas cultivadas en los suelos de temporal (con bajo contenido de MO) y con la dosis más alta (10 mg Kg<sup>-1</sup>) las que presentaron las mayores transferencias del antibiótico. En contraste, en la transferencia del CIP, el contenido de MO del suelo no fue un factor relevante.

El ciprofloxacino se transfirió del suelo a las plantas en ambos suelos incluso a las alfalfas cultivadas en los suelos adicionados con la dosis más baja (1 mg Kg<sup>-1</sup>), en donde no se detectó la presencia del antibiótico en la fracción disponible de los suelos.

El porcentaje de CIP y SMX transferido a la alfalfa es muy bajo, sin embargo se desconoce si estas dosis pudieran tener un efecto en la salud humana.

### *Efectos de los antibióticos en el crecimiento de las plantas*

A los dos meses de cultivo se observó un decremento en la altura de las plantas. En los suelos adicionados con SMX el decremento solamente se registró en las plantas cultivadas en suelos de temporal (en ambas dosis), mientras que para el CIP el decremento se registró en suelos de temporal (ambas dosis) y en la dosis más alta en suelos irrigados.

Al tercer mes, la biomasa aérea de las alfalfas no mostró ningún decremento, por el contrario, hubo un incremento en la biomasa de las plantas cultivadas en suelos irrigados y contaminados con las dosis mayores.

La biomasa radicular de las plantas cultivadas en suelos de temporal se redujo considerablemente en presencia de CIP y SMX en ambas dosis. Este efecto no se observó en las plantas cultivadas en suelos irrigados.

Se plantea un posible efecto hormético de ambos antibióticos en el crecimiento de la alfalfa. Aunque no es posible discernir si el efecto es directo debido a la absorción de los fármacos por las plantas, o bien, es ocasionado indirectamente por la influencia de los antibióticos en las comunidades microbianas del suelo.

## **IX. RECOMENDACIONES**

El presente estudio contribuyó aportando datos acerca de la transferencia de CIP y SMX del suelo a la biomasa aérea de alfalfa. Se propone que en estudios posteriores se dé seguimiento al análisis de las raíces con la finalidad de complementar esta investigación.

De manera particular y respecto a los métodos de extracción realizados se recomienda para estudios futuros:

- Realizar el secado de las plantas mediante liofilización, ya que este método evita problemas de adhesión de material vegetal en el equipo ASE.
- Con base en la experiencia obtenida, se recomienda utilizar 1 g de muestra (en lugar de 2 g) para aumentar la eficiencia de extracción mediante ASE.

Con la finalidad de evaluar la degradación de los antibióticos se recomienda incluir en el diseño experimental una muestra de suelo adicionada sin planta y una muestra adicionada estéril.

**X. LITERATURA CITADA**

- Alexander M. 2000. Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science of technology*. 27:2630-2636.
- Barron L., Havel J., Purcell M., Szpak M., Kelleher B., Paull B. 2009. Predicting sorption of pharmaceuticals and personal care products onto soil and digested sludge using neural networks. *Analyst*. 134(4):663-70.
- Boxall A.B.A., Johnson P., Smith J.E., Sinclair J.C., Stutt E., Levy S.L. 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:2288-2297.
- Brugueras C.M. y Morejón G. M. 1999. Antibacterianos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Revista Cubana de Medicina Integral*. 15(2):156-167.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. 2002. Defining hormesis. *Human and Experimental Toxicology*. 21(2):91-97.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43:175-197.
- Chapela L.M. 2011. Variación temporal en el contenido de metales pesados en suelos regados con aguas residuales. Tesis, Maestría. UNAM. 79 P.
- Chen H., Gao B., Li H. y Ma L.Q. 2011. Effects of pH and ionic strength on sulfamethoxazole and ciprofloxacin transport in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*. 126:29-36.
- Clarke B.O. y Smith S.R. 2011. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*. 37:226-247.
- Collins C., Fryer M. y Grosso A. 2006. Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environmental Science and Technology*. 40(1):45-52.
- Cooper R.E. Siewicki C.T., Phillips K. 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the Total Environment*. 398:26-33.
- Dalkmann P, Broszat M, Siebe C, Willaschek E, Sakinc T, Huebner J., Amelung W., Grohmann E. y Siemens J. (2012) Accumulation of Pharmaceuticals, Enterococcus, and Resistance Genes in Soils Irrigated with Wastewater for Zero to 100 Years in Central Mexico. *PLoS ONE*. 7(9): e45397.
- Daughton G.C. y Ternes A. T. 1999 Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle Change? *Environmental Health Perspectives*. 107(6):907-938.
- Dolliver H., Kumar K., Gupta S. 2007. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of Environmental Quality*. 36:1224-1230.

- Du L. y Liu W. 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 32:309-327.
- Eggen T., Asp TN., Grave K., Hormazabal V. 2011. Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. *Chemosphere*. 85(1):26-33.
- Environment Agency. 2006. Evaluation of models for predicting plant uptake of chemicals from soil. Science report SC050021/SR. <http://www.environment>
- Fatta-Kassinos D., Meric S., Nikolaou A. 2010. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 399(1): 251-257.
- Fatta-Kassinos D., Kakavrouziotis I.K., Koukoulakis P.H. y Vasques M.I. 2011. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of the Total Environment*. 409:3555-3563.
- Figueroa-Diva R.A., Vasudevan D. y MacKay A.A. 2010. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere*. 79:786-793.
- Gao J. y Pedersen J.A. 2005. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environmental Science and Technology*. 39:9509-9516.
- Goldstein M., Shenker M., Chefetz B. 2014. Insights into uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environmental Science and Technology*. 48:5593-5600.
- Grünheid S., Amy G., Jekel M., 2005. Removal of bulk dissolved organic carbon (DOC) and trace organic compounds by bank filtration and artificial recharge. *Water Research*. 39: 3219-3228.
- Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S. Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lüzhof H.C., Jorgensen S.E. 1998. Occurrence , fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. *Chemosphere*. 36(2):357-394.
- Hatzinger P.B. y Alexander. 1995. Effect of aging of chemicals in soil in their biodegradability. *Environmental Science and Technology*. 29:537-545.
- Herklotz P.A., Gurung P., Vanden H.B., Kinney C.A. 2010. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*. 78:1416-1421.
- Hillis D.G., Fletcher J., Solomon K.R., Sibley P.K. 2011. Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60:220-232.
- Hu X., Zhou Q., Lou Y. 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*. 158(9):2992-2998.

- Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*. 131:5-17.
- Khadra A., Pinelli E., Lacroix M.Z., Bousquet-Melou A., Hamdi H., Merlina G., Guiresse M., Hafidi M. 2012. Assessment of genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 76:187-192.
- Kipper K., Herodes K., Lillenberg M., Nei L., Haiba E., Litvin S.V. 2010. Plant uptake of some pharmaceuticals commonly present in sewage sludge compost. *2<sup>nd</sup> International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 261-264.
- Kong W.D., Zhu Y.G., Liang Y.C., Zhang J., Smith F.A., Yang M. 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*. 147:187-193.
- Krämer U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 61:517-534.
- Kumar K., Gupta C.S., Baidoo K.S., Chander Y., Rosen J.C. 2005. Antibiotic Uptake by Plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*. 34:2082-2085.
- Kümmerer K. 2004. Pharmaceuticals in the Environment. *Springer*. 2da Ed. 527p.
- Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment –A review- Part I. *Chemosphere*. 75: 417-434.
- Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E. y Ward R.S. 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*. 163:287-303.
- Leyva E., Monreal E., Hernández A. y Leyva S. 1999. Las fluoroquinolonas. Síntesis y actividad antimicrobiana. *Revista de la Sociedad Química de México*. 43(2):63-68.
- Lillenberg M., Herodes K., Kipper K. y Nei L. 2010. Plant uptake of some pharmaceuticals from fertilized soils. *Proceedings of 2009 International Conference on Environmental Science and Technology*. 24-25 Abril.
- Lin K. y Gan J. 2011. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*. 83(3):240-246.
- Lui F., Ying G-G., Yang J-F., Zhou L-J., Tao R., Wang L., Zhang L-J., Peng P-A. 2010. Dissipation of sulfamethoxazole, trimethoprim and tylosin in a soil under aerobic an anoxic conditions. *Environmental Chemistry*. 7: 370-376.
- Marques P.L.R., Ferracciú A.L.R., Luiz T.V., Borges R.J. 2013. Sorption of fluoroninolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere*. 92:979-985.
- Migliore L., Brambilla G., Cozzolino S., Gaudio L. 1995. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 52:103-110.

- Migliore L., Cozzolino S., Fiori M. 2003. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*. 52:1233-1244.
- Migliore L., Gordeas F., De Filippis S.P. Mantovi P., Barchi D., Testa C., Rubattu N., Brambilla G. 2010a. Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environmental Pollution*. 158: 129-134.
- Migliore L., Rotini A., Cerioli N.L., Cozzolino S., Fiori M. 2010b. Phytotoxic antibiotic sulfadimethoxine elicits a complex hermetic response in the weed *Lythrum salicaria* L. *International Dose-Response Society*. 8:414-427.
- O'Connor S., Aga D.S. 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry*. 26(6): 456-465.
- Picó Y. y Andreu V. 2007. Fluoroquinolones in soil –risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387: 1287-1299.
- Russo y Verdiani. 2012. The health risk of the agricultural production in potentially contaminated sites: an environmental-health risk analysis. *Journal of Agricultural Engineering*. 43:e15.
- Sánchez S.L., Sáenz A. E., Pancorbo M. J., Lanchipa Y.P. y Zerraga Del C. R. 2004. Antibióticos sistémicos en dermatología. Segunda parte: tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, rifamicinas, cloranfenicoles, ácido fusídico, metronidazol y nuevos antibióticos. *Dermatología Peruana* 14 (3):161-179.
- Santos L.H.M.L.M., Araújo A.N. Fachini A., Pena A. Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 175 (1-3):45-95.
- Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxal A.B.A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 65:725-759.
- Shenker M., Harush D., Ben-Ari J., Chefetz B. 2011. Uptake of carbamazepine by cucumber plants – A case of study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere*. 82:905-910.
- Siebe C. 1997. Desarrollo de valores de referencia para Cd y Pb en suelos regados con aguas residuales. *Terra*. 15(4): 365-470.
- 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*. 13: 1-5.
- Siemens J., Huschek G., Siebe C., Kaupenjohann M., 2008. 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., 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(4):1201-1210.



- Srinivasan P., Sarmah AK., Manley-Harris M., Wilkins A.L. 2010. 19th World congress of soil science, soil solutions for a changing world. 1-6. Brisbane, Australia
- Thiele-Bruhn S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils –a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 166:145-167.
- Tolls J. 2001. Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A review. *Environmental Science and Technology*. 35(17): 3397-3406.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. U.S. EPA. Offices of water and wastewater and compliance (Ed.) Guidelines for water reuse. U.S. EPA, Washington. WA State Water Strategy.
- Vasudevan D., Bruland G.L., Torrance, B.S., Upchurch V.G. y MacKay A.A. 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma*. 151: 68-76
- Wang C-J. Li Z. y Jiang W-T. 2011. Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals. *Applied Clay Science*. 53:723-728.
- Wise R. 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49:585-586.
- Witte W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279, 996–997.
- Wu C., Spongberg A.L., Witter J.D., Fang M., Czajkowski K.P. 2010. Uptake of pharmaceuticals and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environmental Science and Technology*. 44(16):6157-6161.
- Wu Y., Chen D-H. y Huang M-H. 2012. Sorption on pH effect on selected antibiotics in soils. *Advanced Materials Research*. 356-360: 35-38.

## XI. ANEXO

Tabla 10.1. Concentración de ciprofloxacino en la fracción de suelo extractable con  $\text{CaCl}_2$  en suelos del Valle del Mezquital adicionados con 1 y 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  (las concentraciones se expresan en  $\text{ng g}^{-1}\text{PS}$ ).

Cosecha	Sitio Tratamiento ( $\text{mg kg}^{-1}\text{PS}$ )	Santiago Tezontlale 1	Santiago Tezontlale 2	Tigre 1	Tigre 2	Juandhó 1	Juandhó 2	Ulapa 1	Ulapa 2
<b>T0</b>	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	0.28	0.70	0.83	0.71	0.38	0.70	0.37	0.34
<b>T1</b>	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	0.33	0.47	0.94	0.61	0.62	0.65	0.36	0.44
<b>T2</b>	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10	0.23	0.23	0.41	0.32	0.39	0.31	0.25	0.27

ND, No detectado

LD (límite de detección)= 0.1  $\text{ng g}^{-1}$

n=1

T0 Muestra de suelo tomada al inicio del experimento

T1 Muestra de suelo tomada en la primera cosecha, 3 meses después del T0

T2 Muestra de suelo tomada a los 5 meses después del T0

Tabla 10.2. Concentración de ciprofloxacino transferido a alfalfa cultivada durante tres meses en suelos adicionados con dosis 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>.

Sitio	Dosis añadida al suelo (mg kg <sup>-1</sup> PS)	Peso seco (g)	Concentración ng g <sup>-1</sup> PS	Concentración total en biomasa aérea ng g <sup>-1</sup> PS
<b>Santiago Tezontlale 1</b>	0	3.9±0.1	ND	ND
	1	3.9±0.1	ND	ND
	10	3.8±0.6	3.8±2.6	13.0±7.6
<b>Santiago Tezontlale 2</b>	0	5.2±0.1	ND	ND
	1	5.2±0.1	ND	ND
	10	3.8±0.6	3.0±2.8	9.7±9.1
<b>Tigre 1</b>	0	3.0±0.2	ND	ND
	1	3.0±0.2	ND	ND
	10	3.9±1.4	0.2±0.2	0.8±0.8
<b>Tigre 2</b>	0	4.9±0.1	ND	ND
	1	4.9±0.1	0.6±0.6	3.2±3.2
	10	4.0 ±1.0	ND	ND
<b>Juandhó 1</b>	0	7.0±0.2	ND	ND
	1	7.0±0.2	ND	ND
	10	9.2±0.8	ND	ND
<b>Juandhó 2</b>	0	7.9±0.6	ND	ND
	1	7.9±0.6	0.7±0.7	6±6
	10	9.4±0.1	ND	ND
<b>Ulapa 1</b>	0	7.3±0.2	ND	ND
	1	7.3±0.2	ND	ND
	10	8.9±0.1	ND	ND
<b>Ulapa 2</b>	0	5.7±0.6	ND	ND
	1	5.7±0.6	ND	ND
	10	8.0±0.5	1.3±1.3	9.9±9.9

ND: No detectado

LD= 0.1 ng g<sup>-1</sup>

n=2 para cada sitio y concentración

Tabla 10.3. Concentración promedio de sulfametoxazol  $\pm$  error estándar en la fracción de suelo extractable con  $\text{CaCl}_2$  y ASE en suelos del Valle del Mezquital adicionados con  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  (las concentraciones se expresan en  $\text{ng g}^{-1}$  PS).

Sitio	Inicio del experimento			Primera cosecha			Segunda cosecha		
	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\sum_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\frac{\sum_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}}{\text{ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\sum_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$
<b>Santiago Tezontlale 1</b>	912 $\pm$ 71.7	0	912	0.46 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 1.5	9.36	ND	NA	-
<b>Santiago Tezontlale 2</b>	716.6 $\pm$ 110.7	22.4 $\pm$ 16.6	738.4	0.1 $\pm$ 0.05	5.7 $\pm$ 0.8	5.8	ND	NA	-
<b>Tigre 1</b>	706 $\pm$ 6.4	10.8 $\pm$ 10.8	716.8	0.11 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.4	7	ND	NA	-
<b>Tigre 2</b>	265.8 $\pm$ 5.1	121.4 $\pm$ 11.7	387.2	0.1 $\pm$ 0.01	10.4*	10.5	ND	NA	-
<b>Juandhó 1</b>	334.3 $\pm$ 22.5	119 $\pm$ 25.4	453.3	0.2 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 7.6	9.7	ND	NA	-
<b>Juandhó 2</b>	379.5 $\pm$ 22.5.6	122.6.0 $\pm$ 10.3	502.1	0.2 $\pm$ 0.01	14.8*	15	ND	NA	-
<b>Ulapa 1</b>	335 $\pm$ 9.9	221.8 $\pm$ 42	556.8	0.31 $\pm$ 0.1	27 $\pm$ 4	27.3	ND	NA	-
<b>Ulapa 2</b>	363 $\pm$ 60.6	109.9 $\pm$ 2.2	472.9	0.27 $\pm$ 0.1	17.4*	17.6	ND	NA	-

ND, No detectado

LD= 0.07  $\text{ng g}^{-1}$

n=2 para cada sitio y concentración

\* n=1 para cada sitio y concentración

Tabla 10.4. Concentración promedio de sulfametoxazol  $\pm$  error estándar en la fracción de suelo extractable con  $\text{CaCl}_2$  y ASE en suelos del Valle del Mezquital adicionados con  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (las concentraciones se expresan en  $\text{ng g}^{-1}\text{PS}$ );

Sitio	Inicio del experimento T0			Primera cosecha T1			Segunda cosecha T2		
	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$
<b>Santiago Tezontlale1</b>	8963 $\pm$ 318.3	23 $\pm$ 23	8986	24.8 $\pm$ 4.7	66.1 $\pm$ 47.2	13.92*	80	NA	-
<b>Santiago Tezontlale2</b>	9289 $\pm$ 54.7	0	9289	23 $\pm$ 3.1	123.6 $\pm$ 7.6	7.69*	131.3	NA	-
<b>Tigre 1</b>	8974.3 $\pm$ 878.5	0	8974.3	12.1 $\pm$ 8.2	104.7 $\pm$ 51.4	1.02*	105.7	NA	-
<b>Tigre 2</b>	6433.5 $\pm$ 626.3	533.11*	6966.6	3.4 $\pm$ 1.4	74.2 $\pm$ 17.5	2.2*	76.4	NA	-
<b>Juandhó 1</b>	6431.4 $\pm$ 291.8	433.4*	6864.8	6 $\pm$ 1.7	133.5 $\pm$ 30.6	2.12*	135.6	NA	-
<b>Juandhó 2</b>	6610.9 $\pm$ 119.4	560.2*	7171.1	8.7 $\pm$ 3.7	132.4 $\pm$ 3.1	2.38*	134.8	NA	-
<b>Ulapa 1</b>	6111.9 $\pm$ 308.2	1357.3 $\pm$ 153.6	6420.1	10 $\pm$ 0.7	180 $\pm$ 0.4	3.51*	183.5	NA	-
<b>Ulapa 2</b>	5806.6 $\pm$ 483	466.9 $\pm$ 133.6	6289.6	9.2 $\pm$ 0.2	141.4 $\pm$ 0.1	1.81*	143.2	NA	-

NA, No analizado

LD= 0.03  $\text{ng g}^{-1}$

n=2 para cada sitio y concentración

\* n=1

Tabla 10.5. Concentración de antibióticos transferidos a alfalfa cultivada durante tres meses (primera cosecha) en suelos adicionados con dos dosis 1 y 10 mg kg<sup>-1</sup> de sulfametoxazol.

Sitio	Dosis añadida al suelo (mg kg <sup>-1</sup> PS)	Peso seco (g)	Concentración ng g <sup>-1</sup> PS	Concentración total en biomasa aérea ng g <sup>-1</sup> PS
<b>Santiago Tezontlale 1</b>	0	3.9±0.1	ND	ND
	1	4.0±0.2	22.6±4.5	90.3±14.6
	10	3.8±0.3	2093.76*	4355±3355
<b>Santiago Tezontlale 2</b>	0	5.2±0.1	ND	ND
	1	4.7±0.3	6.92	52.7±18.1
	10	4.3±0.1	701.1±3.4	2979.9±98.6
<b>Tigre 1</b>	0	3.0±0.2	ND	ND
	1	4.6±0.5	ND	8.9±8.9
	10	3.9±0.5	74.5±20.3	300.8±113.8
<b>Tigre 2</b>	0	4.9±0.1	ND	ND
	1	5.3±0.3	ND	ND
	10	4.7±0.3	41.8±2.1	195.9±4.3
<b>Juandhó 1</b>	0	7.0±0.2	ND	ND
	1	7.5±0.1	ND	ND
	10	8.1±0.4	10.3±0.2	83.4±5.7
<b>Juandhó 2</b>	0	7.9±0.6	ND	ND
	1	7.5±0.8	ND	ND
	10	7.7±0.4	14.2±1.1	109.2±3.1
<b>Ulapa 1</b>	0	7.3±0.2	ND	ND
	1	7.0±0.8	6.33	19.4±19.4
	10	7.9±0.6	17.1±12.7	142.6±110.5
<b>Ulapa 2</b>	0	5.7±0.6	ND	ND
	1	6.3±0.3	6.31	19.0±19.0
	10	7.1±0.6	3.5±3.5	27.0±27.0

ND: No detectado

LD= 0.07 ng g<sup>-1</sup>

n=2 para cada sitio y concentración

\* n=1

Tabla 10.6. Porcentajes de concentración de SMX en suelo y en la parte aérea de alfalfa en suelos del Valle del Mezquital adicionados con 1 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>.

Sitio	Antibiótico añadido al suelo (mg kg <sup>-1</sup> PS	% CaCl <sub>2</sub> (inicio del experimento)	% ASE T0 (inicio del experimento)	% No extraído	% CaCl <sub>2</sub> (3er mes)	% ASE (3er mes)	% Biomasa aérea (3er mes)	% Desconocido (3er mes)
Santiago Tezontale 1	1	91	0	8.8	0.05	0.9	9	90
	10	89.6	0.2	10.1	0.25	0.7	87.1	12.5
Santiago Tezontale 2	1	71	2.2	26.1	0.01	0.6	5.3	94
	10	92.9	0	7.1	0.23	1.2	29.8	68.7
El Tigre 1	1	70	1.1	28.3	0.01	0.7	0.9	98.4
	10	89.7	0	10.3	0.12	1	3	95.8
El Tigre 2	1	26.6	12.1	61.3	0.01	0.5	0	95.5
	10	64.3	2.7	24.1	0.03	0.7	2	97.3
Juandhó 1	1	33.4	11.9	59.4	0.02	0.9	0	99
	10	64.3	2.2	28.4	0.06	1.3	0.8	97.8
Juandhó 2	1	37.9	12.3	49.8	0.02	0.7	0	99.3
	10	66.1	2.8	29.5	0.1	1.3	1.1	97.5
Ulapa1	1	33.5	22.2	44.3	0.03	2.7	1.9	95.3
	10	61.1	13.6	25.3	0.1	1.8	1.4	96.7
Ulapa 2	1	36.3	11	52.7	0.03	0.9	1.9	97.2
	10	58.1	4.7	37.3	0.1	1.4	0.5	98.1

Tabla 10.7. Concentración promedio de sulfametoxazol  $\pm$  error estándar en la fracción de suelo extractable con  $\text{CaCl}_2$  y ASE en suelos del Valle del Mezquital sin el antibiótico (las concentraciones se expresan en  $\text{ng g}^{-1}\text{PS}$ ).

NA: No analizado

Sitio	Inicio del experimento			Tercer mes de cultivo			Quinto mes de cultivo		
	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$	$\text{CaCl}_2$	ASE	$\Sigma_{\text{CaCl}_2\text{-ASE}}$
<b>Santiago Tezontlale 1</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Santiago Tezontlale 2</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Tigre 1</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Tigre 2</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Juandhó 1</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Juandhó 2</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Ulapa 1</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-
<b>Ulapa 2</b>	ND*	NA	-	ND*	NA	-	ND*	NA	-

LD=0.03  $\text{ng g}^{-1}$

T0 Muestra de suelo tomada después de contaminarlo

T1 Muestra de suelo tomada en la primera cosecha, 3 meses después del T0

T2 Muestra de suelo tomada a los 5 meses después del T0

\* n=1



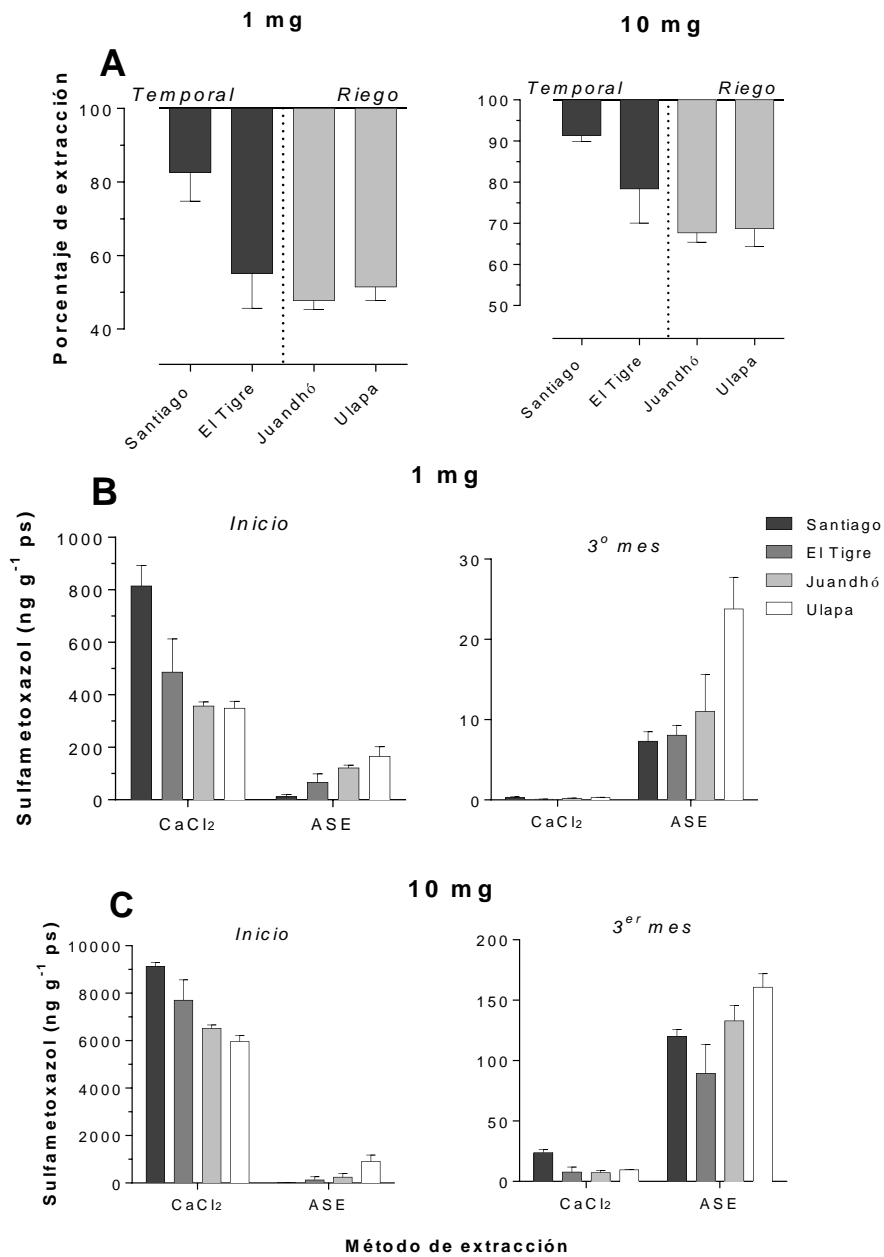


Figura 10.1. Porcentaje de extracción de SMX suelos de Valle del Mezquital adicionados con 10 mg kg<sup>-1</sup> PS. A. Compara las extracciones totales (CaCl<sub>2</sub>+ASE) deSMX entre suelos de temporal y suelos irrigados al inicio del experimento. B denota los porcentajes de extracción por método de extracción entre los suelos de las distintas localidade del Valle del Mezquital al inicio del experimento y tres meses después.