



## **Autor**

**Eloy Bécares Mantecón**

## **Equipo investigador**

**Javier Martín Villacorta**

**María Hijosa Valsero**

**Ricardo Sidrach-Cardona Martínez.**

## **Colaboradores**

**Roberto Romero,**  
Universidad de Almería

**José Luís Balcázar**  
Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA)

# Índice

## Resumen

### 1. Introducción

- 1.1. La resistencia a antibióticos como estrategia adaptativa de las bacterias
- 1.2. Influencia de la actividad humana sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio ambiente
- 1.3. Supervivencia de las bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos
- 1.4. Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos. Papel de las depuradoras de aguas residuales

### 2. Material y Métodos

- 2.1. Zona de muestreo de vertidos urbanos y pozos
- 2.2. Toma de muestras de agua y sedimentos del río Bernesga
- 2.3. Análisis de Antibióticos en agua y sedimentos del Río Bernesga
- 2.4. Parámetros convencionales de calidad de las aguas
- 2.5. Muestreo de las variables microbiológicas
- 2.6. Análisis de la resistencia a antibióticos
- 2.7. Eliminación de bacterias en sistemas naturales de tratamiento (humedales construidos)
- 2.8. Análisis estadístico

### 3. Resultados

- 3.1. Variables convencionales de calidad de las aguas
- 3.2. Concentración de antibióticos en el río
- 3.3. Indicadores microbianos y resistencia a antibióticos en aguas de pozo y vertidos
- 3.4. Comunidades bacterianas del río y resistencia a antibióticos
- 3.5. Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos en humedales construidos

### 4. Bibliografía

### 5. Anexos

## RESUMEN

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos está causando numerosos problemas sanitarios incrementando las tasas de morbilidad y mortalidad de la población. Los mecanismos para reducir este aumento de resistencias implican no solo el uso racional de los antibióticos, sino también la eliminación de las bacterias resistentes. Las bacterias resistentes a antibióticos se excretan a través de las aguas residuales, llegando a los medios acuáticos, principal vía de dispersión en el medio ambiente. El presente proyecto tenía como objetivos: 1- Caracterizar la abundancia de bacterias fecales resistentes a antibióticos en medios acuáticos que reciben aguas residuales con diferente carga de antibióticos, 2- Estudiar la capacidad de las depuradoras de aguas residuales para eliminar o potenciar la resistencia a antibióticos, y la importancia de utilizar métodos convencionales o de bajo coste para dicho tratamiento. 3- Estudiar las tasas de variación de la resistencia a antibióticos y de mortalidad bacteriana a lo largo de un río. El estudio demuestra que la actividad de la industria no ha tenido un efecto significativo sobre el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos en las aguas freáticas o en las comunidades humanas afectadas por dicha actividad, ya que los porcentajes de resistencias a antibióticos no difirieron al compararlos con zonas no influenciadas por la industria. Los vertidos de las depuradoras de aguas residuales, tanto de la industria como los vertidos urbanos, tienen un efecto significativo sobre el aumento de bacterias resistentes del cauce receptor. Dicho efecto es aún más importante debido a que potencia el aumento de multiresistencias. Los vertidos de las plantas de tratamiento de las aguas residuales tienden a presentar mayores porcentajes de bacterias resistentes a antibióticos que las aguas de entrada. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el incremento de resistencias cuando se comparan sistemas convencionales (fangos activados) con sistemas de bajo coste (humedales construidos). Las diferencias en el diseño de los humedales tampoco supuso una diferencia estadísticamente significativa en la variación de bacterias resistentes presentes en sus respectivos efluentes.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La resistencia a antibióticos como estrategia adaptativa de las bacterias

La resistencia a antibióticos es uno de los aspectos de creciente interés en la sanidad humana. El rápido y constatado aumento de infecciones causadas por bacterias patógenas resistentes a antibióticos está produciendo una "carrera de armamento", evolutivamente hablando (Van Valen 1973), en la que el desarrollo de nuevas armas por el hombre (antibióticos), se encuentra por detrás de la

capacidad de los microorganismos para evitar su efecto (aumento de resistencias).

La causa de la resistencia a antibióticos es natural, es decir, las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas producidas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos (Martínez 2009). Pero esta resistencia, o estrategia adaptativa de las bacterias, está potenciada por la actividad humana con el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales. En este caso, el mecanismo selectivo impuesto por el hombre al aumentar la probabilidad de contacto de los antibióticos con las bacterias, ha provocado una rápida selección de las poblaciones bacterianas, favoreciendo aquellas resistentes (Alonso *et al.* 2001). Aunque la resistencia a antibióticos puede aparecer en ausencia de antibiótico por mutación genética (Henriques *et al.* 2006), ha sido el uso excesivo de antibióticos el que ha provocado un incremento alarmante de resistencias que incluso ha llevado a adoptar medidas legales restringiendo su libre adquisición (Kümmerer 2004).

Este uso de antibióticos y el consecuente incremento de bacterias resistentes conllevan un aumento en la excreción, tanto de bacterias resistentes como de antibióticos al medio ambiente, a través fundamentalmente de las aguas residuales. La emisión de bacterias al medio acuático favorece también el intercambio genético con poblaciones previamente no resistentes, lo que aumenta la dispersión de esta capacidad resistente en las bacterias del medio ambiente (Davison 1999).

### 1.2. Influencia de la actividad humana sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio ambiente

La producción industrial de antibióticos genera residuos líquidos en los que se encuentra un alto porcentaje de actividad antibiótica (Bécares 1995). Estos efluentes han sido emitidos al ambiente durante decenas de años antes de que se adoptasen medidas para su tratamiento. Durante este tiempo las aguas residuales de estos vertidos han sido utilizadas, bien directamente, o bien indirectamente a través de aguas contaminadas, como aguas de riego de cultivos. Por otra parte, y dado el largo periodo de ausencia de tratamiento de vertidos en las zonas afectadas por dichas industrias, cabría esperar que la presencia de una industria productora de antibióticos pudiera haber tenido un impacto sobre las comunidades bacterianas de los ecosistemas acuáticos, tanto superficiales (ríos, arroyos) como subterráneos (aguas freáticas).

Por otra parte, el uso de aguas residuales para el riego de cultivos, así como la potencial afección de las aguas freáticas por la actividad industrial relacionada con la producción de antibióticos podrían haber influido en la proporción de bacterias resistentes a antibióticos encontradas en estas zonas, en comparación con zonas no afectadas por dicha actividad.

Parte del presente proyecto intentará comprobar si las aguas freáticas y efluentes residuales de pueblos cercanos a una industria de producción de antibióticos presentan niveles de resistencia a antibióticos diferentes de los de otras zonas no directamente afectadas por dicha actividad.

### 1.3. Supervivencia de las bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos

Las bacterias resistentes llegan a los ríos a través de las aguas residuales. Uno de los aspectos de interés es conocer la capacidad de estas bacterias para sobrevivir en condiciones naturales así como para intercambiar material genético en dichos ambientes. Aunque la mortalidad natural de las bacterias patógenas o sus indicadores es muy elevada en los medios extraenterales, su gran abundancia (valores de  $10^5$ - $10^{10}$  UFC/ml en aguas residuales) (McFeters *et al.* 1990) y las condiciones ambientales (turbidez, temperatura, etc.) pueden mantener viables a estas poblaciones durante mucho tiempo (Davies-Colley *et al.* 1999).

En el presente trabajo se pretende estudiar la viabilidad de estas bacterias resistentes a antibióticos a lo largo de un río que recibe dos vertidos de diferente naturaleza. Por un lado el vertido de las aguas residuales domésticas ya tratadas, y por otro el vertido de las aguas residuales de una industria productora de penicilinas y cefalosporinas. El objetivo será conocer las tasas a las que los principales grupos de bacterias fecales (coliformes totales, *E. coli*, enterobacterias y clostridios sulfito reductores) desaparecen con la distancia, y comparar si esta tasa de desaparición es paralela a la tasa de desaparición de la resistencia a antibióticos en las bacterias supervivientes. A través de pruebas cruzadas con diferentes antibióticos se estudiará además la variación en la multiresistencia, una prueba de la existencia de intercambio genético dentro de las mismas poblaciones de bacterias fecales del río, tanto las suspendidas en el agua como las retenidas en los sedimentos. Los estudios de resistencias irán acompañados del análisis químico de los antibióticos potencialmente presentes, tanto en las aguas residuales brutas como en el río.

### 1.4. Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos. Papel de las depuradoras de aguas residuales

Uno de los métodos para destruir bacterias patógenas, o sus grupos indicadores, de las aguas residuales es su tratamiento en plantas depuradoras. Las depuradoras presentan condiciones hostiles para la supervivencia de dichas bacterias debido a su temperatura ambiente, condiciones físico-químicas de los reactores, y por la gran abundancia de depredadores (organismos bacterívoros y virus). En general las depuradoras reducen en 1-3 log la abundancia de bacterias del agua de entrada (Hirata *et al.* 2003). Sin embargo, esta reducción en la abundancia de bacterias no va acompañada de una reducción de bacte-

rias resistentes, sino al contrario. Las depuradoras convencionales de tratamientos de aguas residuales (fangos activados) tienden a aumentar el porcentaje de bacterias resistentes en su efluente como consecuencia de la gran abundancia de bacterias en el reactor biológico, y del tiempo de contacto entre ellas, lo que incrementa las tasas de intercambio genético (conjugación, transformación y transducción), y por tanto el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos (Da Costa *et al.* 2006).

Los sistemas de fangos activados, debido a su excesivo coste, son sustituidos en zonas rurales por sistemas de bajo coste como filtros percoladores o sistemas extensivos como lagunajes o humedales construidos. Otro de los objetivos del estudio es el de comparar los sistemas convencionales de fangos activados con sistemas de bajo coste como los humedales construidos. Ambos sistemas se diferencian en los tiempos de retención celular, densidad de bacterias dentro de los reactores y exposición a condiciones ambientales (Ferrer *et al.* 2007).

En este estudio se pretende saber si los sistemas "naturales" de tratamiento de aguas residuales tienen la misma capacidad de incrementar las tasas de resistencia que los sistemas convencionales, y cual es el papel de los diferentes elementos de diseño (tipo de planta utilizada, flujo hidráulico empleado) sobre dicho aspecto. Esta demostrado que los sistemas naturales son más eficaces que los convencionales en la eliminación de bacterias indicadoras de contaminación fecal y patógenas (García y Bécars 1997), pero no existen evidencias que cuantifiquen la capacidad para intercambiar genes resistentes a antibióticos dentro de dichos procesos.

Por otro lado, aunque la capacidad de los procesos convencionales para la eliminación de compuestos farmacéuticos como los antibióticos es ya bastante conocida (ej. Hijosa-Valsero *et al.* en prensa), las evidencias sobre el papel de los sistemas de bajo coste para eliminar antibióticos son aún inéditas.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Zona de muestreo de vertidos urbanos y pozos

La zona de estudio estuvo situada al sur de la ciudad de León, en las inmediaciones del río Bernesga, zona en la que se encuentra la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de León y su Alfoz, y el vertido de una industria productora de Antibióticos (AB) dedicada a la elaboración de cefalosporinas y penicilinas, y que aunque en la actualidad también cuenta con su propia estación depuradora de aguas residuales industriales, vertió durante décadas sus efluentes directamente al citado río.

Con el fin de estudiar la potencial influencia de dicha actividad sobre las aguas residuales de los pueblos cercanos, así como sobre las bacterias presentes en las aguas subterráneas, se realizaron muestreos en las aguas residuales de ocho pueblos (Figura 1). Cuatro de dichos pueblos están situados en la margen izquierda del río,

debido a su mayor altitud y a la distancia de la industria, cabe esperar que tanto los campos de riego como otra actividad humana apenas hayan estado afectados por la contaminación industrial. Otros cuatro pueblos están situados en la margen derecha del río, y la mayoría de ellos han utilizado durante décadas las aguas contaminadas del río, e incluso los mismos vertidos, como aguas de riego de prados y cultivos.



Figura 1. Localización de los vertidos muestreados.

Por otra parte se muestrearon pozos de riego o de abastecimiento situados también en ambas márgenes del río (Figura 2) Los pozos situados en la margen izquierda del río están ubicados a una altitud mayor que los de la margen derecha y las aguas freáticas no están por tanto afectadas por la actividad industrial. Los pozos tenían profundidad hasta la lámina de agua no superior a 5 m. lo que asegura el flujo superficial del acuífero.



Figura 2. Localización de los pozos muestreados.

En el río se fijó un punto de muestreo antes y después de cada vertido (AB y EDAR), y dos aguas abajo a diferente distancia, en total en el que se tomaron muestras tanto de agua, como de sedimento, y en los que se midieron los diferentes parámetros físico-químicos. Así mismo se tomaron muestras y se hicieron mediciones de los dos vertidos.

## 2.2. Toma de muestras de agua y sedimentos del río Bernesga

Las muestras de agua y sedimentos se tomaron los días 24, 30 y 31 de agosto de 2010 ( $n=3$ ), entre las 9.00h y las 13.00h. No se registraron lluvias durante la campaña de toma de muestras ni durante las dos semanas anteriores. Las localidades de muestreo se señalan en la Figura 3. En las localidades Río 1 (Punto 1), Río 2 (Punto 2), Río 3 (Punto 3), Río 4 (Punto 4), Río 5 (Punto 5) y Río 6 (Punto 6), se recogieron muestras a lo largo de un transecto que cruzaba el río de orilla a orilla. En el caso de las muestras de agua, se cogían 1000 ml en cada punto del transecto. En el caso de las muestras de sedimento, se utilizó un cilindro de metacrilato de 9 cm de diámetro y 50 cm de longitud para extraer el material. Después, todas las muestras correspondientes a la misma localidad se mezclaban para conseguir una muestra integrada, tanto de agua como de sedimento.



Figura 3. Distribución de los puntos de muestreo en el río. (Distancias acumuladas en metros).

Las muestras de las localidades Vertido Antibióticos y Vertido EDAR corresponden a tuberías de desagüe de la fábrica de antibióticos y de la EDAR de León, respectivamente. En estos dos casos, únicamente se recogieron muestras de agua (ya que no existían sedimentos) de manera puntual.

Las muestras acuosas destinadas al análisis de antibióticos se guardaban en botellas de vidrio de color ámbar de 1000 ml. Las muestras acuosas recogidas para el análisis de los parámetros convencionales de calidad de las aguas (DQO, DBO<sub>5</sub>, SST y SSV) y las muestras de sedimento se guardaron en frascos de plástico de 1000 ml. Todas estas muestras se enviaron refrigeradas al laboratorio (4°C), donde fueron procesadas en un plazo inferior a 24 h.

Las medidas de temperatura, pH, oxígeno disuelto, potencial redox y conductividad se realizaron in situ empleando sondas de electrodos (WTW, Weilheim, Alemania).



Foto 1. Toma de muestras. Core de sedimento.

### 2.3. Análisis de Antibióticos en agua y sedimentos del Río Bernesga

Los análisis se realizaron en el Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, bajo la coordinación del Dr. Roberto Romero González. El método de análisis se describe brevemente a continuación. Se filtraron 1000 ml de agua de río a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Albet, Sant Boi de Llobregat, España). Se añadió ácido fórmico hasta  $\text{pH} = 3$ . A continuación se realizó una extracción en fase sólida con cartuchos *Oasis HLB 200 mg 6 ml* (Waters, Milford, MA, EEUU), previamente acondicionados con 5 ml de metanol y 5 ml de agua a  $\text{pH} = 3$  (acidificada con ácido fórmico). Las muestras de agua se hicieron pasar por los cartuchos con un flujo aproximado de 5  $\text{ml min}^{-1}$  y a continuación se dejaron secar los cartuchos durante 1 h. Seguidamente, se eluyeron los cartuchos por gravedad con 10 ml de metanol. Este metanol se evaporó hasta llegar a

sequedad empleando una corriente suave de gas nitrógeno. El residuo seco se recompuso en 1 ml de una mezcla (1:1) compuesta por metanol y una disolución acuosa de ácido fórmico 0,01 %. Esta muestra se analizó mediante un cromatógrafo de líquidos de ultra presión (UHPLC) acoplado a un triple cuadrupolo.

En lo correspondiente al análisis de sedimentos, en primer lugar se secó el sedimento a 30°C en una estufa Modelo 374-A (P-Selecta, Abrera, España) durante 24 h hasta eliminar el agua. Se tomaron 2 g de sedimento seco y se les añadieron 10 ml de acetonitrilo, 1 ml de una disolución de ácido cítrico 1 M a  $\text{pH} 4$  y 0,5 ml de una disolución de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0,5 M. La mezcla se homogeneizó durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos y a continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó y se guardó, mientras que el precipitado se desechó. Este líquido se evaporó hasta llegar a sequedad empleando una corriente suave de gas nitrógeno. El residuo seco se recompuso en 1 ml de una mezcla (1:1) compuesta por metanol y una disolución acuosa de ácido fórmico 0,01 %. Esta muestra se analizó mediante un cromatógrafo de líquidos de ultra presión (UHPLC) acoplado a un triple cuadrupolo.

Los disolventes acetonitrilo, metanol (Labscan, Dublín, Irlanda), agua *Milli-Q* (Millipore, Billerica, MA, EEUU) eran todos de calidad HPLC. Los reactivos ácido cítrico (Merck, Darmstadt, Alemania),  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (Panreac, Castellar del Vallès, España) y ácido fórmico (VWR, West Chester, PA, EEUU) eran de calidad analítica. Se utilizó arena de mar como sedimento de referencia para el análisis de sedimentos.

### 2.4. Parámetros convencionales de calidad de las aguas

La demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ), los sólidos en suspensión totales (SST) y los sólidos en suspensión volátiles (SSV) se determinaron, respectivamente, según los procedimientos 5220 C, 5210 B, 2450 D y 2540 E, descritos en Standard Methods (APHA, 2005).

### 2.5. Muestreo de las variables microbiológicas

Tanto las muestras de agua (río, pozos, vertidos y humedales construidos) como las de sedimentos fueron procesadas en el mismo día que fueron tomadas para su análisis microbiológico, se analizaron indicadores fecales, esto es *E. coli*, Coliformes Totales (CT), *Enterococcus*, y Clostridios sulfitorreductores.

Para la cuantificación de CT, *E.coli* y *Enterococcus* las muestras de agua fueron diluidas con solución fisiológica de NaCl (0,4%) y filtradas en filtros de membrana (S-Pak Membrane Filters, Millipore HAWG04756). Se filtraron dos replicas de cada muestra y el filtro fue colocado sobre el medio de cultivo e incubado durante 24h (*E. coli* y CT), o 48h (*Enterococcus*). En el caso de los sedimentos se rea-

lizo un resuspensión previa de las bacterias mezclando el sedimento con búfer PBS (50/50 p/v) y recogiendo el sobrenadante, que fue tratado igual que una muestra de agua. Para cuantificar los Clostridios se homogeneizaron 2ml de agua (o de la resuspensión en PBS en el caso de los sedimentos) con el medio de cultivo y se incubó en una cámara de anaerobiosis durante 24 h.

Los medios de cultivo utilizados fueron; Chomocult coliform agar (Merck 1.10426.0500) para *E. coli* y CT, un medio cromogénico selectivo que discrimina en la misma placa esos dos grupos según el color de la colonia, para *Enterococcus* se usó agar SB (*Membrane-filter enterococcus selective agar* acc. to Slanetz and Barley, Merck 1.05262.0500), y para Clostridios sulfitorreductores agar SPS (Agar selectivo para *perfringens* según ANGELOTTI, Merck 1.10235.0500).

## 2.6. Análisis de la resistencia a antibióticos

El estudio de las resistencias a antibióticos se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes, dilución en placa, y mediante difusión en agar.

### Dilución en placa

Este método consiste en diluir el antibiótico directamente en el medio, para obtener una concentración determinada que inhiba el crecimiento de las bacterias sensibles (Schwartz, 2003). Mediante este método se analizaron las resistencias de cada grupo bacteriano (excepto Clostridios) a dos antibióticos, Amoxicilina (A) y Cefalexina (C). La Amoxicilina fue preparada diluyendo Amoxicilina trihidrato (Fluka 31586) en agua, la Cefalexina se preparó diluyendo Cefalexina en polvo en agua. Una vez preparadas soluciones stock de 1000 µg/ml, estas se diluyeron directamente en los medios de cultivo (Chomocult y Agar SB), alcanzando concentraciones finales de 25 µg/ml para Cefalexina y 50 µg/ml para Amoxicilina. El número de colonias que crecen en las placas con antibiótico son comparadas con las placas control de medio sin antibiótico con el fin de conocer el porcentaje de bacterias resistentes. En el caso de los humedales construidos solo se probó la resistencia a Amoxicilina, pero se aplicaron dos concentraciones diferentes al medio, 5 y 50 µg/ml (CT y *E. coli*) o 1 y 10 µg/ml (*Enterococcus*).

### Difusión en agar

Este método permite la clasificación de las bacterias en tres grupos según su resistencia a un determinado antibiótico, sensible, intermedio o resistente (Fernandes Cardoso de Oliveira y Watanabe Pinhata, 2008). Consiste en la colocación de discos con diferentes concentraciones de cada antibiótico en una placa ya cultivada, y en la que el antibiótico se difunde en el agar creando halos de inhibición que pueden ser medidos. Para su realización se to-

maron colonias aisladas de *E. coli* provenientes de la filtración en membrana y con ellas se inoculó un caldo de enriquecimiento de soja triptacaseína (TSB, 1224.00, Conda/Pronadisa), incubado durante 18h para aumentar su concentración. Tras la incubación este caldo se sembró con las bacterias crecidas en Agar Mueller-Hinton (1058.00, Conda/Pronadisa). Sobre este cultivo se depositaron los discos con antibiótico y tras incubarlo durante 24h se midieron los halos de inhibición del crecimiento creados por el antibiótico.

Los discos antibióticos utilizados fueron: dos β-lactámicos (Penicilina, 10U y Ampicilina, 10µg), dos tetraciclinas (Doxiciclina, 30µg y Tetraciclina, 30µg), dos macrólidos (Eritromicina, 15µg y Azitromicina, 15µg), y un aminoglucosido (Streptomycin, 10µg), (BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs, BD).

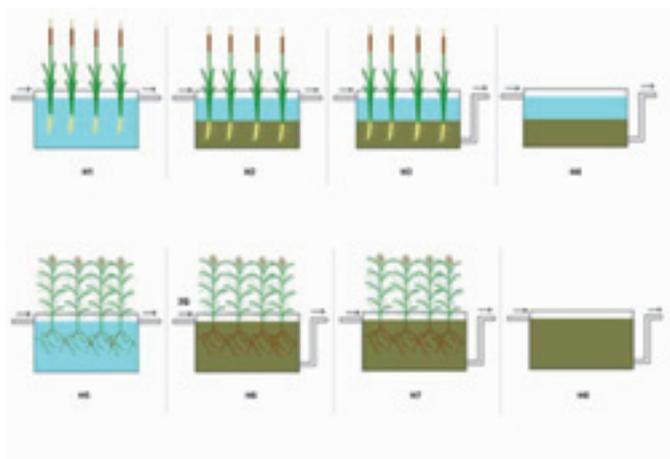
Las colonias que mostraban un comportamiento “resistente” o “intermedio” fueron clasificadas como resistentes, de otro modo como “sensibles” (Constanzo, 2005).

## 2.7. Eliminación de bacterias en sistemas naturales de tratamiento (humedales construidos)

Además de los muestreos realizados a lo largo del río, se tomaron muestras de la planta depuradora de macrófitos acuáticos (Humedales construidos) situada en las instalaciones de la EDAR de León y consistente en 8 tanques de 1 m<sup>2</sup> cada uno con diferente tipo de planta y diseño (Figura 4). Cada tanque simula un sistema y condición diferente de diseño, tal como se indica a continuación:

- H1 y H5: cultivos hidropónicos de espadaña (*Typha angustifolia*) y carrizo (*Phragmites australis*), respectivamente.
- H2: Sistema de lámina de agua libre con flujo superficial (FWS) plantado con espadaña
- H3: Sistema de lámina de agua libre con flujo subsuperficial (FWSSF) plantado con espadaña
- H4: Sistema de lámina de agua libre con flujo superficial, sin plantar (control del H3)
- H6: Sistema de flujo subsuperficial (SSF) plantado con carrizo y con triple carga que el resto de sistemas.
- H7: Sistema de flujo subsuperficial (SSF) plantado con carrizo.
- H8: Sistema de flujo subsuperficial sin plantar (control del H7)

El objetivo del experimento es comparar los diseños más utilizados de humedales construidos con el fin de estudiar si alguno de ellos puede afectar a la eliminación de antibióticos, o a la generación de bacterias resistentes a antibióticos, y comparar ambos aspectos con un sistema convencional de tratamiento como es el de los fangos activados.



**Figura 4.** Esquema de los tanques experimentales simulando diferentes diseños de humedales construidos.



**Foto 2.** Vista del sistema experimental de humedales construidos en verano.

## 2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron comparados entre sí usando el test no paramétrico U de Mann-Whitney o la prueba no

paramétrica de Kruskal-Wallis con el programa informático Statistica v8.0 (Statsoft Inc.)

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Variables convencionales de calidad de las aguas

Los valores de DQO,  $DBO_5$ , SST y SSV medidos en las muestras acuáticas se indican en la Figura 5. Los valores de estos parámetros son constantes y similares en todas las localidades, con la excepción del Vertido Antibióticos. Este vertido se caracteriza por presentar valores relativamente altos de DQO, SST y SSV (regulados por la Resolución de 20 de abril de 2009 de Castilla y León). A pesar de ello, la descarga de estas aguas residuales no hizo incrementar de manera notable las concentraciones de DQO, SST y SSV en el río (Punto 2, Figura 5). Esto se debe, en gran medida, al efecto de dilución que se produce, dado que el caudal del río en el Punto 1 ( $1,24-1,79 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) es muy superior al caudal del Vertido Antibióticos ( $0,09 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Por otra parte, el vertido de la EDAR de León es un vertido con una carga muy baja de DQO,  $DBO_5$  y sólidos en suspensión, ya que se trata del agua de salida de una EDAR que debe cumplir los requisitos de la Directiva 91/271/CE; y por ello, a pesar de su gran caudal ( $1,24 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ), no afecta en exceso al cauce del río, al menos en lo concerniente a estos contaminantes (es decir, no se observa un gran aumento en las concentraciones del Punto 4 con respecto al Punto 3, véase la Figura 5).

La comparación de las variables indica que el vertido de antibióticos presenta una alta concentración de sólidos y DQO, pero relativamente baja proporción de  $DBO_5$ , en comparación con el vertido de la EDAR municipal. Ello parece indicar que el vertido de antibióticos presenta una alta proporción de materia orgánica no biodegradable, en una relación de 10/250, es decir que sólo el 4% de la materia orgánica del vertido de la industria de antibióticos es biodegradable, siendo la mayor parte materia orgánica particulada.

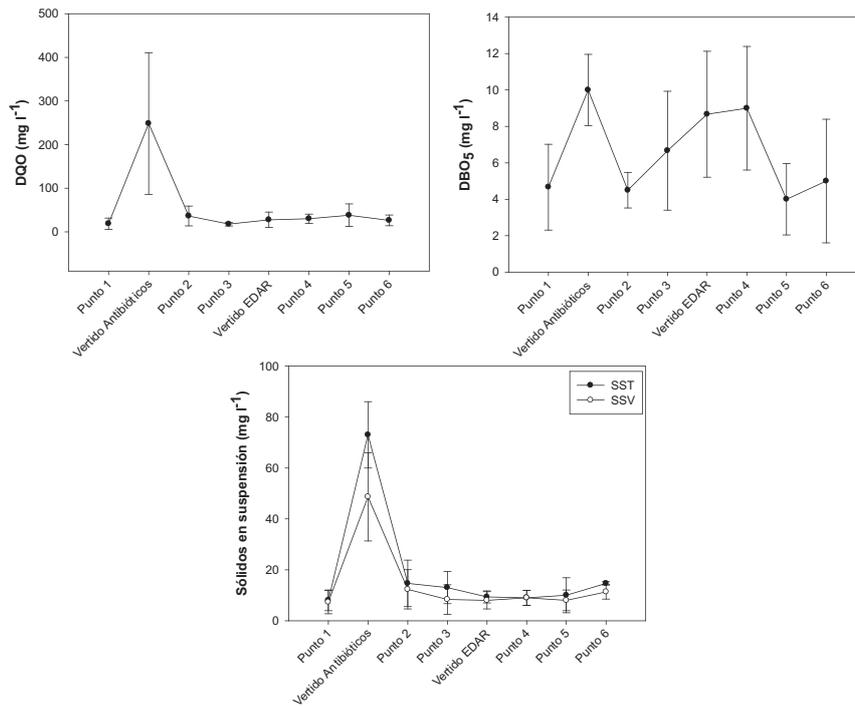


Foto 5. Concentraciones medias de los parámetros convencionales de calidad de las aguas (DQO, DBO5, SST y SSV) en el río Bernesga. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95%.

### 3.2. Concentración de antibióticos en el río

Tanto en las muestras de agua como en las muestras de sedimentos, se estudió la presencia de diferentes antibióticos pertenecientes a las familias de las avermectinas (emamectina, ivermectina), los bencimidazoles (oxfendazol, mebendazol, albendazol, fenbendazol, tiabendazol), los β-lactámicos (penicilinas: amoxicilina, ampicilina, penicilina V, penicilina G, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina; y cefalosporinas: cefepime, ceftriaxona, ceftadizima), una diamina asociada a las penicilinas (benzatina), los derivados del imidazotiazol (levamisol), los macrólidos (tilmicosina, tilosina, eritromicina, josamicina), las quinolonas (marbofloxacina, enrofloxacina, danofloxacina, difloxacina, sarafloxacina, ácido oxolínico, flumequine), las butirofenonas (griseofulvin), las sulfamidazoles (sulfadimidina, sulfadiazina, sulfacloropiridoxina, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina), sustancias asociadas a las sulfamidazoles (trimetoprim) y las tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina).

En la tabla del Anexo se recogen las propiedades físico-químicas de los antibióticos detectados tanto en las muestras de agua como en las muestras de sedimentos.

#### Antibióticos en el agua de río

Las únicas sustancias detectadas en el agua del río Bernesga fueron enrofloxacina, danofloxacina, difloxacina, sarafloxacina, flumequine (quinolonas), oxitetraciclina, clortetraciclina (tetraciclinas), oxacilina (β-lactámico, penicilina) y benzatina (sustancia asociada a las penicilinas). En la tabla 1 pueden verse las concentraciones de cada compuesto en las diferentes localidades. Las sustancias más abundantes eran la enrofloxacina y la benzatina.

Tabla 1. Concentración de antibióticos (µg/l) en el agua del río Bernesga. Media e intervalo de confianza del 95%. Datos de los días 24, 30 y 31 de agosto de 2010 (n=3).

	Enrofloxacina	Danofloxacina	Difloxacina	Sarafloxacina	Flumequine	Oxitetraciclina	Clortetraciclina	Oxacilina	Benzatina
Río 1	0,52 ± 0,85**	<0,07	<0,07	0,07	0,17*	<0,07	<0,07	<0,07	0,19*
Vertido Antibióticos	3,37*	<0,07	0,09*	0,64 ± 0,21**	0,67*	0,46*	<0,07	<0,07	0,77*
Río 2	0,34*	0,018*	0,22*	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	0,16*	0,07*
Río 3	0,19*	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
Vertido EDAR	1,50 ± 2,15***	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	0,50*	0,24*	<0,07	1,69 ± 2,73**
Río 4	0,32 ± 0,34***	<0,07	<0,07	0,07*	0,18*	0,15*	<0,07	<0,07	4,32*
Río 5	0,44 ± 0,21**	<0,07	0,24*	0,17*	0,09 ± 0,04**	<0,07	<0,07	<0,07	2,43*
Río 6	0,61 ± 0,83**	<0,07	<0,07	<0,07	0,09 ± 0,06***	<0,07	<0,07	<0,07	0,70 ± 0,99**

Notas: \* La sustancia sólo fue encontrada en una de las muestras. \*\* La sustancia fue detectada en dos muestras. \*\*\* La sustancia fue detectada en las tres muestras.

Los elevados límites de detección del método utilizado impiden conocer las concentraciones de antibióticos por debajo de 0,07 ppb (límite de detección de la técnica). En general, tanto el vertido de antibióticos como el de la EDAR de León presentan un número mayor de antibióticos que los encontrados en el primer punto del río lo que demuestra que dichos vertidos son fuente de antibióticos a las aguas naturales. No obstante, tanto la enrofloxacin como el flumequine y la benzatina fueron detectados en el primer punto de muestreo, pese a estar alejado del primer vertido que pudiera afectarle.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no son muy diferentes de los de otros investigadores. En la bibliografía consultada, las **quinolonas** resultaron uno de los grupos más frecuentes en las muestras analizadas. La enrofloxacin se ha detectado en aguas de río en concentraciones de 0,30 µg/l en Australia (Watkinson *et al.*, 2009) y algo menores en Portugal, de 67-100 ng/l (Pena *et al.*, 2007). En cambio otros estudios no han podido detectar este compuesto en aguas fluviales de EEUU (Kolpin *et al.*, 2002) y Francia (Tamtam *et al.*, 2008, 2009). La danafloxacin ha sido detectada en ríos franceses con concentraciones medias de 0-19 ng/l (Tamtam *et al.*, 2008). La difloxacin y la sarafloxacin son sustancias fotodegradables (Prabhakaran *et al.*, 2009) y no han sido detectadas en varios estudios llevados a cabo con agua de ríos de Francia (Tamtam *et al.*, 2008, 2009) y EEUU (Kolpin *et al.*, 2002). El flumequine ha sido analizado en agua de ríos de Francia, donde se detectaron concentraciones de 0-18 ng/l (Tamtam *et al.*, 2008, 2009). La presencia de los antibióticos del grupo de las **tetraciclina**s en el medio ambiente ha sido objeto de numerosos estudios. La oxitetraciclina ha sido detectada en muestras de agua fluvial de todo el planeta en concentraciones variables: 0-0,34 µg/l en EEUU (Arikan *et al.*, 2008; Kim y Carlson, 2007; Kolpin *et al.*, 2002; Yang y Carlson, 2003), 0,2-2 µg/l en China (Liu *et al.*, 2009), 0,07-0,10 µg/l en Australia (Watkinson *et al.*, 2009), 0-0,68 µg/l en Francia (Feitosa-Felizzola y Chiron, 2009), 0-10 ng/l en Taiwán (Lin y Tsai, 2009) y 0-1,82 ng/l en Italia (Zuccato *et al.*, 2010). Del mismo modo, la clortetraciclina es un contaminante abundante en las aguas superficiales del mundo: se han detectado concentraciones de 0-0,69 µg/l en EEUU (Kolpin *et al.*, 2002; Yang y Carlson, 2003), de 0,60 µg/l en Australia (Watkinson *et al.*, 2009) y de 0-100 ng/l en Taiwán (Lin y Tsai, 2009). Los antibióticos **β-lactámicos** son medicamentos muy consumidos en España. Además, han sido detectados en aguas superficiales de diferentes países. Se han medido concentraciones

de oxacilina de 10 ng/l cerca de una EDAR en EEUU (Cha *et al.*, 2006).

En un trabajo anterior, Hijosa-Valsero *et al.* (en prensa) estudiaron la concentración de antibióticos en la entrada y salida de la EDAR de León durante el invierno. En este caso el método empleado permitió alcanzar ppt, lo que evidenció la presencia de antibióticos no encontrados en el presente estudio.

**Tabla 2.** Concentración media (ng l<sup>-1</sup>) e intervalo de confianza (0.95) de la concentración de antibióticos en la entrada (influyente) y salida (Efluente) de la EDAR de León (Hijosa-Valsero *et al.* en prensa).

	Influent	WWTP effluent
Doxycycline	180 ± 83	70 ± 30 (61 ± 38)
Amoxicillin	46000 ± 14000	30000 ± 12000 (35 ± 17)
Ampicillin	690 ± 81	640 ± 170 (7 ± 2)
Clarithromycin	250 ± 84	200 ± 60 (18 ± 9)
Erythromycin	57 ± 26	65 ± 28 (n.r.)
Lincomycin	6 ± 3	5 ± 1 (24 ± 9)
Sulfamethoxazole*	260 ± 110	160 ± 46 (60 ± 26)
N-acetyl-sulfamethoxazole*	360 ± 110	92 ± 19
Sulfadimethoxine**	3100	1500 (53 ± 30)
Trimethoprim	100 ± 26	89 ± 20 (14 ± 5)

### Antibióticos en los sedimentos de río

Los antibióticos detectados en los sedimentos del río Bernesga fueron trimetoprim (sustancia asociada a las sulfamidas), enrofloxacin, difloxacin, sarafloxacin, flumequine, ácido oxolínico (quinolonas), oxitetraciclina, doxiciclina (tetraciclina), griseofulvin (butirofona), penicilina V (β-lactámico, penicilina) y benzatina (sustancia asociada a las penicilinas). Sus concentraciones en cada localidad estudiada se muestran en la tabla 3. La sustancia más común era la enrofloxacin. La adsorción de las moléculas estudiadas a los sedimentos depende de las propiedades físico-químicas de los compuestos, especialmente los valores de log K<sub>ow</sub> y log K<sub>oc</sub> (Tabla Anexo).

En los sedimentos del río, en general, se encontraron sustancias similares a las presentes en el agua. Sin embargo, existían algunas diferencias notables, como la presencia de danafloxacin, clortetraciclina y oxacilina exclusivamente en las muestras acuosas o la detección de trimetoprim, ácido oxolínico, doxiciclina, griseofulvin y penicilina V únicamente en las muestras de sedimentos.

**Tabla 3.** Concentración de antibióticos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en los sedimentos del río Bernesga. Media e intervalo de confianza del 95%. Datos de los días 24, 30 y 31 de agosto de 2010 ( $n=3$ ).

	Trimetoprim	Enrofloxacin	Difloxacin	Sarafloxacin	Ácido oxalínico	Flumequine	Oxitetraciclina	Doxiciclina	Griseofulvin	Penicilina V	Benzatina
Río 1	12,72*	48,27 $\pm$ 8,37**	6,33	<5,00	<5,00	22,17*	13,48*	<5,00	<5,00	<5,00	495,81*
Río 2	8,11*	26,71 $\pm$ 0,53**	19,40 $\pm$ 24,00**	<5,00	<5,00	14,57*	<5,00	<5,00	<5,00	<5,00	257,97*
Río 3	<5,00	18,53*	16,00*	<5,00	6,13*	6,83 $\pm$ 1,57**	6,88*	<5,00	7,14*	<5,00	<5,00
Río 4	9,53*	47,04 $\pm$ 76,28**	6,19*	<5,00	<5,00	18,53*	8,72*	<5,00	<5,00	20,97*	30,11*
Río 5	<5,00	41,49 $\pm$ 14,29**	<5,00	7,02*	5,19*	21,28*	<5,00	<5,00	<5,00	7,17*	31,96*
Río 6	<5,00	57,61 $\pm$ 75,68**	28,70*	6,91*	<5,00	20,93*	22,56*	6,38*	<5,00	<5,00	25,16*

Notas: \* La sustancia sólo fue encontrada en una de las muestras. \*\* La sustancia fue detectada en dos muestras. \*\*\* La sustancia fue detectada en las tres muestras

En este caso, los valores registrados en el presente estudio también coinciden con los que se reflejan en la bibliografía internacional relativa a sedimentos fluviales. Para las quinolonas, en un estudio realizado en Francia (Pouliquen *et al.*, 2009) se encontraron concentraciones de 0-700 ng/g de flumequine y 0-20 ng/g de ácido oxalínico en sedimentos de río. En lo referente al grupo de las **tetraciclinas**, cabe decir que estos antibióticos son muy comunes en los sedimentos debido a su naturaleza química. La oxitetraciclina se ha detectado frecuentemente en sedimentos de diversas partes del mundo en concentraciones de 0-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en China (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010), de 0-8,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en EEUU (Arikan *et al.*, 2008; Kim y Carlson, 2007) y de 0-180 ng/g en Francia (Pouliquen *et al.*, 2009). En estudios

realizados en ríos de EEUU (Arikan *et al.*, 2008; Kim y Carlson, 2007) se han detectado concentraciones de doxiciclina de 0-28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en los sedimentos. El trimetoprim ha sido detectado en China en concentraciones de 34,6 ng/g (Tang *et al.*, 2009).

### 3.3. Indicadores microbianos y resistencia a antibióticos en aguas de pozo y vertidos

A partir de los resultados de los conteos en placa se calcularon los porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos con respecto a los controles en cada margen del río. En las siguientes tablas se pueden observar esos resultados (Vertidos; Tabla 4, Pozos; Tabla 5).

**Tabla 4.** Resistencia a antibióticos en los grupos cultivados a partir de los ocho vertidos analizados.

Grupo Bacterias	Antibiótico	Margen del Río	Media % Resistencias	Desviación Estándar
<i>E. coli</i>	Cefalexina	Derecha	54,0	28
		Izquierda	49,3	34
	Amoxicilina	Derecha	71,0	28
		Izquierda	71,3	31
Coliformes Totales	Cefalexina	Derecha	72,0	33
		Izquierda	74,0	27
	Amoxicilina	Derecha	71,0	30
		Izquierda	59,3	32
<i>Enterococcus</i>	Cefalexina	Derecha	81	20
		Izquierda	84,0	22
	Amoxicilina	Derecha	3	10
		Izquierda	3,7	18

**Tabla 5.** Resistencias a antibióticos en los grupos cultivados a partir de los pozos situados en ambas márgenes del río.

Grupo Bacterias	Antibiótico	Margen del Río	Media % Resistencias	Desviación Estándar
<i>E. coli</i>	Cefalexina	Derecha	0	0
		Izquierda	0	0
	Amoxicilina	Derecha	0	0
		Izquierda	0	0
Coliformes Totales	Cefalexina	Derecha	22,98	24,99
		Izquierda	17,39	15,89
	Amoxicilina	Derecha	54,74	26,3
		Izquierda	37,43	32,03
<i>Enterococcus</i>	Cefalexina	Derecha	52,13	26,76
		Izquierda	56,54	49,80
	Amoxicilina	Derecha	0	0
		Izquierda	16,97	62,33

Tras realizar el análisis estadístico de las diferencias encontradas en las dos márgenes, tanto de los vertidos como de los pozos solo se han hallado diferencias significativas en la resistencia de los Coliformes Totales a Amoxicilina en los pozos, mientras que el caso de los vertidos no se ha detectado ninguna diferencia (Tabla 6).

**Tabla 6.** Valores del estadístico p de la U de Mann-Whitney de las diferencias en la resistencia entre la margen izq. y dcha. del río para cada grupo bacteriano (Diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ ).

G. bacteriano	Antibiótico	Pozos	Vertidos
<i>E. coli</i>	Cefalexina	1,00	0,56
	Amoxicilina	–	0,89
CT	Cefalexina	0,39	0,33
	Amoxicilina	0,00	0,16
<i>Enterococcus</i>	Cefalexina	0,60	0,77
	Amoxicilina	0,14	0,73

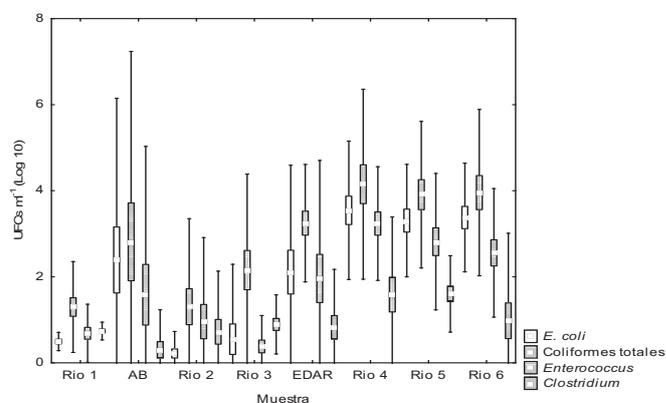
Los resultados demuestran que no hay un efecto de la actividad de la industria sobre las comunidades microbianas de los vertidos domésticos, y escaso impacto sobre las aguas subterráneas.

### 3.4. Comunidades bacterianas del río y resistencia a antibióticos

#### Caracterización de la comunidad bacteriana

Tras la realización de los conteos de bacterias en las placas sin antibiótico (controles) se puede observar cómo tanto la depuradora de antibióticos como la

EDAR de León aportan bacterias al medio receptor, siendo la cantidad de bacterias de todos los grupos mucho mayor (de dos a tres logaritmos de diferencia) a partir del vertido de la EDAR (Puntos Río 4, Río 5, y Río 6) (Figura 6).

**Figura 6.** Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en cada punto de muestreo del río.

Estas diferencias se ven más claramente si la abundancia de bacterias se expresa en relación con el caudal del río y los vertidos (cargas de bacterias). Los caudales se midieron en el punto 1 ( $1,2 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ ) y en el punto 6 ( $3 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ ), los vertidos de AB y la EDAR son conocidos ( $0,09$  y  $1,2 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$  respectivamente), y el resto de puntos del río puede ser calculado (Puntos 2 y 3:  $1,8 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ . Puntos 4 y 5:  $3 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ ). Así se puede observar como el número de bacterias que pasan por cada punto del río es mayor a partir de los vertidos en casi 3 logaritmos de media (Figura 7).

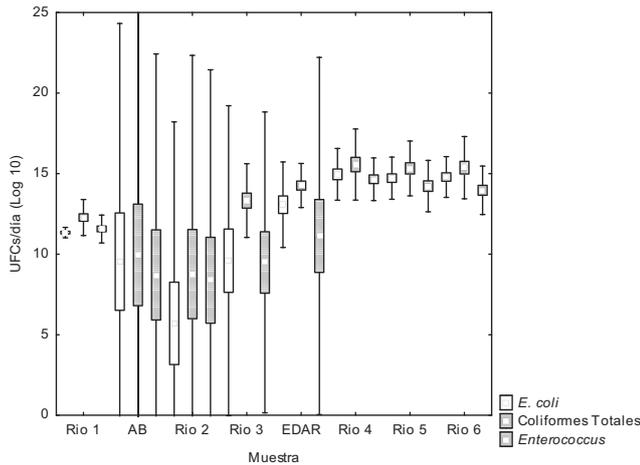


Figura 7. Carga bacteriana (UFCs/día) en cada punto de muestreo.

En el caso de los sedimentos también se observa un incremento sustancial en el número total de bacterias existentes de todos los grupos según se avanza a lo largo del río y se van incorporando los vertidos (Figura 8).

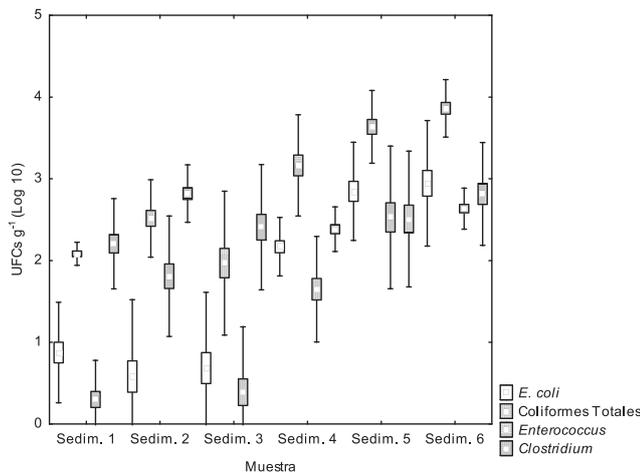


Figura 8. Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en cada punto de muestreo de los sedimentos.

**Análisis de las resistencias**

Además del número total de bacterias que los vertidos aportan al medio receptor, es necesario saber qué porcentaje de esas bacterias son resistentes a antibióticos. Los dos antibióticos ensayados en este estudio corresponden a aquellos que son producidos por la industria y presentes por tanto en sus aguas residuales y en el río.

**Estudio de resistencias por dilución en placa**

Las muestras de agua recogidas durante el periodo de muestreo presentan un patrón de resistencia a los antibióticos dispar, en el caso de la Cefalexina el grupo bacteriano que presenta mayor porcentaje de resistencia es el de los

Coliformes Totales, alcanzando en determinadas muestras valores de hasta el 100% después del vertido de antibióticos, aunque estos porcentajes van disminuyendo a lo largo del río (Figura 9) al contrario de lo que pasaba con el número total de bacterias. En el caso de la Amoxicilina tanto los Coliformes Totales como *E. coli* muestran porcentajes de resistencia bastante elevados, decayendo también según se avanza en el curso del río. No se encontraron *Enterococcus* resistentes salvo en el vertido de la EDAR (Figura 10).

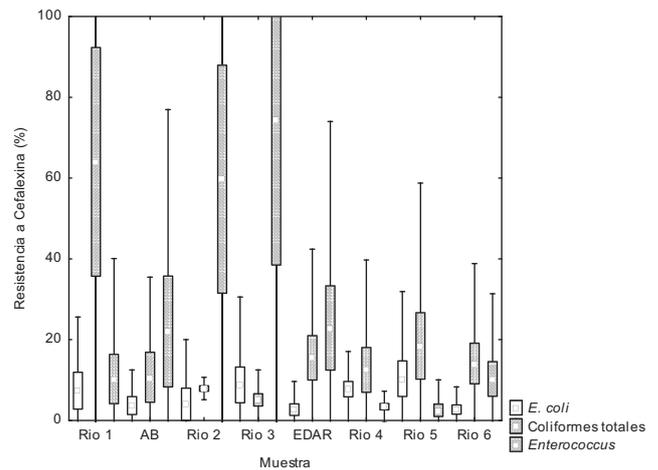


Figura 9. Porcentajes de resistencia a Cefalexina en las muestras de agua del río.

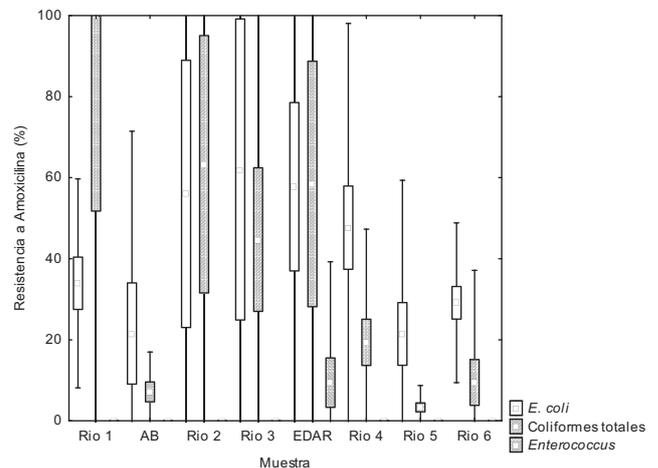


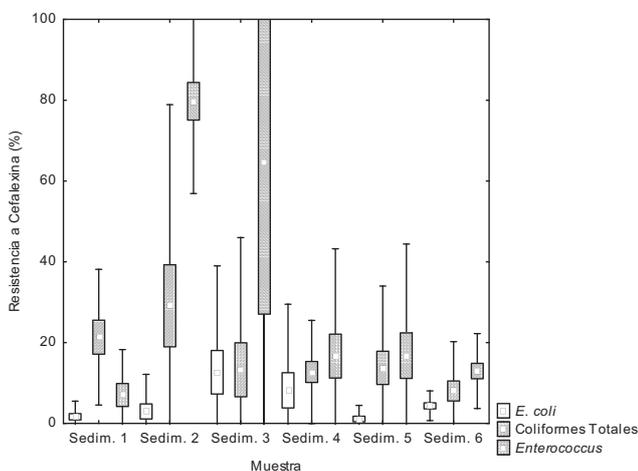
Figura 10. Porcentajes de resistencia a Amoxicilina en las muestras de agua del río.

En la Tabla 7 se pueden ver los valores del estadístico *p* de la prueba de la U de Mann-Whitney para la diferencia entre los diferentes puntos de muestreo del río y los vertidos de AB y la EDAR. En la mayoría de los casos no se observan diferencias significativas, lo que da lugar a pensar que el impacto de los vertidos sobre el cauce receptor es muy variable.

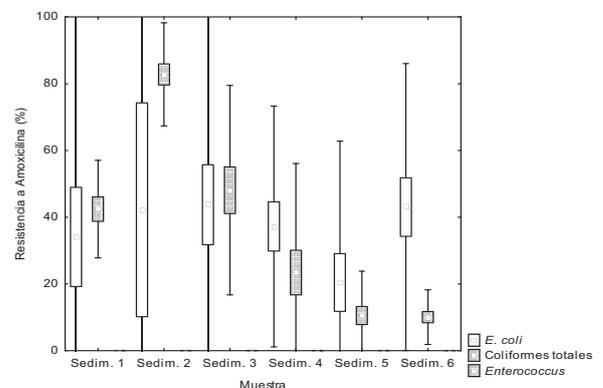
**Tabla 7.** Estadístico  $p$  de la U de Mann-Whitney para la diferencia en el porcentaje de resistencias a Cefalexina y Amoxicilina entre cada punto de muestreo del río (Cefalexina/Amoxicilina) (Diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ ).

		Río 1	AB	Río 2	Río 3	EDAR	Río 4	Río 5
<i>E. coli</i>	AB	0,54/0,56						
	Río 2	0,51/1	0,74/0,54					
	Río 3	0,82/0,39	0,65/0,82	0,4/0,82				
	EDAR	0,5/0,67	0,65/0,28	0,72/0,67	0,55/0,57			
	Río 4	1/0,39	0,2/0,2	0,32/1	0,94/0,33	0,09/0,87		
	Río 5	0,66/0,39	0,27/0,83	0,26/0,66	0,74/1	0,18/0,26	0,87/0,08	
	Río 6	0,66/0,67	0,83/0,83	0,5/1	0,62/0,33	0,87/0,42	0,05/0,2	0,19/0,52
Coliformes totales	AB	0,09/0,06						
	Río 2	0,03/0,67	1/0,08					
	Río 3	0,02/0,42	0,83/0,06	0,29/0,83				
	EDAR	0,15/0,26	0,66/0,17	0,39/0,83	0,26/0,74			
	Río 4	0,04/0,2	0,39/0,09	0,39/0,39	0,52/0,34	0,87/0,63		
	Río 5	0,08/0,00	0,52/0,13	0,83/0,01	0,23/0,02	0,87/0,04	0,75/0,00	
	Río 6	0,15/0,04	0,67/0,45	0,39/0,03	0,08/0,06	0,75/0,13	0,75/0,04	0,75/0,42
<i>Enterococcus</i>	AB	0,2/-						
	Río 2	0,62/-	1/-					
	Río 3	0,08/-	0,39/-	0,46/-				
	EDAR	0,51/0,14	1/0,22	0,62/0,14	0,15/0,14			
	Río 4	0,62/-	0,01/-	0,81/-	0,04/-	0,26/0,14		
	Río 5	0,4/-	0,03/-	0,44/-	0,04/-	0,14/0,14	0,57/-	
	Río 6	1/-	0,39/-	0,62/-	0,11/-	0,51/0,14	0,26/-	0,18/-

En el caso de los sedimentos los patrones son similares a los del agua, para Cefalexina las mayores resistencias se producen tras el vertido de Antibióticos, disminuyendo a lo largo del curso del río, y el grupo bacteriano que mayor porcentaje de resistencias presenta es el de Coliformes Totales (Figura 11), mientras que para la Amoxicilina tanto Coliformes Totales como *E. coli* presentan elevada resistencia, disminuyendo en general a lo largo del curso del río. Tampoco se encontraron *Enterococcus* resistentes a Amoxicilina en los sedimentos (Figura 12).



**Figura 11.** Porcentajes de resistencia a Cefalexina en las muestras de sedimento del río.



**Figura 12.** Porcentajes de resistencia a Amoxicilina en las muestras de sedimento del río.

En la Tabla 8 se pueden ver los valores del estadístico  $p$  de la prueba de la U de Mann-Whitney para comprobar la diferencia entre los diferentes puntos de muestreo de sedimentos. Al igual que en los puntos del río en la mayoría de los casos no se observan diferencias significativas, sin embargo justo después del vertido de AB (punto 2 y 3) si que se puede ver para el grupo de Coliformes Totales que la resistencia a la Amoxicilina es diferente (mayor) de los otros puntos, así como para la Cefalexina en el punto 2 para los *Enterococcus*, lo que da a entender que se están acumulando bacterias resistentes en el sedimento del río justo después del vertido de antibióticos.



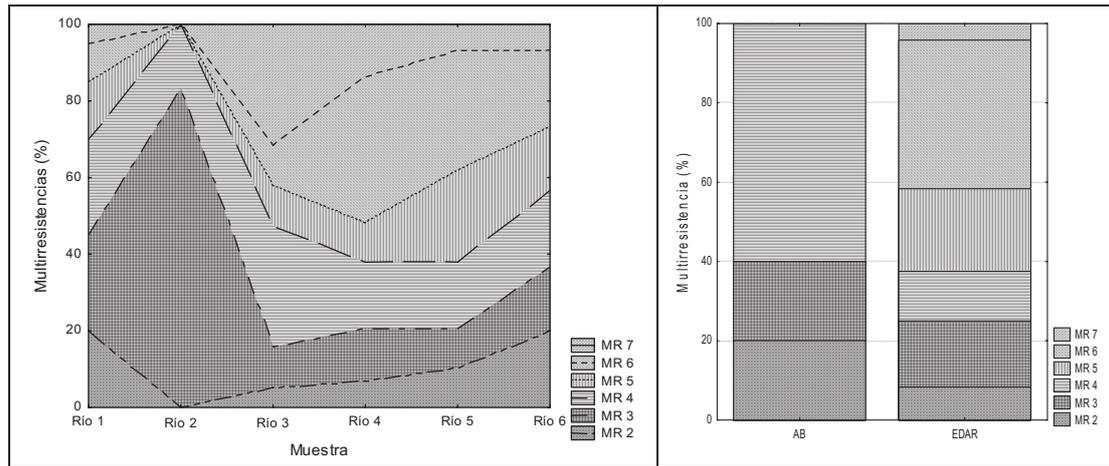


Figura 13. Distribución de los porcentajes de multirresistencia de los puntos muestreados en el río (Izq.) y de los vertidos (Dcha.).

### Patrones de Multirresistencia

A partir de los patrones de resistencia obtenidos por el método de difusión en agar se puede saber a cuantos antibióticos es resistente cada bacteria aislada, permitiendo saber el porcentaje de bacterias que es resistente a 1, 2, 3, ..., 7 antibióticos, dándonos una idea de la existencia de resistencia cruzada a varios antibióticos. En la Figura 13 se puede ver la distribución de estos porcentajes en los puntos del río y de los vertidos. Se observa que en todos los puntos el 100% de las bacterias son resistentes a 2 o más antibióticos, mientras que más del 80% presentan resistencia a 3 o más antibióticos. También se puede apreciar como a partir del punto 3 disminuye drásticamente el porcentaje de resistentes a 3 antibióticos dejando paso a multirresistentes con más de 4 resistencias.

En la Figura 14 se pueden ver los mismos datos para el caso de los sedimentos, el patrón es similar, en el punto 2 prevalecen en este caso los multirresistentes con 4 resistencias, para luego descender su número aumentando el de resistentes a 5 o más antibióticos.

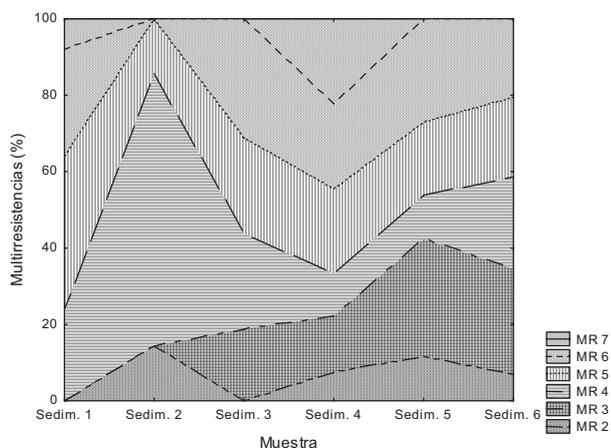


Figura 14. Distribución de los porcentajes de multirresistencia de los puntos muestreados en el sedimento.

Estos datos hacen pensar que las resistencias cruzadas están ampliamente desarrolladas en el ecosistema,

puesto que todas las colonias aisladas fueron resistentes al menos a 2 antibióticos, y muchas de ellas a más de 3 y más de 4, encontrándose también un número significativo de colonias resistentes a todos los antibióticos probados.

### 3.5. Eliminación de bacterias resistentes a antibióticos en humedales construidos

#### Caracterización de la comunidad bacteriana

En los efluentes de los humedales construidos se puede observar la dominancia de los CT como principal grupo bacteriano, seguida de *E. coli* y siendo los *Enterococcus* el grupo menos abundante (Figura 15). En cuanto a la eliminación del número total de bacterias todos los humedales, así como la EDAR presentan diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ) respecto del influente (Infl.) para todos los grupos bacterianos. Asimismo los humedales 3, 4, 7 y 8 eliminan significativamente mejor (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) que la EDAR todos los grupos bacterianos, siendo el H7 la configuración que mejor rendimiento de eliminación presenta.

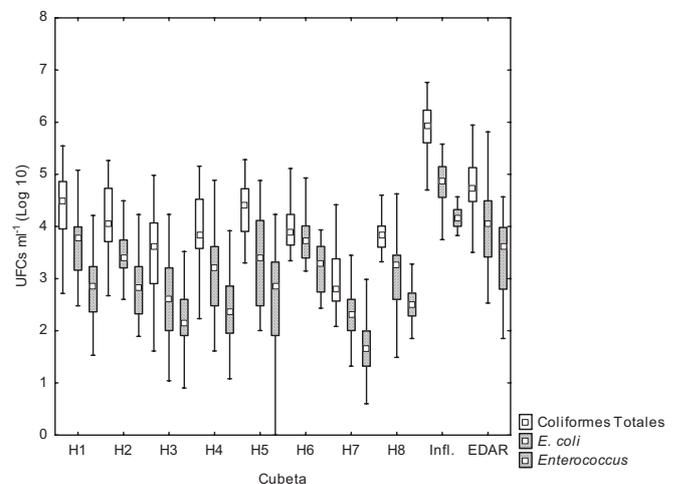
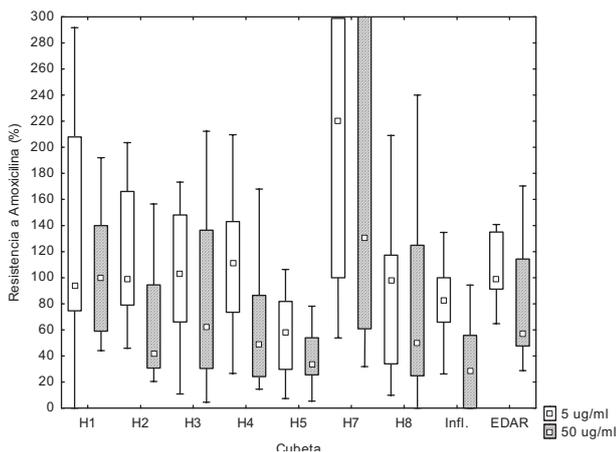


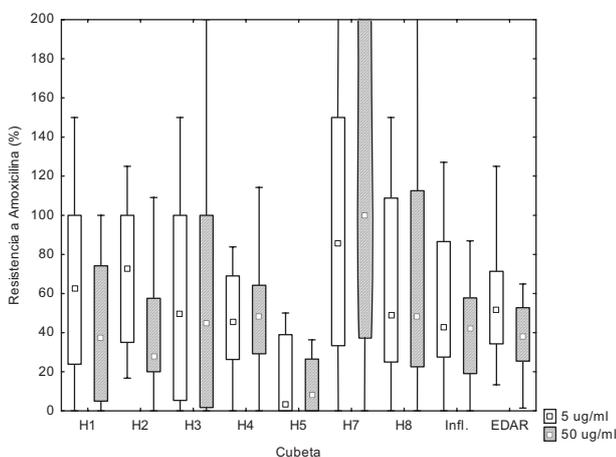
Figura 15. Log 10 de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en los efluentes de los Humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

### Análisis de las resistencias a antibióticos en los humedales construidos

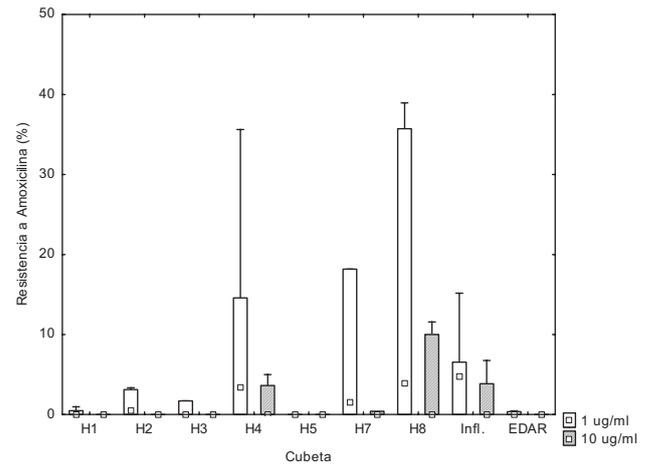
Al realizar los análisis de resistencias de los efluentes de los humedales se comprueba que no presentan tasas de resistencia significativamente diferentes (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ) del efluente de la EDAR ni del influente. Los Coliformes Totales (Figura 16) presentan tasas de resistencia muy altas con valores medios en torno al 100%, y en algunos casos (H7) incluso se observan mayores crecimientos en la placa con antibiótico que en la control. También se observa como un aumento en la concentración de antibiótico se traduce en un menor porcentaje de resistentes. En el caso de *E. coli* (Figura 17) se observan patrones similares entre los diferentes sistemas, pero con tasas de resistencia algo menores, alrededor del 50%. En general también se observa una disminución del porcentaje de resistencias con el aumento de la concentración de antibiótico, pero menor que en el caso de los CT. En los *Enterococcus* (Figura 18) se puede apreciar una sensibilidad mucho mayor al antibiótico, siendo los porcentajes máximos menores del 10%.



**Figura 16.** Porcentajes de Coliformes Totales resistentes a Amoxicilina en los efluentes de los Humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).



**Figura 17.** Porcentajes de *E. coli* resistentes a Amoxicilina en los efluentes de los Humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).



**Figura 18.** Porcentajes de *Enterococcus* resistentes a Amoxicilina en los efluentes de los Humedales construidos (H#), el efluente de la EDAR (EDAR) y el influente de ambos (Infl.).

A pesar de que las resistencias a antibióticos de las bacterias son mecanismos naturales desarrollados por estas como elemento de defensa o estrategia competitiva (Martínez, 2009), la presión selectiva a la que son sometidas por el hombre al ponerlas en contacto con estas sustancias hace que sean favorecidas aquellas que incorporan la resistencia (Alonso *et al.*, 2001). La emisión de bacterias resistentes al medio acuático favorece también el intercambio genético con poblaciones previamente no resistentes (Davison, 1999).

Aunque la mortalidad de las bacterias patógenas o sus indicadores es muy elevada en medios extraenterales, su gran abundancia (McFeters *et al.*, 1990) y determinadas condiciones ambientales pueden mantenerlas viables durante mucho tiempo (Davies-Colley *et al.*, 1999). Este hecho es especialmente relevante en los sedimentos, que actúan como reservorio de bacterias (Fernandes Cardoso de Oliveira y Watanabe Pinhata, 2008; Alm *et al.*, 2003; Howel *et al.*, 1995) debido a la disponibilidad de nutrientes (Davies *et al.*, 1995) a la protección adicional que estos proporcionan frente a la luz (Davies-Colley *et al.*, 1999) y la depredación de los protozoos (Davies y Bavor, 2000). Diversos autores han encontrado una elevada correlación entre la densidad bacteriana en los sedimentos y el agua de diferentes medios (playas y orillas de agua dulce) (Fernandes Cardoso de Oliveira y Watanabe Pinhata, 2008; Alm *et al.*, 2003; Junco *et al.*, 2005), lo que indica la existencia de un flujo continuo de microorganismos entre los dos medios, y por tanto de su material genético (incluyendo los genes de resistencia). Todos estos factores pueden estar influyendo en el hecho de la elevada resistencia en los sedimentos de los puntos 2 y 3, que van disminuyendo a lo largo del río.

En general las depuradoras reducen entre 1 y 3 logaritmos la abundancia de bacterias del agua de entrada (Hirata *et al.*, 2003; Reinthaler *et al.*, 2003), sin embargo, esta reducción no tiene porque ir acompañada de una reducción en el número de bacterias resistentes, sino al contrario, y por tanto aumentando el porcentaje de bacterias resistentes (Da Costa *et al.*, 2006). Las bacterias cuantifica-

das en este estudio son indicadores fecales, y por tanto de fácil detección en efluentes de depuradoras de aguas residuales urbanas, en la que la contaminación es mayoritariamente fecal, no así en las aguas residuales industriales como es el caso del vertido de antibióticos, por lo que aunque, en este efluente no se detecte un número demasiado elevado de indicadores fecales, es posible que se estén aportando genes de resistencia al medio a través de otro tipo de bacterias no detectadas, o incluso no cultivables (Roszak, 1987, Ash, 2002). En el caso de los humedales construidos, sistemas naturales, está demostrado que son más eficaces en la eliminación de bacterias indicadoras de contaminación fecal que los convencionales (García y Bécares, 1997), como también se ha demostrado en este estudio.

Los porcentajes de resistencia obtenidos en este estudio corresponden con los rangos de resistencia hallados por otros autores, así, los *Enterococcus* han presentado resistencias muy bajas (del 0% en la mayoría de los casos) a Amoxicilina coincidiendo con Fernandes Cardoso de Oliveira y Watanabe Pinhata, (2008). Las resistencias de *E. coli* y Los CT a este mismo antibiótico también son comparables a las encontradas por otros autores (Carroll et al., 2005; Fars et al 2005, Lefkowitz and Duran, 2009), aunque en el caso de los CT son un poco más altos los datos

obtenidos en este estudio (aprox un 20%). En el caso de los efluentes de los humedales construidos las resistencias de los CT obtenidas son más altas de lo observado por otros autores. Si comparamos los resultados obtenidos a partir de los antibiogramas encontramos rangos entre el 3 y el 66% de *E. coli* resistentes a Ampicilina, el 100% de resistentes a Eritromicina, entre el 15 y el 33 % de resistentes a Tetraciclina, el 30 % resistente a Streptomina, y el 70% resistente a Penicilina (Reinthal et al., 2003; Lefkowitz and Duran, 2009; Costanzo et al., 2005; Carroll et al., 2005; Schwartz et al., 2003), todos ellos valores comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

La multiresistencia es otra característica comúnmente estudiada, Chelosi et al (2003) encontraron que más del 56% de las Gram negativas de sedimentos marinos cultivadas tenían resistencia a 5 o más antibióticos, Lefkowitz y Duran (2009) midieron la multiresistencia de *E. coli* en plantas de tratamiento de aguas residuales obteniendo valores en el efluente de un 60% de multiresistentes a 2 o más antibióticos, y un 25% a 4 o más, otros autores también lo han estudiado (Tendencia and de la Peña, 2001; Pillai et al., 1997; Lin y Biyela, 2005; Toroglu, 2005; Chapin et al., 2005), y los datos obtenidos en este estudio se encuentran en los mismos rangos.

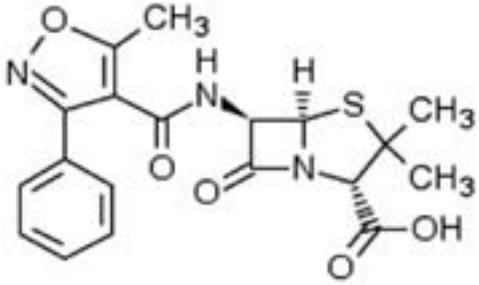
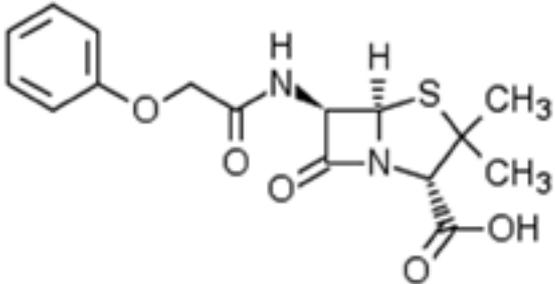
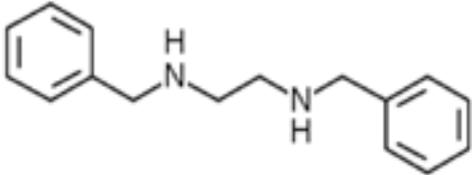
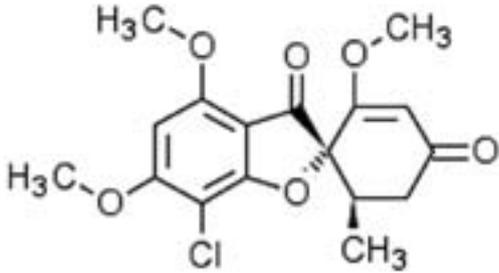
## 4. BIBLIOGRAFÍA

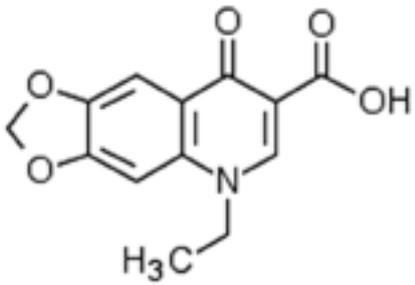
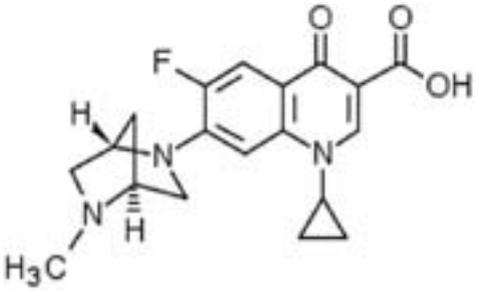
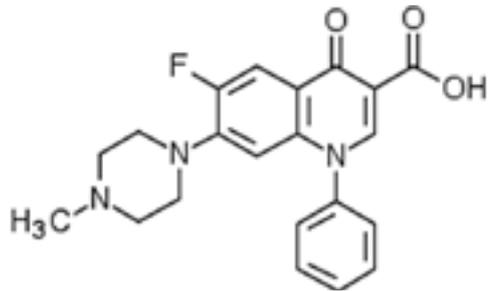
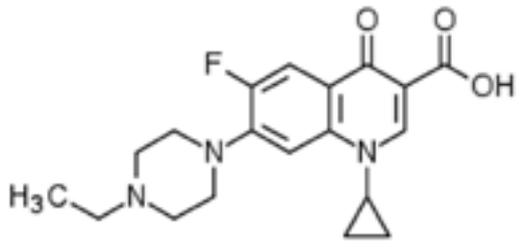
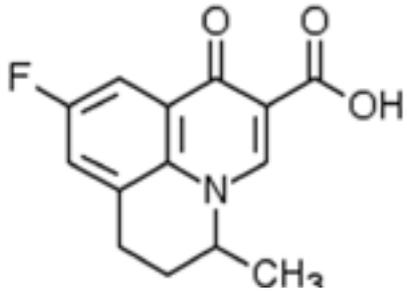
- Alm, E.W.; Burke J.; Spain, A. (2003). Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research* 37 (16), 3978-3982.
- Alonso A., Sánchez P., Martínez J.L. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3:1-9.
- Arikian, O.A.; Rice, C.; Codling, E. (2008). Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. *Desalination* 226, 121- 133.
- Ash, R.J.; Mauck, B.; & Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infectious Diseases* 8, 713-716.
- Bécares, E. (1995). Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratango aguas residuales de la industria farmacéutica. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.
- Carroll, S.; Hargreaves, M.; & Goonetilleke, A. (2005). Sourcing faecal pollution from onsite wastewater treatment systems in surface waters using antibiotic resistance analysis. *Journal of Applied Microbiology* 99, 471-482.
- Cha, J.M.; Yang, S.; Carlson, K.H. (2006). Trace determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1115, 46-57.
- Chapin, A.; Rule, A.; Gibson, K.; Buckley, T., & Schwab, K. (2005). Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives* 113, 137-142.
- Chelossi, E.; Vezzulli, L.; Milano, A.; Branzoni, M.; Fabiano, M.; Riccardi, G.; Banat, I.M. (2003). Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219 (1-4), 83-97
- Constanzo, S.D.; Murby, J.; & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 51, 218-223.
- Da Costa P.M.M.; Vaz-Pires P.M.; Bernardo, F.M. (2006). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from wastewater isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research* 40, 1735-1740.
- Davies, C.M.; Bavour, H.J. (2000). The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. *Journal of Applied Microbiology* 89 (2), 349-460.
- Davies, C.M.; Long, J.A.H.; Donal, M.; Ashbolt, N.J. (1995). Survival of fecal microorganism in marine and freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology* 61 (5), 1888-1896.
- Davies-Colley, R.J.; Donnison A.M.; Speed D.J.; Ross C.M.; Nagels J.W. (1999). Inactivation of faecal indicators microorganisms in waste stabilization ponds: Interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research* 33, 1220-1230.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 73-91.
- EPI Suite 4.00. <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.htm>
- Fars, S.; Oufdou, K.; Nejmeddine, A.; Hassani, L.; Melloul, A.A.; Boussehaj, K.; Amahmid, O.; Bouhoum, K.; Lakmichi, H.; Mezrioui, N. (2005). Antibiotic resistance and survival of faecal coliforms in activated sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21 (4), 493-500.
- Feitosa-Felizzola, J.; Chiron, S. (2009). Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology* 364, 50– 57.
- Fernandes Cardoso de Oliveira, A.J.; & Watanabe Pinhata, J.M. (2008). Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research* 42, 2242-2250.
- Ferrer, C.; Sanguesa, I.; Bécares E.; Llopis J.A. (2007). La depuración en pequeños municipios de Castellón. *FACSA*. Diputación de Castellón. 194 pp.
- García, M.; Bécares, E. (1997). Bacterial removal in three pilot-scale wastewater treatment systems for rural areas. *Water Science Technology* 35 (11-12): 197-200

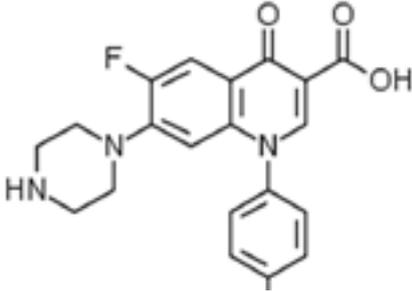
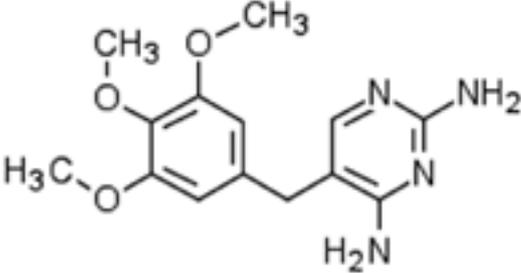
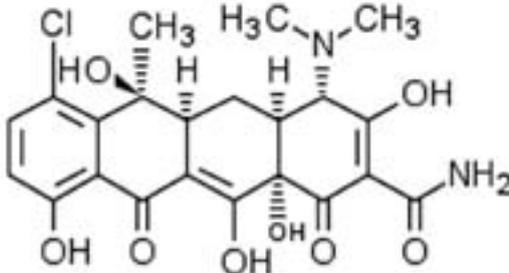
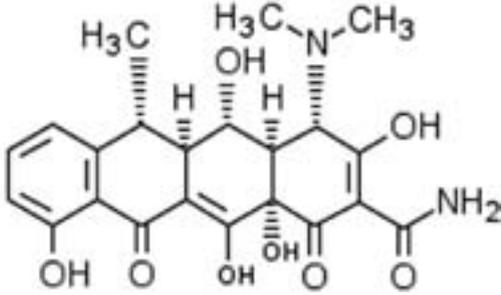
- Henriques, I.; Moura, A.; Alves, A.; Saavedra, M.J.; Correia, A. (2006). Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:418-429.
- Hijosa-Valsero, M.; Matamoros, V.; Sidrach-Cardona, R.; Villacorta, M.; Bécares, E.; Bayona, J.M. (2010). Comprehensive Assessment of the design configuration of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products from urban wastewaters. *Water Res.* 44:3669-3678
- Hijosa-Valsero, M.; Sidrach-Cardona, R.; Martín-Villacorta, J.; Bécares, E. (2010). Optimization of performance assessment and desing characteristics in constructed wetlands for the removal of organic matter. *Chemosphere.* 81:651-657
- Hijosa-Valsero, M.; Fink G, Schlüsener, M.P.; Sidrach-Cardona, R.; Martín-Villacorta, J.; Ternes, T.; Bécares, E. Removal of antibiotics from urban wastewater by means of constructed wetland. *Water Res.*
- Hirata, T.; Kawamura, K.; Yano, K.; Kaneko, M.; Moniwa, T.; Tosa, K.; Taguchi, K. (1993). Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment proceses. *Water Science Technology* 28 (7), 55-61.
- Howell, J.M.; Coyne, M.S.; Cornelius, P.L. (1996). Effect of sediment particle size and temperature on fecal bacteria mortality rates and the fecal coliform/fecal streptococci ratio. *Journal Of Environmental Quality* 25 (6), 1216-1220.
- Junco, M.T.T.; Martin, M.G.; Toledo, M.L.P.; Gómez, P.L.; Barrasa, J.L.M. (2001). Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal Of Hygiene And Environmental Health* 203 (4), 363-368.
- Keg Draw. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.jp/download/>
- Kim, S.C.; Carlson, K. (2007). Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1301–1315.
- Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother* 54:311-320.
- Lefkowitz, J.R.; Duran, M. (2009). Changes in antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* during domestic wastewater treatment. *Water Environment Research* 81 (9), 878-885
- Lin, A.Y.C.; Tsai, Y.T. (2009). Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment* 407, 3793–3802.
- Lin, J.; & Biyela, P.T. (2005). Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the Enterobacteriaceae isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* 31, 257-260.
- Liu, H.; Zhang, G.; Liu, C.Q.; Li, L.; Xiang, M. (2009). The occurrence of chloramphenicol and tetracyclines in municipal sewage and the Nanming River, Guiyang City, China. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1199–1205.
- Martínez, J.L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. B* 276:2521-2530.
- McFeters G.A. (1990). Drinking water microbiology. Springer-Verlag, New York.185-203.
- Pena, A.; Chmielova, D.; Lino, C.M.; Solich, P. (2007). Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of Separation Science* 30, 2924-2928.
- Pillai, S.D.; Widmer, K.W.; Maciorowski, K.G.; & Ricke, S.C. (1997). Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from rural and urban environments. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control* 32, 1665-1675.
- Pouliquen, H.; Delépée, R.; Thorin, C.; Haury, J.; Larhantec-Verdier, M.; Morvan, M.L.; Le Bris, H. (2009). Comparison of water, sediment, and plants for the monitoring of antibiotics: a case study on a river dedicated to fish farming. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 496–502.
- Prabhakaran, D.; Sukul, P.; Lamshöft, M.; Maheswari, M.A.; Zühlke, S.; Spitteller, M. (2009). Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems. *Chemosphere* 77, 739–746.
- Reinthaler, F.F.; Posch, J.; Feierl, G.; Wust, G.; Haas, D.; Ruckebauer, G.; Mascher, F.; Marth, E. (2003). Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research* 37 (8), 1685-1690.
- Resolución de 20 de abril de 2009, de la Dirección General de Prevención Ambiental y Ordenación del Territorio, por la que se hace pública la Autorización Ambiental a Antibióticos, S.A.U. para las instalaciones de fabricación de productos para la industria farmacéutica y química (derivados penicilánicos, cefalosporánicos e inmunosupresores), mediante procesos fermentativos, síntesis enzimáticas y químicas, en el término municipal de León. Boletín Oficial de Castilla y León, viernes 8 de mayo de 2009, 14138-14170.
- Roszak, D.B.; & Colwel, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 365-379.
- Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B.; & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 325-335.
- Tamtam, F.; Mercier, F.; Eurin, J.; Chevreuil, M.; Le Bot, B. (2009). Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1709-1718.
- Tamtam, F.; Mercier, F.; Le Bot, B.; Eurin, J.; Dinh, Q.T.; Clément, M.; Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment* 393 (2008) 84-95.
- Tang, C.M.; Huang, Q.X.; Yu, Y.Y.; Peng, X.Z. (2009). Multiresidue Determination of Sulfonamides, Macrolides, Trimethoprim, and Chloramphenicol in Sewage Sludge and Sediment Using Ultrasonic Extraction Coupled with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, Volume 37, 1119-1124.
- Tendencia, E.A. & de la Peña, L.D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195, 193-204.
- Toroglu, S.; Dinçer, S.; & Kormaz, H. (2005). Antibiotic resistance in gram negative bacteria isolated from Aksu River (Kahramanmaras) in Turkey. *Annals of Microbiology* 55, 229-233.
- Van Valen L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- Watkinson, A.J.; Murby, E.J.; Kolpin, D.W.; Costanzo, S.D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment* 407, 2711-2723.
- Yang, J.F.; Ying, G.G.; Zhao, J.L.; Tao, R.; Su, H.C.; Chen, F. (2010). Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of the Total Environment* 408, 3424-3432.
- Yang, S.; Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research* 37, 4645-4656.
- Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Melis, M.; Fanelli, R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 179, 1042–1048.

## 5. ANEXOS

**Tabla ANEXO.** Estructura molecular y propiedades físico-químicas de los antibióticos detectados. *Notas:* Se utilizó el programa EPI Suite 4.00 para calcular los valores de  $\log K_{ow}$ ,  $\log K_{oc}$  (modelo MCI), constante de Henry y solubilidad en agua (modelo  $\log K_{ow}$ ). Las moléculas se dibujaron con Keg Draw versión 0.1.10 (Beta).

Sustancia	$\log K_{ow}$	$\log K_{oc}$	Constante de Henry a 25°C (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad en agua a 25°C (mg L <sup>-1</sup> )	Estructura molecular
<b><i>β-lactámicos</i></b>					
<b>Oxacilina</b> CAS 66-79-5 Masa 401,44	2,38	2,569	$2,55 \cdot 10^{-17}$	27,84	
<b>Penicilina V</b> CAS 87-08-1 Masa 350,39	2,09	1,498	$4,42 \cdot 10^{-15}$	101,1	
<b><i>Sustancias asociadas a los β-lactámicos</i></b>					
<b>Benzatina</b> CAS 140-28-3 Masa 240,35	2,73	4,414	$3,25 \cdot 10^{-11}$	3930	
<b><i>Butirofenonas</i></b>					
<b>Griseofulvin</b> CAS 126-07-8 Masa 352,77	2,18	2,055	$1,42 \cdot 10^{-13}$	8,64	

Sustancia	log $K_{ow}$	log $K_{oc}$	Constante de Henry a 25°C (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad en agua a 25°C (mg L <sup>-1</sup> )	Estructura molecular
<b>Quinolonas</b>					
<b>Ácido oxolínico</b> CAS 14698-29-4 Masa 261,24	0,94	1,000	4,12·10 <sup>-16</sup>	3,2	
<b>Danofloxacina</b> CAS 112398-08-0 Masa 357,37	–	–	–	1720	
<b>Difloxacina</b> CAS 98106-17-3 Masa 399,40	0,89	2,743	4,22·10 <sup>-19</sup>	1333	
<b>Enrofloxacina</b> CAS 93106-60-6 Masa 359,40	0,70	1,174	1,48·10 <sup>-18</sup>	3397	
<b>Flumequine</b> CAS 42835-25-6 Masa 261,25	160	1,582	2,67·10 <sup>-13</sup>	2186	

Sustancia	log $K_{ow}$	log $K_{oc}$	Constante de Henry a 25°C (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad en agua a 25°C (mg L <sup>-1</sup> )	Estructura molecular
<b>Sarafloxacin</b> CAS 98105-99-8 Masa 385,37	1,07	2,750	$1,92 \cdot 10^{-19}$	1139	
<b>Sustancias asociadas a las sulfamidas</b>					
<b>Trimetoprim</b> CAS 738-70-5 Masa 290,14	0,91	2,857	$2,39 \cdot 10^{-14}$	400	
<b>Tetraciclinas</b>					
<b>Clortetraciclina</b> CAS 57-62-5 Masa 478,11	-0,62	1,858	$3,45 \cdot 10^{-24}$	640	
<b>Doxiciclina</b> CAS 564-25-0 Masa 444,15	-0,02	1,693	$4,66 \cdot 10^{-24}$	630	
<b>Oxitetraciclina</b> CAS 79-57-2 Masa 460,43	-0,90	1,867	$1,70 \cdot 10^{-25}$	313	