

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Escuela de Posgrado

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL Y
DESARROLLO SOSTENIBLE**

**EFFECTO SINÉRGICO DEL CIPROFLOXACINO PRESENTE EN
EL AGUA DE RIEGO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA
ATRAZINA EN EL SUELO Y SU TOXICIDAD EN ALFALFA
(*Medicago sativa*)**

TESIS

PRESENTADA POR:

TATIANA EDITH LAURA PONCE

Para optar el Grado Académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS (*Magister Scientiae*) CON MENCIÓN EN
GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**TACNA – PERÚ
2026**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**Escuela de Posgrado**

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL Y
DESARROLLO SOSTENIBLE

**EFFECTO SINÉRGICO DEL CIPROFLOXACINO PRESENTE EN EL AGUA
DE RIEGO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA ATRAZINA EN EL
SUELO Y SU TOXICIDAD EN ALFALFA (*Medicago sativa*)**

Tesis sustentada y aprobada el 23 de enero del 2026; estando el jurado calificador
integrado por:

PRESIDENTE

:


.....
Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina

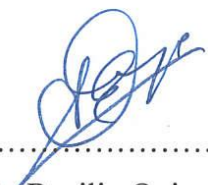
SECRETARIO

:


.....
Dr. Oscar Octavio Fernández Cutire

MIEMBRO

:


.....
Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila

ASESOR

:


.....
Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Alberto Bacilio Quispe Cohaila en mi condición de asesor acreditado con Resolución de Escuela de Posgrado N° 11642-2022-ESPG/UNJBG del 11 de agosto del 2022, del trabajo de tesis titulado: **"EFECTO SINÉRGICO DEL CIPROFLOXACINO PRESENTE EN EL AGUA DE RIEGO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA ATRAZINA EN EL SUELO Y SU TOXICIDAD EN ALFALFA (MEDICAGO SATIVA)"**, presentado por el Srta. Tatiana Edith Laura Ponce, para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias (*Magíster Scientiae*) con mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es **9%**.

Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la tesis y está de acuerdo al nivel PERMITIDO, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado a solicitud del interesado con fines de continuar con los trámites respectivos para la obtención del Grado Académico de Maestro en Ciencias (*Magíster Scientiae*) con mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible.

Tacna, 16 de mayo 2026

FIRMA ASESOR
Nombres y apellidos


.....
Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila
DNI N° 00419682



FIRMA TESISTA
Nombres y apellidos


.....
Srta. Tatiana Edith Laura Ponce
DNI N° 76950401



DEDICATORIA

*Dedico el resultado de este trabajo a mi esposo
Cristian Olguín, por su apoyo incondicional en
esta etapa de mi vida, a mi familia y a mí.*

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por haberme dado las fuerzas para culminar con este trabajo que significó un gran reto y desafío.

Agradecer al Dr. Valdemar Luiz Tornisielo por todo su apoyo al recibirme en su laboratorio y orientarme en todo momento con la gran paciencia y comprensión que lo caracteriza.

Agradezco al Dr. Kassio Mendes y al Dr. Alberto Quispe Cohaila por haberme aceptado como tesista en el momento que más necesitaba de su ayuda.

Al Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad de Sao Paulo-Brasil, por todo el soporte dado en la ejecución de la tesis.

A Felipe Machado, Daniel Nalin y Cristian Olguín, por su apoyo y trabajo incansable en la ejecución de esta tesis.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el importante apoyo financiero que hizo posible este trabajo.

A la Escuela de Posgrado por traslape de conocimientos y formación profesional complementaria.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	 2
1.1. Formulación de los problemas	2
1.1.1 El problema Principal	2
1.1.2 Problemas Secundarios	2
1.2. Justificación e importancia de la investigación	2
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General.....	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Hipótesis	5
1.4.1. Hipótesis general.....	5
1.4.2. Hipótesis específicas	5
 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	 7
2.1. Antecedentes de estudio.....	7
2.1.1. Internacionales	7
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. Contaminantes orgánicos	8
2.2.2. Características fisicoquímicas.....	8

2.2.3.	Coeficiente de partición octanol agua.....	8
2.2.4.	Implicancias ambientales	9
2.2.5.	Proceso de retención	9
2.2.6.	Proceso de transporte	10
2.2.7.	Uso de Isótopos radiactivos	11
2.2.8.	El radioisótopo carbono 14 (^{14}C).....	12
2.2.9.	Lixiviación de compuestos orgánicos en suelos	12
2.2.10.	Antibióticos.....	13
2.2.11.	Pesticida	13
2.2.12.	Ciprofloxacino	13
2.2.12.1.	Propiedades farmacológicas.....	13
2.2.13.	Efectos ambientales del Ciprofloxacino	14
2.2.14.	Atrazina.....	15
2.2.15.	El suelo y sus interacciones	15
2.2.16.	Aguas residuales	15
2.2.17.	Cultivo de Alfalfa	16
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		17
3.1.	Tipo y diseño de investigación	17
3.2.	Lugar de estudio.....	17
3.3.	Instrumentos.....	17
3.3.1.	Reactivos y materiales del experimento con alfalfa (<i>Medicago Sativa</i>).....	17
3.3.2.	Características del material vegetal <i>Medicago sativa</i>	18
3.3.3.	Reactivos y materiales de experimento en suelo	19

3.3.4.	Equipos de experimento en alfalfa.....	19
3.3.5.	Equipos de experimento en suelo	20
3.3.6.	Materiales de campo	20
3.3.7.	Procedimientos para experimento en alfalfa.....	20
3.3.7.1.	Instalación de experimento	20
3.3.7.2.	Preparación de caldo de Atrazina	20
3.3.7.3.	Procedimiento	21
3.3.7.4.	Preparación de suelo	26
3.3.7.5.	Frecuencia de riego	26
3.3.7.6.	Determinación de nódulos	26
3.3.7.7.	Determinación de masa área y radicular	26
3.3.7.8.	Determinación de carbono y nitrógeno en masa aérea y radicular	26
3.3.7.9.	Análisis de datos	27
3.3.8.	Procedimientos para experimento en suelo.....	27
3.3.8.1.	Procedimiento	27
3.3.8.2.	Preparación de suelo	31
3.3.8.3.	Preparación de columnas de suelo	31
3.3.8.4.	Preparación de sustancia Atrazina	32
3.3.8.5.	Colecta de lixiviado	32
3.3.8.6.	Remoción de columnas de suelo.....	32
3.3.8.7.	Análisis de resultados	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		34
4.1.	Resultados del experimento en Atrazina y Ciprofloxacino en Alfalfa	34

4.1.1.	Análisis fisicoquímico de suelo Piracicaba.....	34
4.2.	Resultados estadísticos del número de nódulos en alfalfa	35
4.3.	Resultados estadísticos de biomasa seca aérea y radicular	38
4.4.	Resultados estadísticos de contenido de carbono en biomasa aérea.....	42
4.5.	Resultados del experimento de Atrazina y Ciprofloxacino en suelo	44
4.5.1.	Análisis fisicoquímico del suelo de Tacna.....	44
4.5.2.	Resultados estadísticos del contenido de nitrógeno en el suelo.....	44
4.5.3.	Resultados de lixiviación de Atrazina en suelo	47
4.5.4.	Resultados de lixiviado en suelo por capaz de suelo	51
4.5.5.	Resumen de balance de materia de lixiviación y suelo.....	57
DISCUSIÓN		59
CONCLUSIONES		63
RECOMENDACIONES.....		64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Los cultivos en la región Tacna con mayor cantidad de producción	16
Tabla 2	Resultados fisicoquímicos para suelo de Piracicaba.....	34
Tabla 3	Resultados estadísticos de número de nódulos en alfalfa	35
Tabla 4	Análisis de varianza para número de nódulos.....	36
Tabla 5	Resultados estadísticos biomasa seca aérea en alfalfa	38
Tabla 6	Resultados estadísticos biomasa seca radicular en alfalfa	38
Tabla 7	Análisis de varianza para biomasa aérea en alfalfa	39
Tabla 8	Análisis de varianza para biomasa seca radicular	39
Tabla 9	Resultados estadísticos de contenido de carbono en biomasa aérea.....	42
Tabla 10	Análisis de varianza para carbono en planta.....	43
Tabla 11	Análisis fisicoquímico del suelo de Tacna.....	44
Tabla 12	Resultados estadísticos de nitrógeno en suelo	44
Tabla 13	Análisis de varianza para nitrógeno en suelo.....	45
Tabla 14	Peso de frascos y lixiviados	47
Tabla 15	Valores de lixiviado en 12, 24, 36 y 48 horas.....	48
Tabla 16	Resultados de dpm total por columna y porcentaje de lixiviado por columna	49
Tabla 17	Resultados de la media en porcentaje de lixiviado, porcentaje de lixiviado total y media de lixiviado por tratamiento	50
Tabla 18	Resultados de lixiviación de la primera columna de suelo	51
Tabla 19	Resultados de lixiviación de la segunda columna de suelos.....	52
Tabla 20	Resultados de lixiviación de la tercera columna de suelo.....	53
Tabla 21	Resultados de lixiviación de la cuarta columna de suelo.....	54
Tabla 22	Resultados de lixiviación de la quinta columna de suelo	55

Tabla 23	Resultados de lixiviación de la sexta columna de suelo	56
Tabla 24	Resumen de balance de materia de lixiviado en suelo.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de Ciprofloxacino	14
Figura 2	Cámara de crecimiento de plantas con condiciones controladas y maceteros del experimento instalados.....	21
Figura 3	Imagen referencial del diseño del experimento con concentraciones de Atrazina y Ciprofoxacino.....	22
Figura 4	Lavado de raíces y separación del suelo en bandejas	23
Figura 5	Conteo de nódulos.....	23
Figura 6	Muestras de biomasa aérea y radicular, llevadas a secado en estufa por 48 horas.	24
Figura 7	Muestra de biomasa aérea triturada y siendo tamizada	25
Figura 8	Muestras de biomasa total para análisis de carbono	25
Figura 9	Llenado de columnas con suelo recolectado en Tacna	28
Figura 10	Instalación de columnas de suelo con arena de cuarzo en la punta y lana de vidrio en la superficie.....	29
Figura 11	Aplicación de solución radiomarcada en columnas de suelo.....	30
Figura 12	Recolección de lixiviados en columnas de suelo	31
Figura 13	Test de Tuckey para número de nódulos en alfalfa	37
Figura 14	Test de Tuckey para biomasa aérea en alfalfa	40
Figura 15	Teste de Tuckey para masa radicular en alfalfa.....	41
Figura 16	Test de Tuckey para carbono en planta.....	43
Figura 17	Test de Tuckey para Nitrógeno en suelo.....	46
Figura 18	Tasa de lixiviación de Atrazina y Ciprofloxacino	57
Figura 19	Gráfica de lixiviación de Atrazina y Ciprofloxacino	58

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto sinérgico de dos concentraciones de Atrazina y tres de Ciprofloxacino sobre la fisiología de la alfalfa (*Medicago sativa*) y el comportamiento del herbicida en el suelo. Se empleó un diseño experimental que simuló condiciones de riego con agua contaminada a dosis subletales.

Los resultados revelaron que la interacción conjunta de los contaminantes genera una respuesta hormética en el cultivo. Específicamente, la combinación de 46 $\mu\text{g L}^{-1}$ Atrazina con 35 y 3500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ciprofloxacino incrementó significativamente tanto el número de nódulos como la biomasa seca radicular, sugiriendo un mecanismo de defensa ante el estrés químico. Por el contrario, no se evidenciaron diferencias significativas en la biomasa aérea, ni en el contenido de Carbono en planta y Nitrógeno en suelo, indicando que la afectación principal es a nivel de rizosfera.

En cuanto al estudio de movilidad, se tuvo el tratamiento 1 (Atrazina sola) y el tratamiento 2 (Atrazina + Ciprofloxacino); el ensayo de lixiviación demostró una alta capacidad de retención del contaminante en la matriz del suelo. La recuperación de Atrazina fue del 92 % en el tratamiento individual y del 102,9 % en la mezcla con antibiótico. Sin embargo, no se observó un efecto significativo del Ciprofloxacino sobre la lixiviación de la Atrazina, concluyéndose que, bajo las condiciones evaluadas, el riesgo de contaminación inmediata a estratos profundos es limitado por la retención física del suelo.

Palabras clave: Suelo, plantas, herbicidas, antibióticos

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the synergistic effect of two concentrations of Atrazine and three of Ciprofloxacin on the physiology of alfalfa (*Medicago sativa*) and the behavior of the herbicide in soil. An experimental design was implemented to simulate irrigation conditions with water contaminated at sublethal doses.

Results revealed that the combined interaction of both contaminants induced a hormetic response in the crop. Specifically, the combination of 46 $\mu\text{g L}^{-1}$ Atrazine with 35 and 3500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ciprofloxacin significantly increased both the number of nodules and dry root biomass, suggesting an adaptive defense mechanism to chemical stress. In contrast, no significant differences were observed in aerial biomass, carbon content in plant tissues, or soil nitrogen content, indicating that the primary impact occurred at the rhizosphere level.

Regarding the mobility assessment, two treatments were tested: Treatment 1 (Atrazine alone) and Treatment 2 (Atrazine + Ciprofloxacin). The leaching assay demonstrated a high retention capacity of the contaminant within the soil matrix. Atrazine recovery reached 92 % in the individual treatment and 102,9 % in the combined treatment. However, no significant effect of Ciprofloxacin on the leaching behavior of Atrazine was observed. It was concluded that, under the tested conditions, the risk of immediate contamination of deeper soil layers is limited due to the physical retention capacity of the soil.

Keywords: Soil, plants, herbicides, antibiotics.

INTRODUCCIÓN

La creciente población mundial ha provocado un aumento en la necesidad de alimentos, lo que requiere el uso de pesticidas para garantizar la producción agrícola a través del control de plagas y malas hierbas, y la atrazina es ampliamente utilizada en la agricultura para controlar malas hierbas y plantas herbáceas, tanto antes como después de su aparición en los campos de cultivo.

Por otro lado, a pesar de que los antibióticos se utilizan para tratar enfermedades de infección bacteriana, el 17 al 90 % de ellos son eliminados del cuerpo a través de heces y orina, llegando a las plantas de tratamiento de agua residual PTARs que no eliminan el contaminante, que permanece en el efluente final. Los antibióticos pueden influir en la población objetivo y no objetivo, causando toxicidad, y su presencia en el medio edáfico reduce la cantidad de bacterias que mejoran la calidad del suelo.

Asimismo, se ha demostrado que ciertos herbicidas afectan negativamente la germinación de semillas de maíz y su impacto se intensifica cuando hay antibióticos como el Ciprofloxacino.

Es por ello que se evaluó el efecto sinérgico de Ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de ^{14}C -atrazina (ring- ^{14}C) en el suelo (lixiviación), además del efecto sinérgico de Atrazina y Ciprofloxacino sobre los nódulos de alfalfa, producción de biomasa seca aérea y radicular de alfalfa, producción de carbono e biomasa aérea y radicular de alfalfa.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Formulación de los problemas

1.1.1 El problema Principal

¿Cuál será el efecto sinérgico del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de la atrazina en el suelo y toxicidad en la alfalfa (*Medicago sativa*)?

1.1.2 Problemas Secundarios

- a) ¿Cuál será el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de nódulos en las raíces de alfalfa?
- b) ¿Cuál será el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de biomasa seca aérea y radicular de alfalfa?
- c) ¿Cuál será el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de carbono en la biomasa seca aérea y radicular de alfalfa?
- d) ¿Cuál será el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre el contenido de Nitrógeno en suelo?
- e) ¿Cuál será el efecto sinérgico del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de la atrazina en el suelo (lixiviación)?

1.2. Justificación e importancia de la investigación

La tasa demográfica a nivel mundial ha ido creciendo, lo que ocasiona un aumento en la demanda de alimentos para la población (ONU, 2024) (Kopittke et al., 2019), siendo necesario el uso de pesticidas para asegurar la producción agrícola (Dehghani et al., 2022), a través del control de plagas y malas hierbas (Liu et al., 2021). La atrazina es ampliamente utilizada en la agricultura para controlar malas hierbas y plantas herbáceas antes y después de su aparición en los campos de cultivo (Baghapour et al., 2013; Nasseri et al., 2014; Muzira & Mutatu W Proc, 2018). Su persistencia en un suelo arcilloso puede

durar muchos años a T° menores a 20 °C (Chowdhury et al., 2021), y en promedio puede llegar a permanecer en el suelo 4 semanas, y residuos de sus metabolitos hasta 4 meses (Derakhshan et al., 2018a, 2018b).

Por otro lado, los antibióticos son consumidos para tratar enfermedades de infección bacteriana, no obstante; el 17 al 90 % son expulsados del cuerpo mediante heces y orina (Massé et al., 2014; Carvalho & Santos, 2016), llegando a las plantas de tratamiento de agua residual PTARs que no eliminan el contaminante, estando presente en el efluente final (Xu et al., 2007; Leung et al., 2012; Kostich et al., 2014); estos efluentes son transferidos a las aguas superficiales (Gao et al., 2012), y son utilizados para riego de los cultivos (Han et al., 2015). Los antibióticos tienen el potencial de influir en la población objetivo y no objetivo, provocando consecuencia de toxicidad (Grenni et al., 2018), su presencia en el suelo ocasionaría la reducción de manera cuantitativa de bacterias que contribuyen en la calidad del suelo (Ding et al., 2014).

Asimismo, se ha evidenciado que algunos pesticidas tienen efectos negativos en la germinación de semillas de maíz y su efecto se magnifica cuando hay presencia de antibióticos como el Ciprofloxacino (Eissa et al., 2020), puede deberse a la disminución de la actividad del complejo III mitocondrial, induciendo a la producción de ROS cuando hay exposición de las semillas de maíz a CPX, los pesticidas provocan la disminución la energía metabólica ATP, que es necesaria para la germinación, crecimiento de embrión, producción y modulación de la actividad enzimática (Gomes et al., 2017), además que Glifosato y Ciprofloxacino tienden a provocar la disminución de la longitud de la raíz, pero manteniendo la producción de raíces adventicias (Gomes et al., 2019), en ese sentido; la coexistencia de antibiótico/pesticida, trae consecuencias en la alteración del comportamiento del pesticida en el suelo (Jiang et al., 2021).

Es por ello que se tiene como objetivo evaluar el efecto del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de la Atrazina 14C-atrazine (ring-U-14C) en el suelo y su toxicidad en la alfalfa.

Las enfermedades infecciones suelen ser tratados con medicamento como los antibióticos; asimismo, tienen un bajo costo y es fácil adquirirlos, y debido a ello su

consumo es más frecuente, sin embargo, al consumirlos alrededor de 17 al 89 % son expulsados en las heces y orina, después de ello, pasan por el sistema de alcantarillado y terminan en PTAR's; debido a los deficientes tratamientos, no se eliminan completamente los residuos contaminantes y estos pasan a ser parte de las aguas superficiales, y finalmente estas, se utilizan para el riego en la agricultura. (Payton and Brunetti, 2021; Carvalho and Santos, 2016; Kostich et al., 2014)

Debido a la poca información difundida sobre la presencia de antibióticos en el agua, con frecuencia se usa agua con residuos de antibióticos para la producción agrícola. Se han reportado efectos sobre los procesos bioquímicos del suelo, la cantidad y variedad de microorganismos que la habitan y las funciones que realizan en los ciclos (Rahman et al., 2018).

En el cultivo agrícola se utiliza agua con presencia de antibióticos en muchos casos debido a la falta de información difundida, y asimismo, se reportan impactos en los procesos bioquímicos que ocurren en el suelo, en la cantidad y variedad de microorganismos que la habitan y las funciones que desempeñan en los ciclos (Rahman et al., 2018).

Por otro lado, los pesticidas como la Atrazina son utilizados para el control de malas hierbas antes y después de que aparezcan; tienen la capacidad de habitar el suelo hasta 4 semanas, hasta años, y generan metabolitos como el cloro-triazine, que es altamente tóxicos. Ambos generan grandes efectos en el suelo y plantas; no obstante, efectos sinérgicos entre ambas podrían traer grandes complicaciones en el crecimiento del cultivo.

Es de gran importancia el estudio de la coexistencia de estos contaminantes, ya que en el Perú y en regiones como Tacna, existe la escasez de agua y el uso de agua tratada para el riego en el cultivo, que son de gran necesidad para el consumo de la población; además, el uso de pesticidas para mantener la producción agrícola no es ajeno a nuestra realidad local, regional y Nacional.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto sinérgico del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de la atrazina en el suelo y toxicidad en la alfalfa (*Medicago sativa*).

1.3.2. Objetivos específicos

- a) Evaluar el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de nódulos en las raíces de alfalfa.
- b) Evaluar el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de biomasa seca aérea y radicular de alfalfa.
- c) Analizar el efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre la producción de carbono en la biomasa aérea.
- d) Evaluar efecto sinérgico de Ciprofloxacino y Atrazina sobre el contenido de Nitrógeno en suelo.
- e) Valorar el efecto sinérgico de Ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de ^{14}C -atrazina (ring- ^{14}C) en el suelo (lixiviación).

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis general

Hay efecto significativo negativo en la sinergia del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre la atrazina y su toxicidad en la alfalfa (*Medicago sativa*).

1.4.2. Hipótesis específicas

- a) Existe efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo la producción de nódulos en las raíces de alfalfa.
- b) Existe efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo la producción de biomasa seca aérea y radicular de alfalfa.

- c) Existe efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo la producción de carbono en la biomasa seca aérea.
- d) Existe efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo el contenido de Nitrógeno en el suelo.
- e) Existe efecto sinérgico de Ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre el comportamiento de ^{14}C -atrazina (ring- $\text{U-}^{14}\text{C}$) en el suelo (lixiviación).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de estudio

2.1.1. Internacionales

(Shan et al., 2018) Investigó los efectos de los antibióticos en la transformación de los nitratos y la liberación de NO_2 asociada en los arrozales; los resultados fueron: La reducción de la nitrificación, la oxidación anaeróbica de amonio y el proceso de reducción de nitrato, lo que se atribuye principalmente a los efectos inhibitorios de los antibióticos sobre los microorganismos reductores de nitratos, las tasas de liberación de N_2O fueron estimuladas significativamente por los tratamientos antibióticos, los cuales fueron causados por los diferentes efectos de inhibición de los antibióticos sobre la producción de N_2O y la reducción de N_2O , la abundancia de los genes de resistencia a los antibióticos se incrementó significativamente bajo altas concentraciones de exposición a antibióticos. Estos resultados sugieren que la presencia generalizada de antibióticos en los suelos de arrozales puede suponer una importante amenaza para el medio ambiente.

(Gomes et al., 2019), estudio los efectos interactivos del antibiótico Ciprofloxacino y el herbicida Roundup en la germinación de semillas y el desarrollo de las raíces, donde se obtuvieron los siguientes resultados: Ambos actúan como inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en las semillas; Ciprofloxacino y Roundup mostraron efectos antagónicos en las semillas de maíz y en la fisiología de las raíces.

(Gomes et al., 2018) investigaron la capacidad del helecho acuático Azolla para captar Ciprofloxacino, así como los efectos de ese antibiótico en el proceso de fijación de Nitrógeno en plantas cultivadas: Se observó que la Azolla acumula Ciprofloxacino en concentraciones superiores a $160 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco; Ciprofloxacino promovió cambios con el metabolismo del carbono y el nitrógeno en las plantas.

(W. Jiang et al., 2021), estudió la coexistencia de antibióticos, su modificación y la persistencia de la atrazina en el medio ambiente, donde concluyó que: La coexistencia de antibióticos en el campo puede tener un profundo impacto en los residuos de plaguicidas, la oxitetraciclina podía inhibir significativamente la degradación de la atrazina y prolongar la vida media a 1,27 y 1,59 veces más, la oxitetraciclina disminuyó la proporción de metabolitos hidroxilos, mientras que aumentó los metabolitos cloro-s-triazina, que tenían mayor toxicidad y se lixiviaban fácilmente en el suelo.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Contaminantes orgánicos

Sustancia ajena y no deseada, generalmente de origen químico, que se encuentra en el medio ambiente en concentraciones anormales o en cantidades superiores a las presentes de manera natural. Pudiendo ser cualquier sustancia física, química, biológica o radiológica que alteraría negativamente la calidad del aire, agua, suelo y tendría un impacto en el ambiente.

2.2.2. Características fisicoquímicas

Los contaminantes orgánicos presentan características fisicoquímicas que lo definen y caracterizan y, dependiendo del número, tipo y forma estructural de los átomos que forman este, lo hace que lo distinga de cualquier otra especie química. Entonces, las características fisicoquímicas pueden determinar cuál es el potencial de un contaminante para integrarse entre los componentes del medio ambiente y esto ayuda a prever los riesgos que este pueda llevar, dando oportunidad para evitar acontecimientos peligrosos para el ambiente.

2.2.3. Coeficiente de partición octanol agua

El coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) de determinado contaminante orgánico significa la relación entre la concentración del contaminante orgánico que está dentro del solvente orgánico octanol y la que está en el agua, y con esto se puede llegar a obtener información sobre los valores de la constante de K_{ow} que podría acumularse en la grasa animal. El valor K_{ow} está relacionado de forma directa con la tendencia de

bioconcentrarse en los organismos vivos y es inversamente proporcional con la solubilidad en el agua.

2.2.4. Implicancias ambientales

La presencia de un contaminante orgánico ya es motivo de preocupación, ya que implica daño dependiendo del tipo, concentración y tiempo de exposición del contaminante orgánico, asimismo, es importante considerar las condiciones fisicoquímicas del medio donde se encuentra.

Asimismo, es importante considerar la cantidad de concentraciones analíticas que están presentes en cada estrato del ambiente; por otro lado, el tiempo de exposición de un contaminante también se considera importante, ya que el tiempo de persistencia puede ser variable y está relacionado con el comportamiento y destino final en los estratos del ambiente.

2.2.5. Proceso de retención

Definición: El proceso de retención tiene por objetivo retener e impedir que la molécula de herbicida se mueva o quede biodisponible. Este proceso puede limitar un proceso, pero no evitar que ocurra.

Sorción: Se considera sorción al término retención cuando no se sabe con claridad si la molécula del herbicida fue adsorbida o absorbida.

Adsorción: Cuando hay varios mecanismos de interacción de la molécula del herbicida con las superficies de las partículas sólidas del suelo o los coloides del suelo.

Desorción: El proceso de desorción es inverso al de sorción o adsorción y hace que la molécula de herbicida liberada de los sitios de sorción se torne biodisponible. Sin embargo, la desorción en sí, principalmente cuando las fuerzas de conexión son fuertes, no informa si la molécula del herbicida fue desorbida sin alteración en su estructura química o como una especie química nueva, a menos que se realice una identificación química.

Absorción: La absorción de la molécula del herbicida por parte de algunos seres vivos viene a ser también un proceso de retención, pues hace indisponible la molécula del herbicida para acciones futuras.

Precipitación: El fenómeno de la precipitación genera un cambio de fase o de estado físico líquido a sólido, cuando se presentan las condiciones para su manifestación. También es un proceso de retención porque inmoviliza y hace no biodisponible a la molécula herbicida.

2.2.6. Proceso de transporte

Implica el movimiento de la molécula del herbicida de un local de origen a otro local. Si la molécula de herbicida está siendo aplicada en el campo, a partir de su salida del pico de la pulverizadora, va a ser afectada por el proceso de transporte un antes de alcanzar el suelo, a través de la llamada deriva de la aplicación, en el que varias moléculas de herbicidas son llevadas por el viento a otros lugares donde ella no fue direccionada, pudiendo alcanzar otras áreas con posibilidades hasta de comprometer cultivos susceptibles, áreas de ríos, lagos, etc.

Si la molécula de herbicida ya fue aplicada en el campo y llegó hasta el suelo, entonces se manifestará este proceso de transporte a partir del suelo.

Teniendo en cuenta que la molécula de herbicida tiene cierta presión de vapor y si ella aún está en la superficie del suelo, es de esperarse que se volatilice hacia la atmósfera, sufriendo un transporte, sin alteración en su estructura química, solo con cambio en su estado físico de líquido o sólido al gaseoso.

Estando la molécula del herbicida en la atmósfera, puede aún sufrir un nuevo proceso de transporte y retornar a la superficie del suelo, agua o planta, a través de la deposición tanto seca como mojada.

Moléculas de herbicidas libres en la superficie del suelo o ya adsorbidas a las partículas de esa superficie pueden, a través de la erosión eólica, ser transportadas a otros lugares distantes. Otra manera en que las moléculas de herbicidas sean transportadas a partir de la superficie del suelo es por medio del movimiento del agua de lluvia a lo largo

de la pendiente del área donde ellas sufren el flujo superficial (runoff), hasta alcanzar puntos más distantes y de menor pendiente, como superficies de ríos y lagos.

Cuando las moléculas del herbicida ya estén en la solución del suelo, parte de estas estarán siendo transportadas a la atmósfera o a la propia fase gaseosa del interior del suelo, sin modificación en la estructura química y solo con cambio de estado físico de líquido a gaseoso, en función de los valores de su constante de la Ley de Henry y de su presión de vapor.

Otra posibilidad de la molécula del herbicida de ser afectada por el proceso de transporte es cuando está en la solución del suelo, lo que ocurre cuando llueve o un riego está siendo realizado, y el suelo está saturado. Entonces, el agua va a percolar a lo largo del perfil del suelo, cargando las moléculas de herbicidas a puntos más profundos del suelo, con posibilidades de contaminar aguas subterráneas a través de la lixiviación.

El uso de radioisótopos es muy eficiente para entender los mecanismos de disipación de agrotóxicos en el ambiente después de su aplicación debido a la eficiencia en la detección en concentraciones y precisión con que se obtienen resultados las técnicas radiométricas.

2.2.7. Uso de Isótopos radiactivos

Los radioisótopos son utilizados para saber la elucidación del destino de agrotóxicos orgánicos en el ambiente, siendo el ^{14}C más utilizado, debido a su tiempo de vida (5730 años), ya que emite radiación beta de baja energía y además no necesita equipos de protección personal modernos. Los radioisótopos ayudan a la detección de cantidades mínimas de residuos de agrotóxicos en corto tiempo. La eficiencia en la detección de bajas concentraciones y precisión con que se obtienen resultados; las técnicas radiométricas, utilizando compuestos radiomarcados, son muy eficientes para estudiar los mecanismos de disipación de agrotóxicos en el ambiente después de su aplicación, debido a que la propiedad física del radioisótopo no altera su comportamiento químico y permite el rastreo del compuesto en estudio.

2.2.8. El radioisótopo carbono 14 (^{14}C)

El carbono posee varios isótopos. Los principales son: ^{12}C (98,89 %) y ^{13}C (1,11 %) estables, y el ^{14}C inestable, encontrado en la atmósfera en la proporción de un átomo por cada 1012 átomos de ^{12}C . El ^{14}C recibe esta numeración porque presenta un número de masa 14 (6 protones y 8 neutrones). Este isótopo presenta dos neutrones más en su núcleo que el isótopo estable ^{12}C . Entre los tres isótopos inestables del carbono, el ^{14}C es aquel que presenta la mayor vida media, que es de casi 5730 años. El ^{14}C es un radioisótopo producido de manera continua a través de reacciones nucleares a partir de interacciones entre las partículas energéticas (rayos-cósmicos) y núclidos atmosféricos.

2.2.9. Lixiviación de compuestos orgánicos en suelos

El proceso de lixiviación es la principal forma de transporte de las moléculas no-volátiles y solubles en agua, en el suelo. Esas moléculas se mueven en el perfil del suelo, juntamente con el flujo de agua, por la diferencia de potencial del agua entre dos puntos (Plata, Cardinali, Lavorenti, Tornisiello, & Regitano, 2003). Inoue et al. (2003) definieron lixiviación como el movimiento descendente de los agrotóxicos en la matriz del suelo.

La lixiviación presenta dos aspectos importantes: es fundamental para la incorporación superficial de la mayoría de los agrotóxicos, alcanzando semillas o plantas en germinación; pero, cuando es excesiva, puede llevar al herbicida hasta las cercanías de las semillas en germinación o a las raíces del cultivo, pueden ser cargados en capas del suelo más profundas, limitando su acción y pudiendo, inclusive, promover la contaminación de la napa freática (Velini, 1992). Contrariamente al movimiento descendente en el perfil del suelo, puede ocurrir un movimiento ascendente de agrotóxicos con alta solubilidad en agua por el flujo capilar, especialmente cuando son aplicados en regiones calientes, bajo riego (Mangels, 1991; Oliveira & Brighenti, 2011).

Los factores relacionados con el suelo, ambiente y características de la propia molécula que afectan la lixiviación de determinado herbicida, son: contenido y tipo de materia orgánica, retención por los coloides del suelo, composición y distribución del tamaño de las partículas del suelo, densidad del suelo, tamaño y distribución de los poros, pH, contenido de agua del suelo, topografía o pendiente del área, intensidad de la lluvia

o riego después de la aplicación y el manejo del suelo, solubilidad en agua, persistencia en el suelo y potencial de removilización de las moléculas de los agrotóxicos. Cuanto mayor sea la retención del producto por los coloides del suelo, menor será la cantidad del producto en solución propensa a la lixiviación (Oliveira & Brighenti, 2011).

2.2.10. Antibióticos

Los antibióticos son medicamentos que ayudan en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas.

2.2.11. Pesticida

Los pesticidas son sustancias destinadas a combatir estas plagas. En su mayoría, son de naturaleza química, aunque en ocasiones pueden ser de naturaleza biológica o mineral.

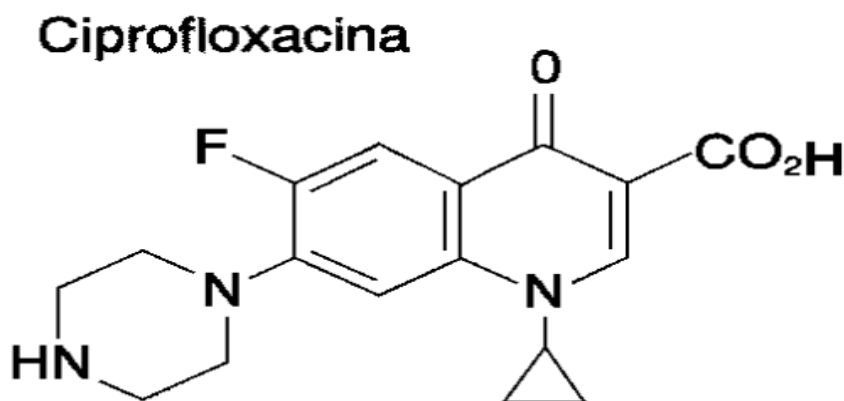
Los pesticidas se utilizan para controlar diversas plagas, transmisores de enfermedades. Los pesticidas son ampliamente utilizados en la agricultura para el control de malezas, la infestación y enfermedades.

2.2.12. Ciprofloxacino

El Ciprofloxacino es un antibiótico que pertenece a la familia de las fluoroquinolonas; el principio activo es ciprofloxacino. Ciprofloxacino actúa eliminando las bacterias que causan infecciones; solo actúa con cepas específicas de bacterias.

2.2.12.1. Propiedades farmacológicas

De la cantidad administrada, máximo puede ser asimilado el 80 %, que se absorbe por vía oral, el hígado lo metaboliza y se forman varios metabolitos activos. Se elimina por vía renal. Su vida media es de unas 4 h.

Figura 1*Estructura química de Ciprofloxacino*

Nota. El gráfico representa la estructura química del ciprofloxacino. Tomado de Antimicrobianos Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación, 2000, Rev.Chill Infect.

2.2.13. Efectos ambientales del Ciprofloxacino

La presencia de ciprofloxacina en diferentes matrices ambientales genera efectos adversos diversos. En componentes acuáticos y del suelo, se ha documentado que la exposición a este antibiótico promueve la resistencia a antibióticos en bacterias relevantes, lo cual puede afectar tanto a la biota animal como a las poblaciones humanas (Al-Buriah et al., 2022). En comunidades microbianas acuáticas, su presencia reduce la actividad respiratoria y el catabolismo microbiano, impactando negativamente en procesos clave como la nitrificación y desnitrificación, esenciales para el equilibrio de los ecosistemas acuáticos (Bhagat et al., 2020).

Asimismo, en organismos fotosintéticos acuáticos, se ha demostrado que concentraciones elevadas de ciprofloxacina inhiben el crecimiento de microalgas y alteran la composición bioquímica de especies como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Monoraphidium* sp. (Ricky & Shanthakumar, 2023). En invertebrados terrestres, como *Eisenia fetida*, la exposición a este compuesto ha producido daño en el ADN y alteraciones en enzimas antioxidantes, evidenciando un efecto tóxico sistémico. Por otro lado, la literatura científica ha reportado que la ciprofloxacina posee un potencial

de bioacumulación en organismos acuáticos, lo cual podría derivar en efectos toxicológicos a largo plazo (Grčić et al., 2023).

En el caso de especies vegetales con capacidad de absorción, como *Lemna minor* (lenteja de agua), se han observado efectos negativos en el crecimiento y en la capacidad fotosintética en presencia de ciprofloxacina (Shen et al., 2024). Además, investigaciones recientes indican que este antibiótico puede inducir estrés oxidativo y alterar el metabolismo mitocondrial en células vegetales, comprometiendo su fisiología (Nunes et al., 2019). Finalmente, en suelos fertilizados con estiércol contaminado, la ciprofloxacina puede facilitar la propagación de genes de resistencia a antibióticos, representando un riesgo emergente para la salud ambiental (Stando, 2022).

2.2.14. Atrazina

La atrazina es el nombre común de un herbicida ampliamente usado. Se usa principalmente en fincas. La atrazina se usa en cosechas de caña de azúcar, maíz, piñas, sorgo y en ciertos tipos de nueces. La atrazina puede ser rociada sobre cosechas antes de que las cosechas empiecen a crecer y después de que han emergido del suelo. Entre los nombres registrados de la atrazina se incluyen Aatrex®, Aatram®, Atratol® y Gesaprim®.

2.2.15. El suelo y sus interacciones

El suelo está compuesto por minerales, materia orgánica, diminutos organismos vegetales y animales, aire y agua. Es una capa delgada que se ha formado muy lentamente, a través de los siglos, con la desintegración de las rocas superficiales por la acción del agua, los cambios de temperatura y el viento. Las plantas y animales que crecen y mueren dentro y sobre el suelo son descompuestos por los microorganismos, transformados en materia orgánica y mezclados con el suelo. (FAO, 1996).

2.2.16. Aguas residuales

Son aquellas aguas cuyas características originales han sido modificadas por actividades humanas y que, por su calidad, requieren un tratamiento previo, antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado (OEFA, 2014).

Las aguas residuales necesitan pasar por tratamiento apropiado, previo a su reúso o disposición final. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales son un conjunto integrado de operaciones y procesos físicos, químicos y biológicos, que se utilizan con la finalidad de depurar las aguas residuales hasta un nivel tal que permita alcanzar la calidad requerida para su disposición final o su aprovechamiento mediante el reúso (Ministerio del Ambiente, 2009).

2.2.17. Cultivo de Alfalfa

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una de las leguminosas más importantes, debido a su facilidad de adaptación a diversos ambientes y a su calidad nutricional. Otra característica importante es su gran producción de biomasa, que permite almacenar forraje para aquellas épocas del año en donde las condiciones del clima afectan la oferta forrajera. (Flórez-Delgado, 2015).

Tabla 1

Los cultivos en la región Tacna con mayor cantidad de producción

CULTIVOS PERMANENTES			
CULTIVO	PRODUCCIÓN ANUAL		
	2019	2020	VAR%
Alfalfa	236,162	269,205	13,99
Cirolero	263	218	17,11
Damasco	72	76	5,56
Higuera	147	161	9,52
Manzano	1,730	2,051	18,55
Melocotonero	556	734	34
Membrillo	91	92	1
Naranja	4588	7,444	62
Olivo	145,887	122,731	16
Palto	212	287	35
Peral	1,538	1,551	1
Plátano	25	26	4
Tuna	1,370	1,397	2
Vid	6,856	6,817	2

Nota. Extraído de la Dirección Regional Agricultura de Tacna, 2020

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo y diseño de investigación

La presente investigación tiene como objetivo demostrar los efectos que tiene la sinergia de un antibiótico y un herbicida sobre alfalfa y suelo; por lo tanto, se enmarca en la investigación experimental.

Enfoque	: Cuantitativo
Tipo	: Aplicada
Nivel	: Explicativo
Diseño	: Experimental Factorial

3.2. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ecotoxicología del Centro de Energía Nuclear en Agricultura de la Universidad de Sao Paulo en Brasil, las muestras de suelo para el experimento de lixiviación en suelo fueron colectadas de la Región Tacna siguiendo las siguientes coordenadas: (17 46'59.4" S, 70 33'34.2" E) en Sama Grande, Tacna. La muestra de suelo para el experimento de alfalfa fue colectada, de campos de cultivo en Piracicaba, SP, Brasil (22 42'49" S, 47 37'12" O), y fue combinada con sustrato NPK (13-36-13) (Basaplant – Compo Expert) en relación 1:1(Mendes et. al. 2019).

3.3. Instrumentos

3.3.1. Reactivos y materiales del experimento con alfalfa (*Medicago Sativa*)

Para el experimento en alfalfa se utilizaron maceteros de 20 X 16 X 15 de ancho, alto y base respectivamente, probetas de vidrio de 20 ml y 30 ml, cámara de crecimiento de plantas con condiciones controladas de temperatura, humedad, concentración de CO₂, iluminación, se utilizó sustrato NPK (13-36-13) (BASAPLANT – COMPO EXPERT),

semillas inoculadas de (*Rizhobium* sp), bandejas de plástico, bolsas de papel, regla, morteros, cernidores de 0,2 mm., pinzas, tijeras.

3.3.2. Características del material vegetal *Medicago sativa*

El experimento se realizó utilizando semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), una leguminosa perenne ampliamente empleada como forrajera debido a su alto contenido proteico, capacidad de fijación biológica de nitrógeno y adaptabilidad a diversos tipos de suelo. Las semillas empleadas pertenecían a una variedad comercial, seleccionada por su tolerancia al estrés ambiental y alta capacidad de nodulación. Antes de la siembra, se realizó un proceso de inoculación con *Rhizobium* sp., una bacteria simbiótica especializada en la fijación de nitrógeno atmosférico, con el fin de establecer una simbiosis efectiva y evaluar la interferencia de los contaminantes en este proceso.

La inoculación se realizó siguiendo el procedimiento adaptado de (Pourbabae et al., 2021b), con 5 g de semillas que se distribuyeron en una bandeja metálica esterilizada con alcohol y se mezclaron con 8 mL de melaza y 5 g de fosfato. Esta mezcla permitió una mejor adhesión del inóculo y nutrientes esenciales. Posteriormente, la preparación fue dejada en la oscuridad durante 12 horas a temperatura ambiente, facilitando la activación de las bacterias fijadoras.

El sustrato utilizado fue un suelo agrícola de la región de Piracicaba, Brasil, tamizado y corregido con cal agrícola hasta alcanzar un pH de entre 6 y 7. Las semillas inoculadas fueron sembradas a 1 cm de profundidad en macetas plásticas de 3,5 kg de capacidad y fueron regadas con agua tipo II para iniciar la germinación. La emergencia de las plántulas se observó a las 24 horas, y las primeras hojas uniformes aparecieron a las 48 horas, correspondientes al estado fenológico de emergencia (VE) según Basigalup y Manfredi (2007). El cultivo se mantuvo por 45 días en cámara de crecimiento, hasta alcanzar un estadio vegetativo avanzado, antes del inicio de floración.

Dado que el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la atrazina y el ciprofloxacino en la alfalfa, se decidió aplicar atrazina en dos momentos estratégicos del ciclo de cultivo: al inicio del desarrollo vegetativo, simulando su uso convencional como herbicida preemergente para el control de malezas, y en la fase final del experimento,

replicando prácticas agrícolas donde se realizan aplicaciones complementarias para prevenir el rebrote de malezas y asegurar la sanidad del cultivo. Esta estrategia experimental permitió observar el impacto del herbicida en fases críticas del desarrollo radicular y aéreo de la planta.

En el caso del ciprofloxacino, al tratarse de un contaminante emergente detectado en aguas de riego afectadas por efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs), se aplicó de forma continua a lo largo del experimento. Esta decisión experimental respondió a la necesidad de replicar condiciones ambientales realistas en zonas agrícolas expuestas a contaminantes farmacéuticos, y permitió evaluar los posibles efectos acumulativos y fisiológicos de su presencia prolongada sobre la alfalfa, incluyendo aspectos como la nodulación, biomasa y fijación de carbono.

3.3.3. Reactivos y materiales de experimento en suelo

Los materiales utilizados en el experimento de lixiviación fueron: Columnas de vidrio de 50 mm de diámetro, 350 mm de altura con punta inferior de 30 mm., lana de vidrio con 40 mm de diámetro y 3 milímetros de espesor.

Funil de vidrio de 40 mm de diámetro, cernidor de +/- 2 mm de abertura de malla, pipetas, papel filme, agua desionizada, arena de cuarzo lavada y seca en estufa a 100 °C, solución de CaCl_2 0.01 mol L^{-1} , sustancia tipo teste no radiomarcada, sustancia teste radiomarcada, sustancia de referencia.

3.3.4. Equipos de experimento en alfalfa

Los equipos utilizados en el experimento de alfalfa fueron: Lente de aumento de luz fría, balanza analítica, equipo espectrofotómetro de masas de relación isotópica ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, EE.UU.) conectado a un analizador elemental (Carla Erba modelo 1110; Milan, Italia) para determinar el contenido de carbono total expresado en porcentaje (%) (Oliveira et. Al. 2021).

3.3.5. Equipos de experimento en suelo

Para este experimento fue necesaria una bomba peristáltica, un vibrador eléctrico para tubo de ensayo, espectrómetro de centilación líquida, oxidador de muestras.

3.3.6. Materiales de campo

Los materiales utilizados fueron: Cooler, bolsas ziploc, lampa, pizarra, plumones.

3.3.7. Procedimientos para experimento en alfalfa

3.3.7.1. Instalación de experimento

Se usaron maceteros con dimensiones de 20 X 16 X 15 cm de ancho, alto y base respectivamente, con 4 kg de tierra agrícola hasta una altura de 17 cm. El suelo colectado correspondió a la capa superficial de (30 cm de profundidad) suelo y fue combinado con sustrato en relación 1:1 (Mendes et al., 2019). La siembra se realizó con semillas inoculadas (*Rizhobium* sp) a 1 cm de profundidad en las macetas. Un total de 48 maceteros con cultivo de alfalfa de 3 tratamientos con concentraciones de Atrazina con concentraciones de 0.46 ug L^{-1} , 46.0 ug L^{-1} (Frank et al., 2011) y Ciprofloxacino con concentraciones 35 ug L^{-1} , 350 ug L^{-1} , 3500 ug L^{-1} con 3 repeticiones cada una.

3.3.7.2. Preparación de caldo de Atrazina

Se utilizó un patrón de solución fría de Atrazina de 4mg/ml, siendo la concentración de trabajo inicial:

$$\begin{aligned} 200 \mu L &\rightarrow 530,75 \mu g \\ 1500 \mu L &\rightarrow x \\ x &= 3980.6 \mu g \end{aligned}$$

Retirándose de patrón técnico:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mL} &\rightarrow 400 \mu g \\ x &\rightarrow 3980,6 \mu L \\ x &= 995,1 \mu L \end{aligned}$$

Siendo la propuesta de solución final:

$$\begin{aligned} &995.1 \mu\text{L de ATZ técnica} \\ &+ 27 \mu\text{L de ATZ radiomarcada} \\ &+ 473 \mu\text{L de agua} \end{aligned}$$

Siendo un total del $1500 \mu\text{L}$ de solución radiomarcada final, quedando $300 \mu\text{L}$ o 227,280 dpm.

3.3.7.3. Procedimiento

Se llevó a cabo un diseño experimental completamente aleatorizado, en el cual se prepararon 48 maceteros con suelo proveniente de Piracicaba, Brasil. Estos maceteros fueron almacenados en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (véase la Figura 2). Durante un período de un mes y medio, se realizaron 13 riegos con agua tipo II, incorporando en algunas irrigaciones Atrazina y Ciprofloxacino, según el diseño experimental establecido (véase la Figura 3).

Figura 2

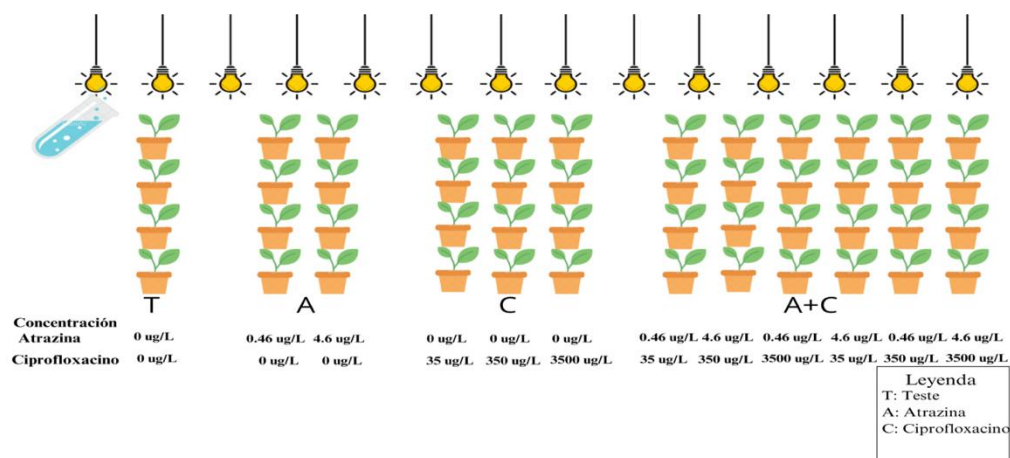
Cámara de crecimiento de plantas con condiciones controladas y maceteros del experimento instalados



Nota. Laboratorista irrigando la alfalfa con concentraciones indicadas de Atrazina y Ciprofloxacino. Fotografía tomada por el autor, 2023.

Figura 3

Imagen referencial del diseño del experimento con concentraciones de Atrazina y Ciprofloxacino



Nota. Maceteros organizados de acuerdo con el diseño experimental y concentraciones de ATZ y CIP consideradas. Imagen creada por el autor 2025.

En la fase de maduración, antes del inicio de la floración, se procedió a la cosecha y recolección de datos. Para la evaluación de las raíces, se utilizaron bandejas para separar el suelo de estas, lavándolas cuidadosamente con agua hasta eliminar completamente los residuos de suelo (véase la Figura 4). Posteriormente, se realizó el conteo manual de nódulos con el apoyo de una lámpara de luz fría y una lupa de aumento (véase la Figura 5).

Figura 4

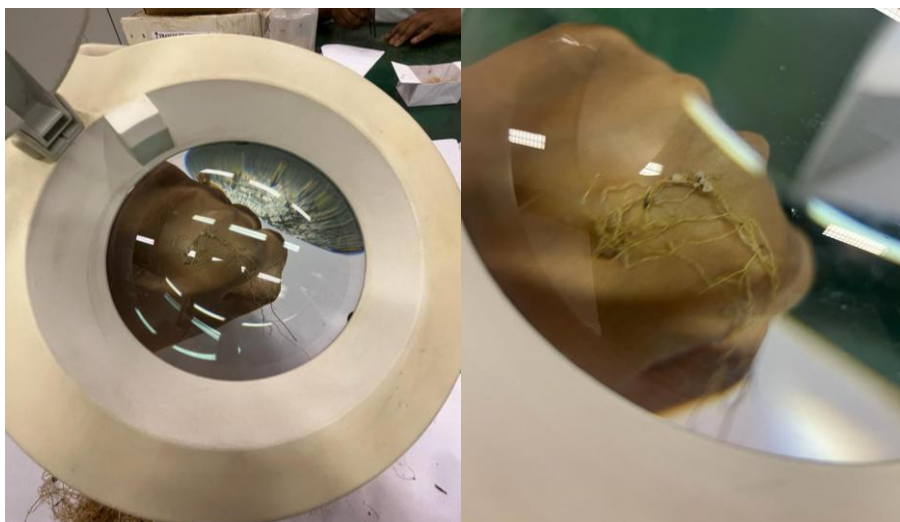
Lavado de raíces y separación del suelo en bandejas



Nota. Etapa de desmontaje de experimento para la obtención de datos requeridos en los objetivos. Fotografía tomada por el autor.

Figura 5

Conteo de nódulos



Nota. La imagen representa el conteo de nódulos de las raíces de cada unidad experimental mediante un lente de aumento. La fotografía fue tomada por el autor.

Figura 6

Muestras de biomasa aérea y radicular, llevadas a secado en estufa por 48 horas.



Notas. Muestras de alfalfa llevadas a estufa para ser pesadas posteriormente. Fotografía tomada por el autor.

Para la cuantificación del contenido total de carbono, los tallos y hojas secas fueron triturados hasta obtener un polvo fino (**véase la Figura 8**). Se extrajeron submuestras, las cuales fueron tamizadas con un cribado de 0,5 mm para garantizar su compatibilidad con el equipo de análisis (**véase la Figura 9**). La determinación del carbono total en porcentaje se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas de relación isotópica ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT, CA, EE.UU.), acoplado a un analizador elemental Carla Erba modelo 1110 (Milán, Italia). Este método se basa en la espectrometría de masas de relaciones isotópicas, donde las muestras son transportadas con helio y sometidas a una reacción térmica en presencia de catalizadores, transformándose en especies gaseosas para su análisis.

Figura 7

Muestra de biomasa aérea triturada y siendo tamizada



Nota. Trituración y tamizado de muestras para ser sometidas a análisis de carbono total.

Figura 8

Muestras de biomasa total para análisis de carbono



Nota. Muestras de planta en viales para ser analizadas. Fotografía tomada por el autor.

3.3.7.4. Preparación de suelo

El suelo fue colectado de la capa superficial de (30 cm de profundidad) de la zona de Tacna y fue combinado con sustrato NPK en relación 1:1, siguiendo la metodología descrita por (Mendes et al. 2019).

3.3.7.5. Frecuencia de riego

Se realizaron 6 riegos con Ciprofloxacino y 1 riego con Atrazina y Ciprofloxacino; se irrigó 100 mL de agua tipo 2, la frecuencia de riego será cada 48 horas con (100 mL) de agua durante 16 días. Durante 21 días se realizaron 6 riegos de agua tipo 2 de (200 mL).

3.3.7.6. Determinación de nódulos

Después de realizada la siembra de semillas de alfalfa (*M. sativa*), al pasar aproximadamente 40 días, se realizó la cosecha para determinar el número de nódulos presentes en las raíces (Carrasco et al., 2005), se utilizaron bandejas de plástico para la separación de las raíces del suelo, se limpiaron con agua tipo 2 (Pourbabaee et al., 2021a) y, con la ayuda de una lámpara de luz fría con lente de aumento, se realizó el conteo de nódulos.

3.3.7.7. Determinación de masa área y radicular

Se dividió la planta, contándose desde el inicio de la raíz de las plantas y término del tallo, luego se colocó la raíz en bolsa de papel, se llevó a Balanza analítica, colocándola en placas Petri, tarando y colocando la planta y se pesará.

3.3.7.8. Determinación de carbono y nitrógeno en masa aérea y radicular

Las hojas y tallos de cada planta fueron colocados en bolsas de papel y se secaron a 65 °C. Luego se molieron hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se tomó una submuestra, se recolectó manualmente para eliminar los restos y luego se molió hasta obtener un polvo fino. Para calcular el contenido total de carbono en porcentaje (%), las submuestras de hojas molidas se colocaron en cápsulas de estaño y se cargaron en un

espectrómetro de masas de relación isotópica ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, EE. UU.) conectado a un analizador elemental (Carla Erba modelo 1110; Milán, Italia). El método se basa en la espectrometría de masas de relaciones isotópicas para analizar moléculas gaseosas. Las moléculas se introducen en un espectrómetro de masas y se arrastran con helio antes de que las muestras sean sometidas a una reacción a altas temperaturas. El proceso se acompaña de catalizadores y tiene como objetivo transformar las muestras para analizar en especies diferentes.

3.3.7.9. Análisis de datos

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos y los cálculos estadísticos se realizarán utilizando el programa informático R STUDIO para Windows. Los resultados indicados serán medias y desviaciones estándar. Para verificar la normalidad e igualdad de varianza del modelo, se utilizará la prueba de Shapiro-wilk. Se utilizará el modelo lineal general (GLM) para determinar los efectos principales e interactivos del cultivo y la concentración de CFX y ATZ; asimismo, se utilizó el test de Tuckey.

3.3.8. Procedimientos para experimento en suelo

3.3.8.1. Procedimiento

Se llevó a cabo un experimento de lixiviación en columnas de suelo para evaluar la movilidad de Atrazina (ATZ) radiomarcada con Carbono-14 (^{14}C -ATZ) en presencia y ausencia de Ciprofloxacino (CIP). Se utilizó la metodología establecida en la OECD Test No. 312, con suelos agrícolas colectados de la región de Tacna, Perú.

Las muestras de suelo fueron secadas al aire, tamizadas a 2 mm y empaquetadas en columnas de vidrio de 50 mm de diámetro y 350 mm de altura (véase la Figura 10), selladas en la base con lana de vidrio y una capa de arena de cuarzo, las columnas se saturaron con una solución de CaCl_2 0.01 M para estabilizar la estructura y minimizar la variabilidad en la percolación (véase la Figura 11).

Figura 9

Llenado de columnas con suelo recolectado en Tacna



Nota. Llenado de columnas con suelo recolectado en Tacna

La imagen representa el llenado de columnas de vidrio con suelo agrícola recolectado en Tacna. El suelo fue previamente secado al aire y tamizado a 2 mm para asegurar la homogeneidad de la matriz edáfica. El llenado se efectuó utilizando un embudo de boca ancha, procurando una deposición gradual que evitara la compactación no deseada. Fotografía tomada por el autor.

Figura 10

Instalación de columnas de suelo con arena de cuarzo en la punta y lana de vidrio en la superficie



Nota. Montaje experimental de columnas de suelo para el ensayo de lixiviación.

Las columnas de vidrio fueron preparadas con una base de lana de vidrio para evitar la pérdida de partículas finas, seguida por una capa de arena de cuarzo para asegurar una distribución homogénea del flujo de agua. Se observa la instalación en serie de las columnas, conectadas a un sistema de irrigación controlado para simular el percolado. Fotografía tomada por el autor.

Se aplicaron los tratamientos experimentales en la superficie del suelo: (A) Atrazina sola ($0.46 \mu\text{g L}^{-1}$ de $^{14}\text{C-ATZ}$) y (B) Atrazina ($0.46 \mu\text{g L}^{-1}$ de $^{14}\text{C-ATZ}$) en presencia de Ciprofloxacino ($35 \mu\text{g L}^{-1}$). Tras la aplicación, se inició un régimen de irrigación controlado con CaCl_2 0.01 M a un flujo de 8 mL h^{-1} durante 48 horas, equivalente a una precipitación de 200 mm (**Véase la Figura 12**).

Figura 11

Aplicación de solución radiomarcada en columnas de suelo



La aplicación de la solución de Atrazina radiomarcada (^{14}C -ATZ) en columnas de suelo mediante micropipeta automática. El Dr. Valdemar realizó la dosificación precisa de la solución en la superficie de cada columna, asegurando una distribución homogénea del contaminante para los ensayos de lixiviación. Este procedimiento es fundamental para la correcta evaluación de la movilidad del compuesto en el perfil del suelo bajo condiciones controladas. Fotografía tomada por el autor.

Los lixiviados fueron recolectados cada 12, 24, 36 y 48 horas (**Véase la Figura 13**), cuantificándose la radioactividad asociada a ^{14}C -ATZ mediante espectrometría de centelleo líquido (LSC). Posteriormente, las columnas fueron desmontadas y el suelo se seccionó en estratos de 5 cm, permitiendo evaluar la distribución del herbicida en el perfil del suelo mediante oxidación de muestras y análisis de radioactividad residual.

Figura 12

Recolección de lixiviados en columnas de suelo



Nota. Recolección de las fracciones de lixiviado en matraces Erlenmeyer

Durante el experimento de percolación en columnas de suelo. Cada fracción fue etiquetada de acuerdo al tiempo de muestreo para el posterior análisis de radioactividad mediante espectrometría de centelleo líquido (LSC). Este procedimiento permitió evaluar la dinámica de movilidad de la Atrazina radiomarcada (^{14}C -ATZ) en la matriz edáfica bajo condiciones controladas. Fotografía tomada por el autor.

3.3.8.2. Preparación de suelo

Las muestras de suelo fueron secadas al aire y cernidas en tamices de aproximadamente 2 mm. Estos procedimientos disminuyen la biomasa y/o la actividad microbiana del suelo, previniendo la biodegradación de la sustancia de prueba, los suelos fueron almacenados en condiciones normales de laboratorio, en bolsas de plástico debidamente identificadas con el número de lote, la fecha y el nombre del colector.

3.3.8.3. Preparación de columnas de suelo

Se cerró la punta de la columna de vidrio con lana de vidrio, se llenó la parte cónica con arena de cuarzo y empaquetó la columna hasta la altura de 30 cm (se pesó el

suelo añadido en la columna), se colocó pequeñas porciones de suelo seco al aire en el fondo de la misma, vibrando el conjunto para acomodar el suelo, evitando así la formación de burbujas de aire. Se pesaron las columnas para controlar la reproducibilidad del proceso de empaquetado de las columnas.

Se humedeció lentamente el suelo con flujo ascendente. Se colocó la columna de vidrio de 2000 ml y agregó la solución de CaCl 0,01 mol L' en ella, lentamente, de modo que el nivel de la solución no fue mayor a 10 cm que el frente de humedad del suelo; se dejó el suelo inundado durante 30 minutos aproximadamente. Se realizó dos repeticiones para cada suelo.

3.3.8.4. Preparación de sustancia Atrazina

Se retiró la columna de vidrio de la probeta, se instaló en el soporte, se esperó 1 o 2 horas para drenar la solución de CaCl 0,01 mol L', luego se aplicó el producto directamente sobre el suelo húmedo; se cubrió con un disco de lana de vidrio, se encajó un embudo invertido, donde se conecta la manguera por donde la solución de CaCl_2 0.01mol L⁻¹ pasa a 8 mL h⁻¹ por 48 horas, simulándose un flujo de lluvia de 200mm.

Este experimento fue conducido en un laboratorio con poca luz y temperatura controlada entre 18 y 25C.

3.3.8.5. Colecta de lixiviado

Cada 12 horas se colectó el lixiviado y se midió el volumen; después se retiró tres alícuotas, posteriormente fueron llevadas y leídas en el Espectrómetro de Cintilación líquida.

3.3.8.6. Remoción de columnas de suelo

El suelo se retiró después de que finalizó la esorrentía de la solución de CaCl 0,01 mol L. Se utilizó inyección de aire para eliminar el suelo de la columna, inyectándose aire en la punta de la columna de vidrio para forzar la salida del suelo, que se cortó en 5 secciones de tamaños iguales, estas muestras de suelo fueron secadas al aire, pesadas y homogeneizadas.

Asimismo, las submuestras del suelo seco se quemaron en un oxidador para cuantificar la radioactividad total.

3.3.8.7. Análisis de resultados

Se utilizó presentaciones de medias y desvíos padrao con Excel.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Resultados del experimento en Atrazina y Ciprofloxacino en Alfalfa

4.1.1. Análisis físicoquímico de suelo Piracicaba

El suelo colectado corresponde a la capa superficial de (30 cm de profundidad) de campos de cultivo en Piracicaba, SP, Brasil (22°42'49''S, 47°37'12'' O), combinado con sustrato NPK (Figura 11) (13-36-13) (BASAPLANT - COMPO EXPERT) en relación 1:1, descrita en la metodología de (Mendes et al., 2019); posteriormente, se realizó el análisis físicoquímico de suelo en el laboratorio de la Escuela Superior Luiz de Queiroz de la Universidad de Sao Paulo.

Tabla 2

Resultados físicoquímicos para suelo de Piracicaba

Muestra	pH	M.O.	CTC	V	Textura de suelo
	-	(g.dm3)	(mmolc.dm3)	(%)	-
Solo 2	5,87	29,9	79	85	Media-arenosa

Nota. M.O: materia orgánica, CTC: capacidad de cambio catiónico, V: Saturación de bases por CTC.

4.2. Resultados estadísticos del número de nódulos en alfalfa

Tabla 3

Resultados estadísticos de número de nódulos en alfalfa

Tratamientos	Número de nódulos	SD Error	
ATZ0.46	152,000	±	84,000
ATZ0.46+CIP35	56,000	±	21,800
ATZ0.46+CIP350	70,400	±	22,900
ATZ0.46+CIP3500	72,300	±	43,700
ATZ46	66,000	±	20,400
ATZ46+CIP35	124,000	±	80,000
ATZ46+CIP350	124,000	±	76,000
ATZ46+CIP3500	173,000	±	76,000
CIP35	132,000	±	63,000
CIP350	146,000	±	94,000
CIP3500	126,000	±	59,000
CK2	22,500	±	7,400

Nota. SD: Desviación estándar error.

Conforme a la hipótesis específica 1, que fue planteada como: Existe un efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo la producción de nódulos en las raíces de alfalfa. Se procede a realizar la prueba de hipótesis.

a) Formulación de Hipótesis estadística

H_0 : No hay diferencia significativa entre los promedios de número de nódulos en las raíces de la alfalfa bajo diferentes concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina.

H_1 : Al menos una combinación de las concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina genera diferencia significativa entre los promedios de número de nódulos en alfalfa.

b) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

c) Prueba estadística: Se emplea ANOVA con prueba F

Tabla 4*Análisis de varianza para número de nódulos*

Tratamiento	GL	SC	MC	F valor	P valor
Número de nódulos por Tratamiento	11	248,900	22,624	3,028	0,0058
Residuo	36	269,000	7,472		

Nota. GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, MC: Media de cuadrados.

d) Criterio de decisión

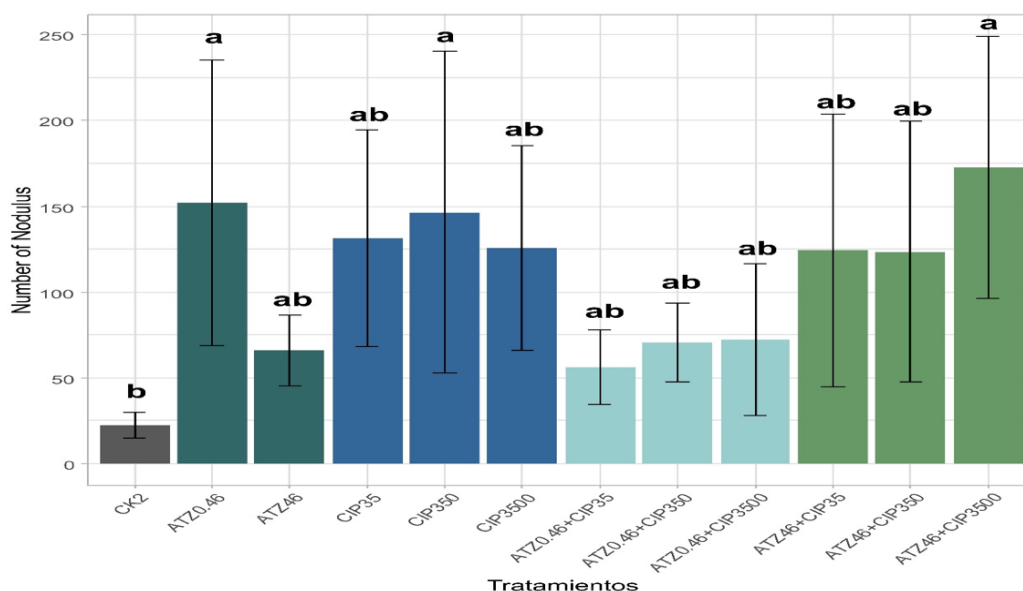
Si $p\text{-valor} < \alpha \Rightarrow$ Rechaza H_0

e) Conclusión estadística

La **Tabla 4** ANOVA descompone la varianza de Número de Nódulos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón F, que en este caso es igual a 3,028, es una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del Número de Nódulos de un nivel de tratamiento a otro con un nivel de confianza del 95 %. Para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras, se seleccionó la Prueba de Tukey, también conocida como prueba de significancia honesta de Tukey (HSD).

Figura 13

Test de Tuckey para número de nódulos en alfalfa



Nota. CK: Test, ATZ: Atrazina, CIP: Ciprofloxacino

La **Figura 13** muestra el procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado a, b y ab en la parte superior de las barras, lo que indica que las barras con diferente literal muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 %. En la figura se identifican hasta 3 grupos homogéneos. Con este método, existe un riesgo del 5 % de considerar que cada par de medias es significativamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0.

4.3. Resultados estadísticos de biomasa seca aérea y radicular

Tabla 5

Resultados estadísticos biomasa seca aérea en alfalfa

Tratamientos	Masa Aérea media	SD Error
ATZ0.46	3,000	± 1,030
ATZ0.46+CIP35	2,860	± 0,620
ATZ0.46+CIP350	3,010	± 0,870
ATZ0.46+CIP3500	2,740	± 0,450
ATZ46	1,920	± 0,500
ATZ46+CIP35	2,900	± 0,600
ATZ46+CIP350	2,960	± 0,880
ATZ46+CIP3500	3,480	± 0,830
CIP35	3,070	± 1,620
CIP350	3,130	± 1,440
CIP3500	2,810	± 0,400
CK2	1,780	± 0,380

Nota. SD: Desviación estándar error

Tabla 6

Resultados estadísticos biomasa seca radicular en alfalfa

Tratamientos	Masa Radicular media	SD Error
ATZ0.46	1,700	± 1,480
ATZ0.46+CIP35	1,250	± 0,710
ATZ0.46+CIP350	1,120	± 0,480
ATZ0.46+CIP3500	0,840	± 0,250
ATZ46	0,400	± 0,206
ATZ46+CIP35	2,620	± 0,960
ATZ46+CIP350	1,560	± 0,940
ATZ46+CIP3500	2,240	± 0,850
CIP35	1,190	± 0,890
CIP350	1,720	± 0,650
CIP3500	1,900	± 1,180
CK2	0,270	± 0,148

Nota. SD: Desviación estándar error.

Conforme a la hipótesis específica 2, que fue planteada como: Existe un efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina disminuyendo la producción de biomasa seca aérea y radicular. Se procede a realizar la prueba de hipótesis.

a) Formulación de Hipótesis estadística

H_0 : No hay diferencia significativa entre los promedios de producción de biomasa seca aérea y radicular en alfalfa bajo diferentes concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina.

H_1 : Al menos una combinación de las concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina genera diferencia significativa entre los promedios de producción de biomasa seca aérea y radicular en alfalfa.

b) Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$

c) Prueba estadística: Se emplea ANOVA con prueba F

Tabla 7

Análisis de varianza para biomasa aérea en alfalfa

Tratamiento	GL	SC	MC	F valor	P valor
Masa Aérea por tratamiento	11	10,470	0,952	1,185	0,3310
Residuo	36	28,900	0,803		

Nota. GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, MC: Media de cuadrados.

Tabla 8

Análisis de varianza para biomasa seca radicular

Tratamiento	GL	SC	MC	F valor	P valor
Massa Radicular por tratamiento	11	4479	0,407	3,581	0,0018
Residuos	36	4093	0,114		

Nota. GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, MC: Media de cuadrados.

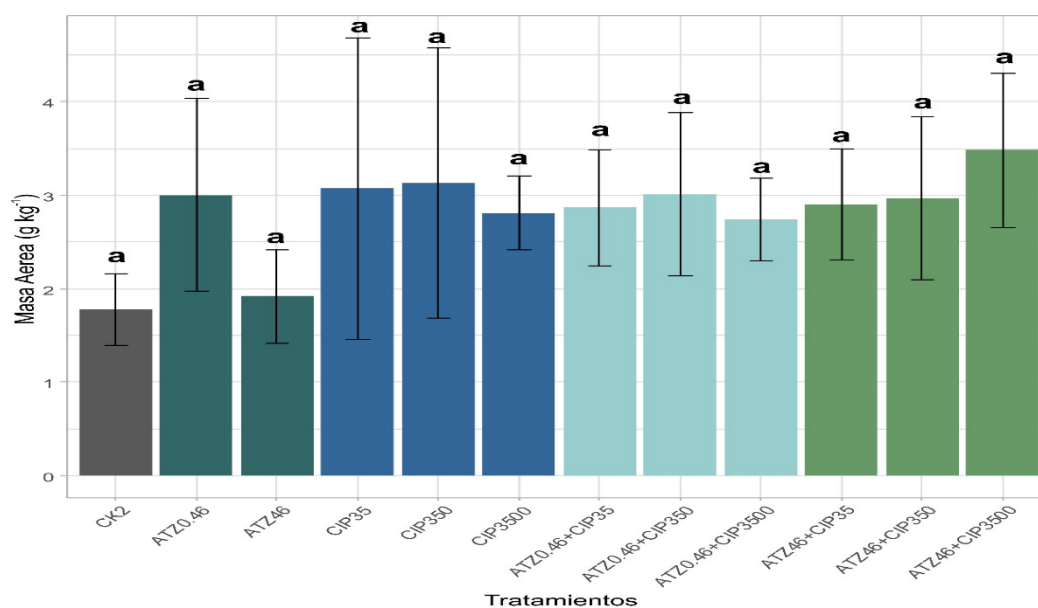
La **Tabla 7** ANOVA descompone la varianza para biomasa aérea en alfalfa en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón F, que en este caso es igual a **1,185**, es una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F no es inferior a 0,05, entonces no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de biomasa aérea en alfalfa de un nivel de tratamiento a otro con un nivel de confianza del 95 %. Por lo que incluso no es necesario determinar qué medias son

significativamente diferentes de otras mediante la Prueba de Tukey, también conocida como prueba de significancia honesta de Tukey (HSD).

La **Tabla 8** ANOVA descompone la varianza para masa radicular en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón F, que en este caso es igual a **3,581**, es una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05, entonces existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de masa radicular en alfalfa de un nivel de tratamiento a otro con un nivel de confianza del 95 %. Por lo que es necesario determinar qué medias son significativamente diferentes de otras mediante la Prueba de Tukey, también conocida como prueba de significancia honesta de Tukey (HSD).

Figura 14

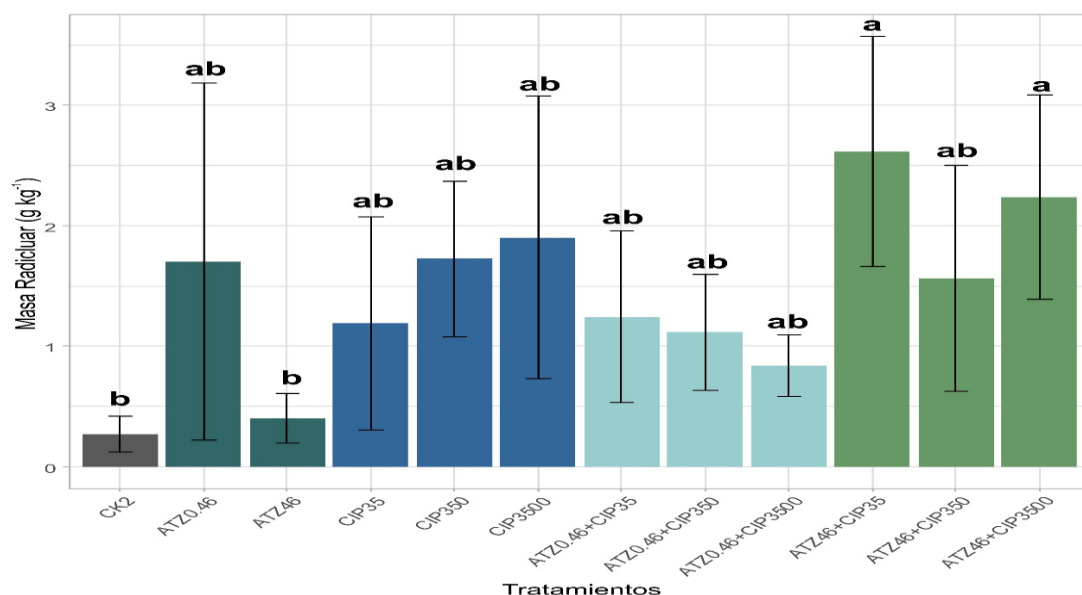
Test de Tuckey para biomasa aérea en alfalfa



Nota. CK: Test, ATZ: Atrazina, CIP: Ciprofloxacino

Figura 15

Teste de Tuckey para masa radicular en alfalfa



Nota. CK: Test, ATZ: Atrazina, CIP: Ciprofloxacino

Así como se observa en la **Figura 15**, solo se tiene un solo grupo, lo cual ratifica que no hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos empleados.

La **Figura 16** muestra el procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado **a**, **b** y **ab** en la parte superior de las barras, lo que indica que las barras con diferente literal muestran diferencias estadísticamente significativas con un **nivel de confianza del 95 %**. En la figura se identifican hasta 3 grupos homogéneos. Con este método, existe un riesgo del 5 % de considerar que cada par de medias es significativamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0.

4.4. Resultados estadísticos de contenido de carbono en biomasa aérea.

Tabla 9

Resultados estadísticos de contenido de carbono en biomasa aérea.

Tratamientos	C-Plant media	SD Error	
ATZ0.46	404,000	±	3,000
ATZ0.46+CIP35	407,000	±	22,000
ATZ0.46+CIP350	415,000	±	14,000
ATZ0.46+CIP3500	425,000	±	23,000
ATZ46	409,000	±	11,000
ATZ46+CIP35	423,000	±	15,000
ATZ46+CIP350	411,000	±	16,000
ATZ46+CIP3500	413,000	±	8,000
CIP35	423,000	±	7,000
CIP350	426,000	±	2,000
CIP3500	415,000	±	10,000
CK2	409,000	±	3,000

Nota. SD: Desviación estándar error

Conforme a la hipótesis específica 3, que fue planteada como: Existe un efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina, disminuyendo la producción de carbono en la biomasa seca aérea y radicular de alfalfa. Se procede a realizar la prueba de hipótesis.

a) Formulación de Hipótesis estadística

H_0 : No hay diferencia significativa entre los promedios de producción de carbono en la biomasa seca aérea bajo diferentes concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina.

H_1 : Al menos una combinación de las concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina genera diferencia significativa entre los promedios de producción de carbono en la biomasa seca aérea.

b) Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$

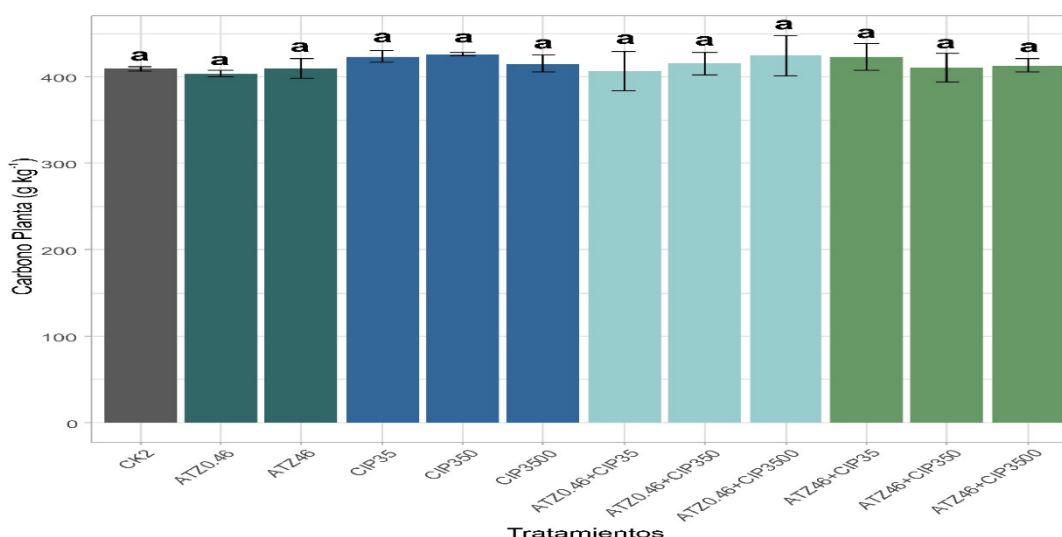
c) Prueba estadística: Se emplea ANOVA con prueba F

Tabla 10*Análisis de varianza para carbono en planta*

Tratamiento	GL	SC	MC	F valor	P valor
C-Planta por Tratamiento	11	2418	219,8	1,346	0,2410
Residuos	36	5880	163,3		

Nota. GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, MC: Media de cuadrados.

La **Tabla 10** ANOVA descompone la varianza para el carbono en planta en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón F, que en este caso es igual a **1,346**, es una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F no es inferior a 0,05, entonces **no existe una diferencia estadísticamente significativa** entre la media de carbono en planta de alfalfa de un nivel de tratamiento a otro con un nivel de confianza del 95 %. Por lo que incluso no es necesario determinar qué medias son significativamente diferentes de otras mediante la Prueba de Tukey, también conocida como prueba de significancia honesta de Tukey (HSD).

Figura 16*Test de Tuckey para carbono en planta*

Nota. CK: Test, ATZ: Atrazina, CIP: Ciprofloxacino

Así como se observa en la **Figura 17**, solo se tiene un solo grupo, lo cual ratifica que no hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos empleados.

4.5. Resultados del experimento de Atrazina y Ciprofloxacino en suelo

Tabla 11

Análisis fisicoquímico del suelo de Tacna

Nota. M.O: materia orgánica, CTC: capacidad de cambio catiónico, V: Saturación de bases por CTC.

4.5.1. Análisis fisicoquímico del suelo de Tacna

Muestra	pH	M.O. (g.dm ³)	CTC (mmolc.dm ³)	V (%)	Textura de suelo
	-				-
Solo 1	5,4	2,4	63,5	82	arenosa

El suelo fue colectado de la capa superficial de (30 cm de profundidad) de la zona de Tacna; posteriormente, se realizó el análisis fisicoquímico de suelo en el laboratorio de la Escuela Superior Luiz de Queiroz de la Universidad de Sao Paulo.

4.5.2. Resultados estadísticos del contenido de nitrógeno en el suelo

Tabla 12

Resultados estadísticos de nitrógeno en suelo

Tratamientos	Media Nitrógeno	SD Error
ATZ0.46	1,670	± 0,130
ATZ0.46+CIP35	1,640	± 0,110
ATZ0.46+CIP350	1,540	± 0,200
ATZ0.46+CIP3500	1,560	± 0,100
ATZ46	1,660	± 0,120
ATZ46+CIP35	1,450	± 0,090
ATZ46+CIP350	1,400	± 0,090
ATZ46+CIP3500	1,830	± 0,560
CIP35	1,470	± 0,150
CIP350	1,440	± 0,150
CIP3500	1,480	± 0,120
CK2	1,570	± 0,170

Nota. SD: Desviación estándar error

Conforme a la hipótesis específica 4, que fue planteada como: Existe un efecto significativo de la sinergia de Ciprofloxacino y Atrazina, disminuyendo el contenido de nitrógeno en el suelo. Se procede a realizar la prueba de hipótesis.

a) Formulación de Hipótesis estadística

H_0 : No hay diferencia significativa entre los promedios del contenido de nitrógeno en el suelo bajo diferentes concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina.

H_1 : Al menos una combinación de las concentraciones de Ciprofloxacino y Atrazina genera diferencia significativa entre los promedios de contenido de nitrógeno en el suelo.

b) Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$

c) Prueba estadística: Se emplea ANOVA con prueba F

Tabla 13

Análisis de varianza para nitrógeno en suelo

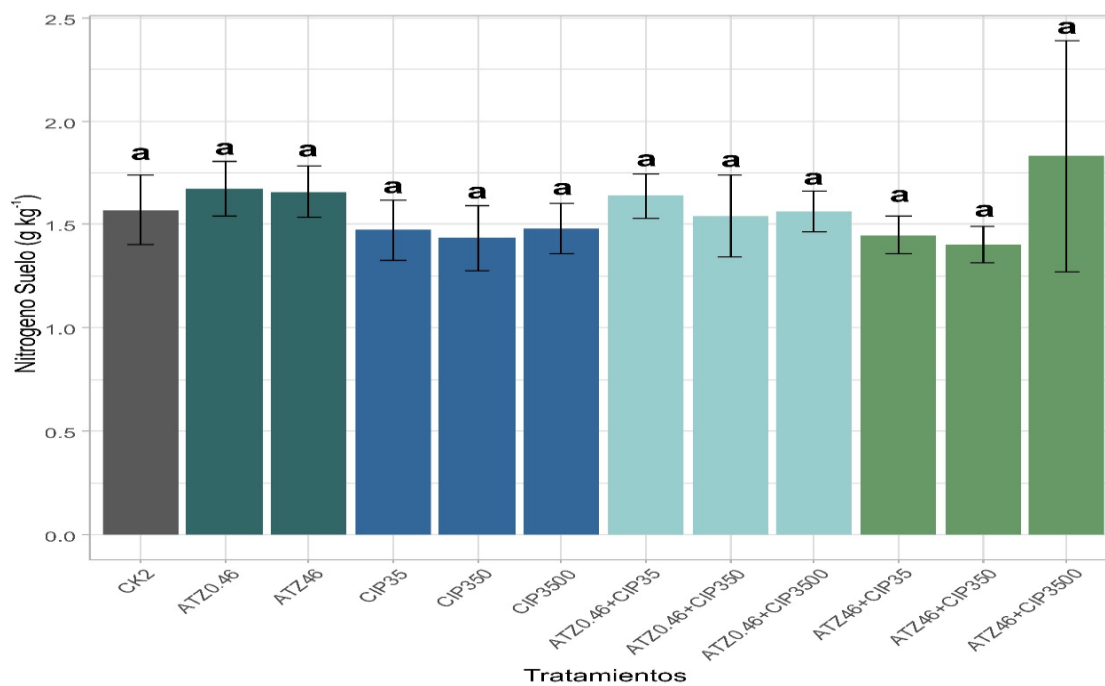
Tratamientos	GL	SC	MC	F valor	P valor
Nitrógeno en suelo por Tratamiento	11	0,0978	0,0089	1,4760	0,1840
Residuos	36	0,2169	0,0060		

Nota. M.O: materia orgánica, CTC: capacidad de cambio catiónico, V: Saturación de bases por CTC.

La **Tabla 13** ANOVA descompone la varianza para el nitrógeno en suelo en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. La razón F, que en este caso es igual a **1,4760**, es una relación entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F no es inferior a 0,05, entonces **no existe una diferencia estadísticamente significativa** entre la media del nitrógeno en suelo de alfalfa de un nivel de tratamiento a otro con un nivel de confianza del 95 %. Por lo que incluso no es necesario determinar qué medias son significativamente diferentes de otras mediante la Prueba de Tukey, también conocida como prueba de significancia honesta de Tukey (HSD).

Figura 17

Test de Tuckey para Nitrógeno en suelo



Nota. CK: Test, ATZ: Atrazina, CIP: Ciprofloxacino

Así como se observa en la **Figura 18**, solo se tiene un solo grupo, lo cual ratifica que no hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos empleados.

4.5.3. Resultados de lixiviación de Atrazina en suelo

Tabla 14

Peso de frascos y lixiviados

ID columna	Tiempo h	Peso dos frascos - lixiviado		Volumen total mL
		Tara g	Tara + lixiviado g	
1	12	121,53	210,21	88,68
	24	116,71	206,8	90,09
	36	107,45	197,02	89,57
	48	126,97	220,7	93,73
2	12	131,69	218,85	87,16
	24	128,04	216,5	88,46
	36	124,6	211,62	87,02
	48	103,51	194,9	91,39
3	12	96,94	183,2	86,26
	24	130,67	218,2	87,53
	36	123,19	209,83	86,64
	48	137,8	228,38	90,58
4	12	136,3	221,8	85,5
	24	136,7	225,3	88,6
	36	134,2	225,27	91,07
	48	133,4	226,43	93,03
5	12	130,4	209,81	79,41
	24	130,6	217,5	88,9
	36	89,6	179,24	89,64
	48	129,6	221,25	91,65
6	12	141,7	225,35	83,65
	24	133,3	220,5	87,2
	36	103,6	193,43	89,83
	48	134,9	226,57	91,67

Nota. Fuente propia

Tabla 15*Valores de lixiviado en 12, 24, 36 y 48 horas*

Tratamiento	Suelo	Subamostras	Radioactividad total aplicada/columna (dpm)	12 h	24 h	36 h	48 h	12 h	24 h	36 h	48 h
				peso lixiviado (g)				dpm / 10 mL			
Atrazina	C1	1	757600	88,68	90,09	89,57	93,73	35,8	34,8	222,5	20488
		2	757600	88,68	90,09	89,57	93,73	34,7	44,8	241,8	20521
		3	757600	88,68	90,09	89,57	93,73	35,9	36,7	229,5	20186
	C2	1	757600	87,16	88,46	87,02	91,39	46,6	29,8	112,5	2439,1
		2	757600	87,16	88,46	87,02	91,39	31,8	34,4	116	2541,8
		3	757600	87,16	88,46	87,02	91,39	29,7	84,7	102,7	2485,1
	C3	1	757600	86,26	87,53	86,64	90,58	29,8	37	171,3	6186,1
		2	757600	86,26	87,53	86,64	90,58	43,7	31	158,2	6093,9
		3	757600	86,26	87,53	86,64	90,58	27,7	87	180,3	6043,2
Atrazina + Ciprofloxacino	C4	1	757600	85,5	88,6	91,07	93,03	45,2	47	266	8879,2
		2	757600	85,5	88,6	91,07	93,03	31,7	42,7	258,3	9017,1
		3	757600	85,5	88,6	91,07	93,03	35	50,6	266,2	8984,5
	C5	1	757600	79,41	86,9	89,64	91,65	36,8	47,4	255,8	7743
		2	757600	79,41	86,9	89,64	91,65	33,4	40,8	270,3	7713,4
		3	757600	79,41	86,9	89,64	91,65	31,7	34,3	273,6	7757,7
	C6	1	757600	83,65	87,2	89,83	91,67	29,1	35,5	243,5	7546,2
		2	757600	83,65	87,2	89,83	91,67	32,1	106,6	252,7	7433,2
		3	757600	83,65	87,2	89,83	91,67	29,8	40,5	251,5	7314,8

Nota. Las submuestras tuvieron 3 repeticiones de 10mL, La radiactividad: cantidad de radiactividad aplicada por columna en dpm

Tabla 16*Resultados de dpm total por columna y porcentaje de lixiviado por columna*

Tratamiento	Suelo	12 h	24 h	36 h	48 h	12 h	24 h	36 h	48 h
		dpm total				% lixiviada			
Atrazina	C1	317,4744	313,5132	1992,9325	192040,59	0,041905	0,041382	0,263059	25,34855
		307,7196	403,6032	2165,8026	192349,89	0,040618	0,053274	0,285877	25,38937
		318,3612	330,6303	2055,6315	189210,88	0,042022	0,043642	0,271335	24,97504
		406,1656	263,6108	978,975	22290,935	0,053612	0,034796	0,129221	2,942309
	C2	277,1688	304,3024	1009,432	23229,51	0,036585	0,040167	0,133241	3,066197
		258,8652	749,2562	893,6954	22711,329	0,034169	0,098899	0,117964	2,997799
		257,0548	323,861	1484,1432	56033,694	0,03393	0,042748	0,195901	7,396211
		376,9562	271,343	1370,6448	55198,546	0,049757	0,035816	0,180919	7,285975
	C3	238,9402	761,511	1562,1192	54739,306	0,031539	0,100516	0,206193	7,225357
		386,46	416,42	2422,462	82603,198	0,051011	0,054966	0,319755	10,90327
		271,035	378,322	2352,3381	83886,081	0,035775	0,049937	0,310499	11,07261
		299,25	448,316	2424,2834	83582,804	0,0395	0,059176	0,319995	11,03258
Atrazina + Ciprofloxacino	C4	292,2288	411,906	2292,9912	70964,595	0,038573	0,05437	0,302665	9,367027
		265,2294	354,552	2422,9692	70693,311	0,035009	0,046799	0,319822	9,331218
		251,7297	298,067	2452,5504	71099,321	0,033227	0,039344	0,323726	9,38481
		243,4215	309,56	2187,3605	69176,015	0,032131	0,040861	0,288722	9,130942
	C5	268,5165	929,552	2270,0041	68140,144	0,035443	0,122697	0,299631	8,994211
		249,277	353,16	2259,2245	67054,772	0,032904	0,046616	0,298208	8,850947
	C6								

Nota. Fuente propia

Tabla 17

Resultados de la media en porcentaje de lixiviado, porcentaje de lixiviado total y media de lixiviado por tratamiento

Tratamiento	Suelo	12 h	24 h	36 h	48 h	% Liviado total	Media Lixiviado%
		Media % lixiviada					
Atrazina	C1	0,041515	0,046099	0,273423	25,23765	25,5986899	12,14
	C2	0,041455	0,057954	0,126808	3,002102	3,22831949	
	C3	0,038409	0,059694	0,194338	7,302514	7,5949542	
Atrazina + Ciprofloxacino	C4	0,042095	0,054693	0,31675	11,00282	11,4163573	10,19
	C5	0,035603	0,046838	0,315404	9,361018	9,75886353	
	C6	0,033492	0,070058	0,29552	8,992033	9,39110382	

Nota. Fuente propia

4.5.4. Resultados de lixiviado en suelo por capaz de suelo

Tabla 18

Resultados de lixiviación de la primera columna de suelo

T	ID	P	Sub (0,2 g)	Dpm das subamostras	Dpm subamostras des.	Peso (g)	dpm total por P	Media dpm	Radioati. T. app/col (dpm)	% em cada prof de suelo	M %	%
ATZ	1	0 - 5	1	302,7	272,7	148,8	202888,8	169062	757600	26,78	22	73
			2	288,2	258,2	148,8	192100,8		757600	25,36		
			3	180,8	150,8	148,8	112195,2		757600	14,81		
		5 - 10	1	156,3	126,3	147,56	93184,14	80100	757600	12,30	11	
			2	127,2	97,2	147,56	71714,16		757600	9,47		
			3	132,2	102,2	147,56	75403,16		757600	9,95		
		10-15	1	340,6	310,6	150,39	233555,67	203703	757600	30,83	27	
			2	247,1	217,1	150,39	163248,345		757600	21,55		
			3	315	285	150,39	214305,75		757600	28,29		
		15 - 20	1	105,1	75,1	149,62	56182,31	62142	757600	7,42	8	
			2	110,3	80,3	149,62	60072,43		757600	7,93		
			3	123,8	93,8	149,62	70171,78		757600	9,26		
		20- 25	1	58	28	157,52	22052,8	25124	757600	2,91	3	
			2	69,9	39,9	157,52	31425,24		757600	4,15		
			3	57,8	27,8	157,52	21895,28		757600	2,89		
		25-30	1	61,3	31,3	105,28	16476,32	11598	757600	2,17	2	
			2	56,3	26,3	105,28	13844,32		757600	1,83		
			3	38,5	8,5	105,28	4474,4		757600	0,59		

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

Tabla 19*Resultados de lixiviación de la segunda columna de suelos*

T	ID	P	Sub (0,2 g)	dpm das subamostras	Dpm das subamostras des.	Peso (g)	Dpm total por P	Média dpm	Radioti. Total app/col (dpm)	% em cada prof. de solo	M %	S %	%
ATZ	2	0-5	1	298,4	50	248,4	146,78	182300,8	190447		24,06	25	81
ATZ	2	0-5	1	302,1	50	252,1	146,78	185016,2	190447	757600	24,42		
ATZ	2	0-5	1	328	50	278	146,78	204024,2	190447		26,93		
ATZ	2	0-5	1	320,4	50	270,4	147,43	199325,4	191192		26,31	25	
ATZ	2	0-5	1	295,1	50	245,1	147,43	180675,5	191192	757601	23,85		
ATZ	2	0-5	1	312,6	50	262,6	147,43	193575,6	191192		25,55		
ATZ	2	0-5	1	176,4	50	126,4	144,18	91121,76	109264		12,03	14	
ATZ	2	0-5	1	203,6	50	153,6	144,18	110730,2	109264	757602	14,62		
ATZ	2	0-5	1	224,7	50	174,7	144,18	125941,2	109264		16,62		
ATZ	2	0-5	1	168,6	50	118,6	138,28	82000,04	60981		10,82	8	
ATZ	2	0-5	1	126,5	50	76,5	138,28	52892,1	60981	757603	6,98		
ATZ	2	0-5	1	119,5	50	69,5	138,28	48052,3	60981		6,34		
ATZ	2	0-5	1	81,1	50	31,1	144,48	22466,64	24441		2,97	3	
ATZ	2	0-5	1	89,6	50	39,6	144,48	28607,04	24441	757604	3,78		
ATZ	2	0-5	1	80,8	50	30,8	144,48	22249,92	24441		2,94		
ATZ	2	0-5	1	95,2	50	45,2	138,69	31343,94	38510		4,14	5	
ATZ	2	0-5	1	116	50	66	138,69	45767,7	38510	757605	6,04		
ATZ	2	0-5	1	105,4	50	55,4	138,69	38417,13	38510		5,07		

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

Tabla 20*Resultados de lixiviación de la tercera columna de suelo*

T	ID	P	Sub (0,2 g)	dpm das subamostras	Dpm das subamostras des.	Peso (g)	Dpm total por P	Média dpm	Radioti. Total app/col (dpm)	% em cada prof. de solo	M %	S %
ATZ	3	0-5	1	313,9	30	283,9	119,51	169644	182412	757600	22,39	24
ATZ	3	0-5	2	335,9	30	305,9	119,51	182791	182412	757600	24,13	
ATZ	3	0-5	3	356	30	326	119,51	194801	182412	757600	25,71	
ATZ	3	5-10	1	287,4	30	257,4	132,1	170013	189123	757600	22,44	25
ATZ	3	5-10	2	312,9	30	282,9	132,1	186855	189123	757600	24,66	
ATZ	3	5-10	3	348,7	30	318,7	132,1	210501	189123	757600	27,79	
ATZ	3	10-15	1	109,4	30	79,4	132,5	52602,5	68966	757600	6,94	9
ATZ	3	10-15	2	156,4	30	126,4	132,5	83740	68966	757600	11,05	
ATZ	3	10-15	3	136,5	30	106,5	132,5	70556,3	68966	757600	9,31	
ATZ	3	15-20	1	87,7	30	57,7	141,51	40825,6	38231	757600	5,39	5
ATZ	3	15-20	2	65,2	30	35,2	141,51	24905,8	38231	757600	3,29	
ATZ	3	15-20	3	99,2	30	69,2	141,51	48962,5	38231	757600	6,46	
ATZ	3	20-25	1	58	30	28	149,16	20882,4	31895	757600	2,76	4
ATZ	3	20-25	2	56	30	26	149,16	19390,8	31895	757600	2,56	
ATZ	3	20-25	3	104,3	30	74,3	149,16	55412,9	31895	757600	7,31	
ATZ	3	25-30	1	72,8	30	42,8	173,39	37105,5	42220	757600	4,9	6
ATZ	3	25-30	2	88,3	30	58,3	173,39	50543,2	42220	757600	6,67	
ATZ	3	25-30	3	75	30	45	173,39	39012,8	42220	757600	5,15	

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

Tabla 21*Resultados de lixiviación de la cuarta columna de suelo*

T	ID	P	Sub	dpm submuestras	dpm submuestras des.	Peso (g)	dpm total por P	Media dpm	Radioati. Total app/col (dpm)	% en cada prof. de solo	M %	S %
ATZ + CPF	4	0-5	1	336,6	30	306,6	143,04	219280,32	223524	757600	28,94	30
	4	0-5	2	333,6	30	303,6	143,04	217134,72	223524	757600	28,66	30
	4	0-5	3	357,4	30	327,4	143,04	234156,48	223524	757600	30,91	30
	4	05-oct	1	257,9	30	227,9	150,7	171722,65	172150	757600	22,67	23
	4	05-oct	2	217,8	30	187,8	150,7	141507,3	172150	757600	18,68	23
	4	05-oct	3	299,7	30	269,7	150,7	203218,95	172150	757600	26,82	23
	4	oct-15	1	175	30	145	134,11	97229,75	94659	757600	12,83	12
	4	oct-15	2	151	30	121	134,11	81136,55	94659	757600	10,71	12
	4	oct-15	3	187,5	30	157,5	134,11	105,611,625	94659	757600	13,94	12
	4	15-20	1	109,4	30	79,4	141,89	56330,33	59547	757600	7,44	8
	4	15-20	2	119,7	30	89,7	141,89	63,637,665	59547	757600	8,4	8
	4	15-20	3	112,7	30	82,7	141,89	58,671,515	59547	757600	7,74	8
	4	20-25	1	87	30	57	128,61	36653,85	38905	757600	4,84	5
	4	20-25	2	90,3	30	60,3	128,61	38,775,915	38905	757600	5,12	5
	4	20-25	3	94,2	30	64,2	128,61	41283,81	38905	757600	5,45	5
	4	25-30	1	119	30	89	141,57	62998,65	57053	757600	8,32	8
	4	25-30	2	110,4	30	80,4	141,57	56911,14	57053	757600	7,51	8
	4	25-30	3	102,4	30	72,4	141,57	51248,34	57053	757600	6,76	8

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

Tabla 22*Resultados de lixiviación de la quinta columna de suelo*

T	ID	P	Sub	dpm submuestras	dpm submuestras des.	Peso (g)	dpm total por Peso	Media dpm	Radioati. Total app/col (dpm)	% en cada prof. de solo	M %	S %
5	0-5	1		517,2	30	487,2	145,1	353463,6	420355	757600	46,66	55
5	0-5	2		507,6	30	477,6	145,1	346498,8	420355	757600	45,74	55
5	0-5	3		803,4	30	773,4	145,1	561101,7	420355	757600	74,06	55
5	05-oct	1		362,9	30	332,9	131,87	219,497,615	204992	757600	28,97	27
5	05-oct	2		347	30	317	131,87	209013,95	204992	757600	27,59	27
5	05-oct	3		312,8	30	282,8	131,87	186464,18	204992	757600	24,61	27
5	oct-15	1		120,5	30	90,5	137,89	62,395,225	84090	757600	8,24	11
5	oct-15	2		197	30	167	137,89	115138,15	84090	757600	15,2	11
5	oct-15	3		138,4	30	108,4	137,89	74736,38	84090	757600	9,86	11
5	15-20	1		47,6	30	17,6	144,67	12730,96	13551	757600	1,68	2
5	15-20	2		44,8	30	14,8	144,67	10705,58	13551	757600	1,41	2
5	15-20	3		53,8	30	23,8	144,67	17215,73	13551	757600	2,27	2
5	20-25	1		45,5	30	15,5	154,97	12.010,175	13353	757600	1,59	2
5	20-25	2		53,4	30	23,4	154,97	18131,49	13353	757600	2,39	2
5	20-25	3		42,8	30	12,8	154,97	9918,08	13353	757600	1,31	2
5	25-30	1		55,3	30	25,3	132,18	16720,77	30644	757600	2,21	4
5	25-30	2		54,8	30	24,8	132,18	16390,32	30644	757600	2,16	4
5	25-30	3		119	30	89	132,18	58820,1	30644	757600	7,76	4

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

Tabla 23*Resultados de lixiviación de la sexta columna de suelo*

T	ID	P	Sub	dpm submuestras	dpm submuestras des.	Peso (g)	dpm total por P	Media dpm	Radioati. Total app/col (dpm)	% en cada prof. de solo	M %	S %	%
		0-5	1	354,4	30	324,4	127,5	206805	228650	757600	27,3		
		0-5	2	370,7	30	340,7	127,5	217196,25	228650	757600	28,67	30	
		0-5	3	440,9	30	410,9	127,5	261948,75	228650	757600	34,58		
		5-10	1	220,6	30	190,6	148,25	141282,25	184670	757600	18,65		
		5-10	2	247	30	217	148,25	160851,25	184670	757600	21,23	24	
		5-10	3	369,8	30	339,8	148,25	251876,75	184670	757600	33,25		
		10-15	1	159,9	30	129,9	141,92	92177,04	95891	757600	12,17		
		10-15	2	189,2	30	159,2	141,92	112968,32	95891	757600	14,91	13	
		10-15	3	146,3	30	116,3	141,92	82526,48	95891	757600	10,89		
	6	15-20	1	87,4	30	57,4	158,7	45546,9	48007	757600	6,01		82
		15-20	2	98,5	30	68,5	158,7	54354,75	48007	757600	7,17	6	
		15-20	3	85,6	30	55,6	158,7	44118,6	48007	757600	5,82		
		20-25	1	63,4	30	33,4	129,18	21573,06	22929	757600	2,85		
		20-25	2	63,4	30	33,4	129,18	21573,06	22929	757600	2,85	3	
		20-25	3	69,7	30	39,7	129,18	25642,23	22929	757600	3,38		
		25-30	1	90,7	30	60,7	138,05	41898,175	37711	757600	5,53		
		25-30	2	89,4	30	59,4	138,05	41000,85	37711	757600	5,41	5	
		25-30	3	73,8	30	43,8	138,05	30232,95	37711	757600	3,99		

Nota. T: Tratamiento; ID: identificación de la columna; Sub: Submuestra de oxidación, M: Media; S: Soma

4.5.5. Resumen de balance de materia de lixiviación y suelo

Tabla 24

Resumen de balance de materia de lixiviado en suelo

Tratamiento	% Lixiviada	% Solo	Suma	Média %
C1	255,986,899	73	9,842,476	88
C2	3,228,319,491	81	8,438,406	
C3	7,594,954,197	73	8,056,864	
C4	1,141,635,731	85	9,666,405	99,5
C5	9,758,863,525	101	1,109,975	
C6	9,391,103,815	82	9,094.,569	

Nota. Fuente propia.

Figura 18

Tasa de lixiviación de Atrazina y Ciprofloxacino

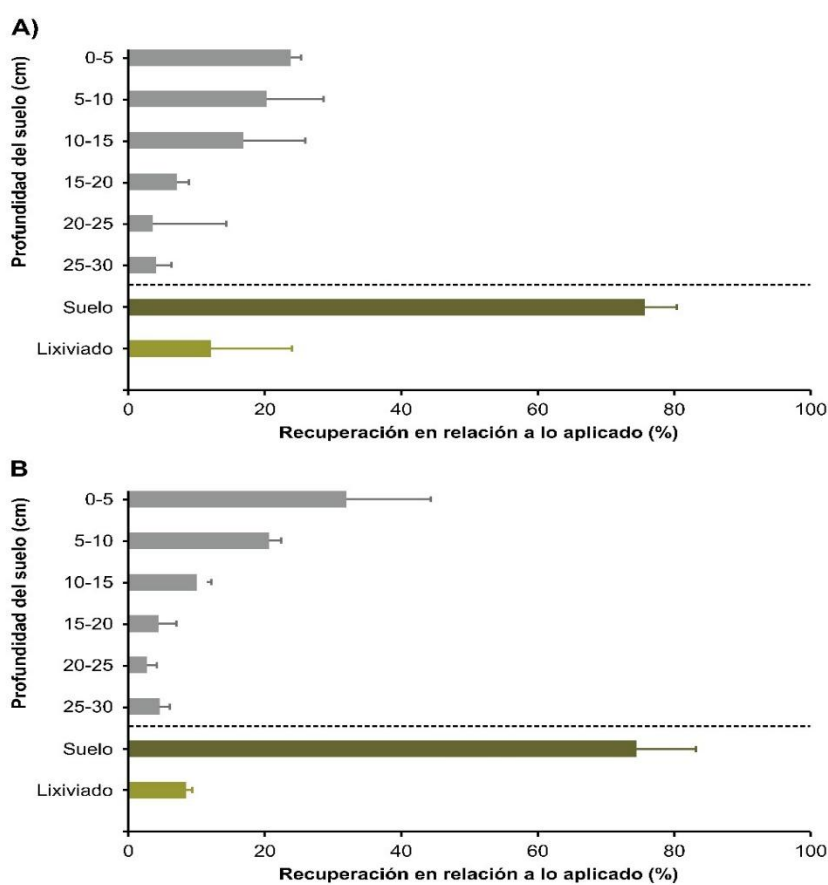
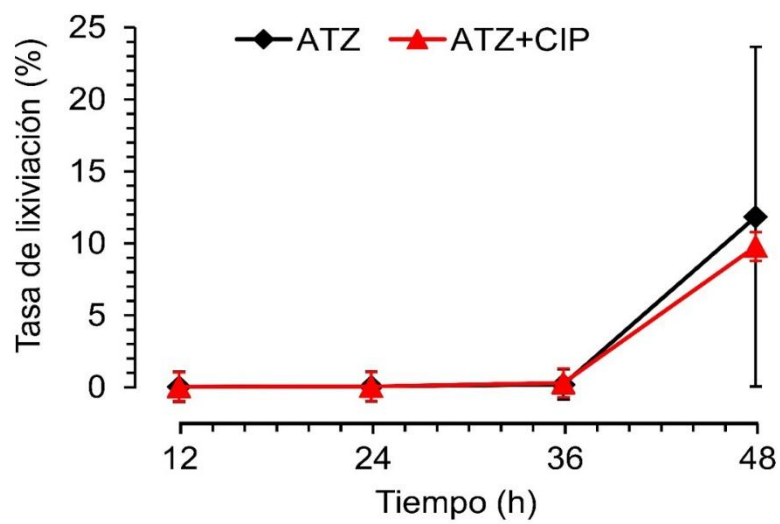


Figura 19

Gráfica de lixiviación de Atrazina y Ciprofloxacino



DISCUSIÓN

Discusión sobre los resultados del número de nódulos en alfalfa

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza ANOVA muestran un valor de p-valor de 0,0058 para el número de nódulos en alfalfa; se observa que es menor al nivel de significancia; entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Por lo tanto, se concluye que la presencia de residuos de Atrazina y Ciprofloxacino en el agua de riego origina un efecto en el número de nódulos en la planta.

Estos revelan un aumento significativo ($P < 0,05$) en el número de nódulos cuando se expone a concentraciones de Atrazina y Ciprofloxacino en comparación con el grupo control. Esto evidencia que las concentraciones de Atrazina y Ciprofloxacino aplicadas provocaron una respuesta hormética en la especie *Medicago Sativa*. Estos descubrimientos subrayan tanto la influencia positiva numérica que ejercen la ATZ y CPF sobre el número de nódulos en la planta de alfalfa.

En este estudio, se reveló que la planta de alfalfa podría tolerar bajas y altas concentraciones de ATZ y CPZ. Asimismo, se obtuvieron resultados para la biomasa radicular; se hizo el análisis de varianza ANOVA, muestran un valor de p-valor de 0,0018 para biomasa radicular en alfalfa, se observa que es menor al nivel de significancia; entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Por lo tanto, se concluye que la presencia de residuos de Atrazina y Ciprofloxacino en el agua de riego origina efecto en la biomasa radicular en alfalfa.

Considerando nuestra hipótesis inicial, los resultados obtenidos fueron contraintuitivos para todas las variables estudiadas, los resultados para la variable número de nódulos fueron hasta 7 veces más con respecto al grupo control en el peor escenario posible de mezcla extrema de contaminación con concentraciones ATZ46+CIP3500, y hasta 5 veces mas respecto al control para un escenario real de contaminación(Jablonowski et al., 2009; Kairigo et al., 2020), así mismo los resultados para la variable biomasa radicular para el peor escenario de contaminación fueron 8 veces mas respecto al control y para el escenario real de contaminación fueron 9 veces mas respecto al control. En las variables biomasa seca aérea, nitrógeno en suelo, carbono en

biomasa seca aérea y radicular, el (p valor $> 0,05$), lo cual es mayor al nivel de significancia; entonces se rechaza la hipótesis alterna y se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto, no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos; se concluye que la presencia de residuos de Atrazina y Ciprofloxacino en el agua de riego no origina efecto en el contenido de nitrógeno en suelo, no origina efecto en la producción de biomasa seca aérea, ni produce efecto en la producción de carbono en la biomasa aérea y radicular.

Sin embargo, esto podría deberse al estrés biótico que se produciría, al estar presentes contaminantes como Atrazina y Ciprofloxacino, que provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que envían una señal de alerta sobre la presencia de estos contaminantes, la planta obtiene una respuesta morfogénica inducida por estrés (SIMR), es así que se incrementó la ramificación lateral en detrimento de la elongación primaria, estas actuarían imitando la función de una fitohormona en la planta causando una desregulación en el crecimiento radicular la planta mediante la alteración o mimetización de auxinas endógenas obstruyendo la dominancia apical y promoviendo la acumulación de auxinas en zonas basales, lo que estimularía la formación de raíces laterales (Iriart & Ashman, 2025), esta proliferación sugiere una estrategia de forrajeo radicular, siendo un fenómeno asociado a estrategias para evitar el contaminante y buscar nuevas zonas de exploración (Alberto et al., 2022).

Asimismo, autores como Jiang et al., 2024, estudiaron los efectos de dosis crecientes de atrazina en Soya (*Glycine max*) donde encuentran que la Atrazina inhibe el crecimiento del número de nódulos debido a una eficiencia enzimática, sin embargo, nuestros resultados difieren al encontrar mayor número de nódulos en los tratamientos, esto podría deberse a las dosis *carry over* que respaldan el estudio, residuos con concentraciones de 42,5 ug/Kg han sido encontradas en suelos hasta con 22 años de antigüedad (Jablonowski et al., 2009). La alta capacidad de nodulación podría estar relacionada a la necesidad de la planta de tener huéspedes que metabolizan sus nutrientes para llegar a su máximo desarrollo aun en condiciones de estrés siendo hormética ante este estímulo (Iriart & Ashman, 2025), sin embargo, nuestros resultados muestran que no se observaron diferencias significativas en los tratamientos para las concentraciones de Carbono en planta y Nitrógeno en suelo, lo que sugiere un fallo funcional en la producción

de Nitrógeno, esto podría deberse a la trampa de carbono (Iriart & Ashman, 2025) donde supone un costo energético mantener las estructuras de defensa y detoxificación que compite con la demanda de simbiosis, donde se produce una señalización de *sugar starvation*, limitando el transporte de fotosintatos hacia los nódulos (Alberto et al., 2017), donde la atrazina inhibe enzimas clave como la Glutamina Sintetasa (GS/GOTAT) que son necesarias para asimilar nitrógeno (D. Jiang et al., 2024) y el Ciprofloxacino puede interferir con la ADN girasa de los rizobios (Khwaza et al., 2024) resultando en nódulos presentes activos pero no competentes metabólicamente.

Este estudio revela que las concentraciones evaluadas reflejan escenarios realistas de contaminación a nivel global, donde el Ciprofloxacino alcanza niveles en cuerpos de agua (Sarafriz et al., 2020) y la Atrazina persiste en suelos agrícolas por más de dos décadas (Iriart & Ashman, 2025). En conclusión, *M. sativa* demuestra una resiliencia estructural notable ante esta co-contaminación, pero a costa de convertir su simbiosis mutualista en una carga parasitaria inducida por el estrés químico.

Discusión sobre los resultados del comportamiento de ^{14}C -atrazina (ring- ^{14}C) en el suelo

El balance de masa del herbicida en el experimento mostró recuperaciones promedio del 92 % para atrazina sola (ATZ) y del 102 % para atrazina con ciprofloxacino (ATZ+CIP), ambos valores dentro del rango aceptable establecido por la OCDE (90–110 %) para ensayos con sustancias radiomarcadas. Esto confirma la calidad metodológica del ensayo y valida la comparación entre tratamientos.

En cuanto a la lixiviación total, los resultados indicaron valores muy similares (~15–20 %), en ambos tratamientos, demostrando que la presencia de ciprofloxacino no incrementó la pérdida total de atrazina fuera del sistema edáfico bajo las condiciones experimentales. Este hallazgo es relevante, ya que sugiere que la co-presencia de antibióticos en aguas de riego contaminadas no implica necesariamente un mayor riesgo de contaminación por lixiviación profunda hacia aguas subterráneas.

El análisis de la distribución vertical de atrazina en las columnas de suelo reveló un patrón similar en ambos tratamientos, caracterizado por una mayor retención

en las capas más profundas (0–5 cm y 5–10 cm) y una recuperación mucho menor en las capas intermedias y superficiales. Sin embargo, al comparar ATZ y ATZ+CIP, se observó una diferencia muy leve en las capas intermedias (10–15 cm), donde el tratamiento con ciprofloxacino mostró barras ligeramente más notorias en algunos casos. Esta diferencia, aunque perceptible visualmente, fue mínima y no alteró el patrón general de distribución vertical del herbicida en el suelo.

Estas observaciones indican que el ciprofloxacino no tuvo un efecto significativo ni concluyente en la movilidad total ni en la lixiviación de atrazina, aunque podría haber generado una redistribución muy sutil hacia capas intermedias, probablemente relacionada con interacciones fisicoquímicas menores o competencia por sitios de adsorción. En conjunto, los resultados de este estudio no demuestran una influencia clara ni importante del ciprofloxacino sobre la lixiviación de atrazina en el suelo, y destacan la necesidad de estudios adicionales que consideren condiciones más variables y repetidas de riego para confirmar si estos efectos leves son consistentes y ambientalmente relevantes.

CONCLUSIONES

1. La presencia de Atrazina y Ciprofloxacino en concentraciones de $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $350 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, y $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF en el agua de riego, incrementa el número de nódulos en alfalfa.
2. La presencia de Atrazina y Ciprofloxacino en concentraciones de $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $350 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, y $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF en el agua de riego, no incrementa la producción de biomasa seca área en alfalfa; sin embargo, las concentraciones $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $350 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF y $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF en el agua de riego sí incrementan biomasa seca radicular en alfalfa.
3. La presencia de Atrazina y Ciprofloxacino en concentración de $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $350 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, y $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF en el agua de riego, no incrementa la producción de carbono en la biomasa aérea y radicular de alfalfa.
4. La presencia de Atrazina y Ciprofloxacino en concentración de $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $350 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, y $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ y $3500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF en el agua de riego, no incrementa el contenido de Nitrógeno en el suelo.
5. La presencia de atrazina en el suelo en el tratamiento ATZ es de un 92 %, mientras que en el tratamiento ATZ+CPF la presencia es de 102,9 %, habiendo una diferencia del 12 % cuando existen ATZ y CPF respecto al primero. La lixiviación total fue similar en ambos tratamientos ($\sim 15\text{--}20\%$), sin evidenciarse un efecto significativo del ciprofloxacino sobre la pérdida de atrazina fuera del suelo. No se observó un efecto sinérgico claro del ciprofloxacino en la lixiviación de atrazina bajo las condiciones de este estudio.

RECOMENDACIONES

1. Se deben considerar ensayos biomoleculares para entender con mayor precisión los efectos en la relación simbiótica de plantas y microorganismos.
2. Se debe considerar realizar estudios exhaustivos sobre los efectos de residuos de más contaminantes orgánicos en sinergia para evaluar el comportamiento que pueden tener en las diferentes matrices ambientales.
3. Se debe considerar estudios en la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en los cultivos, siendo punto principal de estudio la translocación de estos compuestos dentro de la planta. Este enfoque permitiría comprender la afinidad que tienen los compuestos orgánicos por retenerse en las diferentes partes de la planta. Asimismo, la investigación debería incluir técnicas analíticas avanzadas para rastrear la movilidad de los contaminantes orgánicos y determinar sus niveles en distintas estructuras de la planta.
4. Asimismo, es importante realizar mayores estudios en diferentes suelos y cultivos, ya que daría mayor información sobre el comportamiento de diferentes contaminantes orgánicos, sobre una variedad de matrices de estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberto, D., Couée, I., Sulmon, C., & Gouesbet, G. (2017). Root-level exposure reveals multiple physiological toxicity of triazine xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 212, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.01.013>
- Alberto, D., Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., & Couée, I. (2022). Differential effects of root-level exposure to triazine xenobiotics on root development plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03449-9>
- Al-Buriahi, A. K., Al-shaibani, M. M., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A. A., Sharma, A., & Ismail, N. (2022). Ciprofloxacin removal from non-clinical environment: A critical review of current methods and future trend prospects. *Journal of Water Process Engineering*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102725>
- Bhagat, C., Kumar, M., Tyagi, V. K., & Mohapatra, P. K. (2020). Proclivities for prevalence and treatment of antibiotics in the ambient water: a review. In *npj Clean Water* (Vol. 3, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-00087-x>
- Carrasco, A., Armario, P., Chamber, M. A., Palomares, A. J., Caviades, A., & Lo, R. (2005). *Isolation and characterization of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill ' llar pyrite mine at the Aznalco*. 37, 1131–1140. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.015>
- (FAO), O. de las N. U. para la A. y la A. (1996). ECOLOGÍA Y ENSEÑANZA RURAL. Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas. In *Estudio FAO Montes 131*.
- Flórez-Delgado, D. F. (2015). LA ALFALFA (*Medicago sativa*): ORIGEN, MANEJO Y PRODUCCIÓN. *Conexagro*, 5, 27–43.

- Frank, R., Sirons, J., Anderson, G. W., & aNo ANoensoN, G. J. (n.d.). *ATRAZINE: THE IMPACT OF PERSISTENT RESIDUES IN SOIL ON SUSCEPTIBLE CROP SPECIES*.
- Gomes, M. P., de Brito, J. C. M., Carvalho Carneiro, M. M. L., Ribeiro da Cunha, M. R., García, Q. S., & Figueredo, C. C. (2018). Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. *Environmental Pollution*, 232, 293–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.054>
- Gomes, M. P., Richardi, V. S., Bicalho, E. M., da Rocha, D. C., Navarro-Silva, M. A., Soffiatti, P., Garcia, Q. S., & Sant’Anna-Santos, B. F. (2019). Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. *Science of the Total Environment*, 651(October 2018), 2671–2678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.365>
- Grčić, I., Pavlović, D. M., Brnardić, I., Kraljević, T. G., Čop, K. T., Radetić, L., & Runje, M. (2023). Degradation of typical environmental pollutants (ciprofloxacin, carbamazepine and 17- β estradiol) on supported TiO₂ photocatalysts: Identification of degradation products and in silico toxicity assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(6). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111438>
- Iriart, V., & Ashman, T. L. (2025). Viewing the ecological consequences of synthetic auxin herbicides from the ground up. *American Journal of Botany*, 112(4). <https://doi.org/10.1002/ajb2.70024>
- Jablonowski, N. D., Köppchen, S., Hofmann, D., Schäffer, A., & Burauel, P. (2009). Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution*, 157(7), 2126–2131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.02.004>
- Jiang, D., Jiang, Z., Liu, S., Hu, Y., Deng, S., Wang, J., Shi, L., Liu, Y., Qu, J., & Zhang, Y. (2024). Inhibition mechanism of atrazine on soybean growth insight from the

- plant nitrogen fixation and rhizobia diversity inhabiting nodules and rhizosphere soil. *Applied Soil Ecology*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105236>
- Jiang, W., Zhai, W., Liu, D., & Wang, P. (2021). Coexisting antibiotic changes, the persistence and metabolic profile of atrazine in the environment. *Chemosphere*, 269, 129333. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129333>
- Kairigo, P., Ngumba, E., Sundberg, L. R., Gachanja, A., & Tuhkanen, T. (2020). Occurrence of antibiotics and risk of antibiotic resistance evolution in selected Kenyan wastewaters, surface waters, and sediments. *Science of the Total Environment*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137580>
- Khwaza, V., Mlala, S., & Aderibigbe, B. A. (2024). Advancements in Synthetic Strategies and Biological Effects of Ciprofloxacin Derivatives: A Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25094919>
- Mendes, K. F., de Sousa, R. N., Takeshita, V., Alonso, F. G., Régo, A. P. J., & Tornisielo, V. L. (2019). Cow bone char as a sorbent to increase sorption and decrease mobility of hexazinone, metribuzin, and quinclorac in soil. *Geoderma*, 343 (February), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.02.009>
- Ministerio del Ambiente. (2009). Tratamiento y Reuso de Aguas Residuales. *Manual Para Municipios Ecoeficientes*, 511, 179.
- Muzira, E. W., & Mutatu W. Proc, S. (2018). DETERMINATION OF RESIDUAL ATRAZINE IN SOIL AND DRAIN WATERS USING GC-TOF-MS. In *Afr Sug Technol Ass* (Vol. 91).
- Nations, U. (n.d.). *World Population Prospects 2024: Summary of Results*.
- Nunes, B., Veiga, V., Frankenbach, S., Serôdio, J., & Pinto, G. (2019). Evaluation of physiological changes induced by the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin in the freshwater macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*.

Environmental Toxicology and Pharmacology, 72.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103242>

OEFA. (2014). *AGUAS*.

Pourbabae, A. A., Khazaei, M., Alikhani, H. A., & Emami, S. (2021a). Rhizosphere Root nodulation of alfalfa by Ensifer meliloti in petroleum contaminated soil. *Rhizosphere*, 17(December 2020), 100305. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100305>

Pourbabae, A. A., Khazaei, M., Alikhani, H. A., & Emami, S. (2021b). Root nodulation of alfalfa by Ensifer meliloti in petroleum contaminated soil. *Rhizosphere*, 17, 100305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100305>

Rahman, M. M., Shan, J., Yang, P., Shang, X., Xia, Y., & Yan, X. (2018). Effects of long-term pig manure application on antibiotics, abundance of antibiotic resistance genes (ARGs), anammox and denitrification rates in paddy soils. *Environmental Pollution*, 240, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.135>

Ricky, R., & Shanthakumar, S. (2023). An investigation on the removal of ciprofloxacin and norfloxacin by phycoremediation with an emphasis on acute toxicity and biochemical composition. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41144-y>

Sarafraz, M., Ali, S., Sadani, M., Heidarinejad, Z., Bay, A., Fakhri, Y., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). A global systematic review-meta analysis and ecological risk assessment of ciprofloxacin in river water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1791330>

Shan, J., Yang, P., Rahman, M. M., Shang, X., & Yan, X. (2018). Tetracycline and sulfamethazine alter dissimilatory nitrate reduction processes and increase N₂O release in rice fields. *Environmental Pollution*, 242, 788–796. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.061>

- Shen, M., Hu, Y., Zhao, K., Qu, Z., Lyu, C., Liu, B., Li, M., Bu, X., Li, C., Zhong, S., & Cheng, J. (2024). Effects of dissolved organic matter, pH, and nutrients on ciprofloxacin bioaccumulation and toxicity in duckweed. In *Aquatic Toxicology* (Vol. 266). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106775>
- Stando, K. K. E. F. E. H. M. B.-H. M. B. S. (2022). *Determination of antimicrobial agents and their transformation products in an agricultural water-soil system modified with manure.*

ANEXOS

ANEXO N°1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	MÉTODO	INSTRUMENTOS
Problemas	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores	Método	Instrumentos
Problema General: ¿Cuál será el efecto sinérgico del ciprofloxacino en el agua de riego sobre el comportamiento de la atrazina en el suelo y toxicidad en la alfalfa?	Objetivo General: Evaluar el efecto sinérgico del ciprofloxacino en el agua de riego sobre el comportamiento de la atrazina en el suelo y toxicidad en la alfalfa.	Hipótesis General: Hay efecto significativo negativo en la sinergia del ciprofloxacino presente en el agua de riego sobre la atrazina y su toxicidad en la alfalfa.	V1: Independiente Concentraciones de Ciprofloxacino (CIP) y Atrazina (ATZ).	• Dosis de ATZ C14 • Dosis de CIP	Tipo: Aplicada.	Vernier
Problemas Específicos: 1. ¿Efecto sobre la producción de nódulos en raíces? 2. ¿Efecto sobre la biomasa seca aérea y radicular? 3. ¿Efecto sobre la producción de carbono en biomasa? 4. ¿Efecto sobre el contenido de Nitrógeno en suelo? 5. ¿Efecto sobre la lixiviación de la atrazina?	Objetivos Específicos: 1. Evaluar el efecto sobre la producción de nódulos. 2. Evaluar el efecto sobre la biomasa seca aérea y radicular. 3. Analizar el efecto sobre la producción de carbono en biomasa. 4. Evaluar el efecto sobre el Nitrógeno en el suelo. 5. Valorar el efecto sobre la lixiviación de ¹⁴ C atrazina.	Hipótesis Específicas: 1. Disminución del número de nódulos. 2. Disminución de biomasa seca. 3. Disminución de % carbono en planta. 4. Disminución del % de Nitrógeno en suelo. 5. Alteración del comportamiento de lixiviación.	V2: Dependientes Respuesta fisiológica de la planta y movilidad en el suelo.	• Número de nódulos • Peso de biomasa seca (g) • % Carbono total • % Nitrógeno en suelo • % Lixiviación (dpm).	Nivel: Explicativo . Diseño: Experimental Factorial.	Balanza analítica Espectrómetro de centelleo líquido. • Analizador elemental/IRMS . • Oxidador de muestras . • Software R Studio.