



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a  
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

## ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Antibiotikoen kutsadura  
ingurunean: transferentzia  
elikadura-katean zehar**

*Irantzu Vergara Luis,  
Juan Carlos Báez Millán,  
Olatz Zuloaga Zubieta,  
Maitane Olivares Zabalandikoetxea  
eta Ailette Prieto Sobrino*

185-192 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.23>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## **Antibiotikoen kutsadura ingurunean: transferentzia elikadura-katean zehar**

Irantzu Vergara-Luis<sup>1,2</sup>, Juan Carlos Báez-Millán<sup>1</sup>, Olatz Zuloaga<sup>1,2</sup>, Maitane Olivares<sup>1,2</sup>, Ailette Prieto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Euskal Herria*

<sup>2</sup>*Plentziako Itsas Estazioa (PiE), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Plentzia, Euskal Herria*

*irantzu.vergara@ehu.eus*

### **Laburpena**

Azken urteotan, antibiotikoen kutsadura ingurunean areagotu da eta, honen ondorioz, eratorritako arazoak ere bai, bakterio erresistenteen agerpena esaterako. Antibiotikoen eta beraien degradazio produktuen presentzia monitorizatzeko beharrak, konposatu horiek guztiak ingurumeneko matrize desberdinetan (uretan, lurzoruetan eta abar) kuantifikatzeko metodoak garatu behar dira, erresistentziak non eta nola sortzen diren argitzeko, besteak beste. Lan honetan hogeita-lau antibiotiko, hiru fungizida eta hauen degradazio-produktuak aldi berean analizatzeko metodo analitikoak optimizatu eta balioztatu dira barazkietan, lurzoru:konpost nahasteetan, simaurrean eta *Eisenia foetida* zizareetan. Metodoen sentikortasunak lagin errealetan kontzentrazio baxuan egon daitezkeen antibiotikoen kuantifikazioa bermatu du, eta antibiotikoak elikadura-katean metatzen diren ere aztertzeko aukera eman du.

Hitz gakoak: Antibiotikoak, transformazio produktuak, kutsadura, ingurumena, likido-kromatografia, masa-espektrometria

### **Abstract**

*The increased antibiotic contamination in the environment and the associated problems, such as the emergence of resistance, pose the necessity of developing new analytical methodologies to quantify antibiotics and their degradation products in order to broaden the knowledge about where and how resistance occurs. In this work, analytical methods for the simultaneous analysis of twenty-four antibiotics, three antifungals and their degradation products were developed in vegetables, soil:compost mixtures, animal manure and Eisenia foetida earthworms. The calculated limits of quantification were low enough to allow the detection of antibiotics in the different environmental compartments, demonstrating their accumulation in the food-chain.*

*Keywords: Antibiotics, transformation products, contamination, environment, liquid-chromatography, mass-spectrometry*

## **1. Sarrera eta motibazioa**

Antibiotikoak gizakien zein animalien ongizatea bermatzeko ezinbesteko sendagaiak izan dira, praktika klinikoan prebentziorako zein bakterio-infekzioak tratatzeko agente gisa erabiliz. Azken urteotan, ordea, gizarteak antibiotikoekiko duen kezka areagotu da, antibiotikoen etengabeko erabilera hedatuaren ondorioz beraien presentzia ingurumenean zeharo nabarmendu baita (García et al., 2020).

Edozein gizaki zein animaliak antibiotiko bat hartzen duenean, organismoek antibiotikoak partzialki baino ez dituzte metabolizatzen, eta, ondorioz, kontsumitutako antibiotikoen gehiena (% 30-90) gertuaren eta gorozkien bidez iraitzen da (He et al., 2018; Scaria et al., 2021). Gizakiek antibiotikoak modu desegokian erabiltzeak (tratamendua erdira uztea, dosi

desegokiak hartzea edo gaizki agindutako hartualdiak, esaterako) edota abeltzaintzan hauen erabilera masiboek antibiotikoen presentzia ingurumenean areagotzen dute. Beste zenbait kutsatzaileekin batera, antibiotikoak hirietako ur-araztegiara heltzen dira. Araztegiatako irteerako urak antibiotikoak ingurumenera heltzeko beste bide bat direla ere esan daiteke. Ur horietan maiz detektatu izan dira antibiotikoak, araztegiatan erabiltzen dituzten tratamenduak ez baitiria guztiz eraginkorrak antibiotikoak ezabatzeko. Bestalde, hiri-araztegi lohiak eta animalia-jatorriko azpiproduktuak (simaurra, minda, konposta) nekazaritza-lurzoruetan ongarri organiko gisa erabiltzeak sustatu dezake antibiotikoen sarrera nekazaritzarako erabiltzen diren zoruuetan (Feng et al., 2018; He et al., 2018), eta bertatik, landare eta barazkietara hel daitezke, elikadura-katean sartuz (Boxall et al., 2006; Kang et al., 2013).

Antibiotikoak kontsumitzen direnetik ingurumeneko matrize ezberdinetara heltzen diren arte zenbait eraldaketa jasan ditzakete ingurumen-baldintzen (tenperatura, argi-erradiazioa, etab.) edota mikrobioen jardueraren ondorioz. Beraz, jatorrizko antibiotikoaz gain ezinbestekoa bilakatzen da antibiotikoen metabolizazio eta transformazio produktuen jarraipena egitea, azken hauek jatorrizko antibiotikoa baino toxikoagoak izan baitaitezke. Hala ere, oraindik ez dira guztiz ezagunak hondakin horien zeharkako esposizioak eragindako ondorio kaltegarriak zeintzuk diren (Lillenberg et al., 2009).

Ingurune desberdinetan, antibiotikoak bakterio anitzekin kontaktuan egoten dira. Antibiotikoak bakterioak hiltzeko kontzentrazioetik behera daudenean, bakterioek hauekiko erresistente bilakatzeko mekanismoak garatzeko gai dira eta gainerako bakterioen artean barreiatzen dituzte (Cycoń et al., 2019; Kristiansson et al., 2011). Antibiotikoekiko erresistentziaren garapena gaur egungo arazo handienetako bat da, bereziki, erresistentzia anitzeko bakterioen sorrera dela eta. Izan ere, bakterio horiekin infektatuz gero, sendatzeko tratamendu eraginkorren gabezia dago (Gothwal & Shashidhar, 2015).

Ingurumenean antibiotikoen kontzentrazioa determinatzea garrantzitsua da, baina era berean, erronka bat da. Alde batetik, determinatu beharreko kontzentrazio maila: oro har, antibiotikoak kontzentrazio baxuetan ( $1$  eta  $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  arteko tartean eta  $1$ - $1000 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  lagin urtsu eta solidoetan, hurrenez hurren) aurkitzen dira ingurumeneko laginetan (ura, lurzorua, sedimentua, barazkiak,...). Bestalde, aztertu beharreko laginen konplexutasunak analisia zailtzen du. Azkenik, antibiotiko bakoitza ezaugarri fisiko-kimiko ezberdinak dituztenez, beraien aldibereko analisia zaila izaten da (Chuang et al., 2015; Yu et al., 2018). Hori dela eta, antibiotikoen aldibereko analisia bermatzen duten metodo analitiko sentikor, eraginkor eta zehatzak garatu behar dira. Helburu horri eutsi nahian, erauzketa eta garbiketa atalak optimizatzea garrantzia handikoa da, aurre-kontzentrazio handiena lortu, matrize-efektua minimizatu eta oso kontzentrazio baxuetan dauden antibiotiko eta produktu eratorriak determinatzeko. Konposatu hauen analisirako, likido kromatografia erabili ohi da, bereizmen baxuko masa-espektrometriari akoplatuta (LC-MS/MS) konposatu ezagunak determinatzeko, eta bereizmen handiko masa-espektrometriari (HRMS) akoplatuta konposatu ezagunak zein beraien metabolito eta transformazio produktuak determinatu nahi direnean (Larivière et al., 2017).

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa lan honetan antibiotikoak eta hauekiko erresistentzia ildo nagusi hartuta, giza osasunaren, abeltzaintzaren, elikaduraren eta ingurumenaren arteko loturak aztertu nahi dira. Testuinguru horretan, helburu nagusia da metodologia analitikoa garatzea, antibiotikoak eta degradazio-produktuak identifikatzeko, ingurunean gehien atzematen diren antibiotikoak zenbatesteko eta horiek ingurumenean izateak eragiten dituen ondorioak aztertzeke. Horretarako, hiru helburu nagusi ezarri dira:

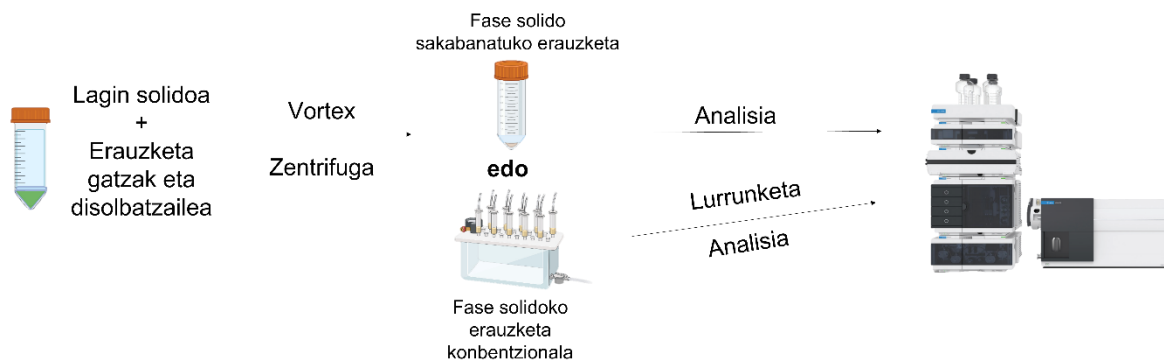
- 1) Konpostean, lurzoruetan, laboreetan eta ur-inguruneetan antibiotikoen presentzia ebaluatzeko azterketa-metodo gidatuak garatzea. Horretarako, erauzketa-, aurre-konzentrazio- eta LC-MS/MS bidezko analisiak optimizatu eta balioztatuko dira.
- 2) Metodo ez-zuzenduak garatzea, antibiotikoen hondakinak (degradazio produktuak) xehetasunez identifikatzeko, degradazio-prozesuak eta ingurunean duten iraunkortasuna ulertzeko. Horretarako, lan-fluxuak eta informazioaren tratamenduko fluxuak aplikatuko dira, LC-HRMS bidez analisiak eginda.
- 3) Ingurumenean bildutako laginak analizatzea balioztatutako metodo analitiko bideratu eta ez-bideratuak erabilita. Honekin, EAE-an antibiotikoek duten egungo hedapena zein den aztertu eta antibiotikoekiko erresistentziarekin erlazionatu nahi da.

## 3. Ikerketaren muina

Lan honetan, zortzi familia kimikoko hogeita-lau antibiotiko (makrolidoak, bentimidazolak, diaminopirimidinak, fluorokinolonak, imidazolak, sulfamidak eta sulfonamidak, tetraziklinak eta triazolak) eta hiru fungiziden aldebereko determinazioa ahalbidetzen duten metodo analitikoak garatu eta balioztatu dira barazkietan (letxuga, tomate, azenario eta tipula), lurzoru:konpost nahasteetan, simaurrean eta *Eisenia foetida* zizareetan.

Matrize solidoen kasuan (1.Irudia), antibiotikoen erauzketarako erabilitako estrategia orokorra solido-likido erauzketan oinarritzen den QuEChERS (*Quick Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* delakoa) metodologia erabiltzea izan da, hain zuzen. Erauzketaren ondoren, erauzien garbiketa egin da fase solidoko erauzketa konbentzionala edo sakabanatuaren bitartez. Azkenik analisisa LC-MS/MS bidez egin da.

### 1.Irudia. Lagin solidoen analisirako metodo analitikoa.



Antibiotikoen galerak metodoan zehar trazagarrien bidezko edo matrizean egindako kalibratuaren bidez zuzendu dira, kasuan kasu, metodoaren zehaztasuna bermatuz. Horretaz gain, kuantifikazio muga baxuak lortu dira (1.Taula). Garatutako metodo analitikoak ingurumeneko laginetan antibiotikoak determinatzeko erabili dira.

### 1.Taula. Matrize bakoitzean antibiotiko eta antifungiko bakoitzaren kuantifikazio-muga.

	Kuantifikazio mugak ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )						
	Lurzoru:konpost	Simaurra	Zizarea	Letxuga	Tomate	Azenarioa	Tipula
Sulfamidak eta sulfonamidak	0,5-7,5	0,3-2,9	1,5-3,9	0,1-1,2	0,1-0,5	0,1-1,0	0,1-1,3
Tetraziklinak	2,0-4,3	2,6-3,2	2,5-3,4	0,3-0,7	0,8-1,1	0,2-3,7	0,4-1,0
(Fluoro)kinolonak	5,8-9,9	1,2-15,8	1,6-9,6	0,5-4,9	0,5-3,4	0,5-10,0	0,7-3,2
Makrolidoak	1,3-7,3	0,3-2,2	1,9-10,3	0,2-2,2	0,2-2,3	0,2-2,1	0,1-3,3
Tiabendazol	4,7	0,9	3,3	0,9	0,5	0,6	0,6
Trimetoprima	1,1	2,0	1,4	0,2	0,5	0,2	0,3
Flukonazol	2,4	0,9	5,6	1,5	1,2	0,7	0,9
Azido mikofenolkoa	4,7	2,1	1,9	2,2	0,6	1,0	0,3
Mikonazol	0,7	2,1	3,4	1,1	0,6	1,6	0,5

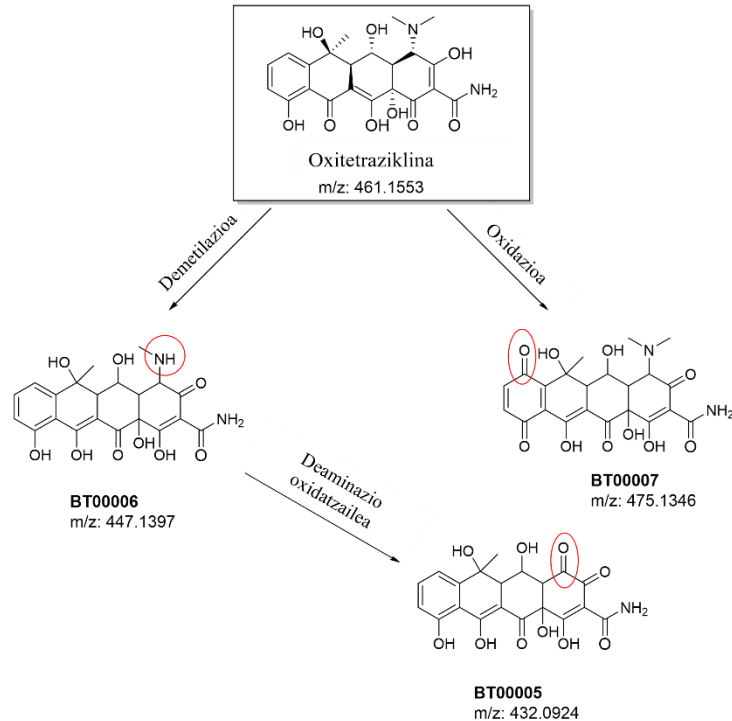
Barazki-laginei dagokienez, laborantza ekologiko eta konbentzionaleko letxuga, tomate, azenario eta tipularen hogeita-lau lagin aztertu ziren, EAE-ko hipermerkatu, supermerkatu eta merkatuetan batutakoak (Vergara-Luis et al., 2022). Bi sulfonamida detektatu ziren lagin horietan, horien kontzentrazioa  $< 1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  izanik. Kontzentrazio horiek Munduko Osasun Erakundeak ezarritako eguneko irenste-atalasea gainditzen ez dutenez ( $50 \mu\text{g}$  gorputz kg bakoitzeko), euskal eskualdean landatutako barazkiak antibiotikoz libre daudela ondoriozta daiteke.

Bestalde, Bizkaian, Gipuzkoan, Araban eta Nafarroan kokatutako Idiazabal izeneko gazta-ekoizpeneko lurzoru-laginak eta ardi-simaurra ere aztertu ziren, baita bildutako lurzoruaren zatikiaren azalean hazitako landare-espezieak ere. Aipatutako matrize guztien artean, espero bezala, simaurrean aurkitu ziren antibiotiko kontzentrazio altuenak. Zehazki, bi sulfonamida (sulfadiazina eta sulfametazina), bi tetraziklina (oxitetraziklina eta klortetraziklina) eta fluorokinolona bat (enrofloxazina) detektatu ziren  $1,7-93,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  kontzentrazio-tartean. Lurzoru-laginei dagokienez, sulfametazina, trimetoprima eta danofloxazina detektatu ziren,  $7,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  eta  $27,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  kontzentrazioetan, hurrenez hurren. Azkenik, belar laginetan lurzoru eta simaurrean detektatutako antibiotiko familia berak behatu ziren, bereziki handia izanik kasu honetan tetraziklinaren kontzentrazioa,  $56,8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Lagin hauetan determinatutako antibiotiko kontzentrazio nabarmena kontuan hartuta, transformazio produktuen analisisa ere egin nahi izan da LC-HRMS erabilita. BioTransformer 3.0 software-a erabiliz, antibiotiko bakoitzak jasan zezakeen degradazio-erreakzio desberdinak (abiotikoak edo biotikoak) aztertu ziren eta produktuak susmagarrien zerrenda batean bildu ziren, guztira 22.281 izanik. Araban batutako simaur lagin batean, bakterioen kontrako ezaugarriak dituzten beste konposatu batzuen artean (propikonazola, piperonilnitrioloa eta brefeldin A, esaterako) sulfametazinaren degradazio produktu bat, formil-sulfametazina, aurkitu zen.

Zoruan ematen diren antibiotikoen degradazio prozesuetan gehiago sakondu nahian, lurzoru:konpost nahastea abeltzaintzan gehien erabilienetarikoa den oxitetraziklina antibiotikoarekin dopatu zen,  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  eta  $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  kontzentrazioetan. Hilabete batez mantendu ziren dopatutako lagin hauek tenperatura eta hezetasun baldintza kontrolatuetan, eta

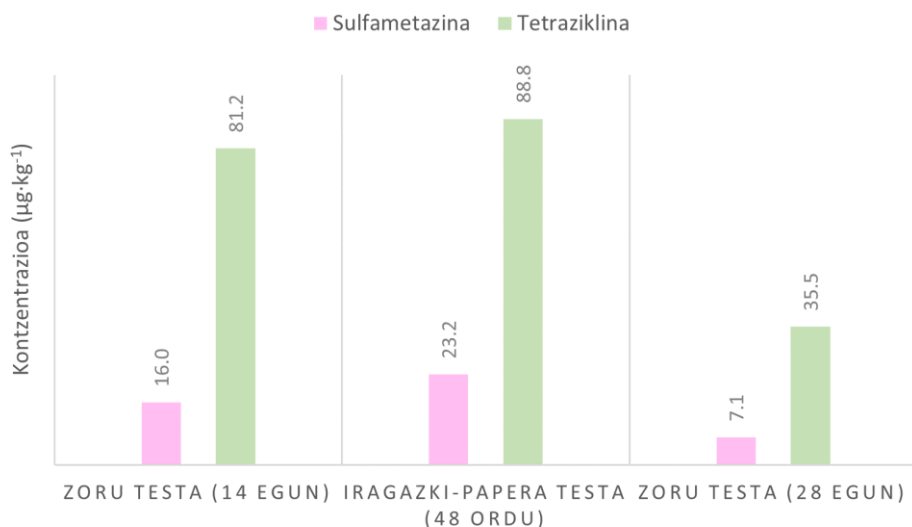
esperimentuko 1, 9, 19 eta 30 egunetan laginak jaso ziren denboran zehar sor zitezkeen degradazio produktu ezezagunen azterketa egiteko. Konkreteki, hiru degradazio produktu aurkitu ziren (2.Irudia).

## 2. Irudia. Identifikatutako oxitetraziklinaren degradazio produktuak zoru:konpost nahastean.



Azkenik, zizare laginei dagokionez, hauek sulfametazina eta tetraziklina antibiotikoen kontzentrazio desberdinen eraginpean jarri ziren bi OECD (207 eta 222) esperimentu eginez. Lehenengo esperimentua zizareek lurzoria irenstea metatu dezaketen antibiotiko kantitatea determinatzeko diseinatu zen. Horretarako, antibiotiko kontzentrazio ezberdinak zituzten (0, 10, 100 eta 1000 mg·kg<sup>-1</sup>) zorueta jarri ziren zizareak eta hamalau eta hogeita-zortzi egunen ondoren zizareak aztertu ziren. Emaitzen arabera, antibiotikoen kontzentrazio handiagoa behatu zen hamalau egun ondoren bildutako zizareetan, ziurrenik epe-luzeagoetan antibiotikoen degradazioa gertatzen delarik (ikus 3. Irudia). Bigarren esperimentu batean, berriz, zizareek azalaren bitartez akumulatu zezaketen antibiotiko kontzentrazioa determinatu nahi zen. Horretarako, 0, 5, 50, 500 eta 1000 mg·L<sup>-1</sup> kontzentrazioa zuten iragazki-paperean kokatu ziren zizareak berrogeita-zortzi orduz. Lurzoru kutsatuaren eraginpean hamalau egunez egondako zizareetan pilatutako antibiotikoen kontzentrazioak, kutsatutako iragazki-paperean eraginpean berrogeita-zortzi orduz egon zirenetan detektatutakoekiko estatistikoki berdinak zirela ikusi zen. Hortaz, zizareek antibiotikoak azaleko xurgapenaren bidez bizkorrago sartzen dituztela ondoriozta daiteke.

### 3.Irudia. OECD esperimntuen ondoren zizareetan detektatutako antibiotiko kontzentrazioa.



### 4. Ondorioak

Antibiotiko hondakinek eta hauen degradazio-produktuek erresistentzien sorrerarako presioa egiten dute, hortaz, garrantzitsua da antibiotikoak ingurumenean duten hedapena kuantifikatzeko metodologia analitikoak eskura izatea. Lan honetan hogeita-lau antibiotiko, hiru fungizida eta hauen degradazio-produktuak aldi berean analizatzeko metodo analitikoak optimizatu eta balioztatu dira zenbait ingurumeneko laginetan. Orokorrean antibiotikoen ezaugarri fisiko-kimiko desberdinak hauen aldi bereko analisisa zailtzen dutenez, lan honek aurrerapauso nabarmena suposatzen du. Balioztatutako metodoen sentikortasuna ingurumenean kontzentrazio baxuan aurkitzen diren antibiotikoen kuantifikazioa bermatu du eta hauen kutsadura elikadura-katean zehar egiaztatuta geratu da. Izan ere, behatu da nekazaritzan antibiotikoak izan ditzakeen simaurrak ongarri gisa erabiltzen badira, antibiotiko horiek landare eta organismo lurtarretan metatu daitezkeela. Hortaz, garrantzitsua da aztertzea antibiotikoen eta hauen degradazio produktuek epe-luzean eragin ditzaketen efektuak.

### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta lurzoruetan antibiotiko gehiagoren degradazio erreakzioak aztertzen jarraitu nahi da bakoitzaren degradazio-produktu espezifikoak identifikatzeko. Horretaz gain, ur laginen analisisan ere sakondu nahi da. Orain arte araztegi-tako irteerako uren eta itsaso-eta estuario- urretarako metodoak balioztatu dira, fase solidoko erauzketa konbentzionalaren bitartez. Garatutako metodoen sentikortasuna hobetu nahi da erauzketa teknika desberdinak frogatuz, hala nola, adsorbatzaile paketatuen bidezko mikro-erauzketa (MEPS delakoa), egitura metal-organikoen bidezko erauzketa (MOFs delakoa), edota antigorputz espezifikoak dituzten irabiagailu magnetikoen bitartezko erauzketak eginez.

## 6. Erreferentziak

- Boxall, A. B. A., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E., & Levy, L. S. (2006). Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2288-2297. <https://doi.org/10.1021/jf053041t>
- Chuang, Y.-H., Zhang, Y., Zhang, W., Boyd, S. A., & Li, H. (2015). Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1404, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.022>
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Feng, Y., Zhang, W.-J., Liu, Y.-W., Xue, J.-M., Zhang, S.-Q., & Li, Z.-J. (2018). A Simple, Sensitive, and Reliable Method for the Simultaneous Determination of Multiple Antibiotics in Vegetables through SPE-HPLC-MS/MS. 13.
- García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review: Antibiotic Pollution in the Environment. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>
- He, Z., Wang, Y., Xu, Y., & Liu, X. (2018). Determination of Antibiotics in Vegetables Using QuEChERS-Based Method and Liquid Chromatography-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 11(10), 2857-2864. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1252-8>
- Kang, D. H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., Murray, H., & Rohwer, C. (2013). Antibiotic Uptake by Vegetable Crops from Manure-Applied Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 9992-10001. <https://doi.org/10.1021/jf404045m>
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., & Larsson, D. G. J. (2011). Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE*, 6(2), e17038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005). Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *Journal of Environmental Quality*, 34(6), 2082-2085. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0026>
- Larivière, A., Lissalde, S., Soubrand, M., & Casellas-Français, M. (2017). Overview of Multiresidues Analytical Methods for the Quantitation of Pharmaceuticals in Environmental Solid Matrixes: Comparison of Analytical Development Strategy for Sewage Sludge, Manure, Soil, and Sediment Samples. *Analytical Chemistry*, 89(1), 453-465. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04382>
- Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Löhmus, R., & Nei, L. (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(32), 5949-5954. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.029>
- Pan, M., & Chu, L. M. (2017). Transfer of antibiotics from wastewater or animal manure to soil and edible crops. *Environmental Pollution*, 231, 829-836. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.051>
- Scaria, J., Anupama, K. V., & Nidheesh, P. V. (2021). Tetracyclines in the environment: An overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management. *Science of The Total Environment*, 771, 145291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145291>
- Vergara-Luis, I., Báez-Millán, J. C., Baciero, I., González-Gaya, B., Olivares, M., Zuloaga, O., & Prieto, A. (2022). Comparison of conventional and dispersive solid phase extraction clean-up approaches for the simultaneous analysis of tetracyclines and sulfonamides in a variety of fresh vegetables. *Talanta*, 124192. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124192>
- Yu, X., Liu, H., Pu, C., Chen, J., Sun, Y., & Hu, L. (2018). Determination of multiple antibiotics in leafy vegetables using QuEChERS-UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41(3), 713-722. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700798>



Zhao, F., Chen, L., Yang, L., Li, S., Sun, L., & Yu, X. (2018). Distribution, dynamics and determinants of antibiotics in soils in a peri-urban area of Yangtze River Delta, Eastern China. *Chemosphere*, 211, 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.162>

## 7. Eskerrak eta oharrak

Egileek eskertu egiten dute “Emergencia y diseminación de resistencia a los antibióticos: vínculos entre salud humana, ganadería, alimentación y medioambiente (Elkartek 20/88)” eta “Evaluación del riesgo de aparición y diseminación de resistencias a antibióticos en productos vegetales frescos y suelos de cultivo de la comunidad autónoma del País Vasco (PA21/05 and PA22/03)” proiektuen bitartez jasotako finantza-laguntza. Egileek eskertu egiten dute, halaber, Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) laguntza finantzarioa “Assessment and preliminary diagnosis of dissemination of antibiotic resistance genes through the food production chain in the Basque Country” COLAB 20/14 lankidetzaproiektuaren bitartez jasotakoa; eta Eusko Jaurlaritzaren Ikerketarako Euskal Sistemaren talde finkatu gisa emandako finantza-laguntzagatik (IT1446-22 and IT1682-22). I. Vergara-Luis EHU/UPV-ri eskertzen dio bere doktoregai beka.