



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



TESIS
EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE HUMEDALES EN CONDICIONES DE LABORATORIO PUNO-2022

PRESENTADA POR:

INGRID MALDONADO JIMENEZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA TECNOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE

ASESOR: EDMUNDO GERARDO MORENO TERRAZAS

COASESOR: FRANZ ZIRENA VILCA

PUNO, PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
**DOCTORADO EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AM-
BIENTE**
TESIS

**EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE HUME-
DALES EN CONDICIONES DE LABORATORIO PUNO-2022**

PRESENTADA POR:

INGRID MALDONADO JIMENEZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

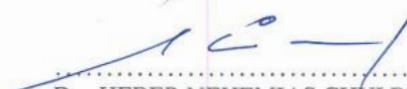
PRESIDENTE


.....
Dr. MARCELINO JORGE ARANIBAR ARANIBAR

PRIMER MIEMBRO


.....
Dra. LIDIA SOFÍA CABALLERO GUTIÉRREZ

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. HEBER NEHEMIAS CHUI BETANCUR

ASESOR DE TESIS


.....
Dr. EDMUNDO GERARDO MORENO TERRAZAS

Puno, 18 de agosto de 2022

ÁREA: Ciencias Biomédicas

TEMA: Evaluación de la remoción de antibióticos mediante humedales en condiciones de laboratorio Puno-2022

LÍNEA: Recursos Naturales y Medio Ambiente



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia.

A mis Padres, por su comprensión y ayuda incondicional en todo momento. Ya que me han ayudado a encarar las adversidades sin importar cuáles fueran. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

A mis hermanos, por su paciencia y ayuda y amor incondicional en momentos de dificultad.

A mi esposo Jesús. Por su paciencia, por su comprensión, así como por el apoyo brindado durante la colección de datos en laboratorio.

A mi hijo, Diego Alonso. Por ser mi motor impulsor para las actividades presentes y futuras.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas e instituciones, quienes apoyaron la ejecución de este trabajo:

Al Dr. Edmundo Moreno Terrazas, por su asesoramiento durante la ejecución de tesis.

Al Dr. Franz Zirena Vilca, por su asesoramiento guía y dirección durante el desarrollo de esta tesis. Por enseñarme y permitirme que utilice el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución y otros equipos, en el Laboratorio de Contaminantes Orgánicos de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Moquegua sede-Ilo.

Al proyecto “Presencia de residuos de antibiótico en el río Osmore, en agua potable de las ciudades de Ilo y Moquegua y su relación con la salud en la población” aprobado con Resolución De Comisión Organizadora N° 0310-2020-UNAM de fecha 26 de junio de 2020, por permitirme hacer uso de los equipos que este proyecto ha adquirido, dentro de ellos el sistema UHPLC-DAD-FLD, equipos que se encuentran en el Laboratorio de Contaminantes Orgánicos y Ambiente de la Universidad Nacional de Moquegua.

Al Proyecto Concytec – Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia (contrato número 01-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales).

Al Dr. Ángel Canales por su valiosa orientación en el transcurso del doctorado.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Contaminantes Emergentes: Anyela Pierina Vega Quispe, Donald Merma Chacca, Elvis Jack Colque y Tatiana por su apoyo durante los análisis de laboratorio en cromatografía.

A Jesús Miranda, quien en todo momento y durante todos estos años me ha brindado su apoyo, ayuda, comprensión incondicional y colaboración durante la ejecución de tesis.

A mi mamá Teodora Jiménez, por su apoyo incondicional durante la realización de la tesis doctoral.

Finalmente, a todos mis amigos, quienes hicieron posible la ejecución de este trabajo de tesis.



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.	Marco teórico	3
1.1.1	Contaminación de los ecosistemas acuáticos de agua dulce	3
1.1.2	Contaminación por antibióticos	3
1.1.3	Características fisicoquímicas de antibióticos	4
1.1.4	Efectos de los antibióticos en el ambiente	5
1.1.5	Métodos de tratamiento para la remoción de antibióticos	5
1.1.6	Fitorremediación acuática	6
1.1.7	Uso de Lemna sp. y Azolla sp. en fitorremediación de compuestos tóxicos	7
1.1.8	Componente Bioelectrogénico con las Celdas de Combustible Microbiana (CCM)	7
1.1.9	Tratamiento de compuestos tóxicos con sustratos	9
1.2.	Antecedentes	9
1.2.1	Presencia de antibióticos en fuentes acuáticas	9
1.2.2	Remoción de antibióticos a través de humedales artificiales	11



1.2.3	Remoción de compuestos tóxicos usando <i>Lemna gibba</i> y <i>Azolla filiculoides</i>	12
-------	---	----

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1	Identificación del problema	15
2.2	Enunciado del problema	17
2.2.1	Pregunta general	17
2.2.2	Preguntas específicas	17
2.3	Justificación	17
2.4	Objetivos	18
2.4.1	Objetivo general	18
2.4.2	Objetivos específicos	18
2.5	Hipótesis	19
2.5.1	Hipótesis general	19
2.5.2	Hipótesis específicas	19

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	20
3.2	Población.	21
3.3	Muestra.	21
3.4	Métodos por objetivos	21
3.4.1	Cuantificación de la concentración de residuos de antibióticos (ug/L), en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno	21
3.4.1.1	Diseño experimental	21
3.4.1.2	Reactivos y solventes	21
3.4.1.3	Muestreo y métodos analíticos en muestras de agua	21



3.4.2	Determinación de las concentraciones de antibióticos (ug/L) removidas por <i>Lemna gibba</i> y <i>Azolla filiculoides</i> evaluados en condiciones de laboratorio	23
3.4.2.1	Diseño experimental	23
3.4.2.2	Cultivo de las macrófitas	24
3.4.2.3	Análisis de antibióticos en muestras de agua y plantas	25
3.4.2.4	Aplicación de prueba estadística inferencial	26
3.4.3	Determinación de la eficiencia de remoción de antibióticos (%), mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio	26
3.4.3.1	Diseño experimental	26
3.4.3.2	Diseño y funcionamiento del humedal	26
3.4.3.3	Aplicación de prueba estadística inferencial.	28

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Cuantificación de la concentración de residuos de antibióticos (ug/L), en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno	29
4.2	Determinar las concentraciones de antibióticos (ug/L) removidas por <i>Lemna gibba</i> y <i>Azolla filiculoides</i> evaluados en condiciones de laboratorio	30
4.2.1	Evaluación de la degradación de los antibióticos mediante un diseño experimental con <i>Lemna gibba</i>	30
4.2.2	Evaluación de la degradación de antibióticos a través del diseño experimental con <i>Azolla filiculoides</i>	35
4.2.3	Efectos de los antibióticos en el crecimiento de la planta	38
4.2.4	Determinación de los puntos óptimos para la remoción de antibióticos	40
4.3	Determinar la eficiencia de remoción de antibióticos (%), mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio	44
4.3.1	Remoción de antibióticos en los humedales con las diferentes combinaciones	44



4.3.2	Crecimiento de las plantas	46
4.3.3	Fito absorción de residuos de antibióticos	48
4.3.4	Producción eléctrica en los humedales experimentales	50
4.3.5	Parámetros fisicoquímicos	51
CONCLUSIONES		53
RECOMENDACIONES		54
BIBLIOGRAFÍA		55
ANEXOS		69



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Principales grupos de antibióticos, características fisicoquímicas y toxicológicas.	5
2. Tomado de: a. Jafari et al. (2020) y b. PubChemDatabase (2021)	5
3. Características analíticas de los antibióticos considerados en el estudio	22
4. TR: tiempo de retención. LD: Límite de detección. LQ: límite de cuantificación Rec%agua: % de recuperación en muestras de agua. REC%planta: % de recuperación en muestra de planta. SD: desviación estandar.	23
5. Variables predictoras y sus valores seleccionados para el diseño Box-Behnken (BBD) para la eliminación de antibióticos.	24
6. Diseño experimental considerando los tres factores	26
7. Residuos antibióticos analizados en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno.	30
8. El diseño experimental y las respuestas basadas en los valores reales y predichos con <i>Lemna gibba</i> y <i>Azolla filiculoides</i> , para el porcentaje de eliminación de tetraciclina (Y1) y el porcentaje de eliminación de cloranfenicol (Y2).	32
9. Coeficientes de regresión obtenidos para el modelo generado por RSM.	37
10. Valores del factor de bioconcentración en las plantas.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Contaminación por residuos de antibióticos en los ecosistemas acuáticos por diferentes fuentes	4
2. Estructura y funcionamiento de un humedal bioelectrogénico. Fuente: https://www.wur.nl/en/project/Plant-microbial-fuel-cell-Mechanistic-characterization.htm	6
3. Combinación de la fitorremediación con celdas de combustible microbiana. 1. Computadora. 2. Data logger 3. Resistencia. 4. Humedal eléctrico 5. Bomba peristáltica y tanque	8
4. La ubicación del lugar de estudio, próximo a la ciudad de Puno. Punto de muestreo del efluente de las aguas residuales	20
5. Esquema del diseño experimental del componente bioelectrogénico.	27
6. Cromatograma de tetraciclina y cloranfenicol en UHPLC	30
7. Porcentaje de incremento de biomasa en <i>Lemna</i> (a) y <i>Azolla</i> (b) durante el periodo experimental de 7 días. Con tres concentraciones C1= 5 y 10 mg/L, C2= 10 y 15 mg/L C3= 15 y 20 mg/L para Tetraciclina y Cloranfenicol respectivamente.	38
8. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Biomasa; (b) Biomasa y concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.	41
9. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Concentración. Para el porcentaje de eliminación de cloranfenicol, contenido en función d Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (b) Día y Biomasa, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.	41
10. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (a) Biomasa y concentración; (b) Día y Concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.	42
11. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Biomasa; (b) Biomasa y concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.	43
12. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Concentración. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción	

- conjunta de (b) Día y Biomasa. Los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción. 43
13. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (a) Biomasa y concentración; (b) Día y Concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción 44
14. Porcentaje de remoción de antibióticos en los diferentes tratamientos usados. AA (Azolla y Arena), AL (Azolla y limo), AAE (Azolla, arena y el componente eléctrico), ALE (Azolla, Limo y el componente eléctrico), LA (Lemna y arena), LL (Lemna y limo), LAE (Lemna, Arena y componente eléctrico), LLE (Lemna, limo y componente eléctrico). 45
15. Incremento de la biomasa y la ratio de crecimiento relativo de las especies *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* en los diferentes tratamientos AA (Azolla y Arena), AL (Azolla y limo), AAE (Azolla, arena y el componente eléctrico), ALE (Azolla, Limo y el componente eléctrico), LA (Lemna y arena), LL (Lemna y limo), LAE (Lemna, Arena y componente eléctrico), LLE (Lemna, limo y componente eléctrico). Las letras diferentes indican diferencia en las medias según el test de Duncan. 48
16. Cantidad de antibióticos absorbidos por las plantas en los diferentes tratamientos. Tetraciclina (a), cloranfenicol (b). AA (Azolla y Arena), AL (Azolla y limo), AAE (Azolla, arena y el componente eléctrico), ALE (Azolla, Limo y el componente eléctrico), LA (Lemna y arena), LL (Lemna y limo), LAE (Lemna, Arena y componente eléctrico), LLE (Lemna, limo y componente eléctrico). 49
17. Registro de producción eléctrica en los 4 humedales, durante 40 días. 50
18. Parámetros físico químicos antes () y después () del tratamiento del humedal. a) pH, b) POR (Potencial oxido-reducción), c) OD (Oxígeno disuelto), d) Conductividad eléctrica, e) Sólidos disueltos totales y f) salinidad. AA (Azolla y Arena), AL (Azolla y limo), AAE (Azolla, arena y el componente eléctrico), ALE (Azolla, Limo y el componente eléctrico), LA (Lemna y arena), LL (Lemna y limo), LAE (Lemna, Arena y componente eléctrico), LLE (Lemna, limo y componente eléctrico). 51



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1 Validación del método de análisis. a. Añadiendo antibiótico al agua destilada para evaluar el porcentaje de recuperación en los cartuchos. b. Cogiendo cierta cantidad del estándar de antibióticos con una micropipeta.	70
2 Curva de calibración para agua. a. para tetraciclina y b. Cloranfenicol.	71
3 Adecuación del método de análisis de antibióticos en plantas a través del método QueChers. a. Moliendo la muestra. b. Vortexando las muestras en los tubos falcon. c. Centrifugando las muestras. d. Extrayendo el sobrenadante con una micropipeta.	72
4 Muestreo de aguas residuales en el efluente de la laguna de oxidación de el Espinar	73
5 a. Instalación del experimento del humedal. b. Aleatorización de las unidades experimentales.	74
6 a. Medición de la electricidad en los humedales artificiales. b. Registro de producción eléctrica.	75
7 Datos del factor de bioconcentración de antibióticos en plantas.	76
8 Porcentaje de remoción de antibióticos y absorción en plantas	77
9 Tabla de análisis de la varianza para el modelo generado por RSM. FO: primer orden; TWI: interacción bidireccional; PQ: cuadrático puro	78

TABLA DE ABREVIATURAS

AA:	Interacción entre <i>Azolla</i> y Arena.
AAE:	Interacción entre <i>Azolla</i> , arena y el componente eléctrico.
AL:	Interacción entre <i>Azolla</i> y limo.
ALE:	Interacción entre <i>Azolla</i> , Limo y el componente eléctrico.
BBD:	Diseño Box Benhken (Box Benhken design).
Clor:	Cloranfenicol.
LA:	Interacción entre <i>Lemna</i> y arena.
LAE:	<i>Lemna</i> , Arena y componente eléctrico.
LD:	Límite de detección.
LL:	Interacción entre Lemna y limo.
LLE:	Lemna, limo y componente eléctrico.
LQ:	Límite de cuantificación.
CCM:	Celdas de Combustible Microbiana (Microbial Fuel Cell).
Rec%agua:	% de recuperación en muestras de agua.
Rec%planta:	% de recuperación en muestra de planta.
RSM:	Metodología de Superficie de Respuesta.
SD:	Desviación Estándar
Tet:	Tetraciclina.
UHPLC:	Cromatografía Líquida de Rendimiento Ultra alto (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography).

RESUMEN

Los lagos y ríos son afectados por diversos contaminantes. En esta investigación se cuantificó la presencia de antibióticos en aguas residuales, así como la remoción de antibióticos a través de humedales artificiales con macrófitas (*Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*). Para ello, se analizaron residuos de tetraciclina (Tet) y cloranfenicol (Clor) en muestras de agua y macrófitas, con técnicas UHPLC-Agilent. Para hallar el óptimo de remoción de antibióticos se usó el diseño Box Benhken con parámetros de tiempo de contacto, concentración de antibiótico y biomasa de macrófitas. Asimismo, se usó un diseño factorial 2^3 , con un diseño completamente al azar para hallar el humedal con la mejor configuración. Se midieron muestras de agua al inicio y final del experimento (50 días), y en macrófitas al final. Se halló residuos de Tet (4.25 $\mu\text{g/L}$) y Clor (1.87 $\mu\text{g/L}$) en agua residual. Asimismo, concentraciones menores (10 mg/L) de antibióticos fueron mejor removidas por macrófitas con influencia del tiempo de contacto. Las combinaciones de humedales fueron eficientes en remover residuos de antibióticos, con similitud de resultados (p valor= 0.129 >0.05 para Tet y (p valor= 0.438 >0.05 para Clor), representando como máximo el 100% para Tet y Clor. La absorción por macrófitas, tuvo mínimos de 0.58 y 00 $\mu\text{g/g}$ y como máximos 5.67 y 0.81 $\mu\text{g/g}$ para Tet y Clor, respectivamente. Se concluye que las especies empleadas, así como los humedales con sus diferentes combinaciones, son eficientes en el proceso de remoción de contaminantes antibióticos hallados en las aguas residuales de la ciudad de Puno.

Palabras clave:

Aguas residuales, Arena, Bioelectricidad, Contaminante Ambiental, Humedales, Macrófitas flotantes.

ABSTRACT

Lakes and rivers are affected by various pollutants. In this research, the presence of antibiotics in wastewater was quantified, as well as the removal of antibiotics by macrophytes (*Lemna gibba* and *Azolla filiculoides*) in artificial wetlands. For this purpose, tetracycline (Tet) and chloramphenicol (Chlor) residues were analyzed in water and macrophyte samples with UHPLC-Agilent techniques. The Box Benhken design with parameters of contact time, antibiotic concentration and macrophyte biomass was used to find the optimum antibiotic removal. Also, a 2^3 -factorial design with completely randomized design was used to find the wetland with the best configuration. Water samples were measured at the beginning and end of the experiment (50 days), and macrophytes at the end. Residues of Tet (4.25 $\mu\text{g/L}$) and Chlor (1.87 $\mu\text{g/L}$) were found in wastewater. Also, lower concentrations (10 mg/L) of antibiotics were better removed by macrophytes with influence of contact time. The wetland combinations were efficient in removing antibiotic residues, with similarity of results (p value= 0.129 >0.05 for Tet and (p value= 0.438>0.05 for Chlor), representing at most 100% for Tet and Chlor. Macrophyte uptake had minimums of 0.58 and 00 $\mu\text{g/g}$ and maximums of 5.67 and 0.81 $\mu\text{g/g}$ for Tet and Chlor, respectively. It is concluded that the species used, as well as the wetlands with their different combinations, are efficient in the removal process of antibiotic contaminants found in the wastewater of the city of Puno.

Keywords:

Bioelectricity, environmental pollutant, floating macrophytes, sand, wastewater, wetlands.

INTRODUCCIÓN

En el mundo es ampliamente conocido que el proceso de depuración de las aguas residuales es insuficiente para eliminar los diversos compuestos que se hallan en su composición (Huber et al., 2012). Existe una gran cantidad de residuos tóxicos en los efluentes de las plantas de tratamiento, tales como los antibióticos, sustancias de cuidado personal y otros. Por ejemplo, alrededor del planeta el uso de antibióticos excede los 100,000 T/A, y gran porcentaje de ellos son liberados al ambiente (Danner, Robertson, Behrends, & Reiss, 2019); llegando hasta los ecosistemas acuáticos a través de las aguas residuales. La presencia de residuos antibióticos pueden llegar hasta el ser humano a través de los alimentos, así como el agua de consumo, lo cual representa un riesgo para la salud humana (Barra Caracciolo et al., 2015; Carvalho & Santos 2016; Song et al., 2020), generando resistencia bacteriana e ineficacia en los antibióticos suministrados, lo que también afecta la salud del ser humano y del ambiente (Wang et al., 2019).

El Perú tiene serias deficiencias en relación a tecnologías de tratamiento de aguas residuales (Kuroiwa, 2009), las 50 EPSs (Entidad Prestadora de Servicios de Saneamiento), solo prestan servicio al 69.65% de la población, el resto incluyendo zonas rurales vierten sus aguas servidas directamente a los ecosistemas acuáticos (OEFA, 2014). Esta situación genera un problema de salud ambiental, tal como es el caso del agua potable en la ciudad de Cajamarca, en la cual, se identificó resistencia bacteriana a antibióticos como la amoxicilina + ácido clavulánico, ampicilina, azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina trimetoprima + sulfametoxazol, tetraciclina, y otros; lo cual indica que existe contaminación por agua residual no tratada (Larson et al., 2019).

En el lago Titicaca, existen estudios en los que muestran la existencia de residuos antibióticos, en una cuenca afluyente al lago Titicaca (Archundia et al., 2017) y en el mismo lago en el lado boliviano (Duwig et al., 2014). En el lado peruano, se hallaron residuos antibióticos veterinarios en las aguas superficiales cercanas a la zona de crianza de trucha (Zirena et al., 2021) y también en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno (Nieto-Juarez, Torres-Palma, Botero-Coy, & Hernández, 2021). Dentro de ellos se halló tetraciclina (Nieto-Juarez et al., 2021) que es considerado como el segundo antibiótico más usado en el mundo (Wang et al., 2017). Y cloranfenicol en uno de los afluentes al lago entre 20 a 28 ng/L (Duwig et al., 2014), siendo considerado un antibiótico prohibido

en algunos países por su elevada toxicidad (Leston, Nunes, Viegas, Ramos, & Pardal, 2013; J. Wang et al., 2017).

En este contexto, se presenta la investigación relacionada a la presencia de residuos de antibióticos en muestras de agua residual de la laguna de oxidación de el Espinar-Puno que descarga sus efluentes a la bahía interior de Puno-lago Titicaca, y la aplicación de métodos de fitorremediación para la remoción de estos compuestos del medio acuático. En el primer capítulo se describen las bases teóricas relacionadas a los temas de estudio mencionados, como la contaminación de los ecosistemas de agua dulce, fitorremediación, uso de especies como *Lemna* y *Azolla*, uso de sustratos para tratamiento de adsorción y el uso de celdas de combustible microbiana en el tratamiento de este tipo de compuestos. En el capítulo II se muestra el planteamiento del problema, justificación, objetivos e hipótesis. Los objetivos planteados en esta tesis fueron: primero, determinar la presencia de antibióticos en muestras de agua residual (tetraciclina y cloranfenicol). Segundo determinar las concentraciones de antibióticos (ug/L) removidas por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* evaluados en condiciones de laboratorio. Finalmente, aplicar un tratamiento a través de humedales artificiales con diferentes sustratos, macrófitas (*Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*) y un componente bio-electrogénico, el cual se prevé que acelere el proceso de degradación de residuos antibióticos. En el capítulo III se desarrolla los materiales y métodos empleados en la tesis. En el Capítulo IV se describe los resultados y discusiones por objetivos. Finalmente, las conclusiones.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico

1.1.1 Contaminación de los ecosistemas acuáticos de agua dulce

Las actividades humanas se extienden hasta los ríos de zonas altoandinas generando alteración en estos ecosistemas (Custodio, Chanamé, Pizarro, & Cruz, 2018), tales como contaminación orgánica, proveniente de aguas residuales, e inorgánica, proveniente de la agricultura así como otros tipos de usos de suelo como la minería (Acosta, 2009; Loayza-Muro, 2017), los cuales deterioran la calidad de las aguas de los ríos, por ende de los cuerpos receptores como son los lagos.

1.1.2 Contaminación por antibióticos

Los antibióticos son parte de los contaminantes denominados emergentes, entre los cuales también se encuentran los productos de cuidado personal, pesticidas, surfactantes y plastificantes (Ávila, Pedescoll, Matamoros, Bayona, & García, 2010). Los antibióticos son compuestos que matan o inhiben el crecimiento y desarrollo de las bacterias (Danner et al., 2019), lo cual ha contribuido con el control de las enfermedades; por ello su uso se ha masificado en el mundo, tanto así, que al año se producen miles de toneladas (Liu et al., 2013). La agencia de medicina europea en 2013 indicó que en los 13 países de la comunidad se tuvo un consumo de 8122 T (Carvalho & Santos 2016). En Estados Unidos se liberan al ambiente 15,000 T/A (He et al., 2018). Esta liberación se da debido a que, de todo los antibióticos ingeridos, el cuerpo sólo asimila el 25%, mientras que el resto es eliminado a través de las heces y la orina (Cha & Carlson, 2019; Guan et al., 2017; Pei et al., 2019). En consecuencia, estos

contaminantes llegan a los ecosistemas acuáticos a través de las aguas residuales ineficientemente tratadas, y esta liberación se da de forma continua (Rabello, Teixeira, Gonçalves, & de Sá Salomão, 2019), lo que acrecienta la contaminación.

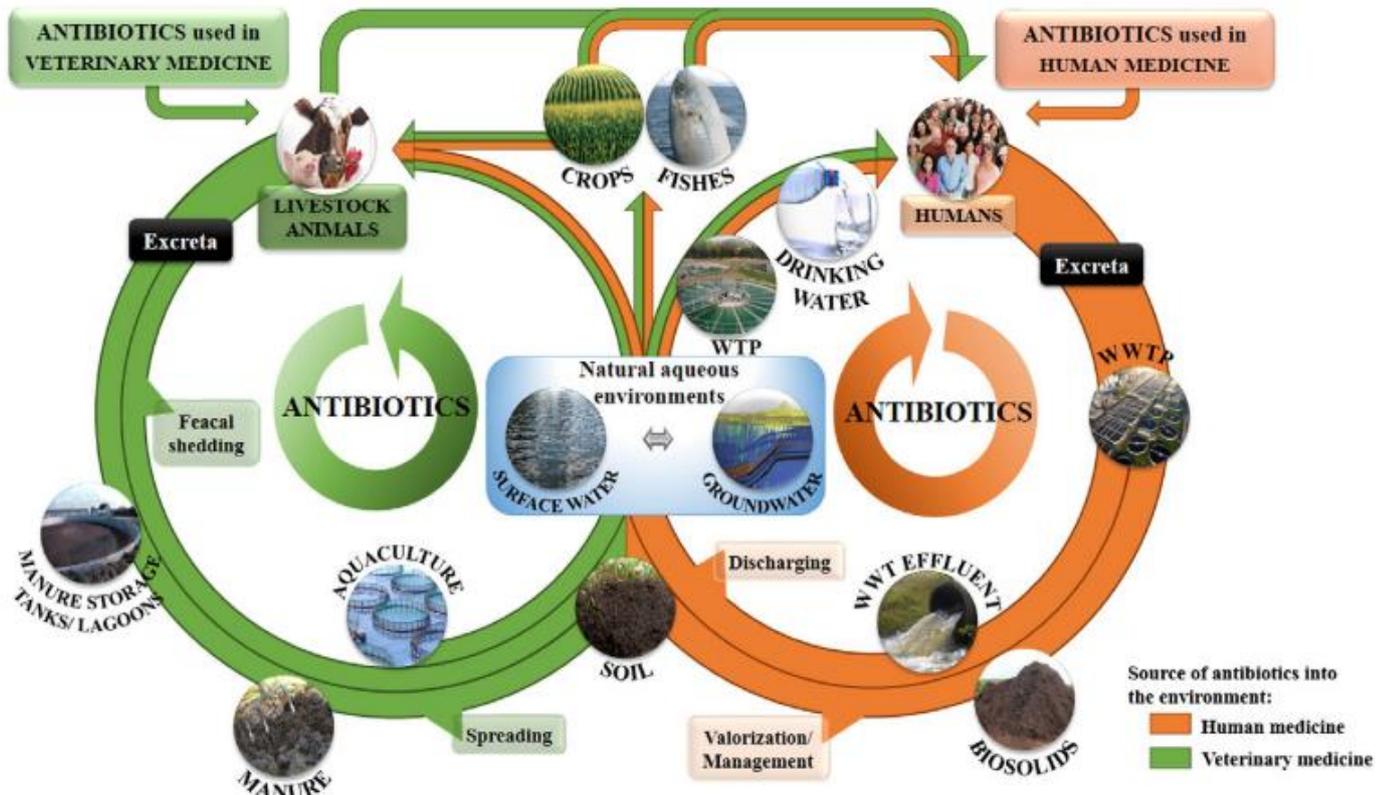


Figura 1. Contaminación por residuos de antibióticos en los ecosistemas acuáticos por diferentes fuentes. (Carvalho y Santos, 2016). Características fisicoquímicas de antibióticos

Algunos de los más importantes que se mencionan son:

- El coeficiente de partición octanol de agua K_{ow} . Antibióticos con valores $\log K_{ow}$ de 0.5 - 3.5 son absorbidas por las plantas, mientras que valores por encima solo son aprovechadas por la rizosfera y no se puede translocar a las hojas (Ijaz et al., 2016).
- Constante de disociación pK_a . Esta constante mide la capacidad de separarse o disociarse, cuanto mayor disociación tiene un compuesto mayor capacidad de solubilidad tiene, lo contrario será más fácil su deposición en sedimentos (Qiang & Adams, 2004).

- Coeficiente de distribución (K_d). Este cociente nos indica que un compuesto con $\gg K_d$ son absorbidos por sedimentos, mientras que compuestos con $\ll K_d$ son más solubles en agua; por lo tanto, tienen mayor distribución (Jafari, Hamidian, Zhang, & Yang, 2020).

Considerar las características fisicoquímicas de los antibióticos es importante, debido a que, dependiendo de eso, los antibióticos serán mejor absorbidos por las plantas o adsorbidos por los sedimentos (Tabla 1).

Tabla 1

Principales grupos de antibióticos, características fisicoquímicas y toxicológicas.

Antibióticos	Log Kow	PK A	Solubilidad (mg/L)	Kd (L kg ⁻¹)	Vida media biológica (hora)	Toxicidad
Tetraciclina	- 1.37 b	3.3 b	231 ^b	855.93 a	6 a 12 ^b	LD50 678 mg/kg (ratones) ^b
Cloranfenicol	1.14 b		2.5 ^b		1.5 - 3.5 ^b	EC50 780 ug/L en 72 hr (algas) ^b

Tomado de: a. Jafari et al. (2020) y b. PubChemDatabase (2021)

1.1.3 Efectos de los antibióticos en el ambiente

Los antibióticos poseen una toxicidad persistente que afecta a las especies acuáticas (Li et al., 2019); las tolerantes a la contaminación bioacumulan sustancias tóxicas en su organismo, y las menos tolerantes terminan siendo desplazadas de su hábitat (de Castro-Catalá et al., 2015; Rodil et al., 2019). Los afectados en primera instancia son microorganismos como bacterias en quienes da origen a bacterias resistentes a antibióticos (Huang et al., 2017), esto altera la comunidad acuática de forma general.

1.1.4 Métodos de tratamiento para la remoción de antibióticos

Hasta hoy se han aplicado diversas metodologías de tratamiento en la remoción de antibióticos existentes en las aguas residuales. Los métodos empleados más conocidos son: lodos activados, procesos de oxidación avanzada, lagunas de oxidación, humedales artificiales y fitorremediación, (Conkle et al., 2008), así como tecnologías

de electroquímica en humedales artificiales (Hassan et al., 2021) los cuales muestran efectividad de tratamiento (Figura 2). Sin embargo, algunos de ellos suelen ser tratamientos costosos y con un mantenimiento complicado (Amare, Kebede, & Mulat, 2018; Maldonado, Moreno, & Zirena, 2022).

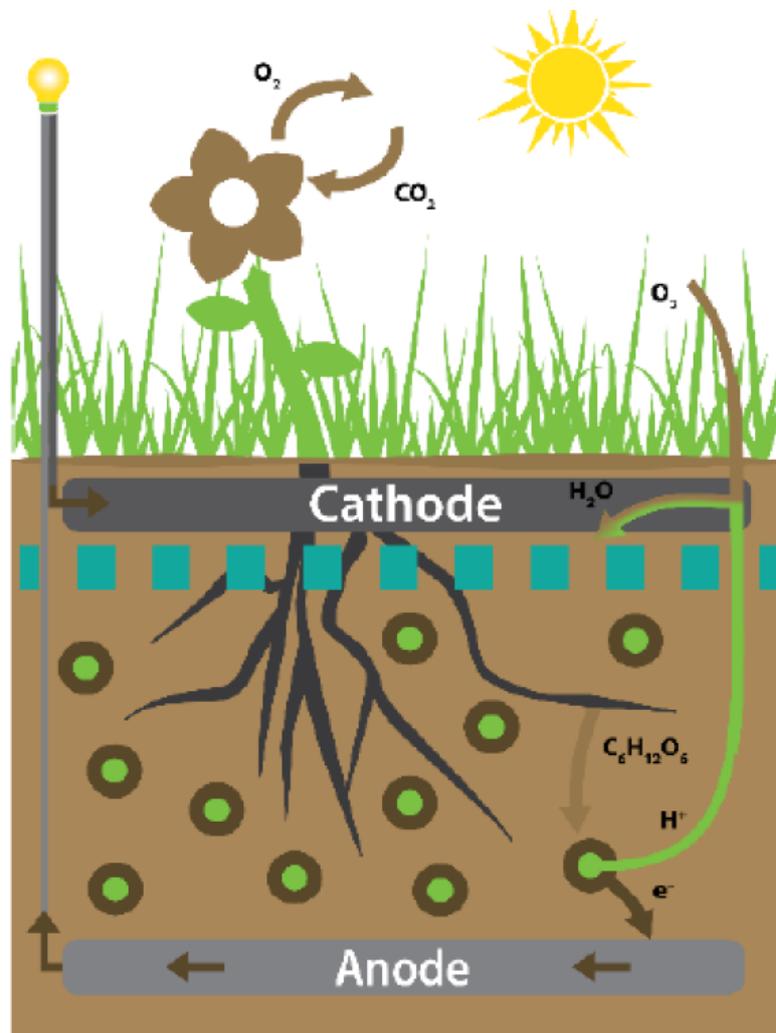


Figura 2. Estructura y funcionamiento de un humedal bioelectrogénico. Fuente: <https://www.wur.nl/en/project/Plant-microbial-fuel-cell-Mechanistic-characterization.htm>

1.1.5 Fitorremediación acuática

Es conocido que los humedales artificiales, han sido ampliamente estudiado en su aplicación para tratamiento de aguas residuales, así como para remover compuestos tóxicos del ambiente (Carvalho et al., 2014). Dentro de los humedales, ocurren varios mecanismos de acción, tales como la absorción, adsorción fito-extracción, fito-volatilización (Fahid et al., 2020). Su aplicación tiene resultados promisorios debido a su

bajo costo de instalación, operación y mantenimiento (Carvalho et al., 2013; Li et al., 2014). Son más de 150 plantas usadas en este tipo de tratamiento (Wu et al., 2015), para lo cual se ha usado diversas especies de plantas resistentes al estrés generado por la presencia de antibióticos en el agua, tales como *Ipomoea aquatica* y *Phragmites australis* (Carvalho et al., 2012; Kurade et al., 2019), demostrando que este tipo de tecnologías evidencia buenos resultados en la remoción de antibióticos (Liu et al., 2019).

1.1.6 Uso de *Lemna* sp. y *Azolla* sp. en fitorremediación de compuestos tóxicos

Diversas especies del género *Lemna* y *Azolla* han sido halladas como buenas fitorremediadoras en la aplicación de tratamiento de aguas residuales. Mostrando elevados porcentajes de eficiencia en la remoción de compuestos tóxicos (Amare et al., 2018), tal como los metales pesados (Bianchi et al., 2020; Bokhari, Ahmad, Mahmood-Ul-Hassan, & Mohammad, 2016), fármacos (Hájková, Kummerová, Zezulka, Babula, & Váczi, 2019) como el ibuprofeno cuyo porcentaje de remoción por *Lemna* sp alcanzó un 92% (Di Baccio et al., 2017). El mecanismo de remediación se da principalmente a través de los tejidos o biomasa (Lu & Lu, 2019), así contribuyen en la calidad de agua y la biotransformación de compuestos tóxicos.

1.1.7 Componente Bioelectrogénico con las Celdas de Combustible Microbiana (CCM)

En los últimos años el uso de las CCMs ha mostrado resultados promisorios en relación al tratamiento de aguas residuales en la remoción de nitrógeno y compuestos tóxicos de este medio (Türker & Yakar, 2017), tales como metales pesados y antibióticos (Hassan et al., 2021). En el cual, juegan un rol importante microorganismos como las bacterias, quienes en un sistema biodegradable oxidan la materia orgánica e inorgánica en los suelos del humedal (Türker & Yakar, 2017). Pues Muchos microorganismos tienen la capacidad de liberar y/o recibir electrones hacia y desde materiales de estado sólido como los electrodos, lo cual es aprovechado por este sistema (Sharma et al., 2014). Este mecanismo se da gracias a procesos químicos como el de redox y la energía que estos microorganismos producen a través de ceder electrones, que luego pueden ser utilizados para la producción eléctrica (Sharma et al., 2014; Türker y Yakar 2017; Wang et al., 2020).

El sistema CCM normalmente funciona en dos cámaras, una cámara anódica y la otra es la cámara catódica. Sin embargo, también existen sistemas de una sola cámara, en la que la zona anódica se encuentra en una parte anaeróbica, lugar en el cual las bacterias degradarán al compuesto tóxico objetivo, liberando electrones y protones (Kumar et al., 2019). Los electrones son aceptados por el electrodo (en la parte anódica) luego son trasladados de forma directa o indirecta a la zona cátodo (Wen, Zhu, Yan, Xu, & Shutes, 2020). En la cámara o zona catódica se produce una reacción de reducción de oxígeno con la combinación de electrones y protones, generando agua y bioelectricidad (Wang et al., 2020). También existen CCM de una sola cámara tal como se muestra en la Figura 3, en el que la cámara anódica se halla en la parte inferior, una zona anaeróbica y la zona catódica en una parte oxigenada, principalmente en la parte superior.

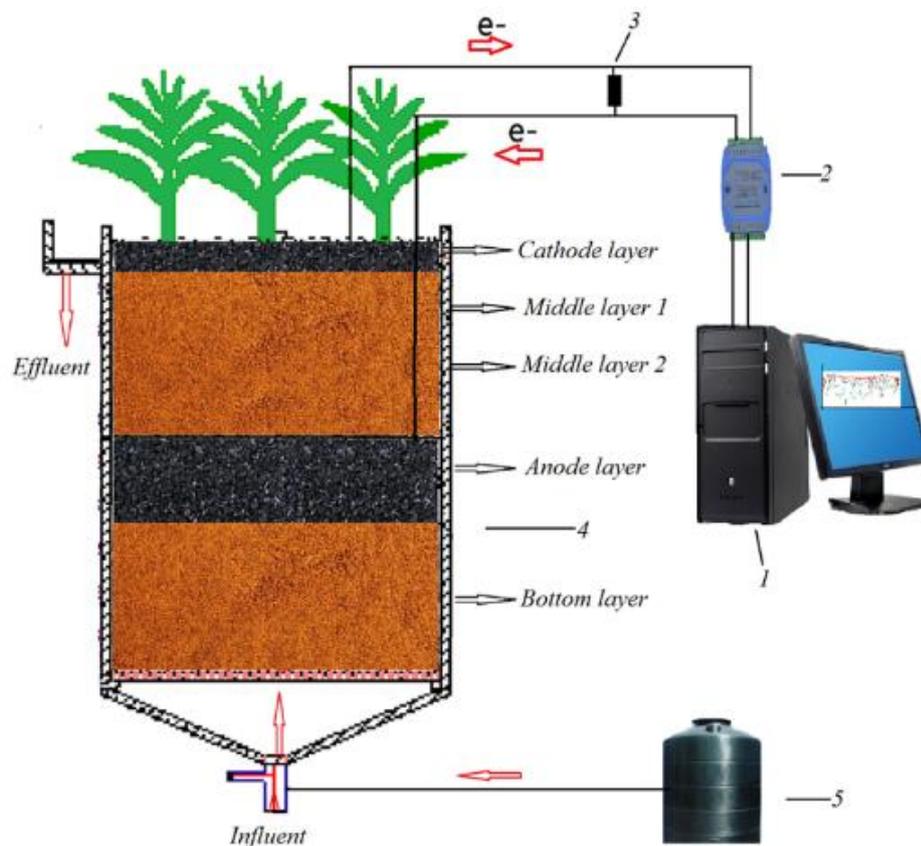


Figura 3. Combinación de la fitorremediación con celdas de combustible microbiana. 1. Computadora. 2. Data logger 3. Resistencia. 4. Humedal eléctrico 5. Bomba peristáltica y tanque. Fuente: (Zhang et al., 2017)

1.1.8 Tratamiento de compuestos tóxicos con sustratos

A lo largo del tiempo se han usado diversos tipos de sustrato para realizar un tratamiento pasivo, por filtración de sustancias tóxicas; se han usado limo, arena, grava, así como restos vegetales orgánicos (Jia, Zhang, Wu, Xie, & Zhang, 2010), de los cuales la arena demostró mejores resultados (Dordio & Carvalho, 2013; Ilyas & Hullebusch, 2019; Saeed & Sun, 2012), esto por tener gran peso molecular y tiene la propiedad de disponer de un residuo catiónico o aniónico intercambiable, lo que contribuye con el proceso de adsorción (Arnanz, 2018). Otro sustrato ampliamente usado es el limo, el cual es un tipo de sustrato existente en todo lugar y eficiente en procesos de remoción, por ello también se ha aplicado para remover fármacos en humedales (Cardinal et al., 2014; Thi, Thuy, Thi, & Loan, 2014).

1.2. Antecedentes

1.2.1 Presencia de antibióticos en fuentes acuáticas

Al Aukidy et al., (2012) trabajaron en dos efluentes de aguas residuales, así como en muestras de agua del río receptor. Se consideraron puntos por abajo y arriba del punto de vertimiento de aguas residuales a fin de determinar el impacto de este vertimiento sobre la calidad del agua. Allí encontraron 27 compuestos farmacéuticos, pertenecientes a diferentes clases, en los efluentes analizados, lo que muestra que estas aguas están contaminadas y que existe impacto por este tipo de vertimientos. También hallaron otros compuestos aguas arriba del punto de vertimiento, lo que indica que existen fuentes distintas de contaminación, aparte de los efluentes analizados.

En otro estudio en el que se analizaron muestras de agua en el delta del río Amarillo, se tomaron muestras en aguas superficial, sedimentos del río y la zona intermareal. En estos, se hallaron ocho antibióticos pertenecientes a tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos. Se establecieron dos modelos para predecir los coeficientes de partición de la norfloxacin y la eritromicina en cantidades de 82.94-230.96 ng/L y 40.97-207.44 ng/g, en agua y sedimento respectivamente (Zhao et al., 2016).

Huang et al., (2019) evaluaron seis ríos urbanos en Guangzhou, sur de China impactado por aguas residuales, en los que se evaluaron la presencia de residuos de antibióticos y genes resistentes a los mismos. Se analizaron nueve antibióticos (pertene-

cientes a sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas y macrólidos) y sus ARG correspondientes en agua y sedimentos de los ríos considerados, a fin de analizar la distribución espacial y la influencia de la remediación del agua. Los resultados evidenciaron elevadas concentraciones para norfloxacin y ciprofloxacina; así como los genes resistentes a tetraciclinas tetC ($\sim 10^{-2}$ ARG/ARNr 16S).

En otro estudio en el que también se analizaron residuos de antibióticos de uso humano y veterinario en la cuenca del río Haihe entre los años 2016 y 2017, y los resultados se compararon con estudios anteriores, y evidenciaron que la concentración de antibióticos se ha incrementado en las matrices evaluadas, lo que muestra que el consumo de los antibióticos está aumentando en la cuenca evaluada. Adicionalmente, hallaron que el ingreso anual de los residuos de antibióticos al río Haihe fue de 5008 kg/año. De ellos, ofloxacino, trimetoprima, leucomicina, eritromicina anhidro y florfenicol fueron los antibióticos más resaltantes (Lei et al., 2019).

En otro estudio tomaron muestras de sedimentos superficiales y muestras de plantas del humedal adyacente a fin de evaluar la distribución de los residuos de antibióticos en el río Yang y su estuario en la bahía de Jiaozhou. En el cual se analizaron ocho antibióticos y su impacto ambiental en el ecosistema acuático. Los resultados mostraron que los antibióticos analizados estaban presentes en los sedimentos del río Yang y su estuario, con un promedio de 4.46 ng/g en el río Yang y de 3.92 ng/g en su estuario, respectivamente. La cantidad de antibióticos individuales provenientes del río Yang a su estuario fue de 11.73 a 391.59 g/año. Asimismo, hallaron residuos de antibióticos en las cinco especies de plantas evaluadas, lo que sugiere que también se pudiera usar estas plantas como un método de fitorremediación (Liu et al., 2020).

Y es lamentable conocer que estos residuos llegan hasta los océanos, en relación a esto Xu et al., (2013) comentan que a partir del río Pearl- China, cada año ingresan al mar del sur de China 193 T con 102 T correspondientes a fluoroquinolonas. Adicionalmente, se halló que las concentraciones de antibióticos disminuían a medida que las aguas llegaban al estuario y más aún en mar abierto. La evaluación del riesgo ambiental evidenció que todos los antibióticos hallados representaban riesgos para el ecosistema, en los que ofloxacino, la eritromicina y la ciprofloxacina presentaban riesgos ecológicos elevados para los entornos acuáticos estudiados.

En un estudio eco-toxicológico realizado por Zhang et al., (2012) con antibióticos como enoxacino, ciprofloxacino y sulfametoxazol, sobre individuos de *Vibrio fisheri*, *Microcystis aeruginosa*, y *Synecho-coccus leopoliensis*; hallaron un alto riesgo ecológico. Y esta problemática se repite alrededor del mundo. Tal es el caso de nuestro país, en Cajamarca se identificó resistencia a Amoxicilina + ácido clavulánico, ampicilina, azitromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina trimetoprima + sulfametoxazol, tetraciclina, y otros. Lo cual indica que existe contaminación por agua residual no tratada (Larson et al., 2019).

1.2.2 Remoción de antibióticos a través de humedales artificiales

Se han usado especies macrófitas para el tratamiento de aguas residuales y remoción de metales, tal como hallaron Sasmaz y Obek., (2012) en un estudio en el que analizaron la capacidad de remoción de *Lemna gibba* aplicado a metales pesados como plata y oro de efluentes secundarios. El experimento se desarrolló durante 7 días, periodo en el cual acumuló cantidades significativas de plata y oro en sus tejidos. Los mayores porcentajes de acumulación de metales en su biomasa fueron 23.03% para plata y 24.7% para oro. Estos resultados evidencian la efectividad de esta planta para remover metales o recuperar metales preciados como son la plata y el oro.

En otro estudio en el que se usó *L. minor* para remover cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y níquel (Ni) de dos tipos de aguas residuales sin tratar, el experimento tuvo una duración de 31 días en un invernadero. A fin de determinar la concentración de metales pesados en el agua y en las plantas se muestrearon a los 3, 10, 17, 24 y 31 días. Con estos datos se hallaron los porcentajes de remoción, así como el factor de bioconcentración en los tejidos de *Lemna minor*. Los resultados evidenciaron la fitoabsorción de metales pesados en los tejidos de la planta, lo que contribuyó en la disminución de metales en el medio acuático. En relación a la remoción de los elementos analizados, se hallaron porcentajes mayores a 80% en todos los metales y hallaron una remoción máxima para el níquel (99 %) lo que evidenció que *Lemna minor* es una especie con capacidad de remover compuestos tóxicos del medio acuático (Bokhari et al., 2016).

En algunos casos específicos como el enrofloxacino y ceftiofur tratado con microorganismos Proteobacteria (38–48 %), Firmicutes (20–27 %), Bacteroidetes (12–15 %)

y Actinobacteria (4-9%) provenientes de la zona radicular de *Pragmites australis*. Los investigadores hallaron que el porcentaje de remoción alcanzó valores mayores a 85%, evidenciando también elevados porcentajes de remoción de nutrientes y materia orgánica (Santos, Almeida, Ribeiro, Ferreira, & Mucha, 2019).

En otro estudio evaluaron la capacidad de remoción de oxitetraciclina y ciprofloxacina en tres humedales artificiales (CW) que consideraron tres tipos de flujo (superficie, subsuelo horizontal y flujo vertical subsuperficial). Los tratamientos aplicados tuvieron elevados porcentajes de remoción, que variaron entre 85 y 99%. Asimismo, los humedales de flujo subsuperficial vertical evidenciaron porcentajes de remoción más elevados para oxitetraciclina (99 %) que para ciprofloxacina (97 %). Adicionalmente, los resultados hallados en los humedales, también evidenciaron la influencia del tipo de humedal utilizado en la remoción de antibióticos, dado que la comunidad bacteriana fue la más afectada en los humedales (Liu et al., 2019).

1.2.3 Remoción de compuestos tóxicos usando *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*

En otro estudio investigaron la capacidad depuradora de las especies *Lemna* y *Azolla* aplicado a aguas residuales, para lo cual usaron tres tipos de efluentes textiles, de una destilería y efluentes domésticos, en una cantidad de (3:1:18) respectivamente. Para ello emplearon 9 contenedores 3 para cada especie y 3 para el control, en los resultados no hubo diferencia significativa entre las macrófitas usadas en el tratamiento; asimismo, obtuvieron resultados de remoción de nutrientes entre un 90 y 96%, y si se compara con el grupo control, toda esta remoción se atribuye a las especies usadas (Amare et al., 2018).

El uso de las plantas flotantes en la remoción de contaminantes es frecuente, mostrando resultados esperanzadores para el tratamiento de nuevos compuestos que se presentan en el ambiente, tal es el caso de los contaminantes emergentes. Se realizó un estudio de remoción de oxitetraciclina en 4 concentraciones, cuyos resultados mostraron que a menor concentración mayor es la capacidad de remoción del antibiótico (Hu et al., 2019). En otro estudio, con aplicación de *Lemna* se halló que la remoción de penicilina, puede alcanzar valores de 84.6 – 100% de remoción, esto se

encuentra en función de la concentración del antibiótico en el medio (Singh, Pandey, & Suthar, 2018).

En otro estudio evaluaron la capacidad acumuladora y efectos toxicológicos de amoxicilina, enrofloxacino, y oxitetraciclina en *Lemna minor*. Hallaron que oxitetraciclina influenció en la disminución del crecimiento de la planta, la división celular, así como la acumulación de peróxido de hidrógeno y estrés oxidativo relacionados a través de su interferencia con las actividades de las enzimas relacionadas a la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. *L. minor* acumuló cantidades significativas de amoxicilina, enrofloxacino y oxitetraciclina, a través de su biomasa. Por lo cual, recomendaron a *L. minor* como especies usar en fitorremediación (Gomes, Moreira Brito, Cristina Rocha, Navarro-Silva, & Juneau, 2020).

En otro estudio evaluaron la eliminación de Fe (III), Cr (VI), Al (III), diclofenaco y levofloxacino de aguas residuales, para lo cual se usó especies flotantes como *Azolla filiculoides* y *Lemna minuta*. El experimento se llevó a cabo a nivel de laboratorio con 5 mg/L de concentración para los metales, y 1 µg/L para los fármacos. Los resultados evidenciaron que hubo efectos toxicológicos provenientes de los metales pesados y diclofenaco en *Lemna minor*, mientras que un efecto estimulador en el crecimiento de las plantas, en el caso de *Azolla* con aluminio y para el caso de *Lemna* con Aluminio y levofloxacina). A pesar de que *A. filiculoides* mostró el mejor desempeño en el proceso de remoción, ambas especies evidenciaron buenos resultados en la remoción de los compuestos testeados (Bianchi et al., 2020).

Adicionalmente, se analizó la capacidad de remoción de la *Azolla* sobre ciprofloxacino y se halló 160 µg/g en peso seco de *Azolla*, en un medio en el que había 3.05 mg/L del antibiótico analizado, dando a conocer que esta especie es buena candidata para remover antibióticos del agua a través de sus tejidos. Lo que también influenció en este aspecto es la presencia de bacterias simbióticas en sus frondas lo que hace que resista y remueva estos contaminantes (Gomes et al., 2018).

1.2.4 Celdas de combustible microbiana (CCM) en la remoción de antibióticos

En un estudio realizado por Wang et al. (2017) en el que analizaron la degradación de tetraciclina en una celda de combustible microbiana, para lo cual se tuvo que aclimatar los microorganismos antes de iniciar el experimento. En los resultados hallaron elevado porcentaje de remoción en un periodo de 7 días (79.1%). Adicionalmente,

obtuvieron mejores resultados en las celdas de combustible de circuito cerrado, que obtuvo 31.6% más que en un circuito abierto; por lo que este estudio demostró que la biodegradación anaeróbica de TC por CCM es un método rentable (debido a la producción eléctrica) y respetuoso con el medio ambiente por degradar los compuestos tóxicos y no generar residuos peligrosos.

En otro estudio en el que también se evaluó la remoción de antibióticos y la producción eléctrica en humedales con celdas de combustible microbiana. Se obtuvieron elevados porcentajes de remoción para los antibióticos estudiados sulfametoxazol (99.4%) y tetraciclina (97.8%) con una resistencia externa de 700 Ω en comparación con otros tratamientos de resistencia externa (Wen et al., 2021).

Adicionalmente, en otro estudio usaron humedales experimentales con tres diseños y con celdas de combustible microbiana, a fin de remover antibióticos y genes resistentes a antibióticos. Para ello, emplearon dos concentraciones de antibióticos (sulfametoxazol y tetraciclina), en tres concentraciones (400, 1000 y 1600 $\mu\text{g/L}$). Los resultados que hallaron evidenciaron que la producción eléctrica se mantuvo elevada a pesar de la presencia de antibióticos 605.8 mV, 613.7 mV y 541.4 mV respectivamente. Adicionalmente, las muestras del efluente de los humedales mostraron menores concentraciones de genes resistentes a antibióticos que el sustrato, y en relación a la remoción de antibióticos se halló resultados > 98%; lo que evidenció la eficiencia de este tratamiento (Zhang et al., 2017).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

Los ecosistemas acuáticos están contaminados con residuos antibióticos provenientes de las aguas residuales (Danner et al., 2019). Tal como lo evidencia un estudio en el que se halló 13 residuos de antibióticos en muestras de agua residual, las que no solo contaminan el ecosistema acuático, sino también los campos con los que se riega, dado que también es utilizado para regadío (Harrabi et al., 2018). De manera similar, en otro estudio en el que se analizaron muestras de un río estuarino en la Bahía Jiaozhou de China, se halló ocho residuos de antibióticos, los que también se hallaron muestras de sedimentos y plantas (Liu et al., 2020). Asimismo, en el mismo país, en la Bahía de Laizhou, se halló 13 antibióticos en muestras de agua de los ríos tributarios, contaminando así no solo los ecosistemas de agua dulce, sino también los ecosistemas marinos (Zhang et al., 2012). Y finalmente resultados similares en relación a muestras de agua de ríos urbanos de diferentes ciudades en China, en los que no solo se hallaron residuos de cuatro antibióticos objetivo, sino también se hallaron genes resistentes a antibióticos como consecuencia de la presencia de antibióticos (Y. H. Huang et al., 2019). Ejemplos como los citados evidencia de la contaminación de los ecosistemas acuáticos tanto continentales como marinos con este tipo de residuos, lo que genera gran preocupación en la comunidad científica (Danner et al., 2019).

La región de Puno y el lago Titicaca no son ajenos a este problema, dado que se ha registrado la presencia de residuos antibióticos en el mismo lago y sus afluentes. Uno de estos reportes se da en la cuenca Katari, un río tributario del lago en el lado boliviano, que está afectado con las aguas residuales de la ciudad la paz, y cuyas aguas

están contaminadas con residuos de antibióticos (Archundia et al., 2017; Duwig et al., 2014). De manera similar en el lado boliviano, actividades como la truchicultura ha incrementado la presencia de residuos antibióticos veterinarios en el lago Titicaca, principalmente en zonas aledañas a esta actividad. Incluso llegando hasta el agua potable de la ciudad de Puno (Zirena et al., 2021). Finalmente un estudio que evaluó el efluente de las aguas residuales de la ciudad de Puno reportó la presencia de 17 residuos de antibióticos (Nieto-Juarez et al., 2021). Por lo que también se requiere de estudios que complementen los ya existentes y que brinden alternativas de tratamiento de estos residuos.

Los antibióticos Tetraciclina y Cloranfenicol son antibióticos de amplio uso por la población y el cloranfenicol es conocido por ser un compuesto recalcitrante y capaz de generar anemia aplásica (Bhattacharjee, 2016; Holanda et al., 2019; Reis, Kolvenbach, Nunes, & Corvini, 2020; Yao, Liu, & Zou, 2019), leucemia, y supresión de la médula ósea (Yao et al., 2019) lo que en ocasiones puede ser mortal (Bhattacharjee, 2016). Sin embargo, aún son usados en países en desarrollo y emergentes (He et al., 2018), por lo que es necesario evaluar su concentración en el efluente de las aguas residuales para tener un panorama completo sobre la problemática de contaminación a la que se hace frente en relación a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Pues al respecto el Perú tiene serias (Kuroiwa, 2009), las 50 EPSs (Entidad Prestadora de Servicios de Saneamiento) que se tiene, solo prestan servicio al 69.65% de la población, el resto se vierten directamente a los ecosistemas acuáticos (OEFA, 2014). Lo que conlleva a aplicar métodos de tratamiento mínimos tales como las lagunas de oxidación que resultan insuficientes en relación a cantidad y calidad, repercutiendo en la degradación de la calidad del agua (Jhansi & Mishra, 2013).

Por ello la urgencia de determinar los niveles de antibióticos de uso frecuente que ingresan al lago a través del efluente de la planta de tratamiento de la ciudad de Puno. Así mismo, usar tecnologías ecológicas sostenibles, tales como plantas acuáticas que han mostrado eficiencia en la remoción de nutrientes de aguas residuales, en este caso aplicarlas para remoción de residuos antibióticos (*Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*) en condiciones de laboratorio, y adicionalmente mejorar la tecnología a través de la bioelectrogénesis, por todo lo descrito se plantea las siguientes cuestiones.

2.2 Enunciado del problema

2.2.1 Pregunta general

¿Cuál es la eficiencia en la remoción de residuos de antibióticos en aguas residuales de la ciudad de Puno mediante tratamiento con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en humedales artificiales?

2.2.2 Preguntas específicas

- a) ¿Qué concentraciones de residuos de antibióticos se encuentran en las aguas residuales de la ciudad de Puno?
- b) ¿Existirá diferencias en la remoción de antibióticos por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* en condiciones de laboratorio?
- c) ¿Cuál será la eficiencia de remoción de antibióticos con sustratos, macrófitas, y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio?

2.3 Justificación

En las ciudades no existe un adecuado tratamiento de las aguas residuales, en consecuencia, los efluentes de las plantas de tratamiento convencionales aún tienen en su composición restos de contaminantes emergentes como los antibióticos. Por otro lado, el consumo de antibióticos por la población sigue incrementándose desmesuradamente, cuyos residuos aumentan en los ecosistemas acuáticos. Por ello, es necesario realizar estudios de identificación y cuantificación de antibióticos más consumidos por la población en el efluente de las aguas residuales de la ciudad de Puno para plantear una alternativa de solución. Asimismo, esta información servirá de base para que las autoridades puedan tomar decisiones adecuadas y realizar la reglamentación pertinente al respecto.

De forma general, la gran mayoría de los tratamientos existentes para la remoción de este tipo de compuestos son costosos. Sin embargo, existen alternativas más económicas y sostenibles, como los humedales artificiales, dado que es una tecnología viable y sostenible, debido a su bajo costo de instalación, operación y mantenimiento. Por lo que, las poblaciones locales pueden implementar esta tecnología a fin de tratar sus aguas residuales con este tipo de contaminantes. Y una planta ideal para la remoción

de tóxicos es aquella que posee una alta producción de biomasa y tenga altos niveles de tolerancia a la contaminación. En este sentido, las macrófitas lenteja de agua (*Lemna gibba*) y el helecho acuático (*Azolla filiculoides*), han demostrado ser eficientes en el tratamiento de aguas residuales e incluso en la remoción de otros compuestos tóxicos. Tienen un acelerado incremento de biomasa y su facilidad de manejo en procesos de siembra y cosecha. Aunque se ha usado estas especies para la remoción de nutrientes y otros contaminantes, la combinación con sustratos y bioelectrogénesis, ofrece resultados prometedores aplicado a residuos antibióticos, por lo que se desea contribuir con evaluar su aplicación en la remoción de este tipo de compuestos. Además, no solo se remueve los compuestos tóxicos, sino también se produce electricidad simultáneamente, lo que contribuiría en el mejor funcionamiento de la planta. Se espera que el empleo de estas plantas acuáticas conjuntamente con sustratos y el componente bioelectrogénico, sean eficientes en el proceso de remoción de antibióticos y brinde una alternativa económica y sostenible en el proceso de remoción de estas sustancias

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de remoción de residuos de antibióticos en aguas residuales de la ciudad de Puno mediante tratamiento con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en humedales artificiales

2.4.2 Objetivos específicos

O1: Cuantificar la concentración de residuos de antibióticos (ug/L), en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno.

O2: Determinar las concentraciones de antibióticos (ug/L) removidas por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* evaluados en condiciones de laboratorio.

O3: Determinar la eficiencia de remoción de antibióticos (%), mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

La remoción de residuos de antibióticos en aguas residuales de la ciudad de Puno mediante tratamiento con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en humedales artificiales será eficiente.

2.5.2 Hipótesis específicas

H1: Las muestras de aguas residuales del efluente de la laguna de oxidación de aguas residuales de la ciudad de Puno tendrán residuos de cloranfenicol y tetraciclina.

H2: La concentración de antibióticos (ug/L) removidos por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* evaluados en condiciones de laboratorio, son diferentes.

H3: La remoción de antibióticos, mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio será eficiente.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La muestra para la realización de este estudio, provino del efluente de la laguna de oxidación de la ciudad de Puno, la misma que se encuentra ubicada en la isla El Espinar. Esta ciudad cuenta con una población proyectada para el 2020 de 143 867 habitantes (INEI, 2020), cuya actividad principal es la actividad turística. Ubicada en el departamento de Puno (*Figura 4*) a una altitud de 3 810 msnm. La parte experimental se realizó en el invernadero de la Oficina de Gestión Ambiental de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno y en el Laboratorio de Calidad de Suelos de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Moquegua, sede Ilo.

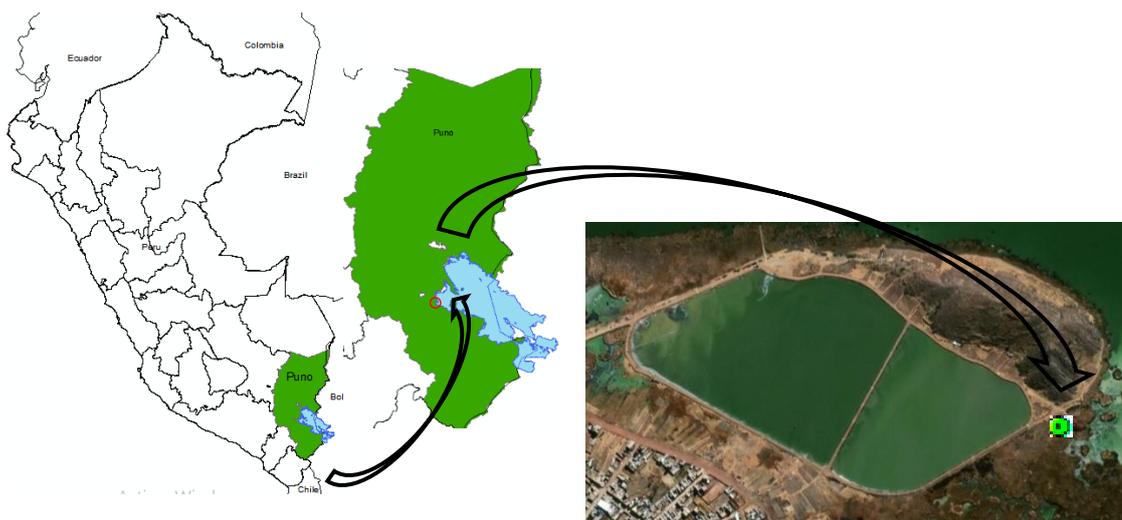


Figura 4. La ubicación del lugar de estudio, próximo a la ciudad de Puno. Punto de muestreo del efluente de las aguas residuales

3.2 Población.

La población referida en el estudio, son las aguas residuales de la laguna de oxidación de la isla El Espinar, así como las unidades experimentales consideradas para cumplir con los objetivos planteados.

3.3 Muestra.

Las muestras se describen detalladamente por cada objetivo en el ítem de métodos.

3.4 Métodos por objetivos

3.4.1 Cuantificación de la concentración de residuos de antibióticos (ug/L), en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno

3.4.1.1 Diseño experimental

Para este objetivo no hubo diseño experimental debido a que no se aplicó experimento alguno, solo se consideró algunas muestras para su análisis.

3.4.1.2 Reactivos y solventes

Los antibióticos tetraciclina y el cloranfenicol (98%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las sales para los métodos QuEChERS se obtuvieron de Thermo Scientific, Estados Unidos. El metanol, acetonitrilo y ácido fórmico (grado HPLC) se obtuvieron de BAKER ANALYZED.

3.4.1.3 Muestreo y métodos analíticos en muestras de agua

Se tomaron muestras de agua residual del efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno (Laguna de oxidación de El Espinar). Las muestras de agua residual (Anexo 4) se tomaron considerando las recomendaciones del protocolo de muestreo de aguas residuales (MVCS, 2013). Para la toma de muestras se utilizaron botellas de vidrio ámbar previamente lavadas y enjuagadas con agua de muestra 3 veces (Babić et al., 2010). Registrándose, parámetros de conductividad, pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto (Alonso, Demetrio, Capparelli, & Marino, 2019), luego se añadió Na_2EDTA (0.5 gr) (Lissemore et al., 2006; Zirena et al., 2021), a fin de evitar la complejación de antibióticos con metales. Luego, se mantuvo a 4°C hasta la llegada de laboratorio (Li et al., 2012).

Las muestras de agua se filtraron en un filtro de papel de 14 μm luego los compuestos fueron extraídos por extracción en fase sólida (SPE) en un cartucho SiliaPrep C-18 (17%) 500 mg 3ml, 60A, los cartuchos se acondicionaron primero con 10 ml de metanol (MeOH) acidificado con 10 μl de Ac. fórmico y 10 ml de agua ultrapura (Alonso et al., 2019). Posterior a ello se secó los 10 ml de la dilución con corriente de gas nitrógeno, luego se restituyó la muestra con 1 ml de acetonitrilo, el cual fue filtrado a través de una filtro-jeringa PTFE 25 mm 0.2 μm en un vial de 1.5 ml para su posterior análisis en el cromatógrafo (Benotti et al., 2009; Jiménez, Soto, & Álvarez, 2015; Matamoros, Arias, Nguyen, Salvadó, & Brix, 2012). Los análisis se realizaron en cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC, Agilent 1290 infinity II, USA) equipada con detección de matriz de diodos (DAD) basada en un estudio anterior para la determinación de la concentración de antibióticos (Santos et al., 2019). Se inyectaron dos microlitros de muestra en una columna InfinityLab Poroshell EC-C8 (2.1 x 150mm 1.9-Microm, Agilent, USA), con una temperatura de columna de 50 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (B). Se realizó una elución en gradiente: 0 min - 90% B, 7 min -60% B. El flujo de la fase móvil fue de 0.350 ml/min. El efluente de la columna se monitorizó a 280,4 nm para detectar el antibiótico. El LOD y el LOQ fueron de 0.08 y 0.24 $\mu\text{g/ml}$ para el Tet y de 0.016 y 0.048 $\mu\text{g/ml}$ para Clor, respectivamente (Tabla 2). La curva de calibración de cinco puntos (0.5, 1, 3, 6 y 10) y mostraron una buena linealidad para el Tet ($R^2 = 0.9978$) y el Clor ($R^2 = 1$) en el dominio de la concentración esperada de la muestra (Gomes et al., 2017).

Tabla 2

Características analíticas de los antibióticos considerados en el estudio

Compuesto	TR (min)	Ecuación	R^2	LD	LQ	Rec % agua	SD	Rec % Planta	SD
Tetra	3.9	$Y = 2.7471x - 0.789$	0.998	0.08	0.24	113.28	6.18	116.47	2.96
Clor	6.4	$Y = 94.01X + 2.419$	1	0.016	0.048	115.52	6.68	87.57	1.62

TR: tiempo de retención. *LD*: Límite de detección. *LQ*: límite de cuantificación
Rec%agua: % de recuperación en muestras de agua. *REC%planta*: % de recuperación
en muestra de planta. *SD*: desviación estandar.

3.4.1.4. Condiciones cromatográficas para el análisis

Para los análisis se usó cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC, Agilent 1290 infinity II, USA) equipada con detección de matriz de diodos (DAD) basada en un estudio anterior para la determinación de la concentración de antibióticos (Santos et al., 2019). Se inyectaron dos microlitros de muestra en una columna InfinityLab Poroshell EC-C8 (2,1 x 150mm 1,9-Microm, Agilent, USA), con una temperatura de columna de 50 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (B). Se realizó una elución en gradiente: 0 min - 90% B, 7 min -60% B. El flujo de la fase móvil fue de 0.350 ml/min. El efluente de la columna se monitorizó a 280,4 nm para detectar el antibiótico. El LOD y el LOQ fueron de 0.08 y 0.24 µg/ml para el Tet y de 0.016 y 0.048 µg/ml para Clor, respectivamente (Tabla 2). Las curvas de calibración de cinco puntos (0.5, 1, 3, 6 y 10) y mostraron una buena linealidad para el Tet ($R^2 = 0.9978$) y el Clor ($R^2 = 1$) (ANEXO 1 y 2) en el dominio de la concentración esperada de la muestra (Gomes et al., 2017).

3.4.2 Determinación de las concentraciones de antibióticos (ug/L) removidas por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* evaluados en condiciones de laboratorio

3.4.2.1 Diseño experimental

Para este objetivo se aplicó un diseño denominado Box Behnken, a fin de testear las concentraciones que pueden ser removidas del medio por las plantas, el cual consistió en lo siguiente

Para el diseño Box-Behnken (BBD) se usó tres niveles y tres variables para obtener las condiciones óptimas de porcentaje de eliminación de antibióticos (% de remoción). Los factores para el diseño experimental fueron: tiempo de contacto (3-7 días), biomasa (10-14 g) y concentración de antibiótico (5-15 mg/L de tetraciclina y 10-20 mg/L de cloranfenicol) en la solución acuática. Se tuvieron un total de 17 ensayos con la metodología de superficie de respuesta (RSM) para investigar los efectos de estos procesos. Los experimentos se realizaron en dos grupos. El primero se hizo para *Lemna* y el segundo para *Azolla*, en total 34 ensayos. Se registraron

dos respuestas diferentes, el porcentaje de eliminación de tetraciclina (Y1) y el porcentaje de eliminación de cloranfenicol (Y2), respectivamente (Tabla 3) (Fernandes et al., 2015). Los experimentos se realizaron en depósitos de plástico, cubiertas externamente con aluminio para evitar el paso de la luz. Se añadieron 500 ml de solución de prueba con una mezcla de concentración de antibióticos, tetraciclina (10, 15 y 20 mg/L) y cloranfenicol (5, 10 y 15) en cada maceta de plástico, con diferentes cantidades de biomasa (10, 12 y 14 g) de *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* por separado, 34 potes de plástico en total, 17 para *Lemna* y 17 para *Azolla*. El régimen de iluminación diario fue de 12 h de luz: 12 h de oscuridad siguiendo las recomendaciones de la OCDE (OCDE, 2006). A los días 3, 5, 7 de exposición, se tomaron algunas unidades experimentales, de las cuales se muestreó 1 ml de muestra de agua y 10 g de biomasa vegetal para su análisis. Adicionalmente, se registró la biomasa final de las plantas a fin de ver el incremento de ella en cada unidad experimental.

Tabla 3

Variables predictoras y sus valores seleccionados para el diseño Box-Behnken (BBD) para la eliminación de antibióticos.

Símbolo de variable independiente	Unid	Niveles				
		-1	0	1		
Tiempo de contacto	Días	X1	A	3	5	7
Biomasa	G	X2	B	10	12	14
Concentración de tetraciclina	mg/L	X3	C ₁	10	15	20
Concentración de cloranfenicol	mg/L	X3	C ₂	5	10	15

3.4.2.2 Cultivo de las macrófitas

Para el acondicionamiento, las especies de macrófitas se cultivaron en laboratorio, seis meses antes del proceso de experimentación, en un medio de cultivo que brindó los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas (García-Rodríguez et al., 2015). El medio de cultivo que se usó es el medio hidropónico; el cual fue modificado para la *Azolla*, disminuyendo la concentración de nitrógeno en el medio.

3.4.2.3 Análisis de antibióticos en muestras de agua y plantas

• Agua

Las muestras se analizaron a través de lecturas directas, debido a las elevadas concentraciones usadas en el experimento. Para ello se tomó un ml de muestra de agua y se filtró a través de un filtro de jeringa (PTFE de 0,22-um 13 mm), y se depositó en un vial ámbar de 1.5 ml de capacidad, para luego ser inyectado en el cromatógrafo con las mismas condiciones cromatográficas descritas para el primer objetivo. La fórmula que se usó para verificar el porcentaje de remoción es la sugerida por Amare et al., (2018).

$$R=1 - \frac{c_i}{c_f} * 100 \dots \dots \dots \text{Ecuación 1.}$$

Donde c_i representa la concentración inicial (mgL^{-1}), y c_f denota la concentración al tiempo deseado.

• Macrófitas

Al finalizar el experimento se registró la biomasa final y se tomaron submuestras de 10 g para el análisis de residuos antibióticos en plantas. Para ello se aplicó el método QuEChERS (Anexo 3), cuyo procedimiento es el siguiente:

Para la determinación de los antibióticos en las plantas se aplicó el método Quecher modificado, basado en estudios previos (He et al., 2018; Zhang et al., 2019). Para ello las muestras vegetales fueron trituradas en un mortero, de la cual se usó 10 gr de muestra que fue depositado en un tubo de centrifuga de 50 ml, luego se añadió 10 ml de acetonitrilo, homogenizar, y luego 4 gr de Sulfato de magnesio (MgSO_4), 1 gr de Cloruro de sodio (NaCl) y 0.049gr de fosfato monosódico (NaH_2PO_4), seguidamente se cerró el tubo y se puso en el vortex durante 3 minutos. Luego al ultrasonido por 20 min a 25 °C, se centrifugó 5 min a 3500 rpm. Se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 2 ml y se añadió los sorbentes de la fase de extracción solida dispersiva (PSA 25mg, C18 25mg, GCB 2.5mg y MgSO_4 150 mg), se puso en el vortex por 1 min para luego ser centrifugado a 5 min a 3500 rpm. El sobrenadante se filtró en un filtro jeringa PTFE de 0.22-um 13 mm a un vial para

su posterior análisis en UHPLC (He et al., 2018; Zhang et al., 2019). Los porcentajes de recuperación fueron del 116,47% y 87,57% para el Tet y el Clor, respectivamente.

3.4.2.4 Aplicación de prueba estadística inferencial

Se realizó la validez de cada serie experimental mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el modelo de regresión que corresponde al análisis de superficie de respuesta. Las condiciones óptimas se obtuvieron aplicando la ecuación predictiva de la metodología de respuesta. El análisis se realizó utilizando el paquete rsm en el software libre R Studio versión 4.0.0.

3.4.3 Determinación de la eficiencia de remoción de antibióticos (%), mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio

3.4.3.1 Diseño experimental

Para este objetivo se usó el diseño factorial de $2^{(3)}$, es decir, 3 factores con dos niveles bajo el diseño completamente al azar, con dos tipos de especies (*Lemna gibba* Linnaeus 1753 y *Azolla filiculoides* Lam.) (Follieri, 1977), dos tipos de sustratos (limo y Arena), y un componente bioelectrogénico (con y sin) como tercer factor (Anexo 5). En total se tuvo 24 unidades experimentales (Tabla 4). Los muestreos de agua se realizaron al inicio y al finalizar el experimento (a los 50 días de experimentación), en las macrófitas. Se tomó 1 L de muestra de agua (Carvalho et al., 2013), 10 g de vegetales para su análisis.

Tabla 4.

Diseño experimental considerando los tres factores

Repeticiones	1 (Humedal convencional)				2 (Humedal bioelectrogénico)			
	1 (<i>Lemna</i>)		2 (<i>Azolla</i>)		1 (<i>Lemna</i>)		2 (<i>Azolla</i>)	
	1 (arena)	2 (limo)	1 (arena)	2 (limo)	1 (arena)	2 (limo)	1 (arena)	2 (limo)
1	Y1111	Y1121	Y1211	Y1221	Y2111	Y2121	Y2211	Y2221
2	y1112	Y1122	Y1212	Y1222	y2112	Y2122	Y2212	Y2222
3	y1113	Y1123	Y1213	Y1223	y2113	Y2123	Y2213	Y2223

3.4.3.2 Diseño y funcionamiento del humedal

El humedal bioelectrogénico tuvo electrodos de grafito, el cual fue conectado por una corriente de cobre para luego ser conectados a una resistencia de 1000Ω (Figura 5). El diseño del humedal, a nivel de microcosmo fue en recipientes de plástico (Carvalho et al., 2013). Toda unidad experimental se diseñó para funcionar a modo de lotes, dado que solo tuvo un grifo ubicado en la base que sirvió para la toma de muestras. A fin de tratar las aguas contaminadas por 2 antibióticos (tetraciclina y cloranfenicol), se añadió a cada recipiente 20 g de *Lemna* y *Azolla* (Bokhari et al., 2016); así como, 7 cm de espesor de sustrato en cada humedal. Los depósitos experimentales fueron de tipo de flujo sup-superficial horizontal, los cuales se recircularon diariamente de forma manual (Bôto, Almeida, & Mucha, 2016). Se añadió lodos de la laguna de oxidación antibióticos (10 g) en la zona del sustrato a fin de inocular microorganismos que degradan (Wen et al., 2020; Zhang et al., 2017). En la semana, se agregó agua de lluvia, siempre que fue necesario, para compensar las pérdidas de agua por evaporación (Bôto et al., 2016).

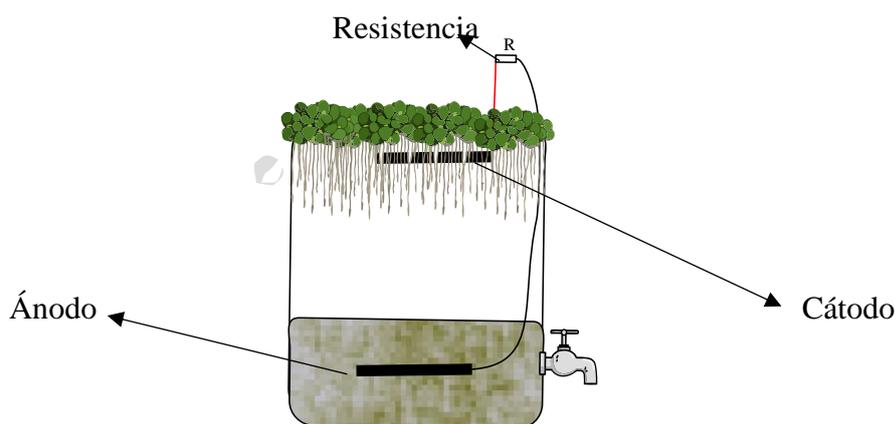


Figura 5. Esquema del diseño experimental del componente bioelectrogénico.

Agua. Las muestras de agua y los análisis se realizaron de igual manera como se describieron para el objetivo uno. Y el porcentaje de remoción de antibióticos se determinó a través de la Ecuación 1.

Macrófitas. El procedimiento de muestreo y análisis fue igual al realizado en las plantas en el segundo objetivo.

Lectura del rendimiento eléctrico. El voltaje (V) y el amperaje (A), se midió a través de un multímetro (Anexo 6), los registros se realizaron diariamente durante 40 días, 10 días después de iniciado el experimento (Wen et al., 2020).



Se utilizó la siguiente fórmula para hallar la producción eléctrica en vatios.

$$mW = mA * mV$$

Donde mW son miliwatts, mA son miliamperios y mV son milivoltios.

3.4.3.3 Aplicación de prueba estadística inferencial.

Las diferentes cantidades de contaminantes encontradas en cada matriz de muestreo se analizaron mediante ANOVA de una vía para los tratamientos y las variables de respuesta (eliminación de antibióticos, biomasa y absorción por parte de las plantas), después de comprobar los supuestos de las pruebas paramétricas, y la prueba de Duncan para el incremento de la biomasa. Los datos se analizaron con el software RStudio versión 4.0.0.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de la concentración de residuos de antibióticos (ug/L), en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno

Se halló los dos antibióticos objetivo en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno, los que son tetraciclina y cloranfenicol (Tabla 5). Los resultados hallados concuerdan con estudios similares en los que se hallaron residuos de antibióticos en aguas residuales (Al Aukidy et al., 2012). Adicionalmente, en otro estudio en el que se analizaron muestras de aguas residuales de la laguna de oxidación de El espinar – Puno, en el que hallaron 17 residuos de antibióticos, dentro de ellos tetraciclina (0.01 µg/L) (Nieto-Juarez et al., 2021). La menor concentración hallada puede ser debido a que el estudio se hizo antes o durante los inicios de la pandemia, mientras que este estudio se hizo este año 2022, en el que el uso de antibióticos se ha generalizado para combatir infecciones relacionadas a las vías respiratorias (Gonzalez-Zorn, 2021), como el uso de tetraciclina para combatir bronquitis y faringitis. Adicionalmente, cabe resaltar que en otro estudio hallaron residuos de antibióticos en muestras de agua del lago Titicaca, en el que determinaron 10 residuos de antibióticos de uso veterinario, dentro de ellos tetraciclina 75.6 ng/L en muestras de agua, esto en zonas cercanas a las jaulas de crianza de peces (Zirena et al., 2021). Estos resultados muestran el riesgo al que se expone la ciudad de Puno; dado que, en una zona cercana al punto de descarga se halla el lugar de captación de agua para el suministro de agua potable a la población de Puno.

Tabla 5

Residuos antibióticos analizados en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Puno.

Antibióticos	Concentración media $\mu\text{g/L}$	N	Error estándar
Cloranfenicol	4.25 ± 3.95	2	2.79
Tetraciclina	1.87 ± 0.07	2	0.05

La identificación de los compuestos antibióticos en el cromatograma se da por los tiempos en los que sale cada compuesto, para tetraciclina fue en el minuto 3.9 y cloranfenicol en el minuto 6.4 (*Figura 6*). Los valores mostrados en el panel izquierdo corresponden a una longitud de onda de 280.4 nm.

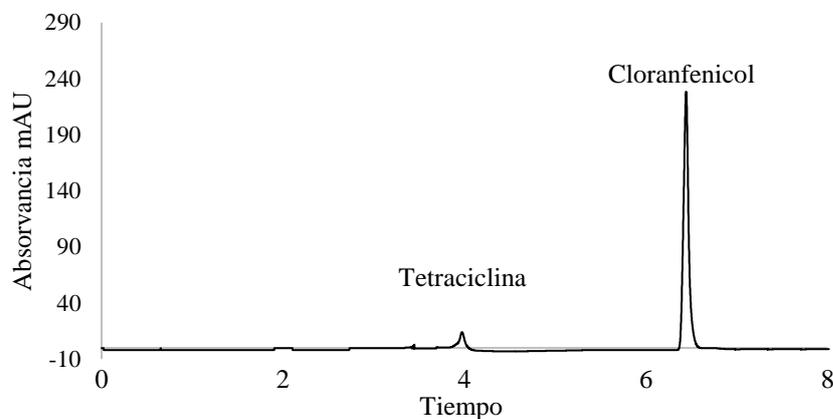


Figura 6. Cromatograma de tetraciclina y cloranfenicol en UHPLC

4.2 Determinar las concentraciones de antibióticos ($\mu\text{g/L}$) removidas por *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* evaluados en condiciones de laboratorio

4.2.1 Evaluación de la degradación de los antibióticos mediante un diseño experimental con *Lemna gibba*

4.2.1.1 Tetraciclina

La lenteja de agua es una planta con elevadas capacidades de remover contaminantes del medio, en este caso se aplicó junto a otros parámetros para la remoción de compuestos antibióticos. Se utilizó un diseño con modelado de superficie de respuesta para determinar la condición óptima de cada parámetro (tiempo de contacto, biomasa y concentración) para mejorar la variable de respuesta que es el porcentaje de eliminación de antibióticos. La Tabla 6 muestra las variables con sus respectivas combinaciones, así como las variables de respuesta y predictivas. De forma general,



en todas las combinaciones se muestran porcentajes de remoción. Teniendo resultados de remoción para tetraciclina como mínimo 5% y máximo 84% y para cloranfenicol 50% y 64% como mínimo y máximo respectivamente con *Lemna gibba*.

Los datos obtenidos y los datos predichos se compararon y se hallaron R^2 de 0.99 para tetraciclina y 0.95 para cloranfenicol, lo que garantiza la idoneidad del modelo obtenido.

De acuerdo a la Tabla 7, la variable que más influencia en el porcentaje de remoción de tetraciclina en *Lemna gibba* es el día ($P < 0.05$) y lo mismo para esta variable cuadrática ($P < 0.05$), mientras que las otras no muestran significancia estadística. Asimismo, el intercepto es significativo ($\text{Pr}(> |t|) = 0.02$ y es $< 0,05$) y un R^2 adj 0.98, lo que sugiere que el modelo aplicado es confiable. Este resultado es corroborado por el análisis de ANOVA en el que first-order (FO), y pure quadratic (PQ), son significativos para este modelo, mientras que las interacciones de las variables no tienen influencia en los resultados de remoción (Anexo 9).

Tabla 6.

El diseño experimental y las respuestas basadas en los valores reales y predichos con Lemna gibba y Azolla filiculoides, para el porcentaje de eliminación de tetraciclina (Y1) y el porcentaje de eliminación de cloranfenicol (Y2).

Ru n	A	B	C	A	B	C1 (Tet)	C2 (Chlor)	<i>Lemna gibba</i>				<i>Azolla filiculoides</i>			
								Y1 (Act)	Y1 (Pred)	Y2 (Act)	Y2 (Pred)	Y1 (Act)	Y1 (Pred)	Y2 (Act)	Y2 (Pred)
1	- 1	- 1	0	3	1 0	15	10	5	7	50	49	86	84	51	49
2	1	- 1	0	7	1 0	15	10	80	81	54	54	100	102	56	56
3	- 1	1	0	3	1 4	15	10	7	6	51	51	86	84	58	57
4	1	1	0	7	1 4	15	10	80	78	56	57	100	102	62	64
5	- 1	0	- 1	3	1 2	10	5	8	11	59	61	93	92	62	61
6	1	0	- 1	7	1 2	10	5	74	79	64	64	100	95	70	67
7	- 1	0	1	3	1 2	20	15	5	1	54	54	66	71	53	56
8	1	0	1	7	1 2	20	15	82	79	63	61	100	101	62	63
9	0	- 1	- 1	5	1 0	10	5	84	79	63	62	98	101	45	48
10	0	1	- 1	5	1 4	10	5	76	74	64	63	99	102	45	46
11	0	- 1	1	5	1 0	20	15	69	72	55	56	97	94	35	34
12	0	1	1	5	1 4	20	15	66	72	59	60	97	94	53	51
13	0	0	0	5	1 2	15	10	78	81	55	55	99	99	57	56
14	0	0	0	5	1 2	15	10	82	81	55	55	99	99	54	56
15	0	0	0	5	1 2	15	10	84	81	55	55	99	99	55	56
16	0	0	0	5	1 2	15	10	78	81	53	55	99	99	57	56
17	0	0	0	5	1 2	15	15	82	81	56	55	98	99	57	56

Y1 (act) = valor real o actual del % de remoción de tetraciclina, Y1 (Pred)= valor predicho del % de remoción de tetraciclina. Y2 (Act) valor real o actual del % de remoción de cloranfenicol, Y2 (Pred)= valor predicho del % de remoción de cloranfenicol.

Las plantas de tratamiento remueven los compuestos tóxicos del medio acuático. Sin embargo, cuando el ingreso de estos contaminantes es constante y abundante, la capacidad degradadora disminuye en gran manera (Topal, Uslu Şenel, Öbek, & Arslan Topal, 2016), es allí que se requiere otro método adicional para mitigar su concentración, tal como es la fitorremediación. Los resultados hallados con el diseño experimental usado muestran eficientes resultados, en todas sus combinaciones, lo que sugiere que las plantas juegan un rol muy importante. No obstante, de las variables empleadas, solo tuvo significancia los días de forma individual y cuadrática, mas no las demás variables. Esto puede ser debido a que, de forma general, los rangos de las variables analizadas fueron muy cercanos entre sí, por ejemplo, para Biomasa se tuvo intervalos de 2 g y para la concentración se tuvo 5 mg.

De manera similar, en un estudio en el que se removió tetraciclina con *Lemna gibba*, se analizó tres concentraciones iniciales (50, 100 y 300 µg/L) con 5 g de *Lemna* en cada unidad experimental, y con diferentes tiempos de retención hidráulica (hasta 10 días), los resultados de remoción para las tres concentraciones fueron 99.8 ± 4.1 ; 99.9 ± 4.9 y $99 \pm 4.9\%$ respectivamente a los 10 días (Topal, Öbek, Uslu Şenel, & Arslan Topal, 2020). Evidenciando así que parámetros cercanos en las variables independientes pueden brindar resultados de remoción similares. En un estudio en el que se removió oxitetraciclina (1µg/L) con *Lemna minor*, se evidenció la capacidad de tolerar el estrés y absorberlo en su estructura, influyendo en su remoción en un 79% en 14 días (Gomes et al., 2020). La razón por la que se removió un porcentaje menor y en un tiempo más prolongado puede ser debido a que es el estudio mencionado se usó menos biomasa de *Lemna* (20 individuos con 2 frondas cada uno) (Gomes et al., 2020), que representan pocos gramos. Adicionalmente, en otro estudio con *Lemna gibba*, solo se removió el 85% de tetraciclina en 13 días de exposición (Topal, Senel, Obek, & Arslan Topal, 2014).

Los resultados del FBC para tetraciclina indica bajos valores (Tabla 8), teniendo como promedio 2.9%, lo que indica que habría otros factores como la fito-volatilización, hidrólisis y la fotodegradación, los que influenciaron en la remoción de los antibióticos (Bianchi et al., 2020; Topal et al., 2016). Contrariamente, en un estudio realizado por Topal et al., (2014) la fotodegradación y otros factores ambientales no influenciaron en la remoción de tetraciclina en el grupo control, aunque esto puede deberse al tiempo de retención hidráulica que fue de 1.31 horas en la unidad

experimental, mientras que en este estudio el mínimo fue de tres y el máximo de siete días. También estos bajos valores de FBC pueden deberse a las elevadas concentraciones que se usaron en el experimento, los que pudieron tener efectos fitotóxicos en las plantas, pues existe amplia evidencia de los efectos fitotóxicos de los antibióticos en las plantas (Gomes et al., 2017, 2020; Iatrou, Gatidou, Damalas, Thomaidis, & Stasinakis, 2017). A pesar de ello esta planta mostró capacidad de absorber este antibiótico y seguir incrementando su biomasa, lo que incrementa la confiabilidad en su uso para fitorremediación, por ello en un estudio, se usó la lenteja de agua en biomasa seca como adsorbente de tetraciclina con eficientes resultados en pocas horas (Balarak, Mostafapour, & Khatibi, 2018). Por lo que no solo la biomasa húmeda puede ser útil en la remoción de este compuesto.

4.1.1.2. Cloranfenicol

De acuerdo a la Tabla 7, la variable que más influencia en el porcentaje de remoción de cloranfenicol en *Lemna gibba* es la concentración ($P < 0.05$) y lo mismo para la variable cuadrática de concentración ($P < 0.05$), mientras que las otras no muestran significancia estadística. Con un R^2 adj. de 0.886 lo que sugiere que el modelo aplicado es confiable, por ello los datos predichos en la Tabla 5 en comparación con los datos experimentales muestra un R^2 de 0.95. Este resultado es corroborado por el análisis de ANOVA en el que las variables de primer orden y las cuadráticas son significativas (Anexo 9). Por lo que en el caso de cloranfenicol la variable que más ha influenciado es la concentración.

De manera similar, en un estudio en el que se aplicó esta misma metodología de superficie de respuesta con biodegradación de cloranfenicol, se halló que las variables que más influenciaron en la remoción de cloranfenicol, fueron la concentración y el tiempo (Holanda et al., 2019). Incluso en ensayos de adsorción de compuestos químicos, la concentración es un factor muy importante, por ello es usado a menudo en pruebas de laboratorio (Yiran Li, Zhang, & Liu, 2018; X. Liu et al., 2018; Nguyen et al., 2022; Van Tran et al., 2019; Xiao et al., 2021; Yao et al., 2019) a fin de evaluar las concentraciones mejor removidas por las diferentes metodologías aplicadas. Esto es entendible dado que elevadas concentraciones tienden a sobrepasar la capacidad de remediadora de las plantas teniendo por el contrario efectos

tóxicos en las plantas tal como demuestra estudios de toxicidad, en los que se evidencia los efectos fitotóxicos del cloranfenicol a elevadas concentraciones, influenciando en la inhibición de la biomasa de las algas evaluadas, así como otras alteraciones de los componentes bioquímicos (Leston et al., 2013; Xiong, Hu, Liu, Wang, & Ying, 2019). Tal como ocurrió en este estudio, dado que de forma general se evidencia la inhibición de la biomasa en relación a la concentración de antibióticos (*Figura 4*).

4.2.2 Evaluación de la degradación de antibióticos a través del diseño experimental con *Azolla filiculoides*

4.2.2.1 Tetraciclina

En relación a la remoción de la tetraciclina la variable que más influenció en el porcentaje de remoción en *Azolla filiculoides* es la interacción de las variables Día: concentración ($P < 0.05$) y lo mismo para la variable cuadrática de Día ($P < 0.05$) (Tabla 7), mientras que las otras no mostraron significancia estadística ($P > 0.05$). Con un R^2 adj. del modelo 0.80, lo que sugiere que el modelo aplicado es confiable, por ello los datos predichos en la Tabla 5 en comparación con los datos experimentales muestra un R^2 de 0.91. El valor de remoción alcanza un máximo de 100%; aunque los resultados de FBC, indican que la cantidad absorbida por esta planta son mínimos con un máximo de 12% (Tabla 6). Y en este caso la absorción en los tejidos de la planta no fue un factor relevante en su remoción.

Los resultados muestran que la acumulación en la planta no fue un factor importante en la remoción de tetraciclina; sin embargo, eso no quiere decir que no haya contribuido con la remoción. Dado que, las plantas contribuyen de diversas maneras; por ejemplo, para *Azolla* sería la biodegradación realizada por las cianobacterias endosimbióticas, *Anabaena azollae* y *Arthrobacter* (Bianchi et al., 2020; Forni, Cascone, Fiori, & Migliore, 2002; Forni, Tel-Or, & Grilli, 1991), quienes a pesar de verse afectadas por los antibióticos suelen contribuir en la degradación de las mismas (Forni et al., 2002), incluso en un estudio se halló que *Arthrobacter* fue capaz de incrementar su población con el incremento del antibiótico probado en sistemas de tratamiento con plantas, lo que contribuyó en la remoción del antibiótico del medio (Tong, Wang, He, Xu, & Mao, 2019).

Los estudios de remoción de tetraciclina con la biomasa húmeda de *Azolla* son escasos. Sin embargo, los estudios en los que se usa *Azolla* para remover antibióticos muestran resultados eficientes, tal como el estudio de Bianchi *et al.*, (2020) en el que se usó *Azolla* como uno de los tratamientos de remoción, cuyos resultados indicaron que no solo removió del medio levofloxacino (1µg/L), sino también que se vio estimulada el incremento de la biomasa de *Azolla*. En otro estudio en el que se expuso a *Azolla* a sulfadimetoxina a elevadas concentraciones (50, 150, 300 y 450 mg/L), el incremento de bioadsorción se dio en función del incremento de la dosis. A pesar de tener efectos en la biomasa, fue capaz de sobrevivir, incrementar su biomasa después de un proceso de adaptación inicial y remover del medio el antibiótico testeado (Forni *et al.*, 2002). Por lo que, la concentración y el tiempo si influyen en el porcentaje de remoción del medio acuático.

Adicionalmente, se usaron la biomasa seca de *Azolla* para remover tetraciclina del medio acuático con resultados eficientes, tal como lo muestra un estudio en el que se usó la biomasa de *Azolla* como adsorbente, considerando otras variables como la concentración inicial de tetraciclina, tiempo de contacto y temperatura, los resultados evidenciaron que la biomasa de *Azolla* junto a las otras variables influenciaron positivamente en la remoción de tetraciclina del medio acuático (Mahvi, Mostafapour, & Balarak, 2018). Sin embargo, en otro estudio en el que también se usó la biomasa de *Azolla* como adsorbente los resultados fueron menores en comparación con los otros adsorbentes utilizados (Besharati, Alizadeh, & Shariati, 2021). Lo que indica que de forma general la biomasa viva de la planta ofrece mejores resultados, tal como también se evidenció en este estudio.

4.2.2.2 Cloranfenicol

El modelo aplicado a los resultados de remoción de Cloranfenicol en las unidades experimentales de *Azolla* indican que el modelo es adecuado con un $R^2 = 0.90$, las variables que más influenciaron en el porcentaje de remoción fueron, día, biomasa, y tiempo de contacto, así como las variables cuadráticas de todas las variables independientes. Lo que es corroborado por el análisis de Varianza en el que se muestra que las contribuciones de las variables de first order (FO), pure quadratic (PQ), y el two-way interaction (TWI) fue significativo para el modelo (Anexo 9).

Los resultados indicaron que las variables día: biomasa y las variables cuadráticas de todas las variables independientes fueron significativas. De manera similar en un estudio en el que se expuso a *Azolla* a un fármaco (diclofenaco), en diferentes dosis (0.1, 1, 10 y 100 mg/L) en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 240 h), se halló que el tiempo y las dosis influenciaron en la toxicidad de *Azolla*, por ende en la menor remoción del medio (Vannini et al., 2018). Adicionalmente, otro estudio mostró que a mayor concentración probada descendía el porcentaje de remoción (Xiao et al., 2021). Lo que evidencia que a mayor concentración menor remoción por el incremento de la toxicidad en la planta.

Tabla 7

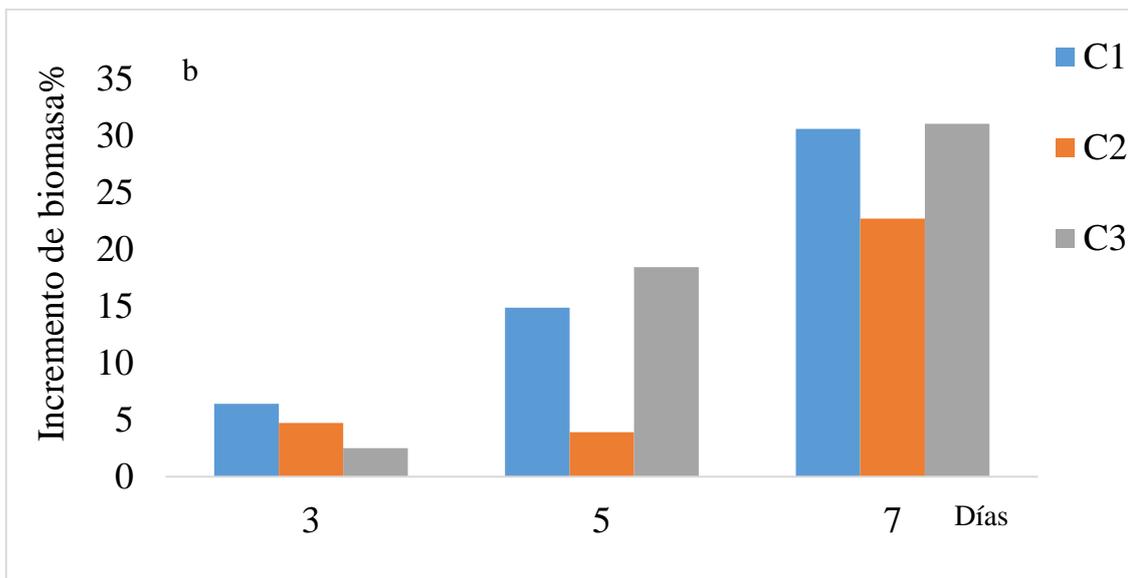
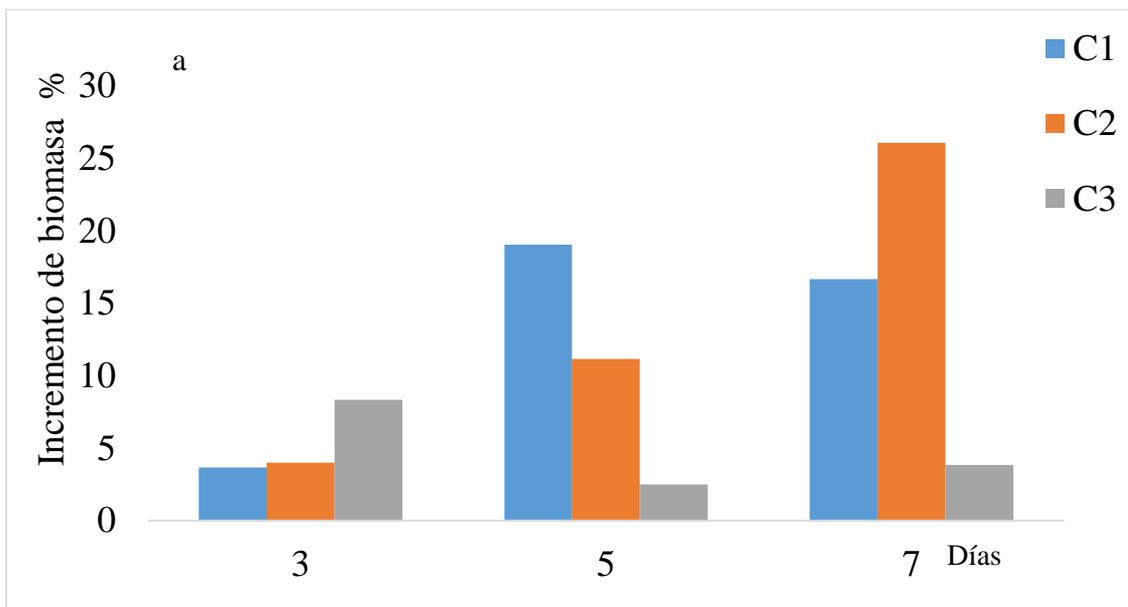
Coefficientes de regresión obtenidos para el modelo generado por RSM.

	Tetraciclina en <i>Lemna</i>			Tetraciclina in <i>Azolla</i>			Cloranfenicol en <i>Lemna</i>		
	Estimado	Pr(> t)		Estimado	Pr(> t)		Estimado	Pr(> t)	
(Intercepto)	-322.7	0.02	*	110	0.24		51.1	0.13	
Día	102.3	0	***	10.6	0.23		2.2	0.48	
Biomasa	16.4	0.31		-6.3	0.62		4.9	0.32	
Concentración	1.7	0.74		-0.6	0.88		-7.1	0	***
Día: Biomasa	-0.1	0.84		0	0.98		0.1	0.74	
Día: Concentración	0.3	0.31		0.7	0.01	*	0.1	0.21	
Biomasa: Concentración	0.2	0.58		0	0.93		0.1	0.27	
Día ²	-8.7	0	***	-1.7	0.01	**	-0.3	0.19	
Biomasa ²	-0.8	0.23		0.3	0.57		-0.2	0.25	
Concentración ²	-0.2	0.15		-0.1	0.23		0.2	0	***

*Códigos de significación: 0 ***; 0,001 **; 0,01 **

1 4.2.3 Efectos de los antibióticos en el crecimiento de la planta

2 Los resultados del incremento neto de biomasa evidencian que existe mayor influen-
3 cia por las concentraciones de los antibióticos Tet y Clor. En el que se aprecia que
4 *Lemna* es más afectada por el incremento de las concentraciones en el tiempo, mien-
5 tras que *Azolla*, aunque tiene descenso para el 5to día, se incrementa para el sétimo
6 día hasta en un 31.02 %, lo que sugiere que *Azolla* tolera mejor esas concentraciones
7 de contaminación de antibióticos (Figura 7).



10 *Figura 7.* Porcentaje de incremento de biomasa en *Lemna* (a) y *Azolla* (b) durante el pe-
11 riodo experimental de 7 días. Con tres concentraciones C1= 5 y 10 mg/L, C2= 10 y 15
12 mg/L C3= 15 y 20 mg/L para Tetraciclina y Cloranfenicol respectivamente.

13

Los resultados evidenciaron que, *Azolla* reportó mejores resultados en contraste a *Lemna*. De manera similar, en un estudio se observó que a los tres días de experimentación con tetraciclina *Lemna gibba* manifestó clorosis con 1 mg/L, lo cual repercutió en la disminución de la biomasa (Brain et al., 2004). Adicionalmente en otro estudio se halló la EC₅₀ (dosis efectiva media) fue de 3.26 mg/L de oxitetraciclina, afectando así en el incremento de la biomasa (Kołodziejska et al., 2013). Asimismo, estas especies fueron testeadas en otros estudios con antibióticos, tal como lo muestra Bianchi et al., (2020) quienes hallaron que levofloxacino a 1ug/L de concentración tuvo efectos estimulador en el crecimiento de las plantas (*Lemna minuta* y *Azolla fiiculides*) en 8 días de experimentación. Y en otro estudio en el que se expuso a *Azolla* a un antibiótico (sulfadimetoxina) se halló que el incremento de la biomasa tuvo una relación logística con la dosis probada, en 5 semanas de exposición (Forni et al., 2002).

Los resultados del factor de bioconcentración muestran que en general tetraciclina fue menos absorbida por las plantas, teniéndose valores máximos de 7.9% y 12.2% en *Lemna* y *Azolla* respectivamente; mientras que para cloranfenicol se tienen valores máximos de 57.3% y 58.3%, evidenciándose que *Azolla* absorbió mayor cantidad de ambos antibióticos.

Estudios de bioconcentración de antibióticos evidencian que cloranfenicol es mejor absorbido por las plantas (Tabla 8), como se evidenció en un estudio en el que analizaron plantas de cultivo con regadío de aguas residuales y hallaron que Cloranfenicol tuvo mayor BCF (Anexo 8) para diferentes cultivos como arroz, maíz y rábano chino (Pan, Wong, & Chu, 2014; Sorinolu, Tyagi, Kumar, & Munir, 2021). Asimismo, cabe mencionar que la planta contribuye con la remoción de los compuestos antibióticos no solo a través de la absorción, sino también a través de otros mecanismos como los exudados de las raíces que interactúan con los antibióticos, disminuyendo su toxicidad y concentración (Kotyza, Soudek, Kafka, & Vaněk, 2010).

Tabla 8

Valores del factor de bioconcentración en las plantas.

	<i>Lemna gibba</i>		<i>Azolla filiculoides</i>	
	Tetraciclina BCF%	Cloranfenicol BCF%	Tetraciclina BCF%	Cloranfenicol BCF%
Prom	2.9	38.1	4.9	37.8
Min	0.6	22.3	0.7	23.7
Máx	7.9	57.3	12.2	58.3

4.2.4 Determinación de los puntos óptimos para la remoción de antibióticos

4.2.4.1 Puntos óptimos para la remoción de antibióticos con *Lemna gibba*

La eficiencia de eliminación con *Lemna gibba* en las condiciones óptimas para la tetraciclina fueron Día 6, Biomasa: 11.4 g, Concentración: 13.4 mg/L. Para la validación cualitativa se presenta las Figura 5-7. Para el Cloranfenicol fueron Día 7.8, Biomasa: 13.6 g, Concentración: 10.2 mg/L. Mientras que para cloranfenicol valores intermedios de Día y Biomasa (a), y en relación a Biomasa: Concentración se obtienen mejores resultados a menores concentraciones y a biomasa intermedia entre 11 y 13 g aproximadamente. Referido a la interacción de Día: Concentración se obtienen mejores resultados a mayor cantidad de días y menores valores de concentración. Basado en ello, se aprecia que, en el caso de tetraciclina, los días de experimentación son un factor muy influyente en la el porcentaje de remoción que la biomasa, seguido de la concentración del antibiótico Figura 8-10.

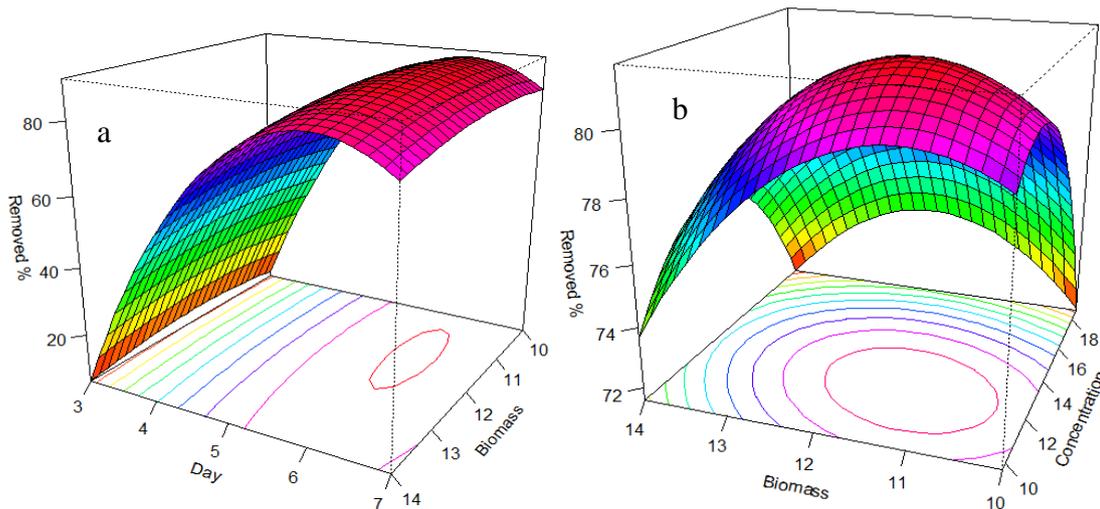


Figura 8. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Biomasa; (b) Biomasa y concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.

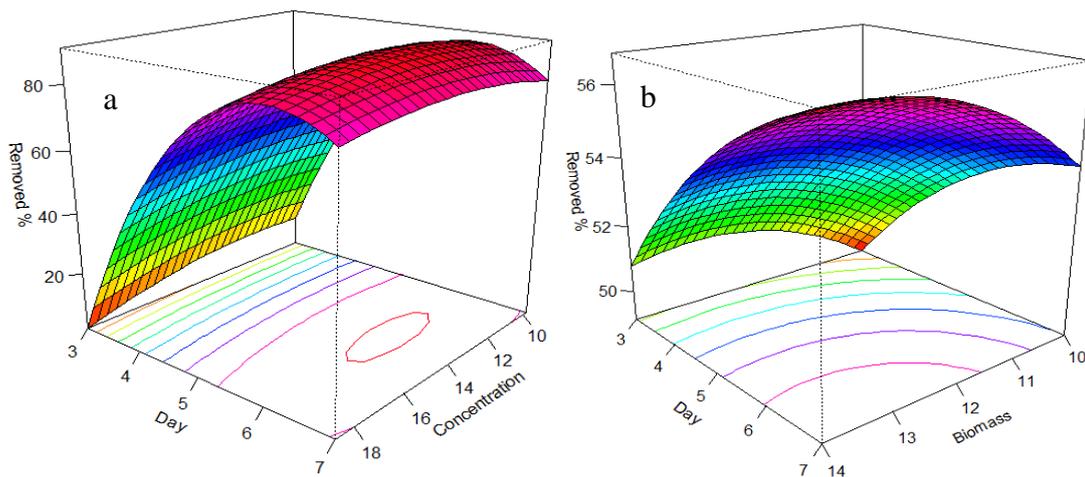


Figura 9. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Concentración. Para el porcentaje de eliminación de cloranfenicol, contenido en función d Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (b) Día y Biomasa, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.

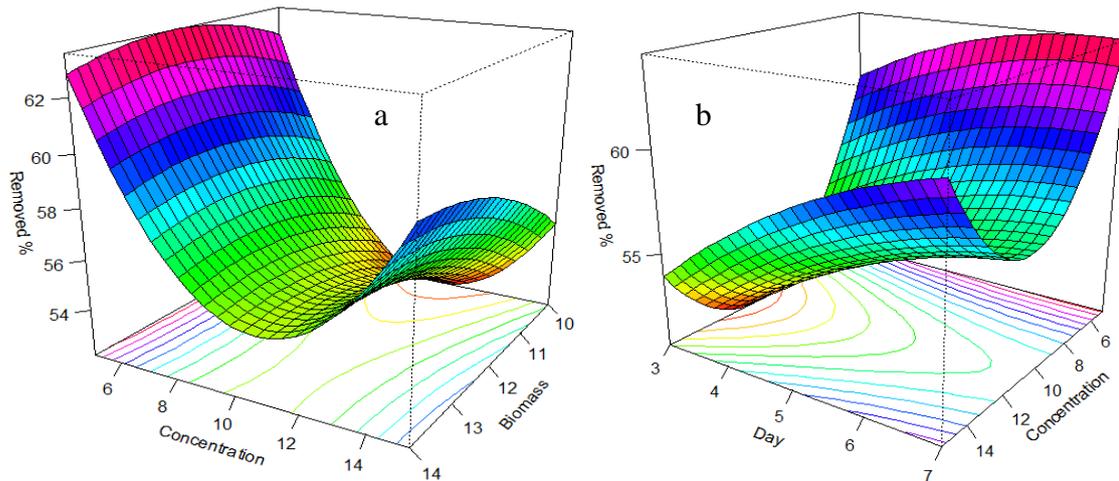


Figura 10. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (a) Biomasa y concentración; (b) Día y Concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.

4.2.4.2 Evaluación de la biodegradación de antibióticos mediante un diseño experimental con *Azolla filiculoides*

En mención a tetraciclina removido por *Azolla* los valores óptimos son: Día: 6.3, Biomasa: 11.9 g, Concentración: 14.7 mg/L para tetraciclina; y Día: 4.6, Biomasa: 12.3 g, Concentración: 8.7 mg/L para Cloranfenicol. Las Figuras 11-13 muestran cualitativamente las interacciones y sus efectos en el porcentaje de remoción de los compuestos evaluados. En el que, de forma general para la tetraciclina, se aprecia mejores porcentajes a mayor cantidad de días, y valores intermedios para biomasa (11-13 g) y concentración (12-16 mg/L). De manera similar, en relación a Cloranfenicol los mayores porcentajes de remoción corresponden a mayor tiempo de contacto, biomasa intermedia y menores valores de antibióticos.

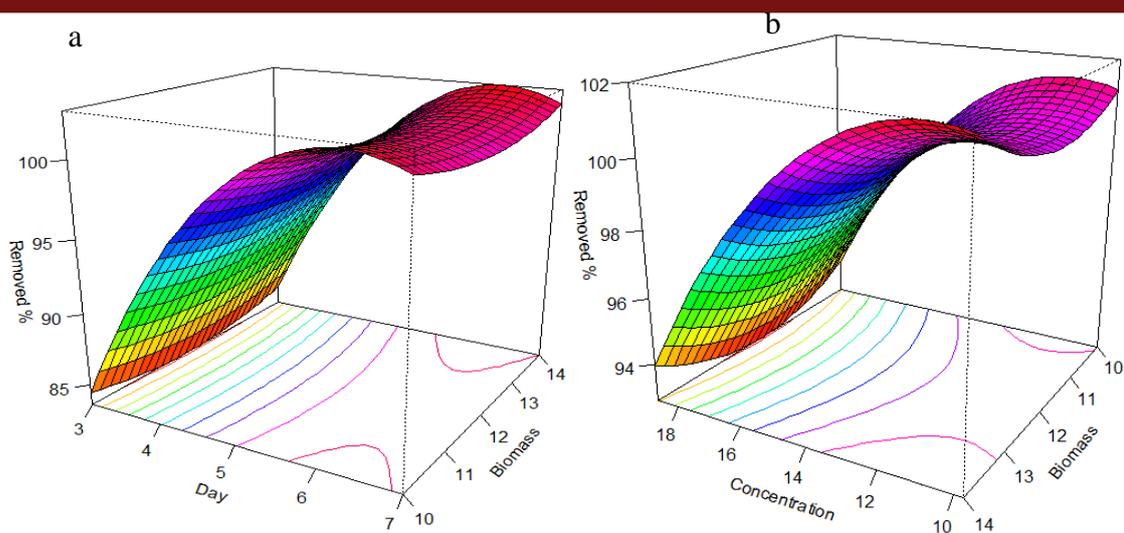


Figura 11. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Biomasa; (b) Biomasa y concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.

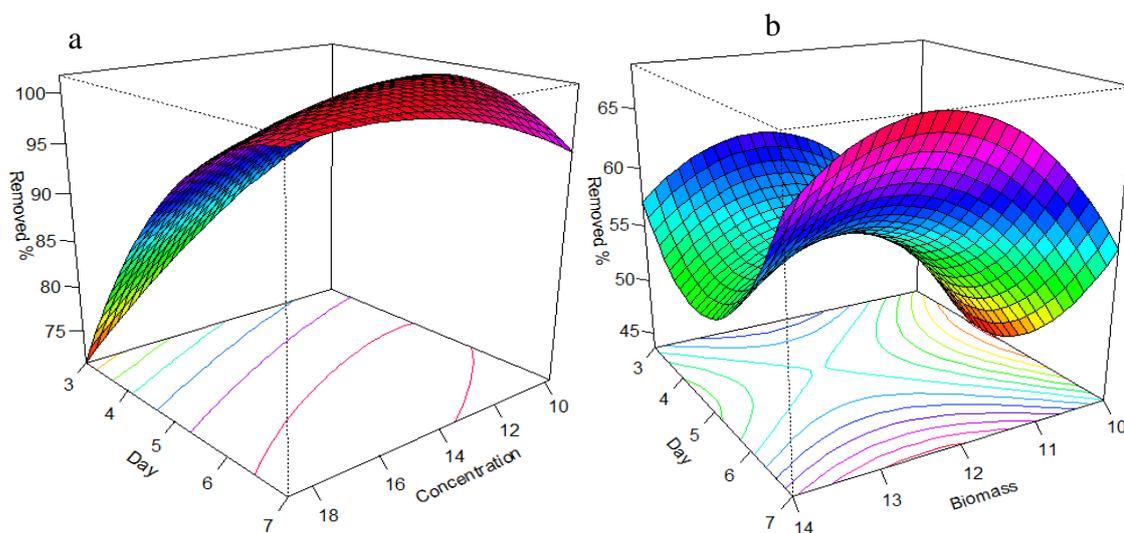


Figura 12. Porcentaje de remoción de tetraciclina en función a la acción conjunta de (a) Día y Concentración. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (b) Día y Biomasa. Los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción.

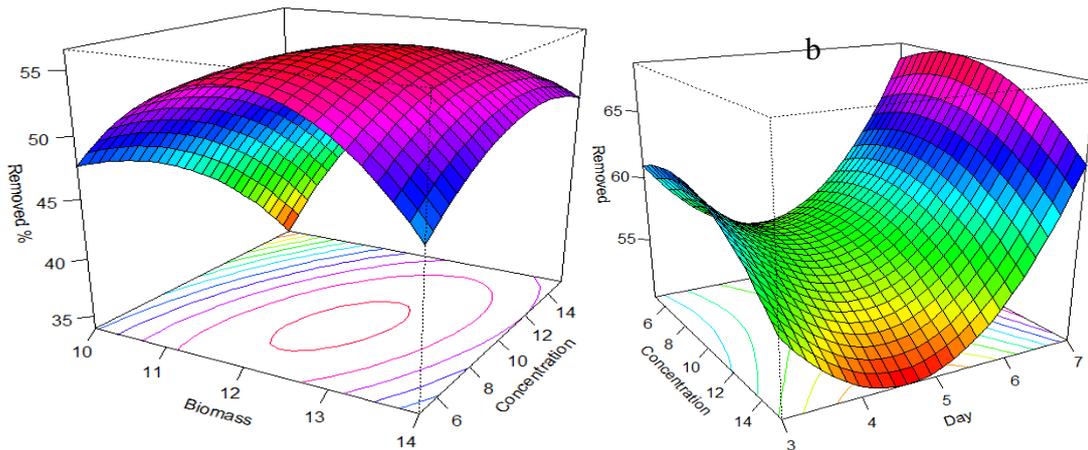


Figura 13. Porcentaje de remoción de cloranfenicol en función a la acción conjunta de (a) Biomasa y concentración; (b) Día y Concentración, en los que los colores más cercanos a granate indican mayor porcentaje de remoción

4.3 Determinar la eficiencia de remoción de antibióticos (%), mediante humedales artificiales con sustratos, macrófitas y bioelectrogénesis en condiciones de laboratorio

4.3.1 Remoción de antibióticos en los humedales con las diferentes combinaciones

Las diferentes combinaciones utilizadas en los humedales ejercieron un efecto positivo en la remoción de antibióticos, dado que se removió ambos antibióticos en elevados porcentajes (*Figura 14*), no habiendo diferencia estadística de los tratamientos sobre la remoción (p -valor >0.05). Teniéndose como máximo el 100% para tetraciclina y cloranfenicol y como mínimos valores de 99.45% 97.84% para Tet y Clor respectivamente. Lo que muestra que los tratamientos usados son eficientes en este proceso.

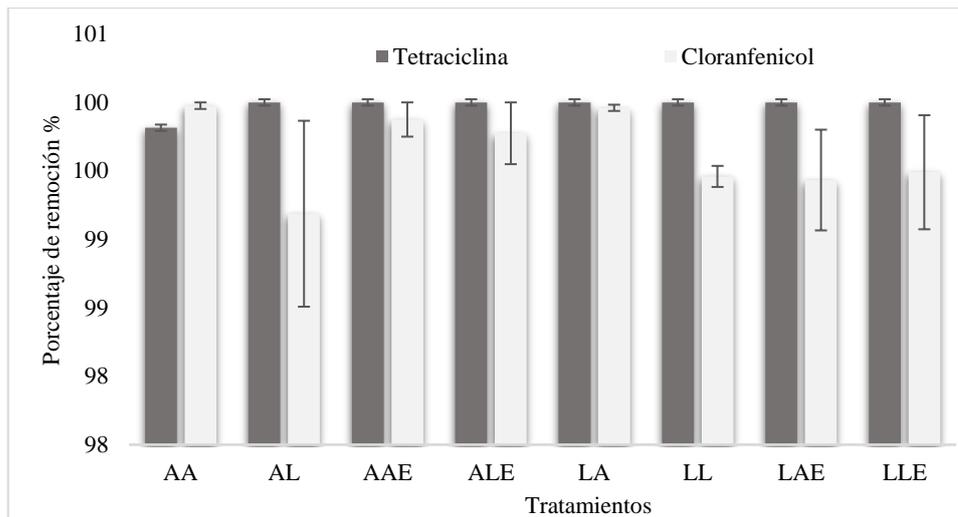


Figura 14. Porcentaje de remoción de antibióticos en los diferentes tratamientos usados. AA (*Azolla* y Arena), AL (*Azolla* y limo), AAE (*Azolla*, arena y el componente eléctrico), ALE (*Azolla*, Limo y el componente eléctrico), LA (*Lemna* y arena), LL (*Lemna* y limo), LAE (*Lemna*, Arena y componente eléctrico), LLE (*Lemna*, limo y componente eléctrico).

Los resultados evidencian elevados porcentajes de remoción en los tratamientos analizados (hasta un 100% en ambos casos), esto se debería a los diferentes procesos como la absorción del sustrato, absorción en las plantas y la degradación (fotodegradación, biodegradación e hidrólisis), los cuales son conocidos como los principales mecanismos de remoción de los antibióticos en humedales (Bianchi et al., 2020; Dordio & Carvalho, 2013; Liu et al., 2013; Matamoros et al., 2012; Wen et al., 2020). En este estudio se evitó la fotodegradación a través del uso de depósitos oscuros y las plantas flotantes que evitan el paso de la luz (Maldonado et al., 2022).

Otro factor es el tiempo de experimentación (50 días), se consideró este tiempo debido a que en la mayoría de estudios con CCM, se realizan en periodos de tiempos largos. Esto a fin de permitir la adaptación de las bacterias a los antibióticos y mejorar la eficiencia de remoción y la producción eléctrica (Hassan et al., 2021; Türker & Yakar, 2017; Wen et al., 2020; Yadav, Chiranjeevi, Sukrampal, & Patil, 2020). Sin embargo, otros estudios en periodos de tiempo cortos también evidenciaron buenos resultados. Al respecto, en un estudio en el que se consideró cinco días, se usó 4 diseños de humedales con CCM, dos de ellos con plantas y los otros dos sin plantas; los resultados evidenciaron que no hubo diferencia significativa en la remoción de

antibióticos (tetraciclina y sulfametoxazol), dado que todos los humedales evidenciaron elevados porcentajes de remoción (Wen et al., 2020). De manera similar, los resultados para tetraciclina evidenciaron que en sistemas CCM en siete días de tratamientos alcanzó un 79.1% de remoción (Wang et al., 2017). Por lo que, se puede usar este sistema para mejorar la remoción de compuestos antibióticos, tal como se evidenció en este estudio

Hasta la fecha, se han utilizado varios tipos de sustratos para mejorar la remoción de antibióticos en humedales, con resultados eficientes (Chen et al., 2016; Dan et al., 2020). De ellos, la arena es el sustrato que ha mostrado una ligera tendencia de mejora en esta investigación. En un estudio en el que se usó varios tipos de sustratos (concha de ostra, arena, piedra medicinal y cerámica); y de ellos, la arena fue la mejor opción para la remoción de compuestos antibióticos (Chen et al., 2016). Esto puede ser debido a que materiales como la arena se produce la protonación de los grupos aluminol/silanol presentes en su composición en pH bajos, lo cual contribuye en la adsorción de contaminantes de compuestos aniónicos a través de la interacción electrostática (Manthiram Karthik & Philip, 2021). Y también por la mayor conductividad hidráulica relativa que podría facilitar el movimiento del agua dentro del perfil arenoso, lo que daría lugar a una mayor oportunidad de interacción entre la arena y los contaminantes (Li et al., 2014). Por ello los suelos arenosos suelen tener mejores resultados de adsorción que suelos franco arcillosos (Chen et al., 2019; Hussain et al., 2012). No obstante, los resultados experimentales no indican que la capacidad de absorción de la arena sea mejor que la del suelo limoso, dado que los resultados varían muy poco; por lo que todos los humedales usados evidenciaron elevados porcentajes de remoción.

4.3.2 Crecimiento de las plantas

El incremento de biomasa en presencia de antibióticos mostró diferencias significativas (p valor = $2.20E-08 < 0.05$). En el caso de *Azolla*, evidenció mejores resultados en los humedales con el componente eléctrico con valores promedios de 49.07 g y 62.10 g en los humedales AAE y ALE respectivamente que con los humedales sin este componente. De manera similar, los valores de la ratio de crecimiento en las plantas evidenciaron que en estos tratamientos se tuvieron un crecimiento mayor por

día 0.58 y 0.84 en AAE y ALE respectivamente. Mientras que para *Lemna*, los diferentes tratamientos no evidencian influencia en el incremento de biomasa, observándose buenos resultados en la mayoría de ellos con mayores valores con los tratamientos de limo 123.33 g y 114.00 g en LL y LLE y unos valores de RCR también elevados, de 2.07 y 1.88 respectivamente (*Figura 15*). De manera similar, en un estudio en el que se expuso a *Lemna* a diferentes concentraciones de tetraciclina, las bajas concentraciones no tuvieron efectos negativos en la biomasa, como las que si tuvieron las elevadas concentraciones (Baciak, Sikorski, Piotrowicz-Cieślak, & Adomas, 2016).

En otro estudio relacionado a *Azolla* a diferentes concentraciones de un antibiótico (sulfadimetoxina a 50, 150, 300 y 450 mg/L) se halló mayores efectos inhibitorios a mayor tiempo (5 semanas) en las mayores concentraciones (Forni et al., 2002). De manera similar, otro estudio evidenció que bajas concentraciones de antibióticos (levofloxacino 1 µg/L), no afectaron el crecimiento de *Azolla*, incluso tuvieron un efecto estimulador en el crecimiento (Bianchi et al., 2020). Adicionalmente, otro factor que pudo haber influenciado en el menor crecimiento de *Azolla* es el agua residual en sí; dado que el agua residual tiene elevadas concentraciones de nitrógeno, elemento que no es necesario para *Azolla*, pues tienen su propia bacteria fijadora de nitrógeno (Carrapico, 2014). En relación a esto, en un estudio en el que se expuso a *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* a diferentes tipos de agua residual sintética en contraste con un medio de cultivo diluido 10 veces, se halló que *Azolla* se desarrolló mejor en el medio de cultivo diluido, mientras que en el agua residual incluso disminuyó su crecimiento (Vermaat & Khalid Hanif, 1998). Por lo tanto, se puede asumir que los factores que más influenciaron en la inhibición del crecimiento de *Azolla* fue el agua residual sintética con la interacción de los antibióticos.

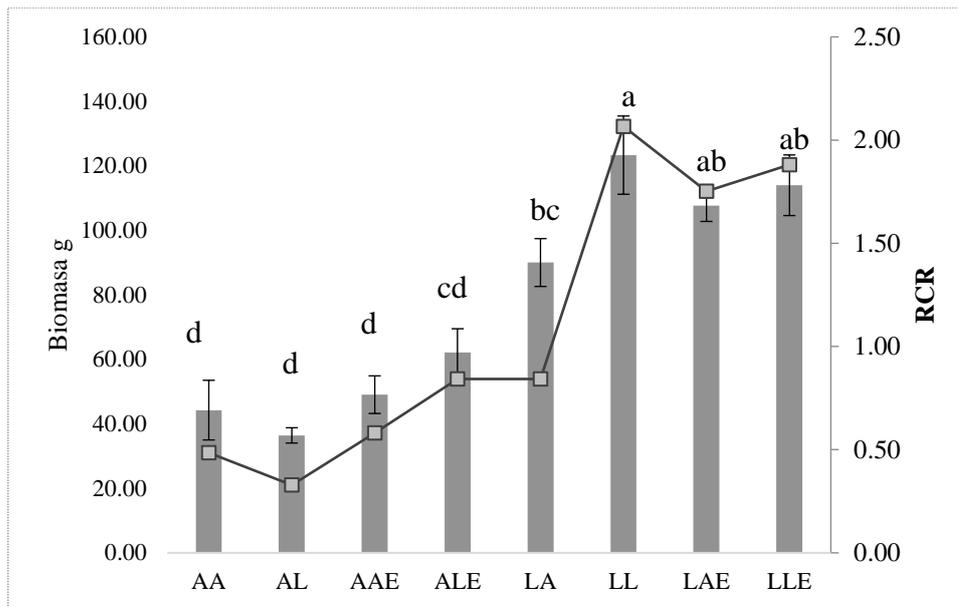


Figura 15. Incremento de la biomasa y la ratio de crecimiento relativo de las especies *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* en los diferentes tratamientos AA (*Azolla* y Arena), AL (*Azolla* y limo), AAE (*Azolla*, arena y el componente eléctrico), ALE (*Azolla*, Limo y el componente electrico), LA (*Lemna* y arena), LL (*Lemna* y limo), LAE (*Lemna*, Arena y componente eléctrico), LLE (*Lemna*, limo y componente eléctrico). Las letras diferentes indican diferencia en las medias según el test de Duncan.

4.3.3 Fito absorción de residuos de antibióticos

Con respecto a la cantidad absorbida por las plantas, se muestra diferencias significativas con los tratamientos teniendo un $p\text{-valor} = 0.00579 \leq 0.05$ para cloranfenicol y $p\text{-valor} = 0.0058 \leq 0.05$ para tetraciclina. Lo que evidencia que los tratamientos si influenciaron en la absorción de antibióticos por las plantas, teniendo mejores resultados con *Azolla*, más aún en la combinación AAE (Figura 16). Y en el caso de *Lemna*, de forma general los resultados son inferiores a los tratamientos con *Azolla*, lo cual evidencia que *Azolla* acumula mayor cantidad de estos antibióticos en su estructura. Hallándose resultados similares con respecto a otros antibióticos a los que se expuso a *Lemna* y *Azolla* (Bianchi et al., 2020), otros estudios con *Azolla* y antibióticos, mostraron resultados similares (Balarak & Mostafapour, 2016; Balarak, Mostafapour, Akbari, & Joghtaei, 2017), lo cual puede estar influenciado por la existencia de bacterias simbióticas como *Anabaena* y *Artrobacter*, las cuales en simbiosis contribuyen en el proceso de biodegradación (Carrapico, 2014). Por lo que esta especie muestra una opción ventajosa para futuros proyectos de remoción.

La fitorremediación es un método eficiente en la remoción de estos compuestos, a través de sus diversos mecanismos, como la fito-absorción, fito-acumulación de antibióticos que ocurre en los tejidos de la planta (Zhang et al., 2016), también la fito-volatilización, que es la transpiración del contaminante transformado que ha sido absorbido por la planta, lo que ocurre normalmente en las hojas (Burken, 2004; Singh, Pandey, & Suthar, 2019), lo que explicaría las bajas concentraciones acumuladas de antibióticos en los tejidos de las plantas (Figura 9).

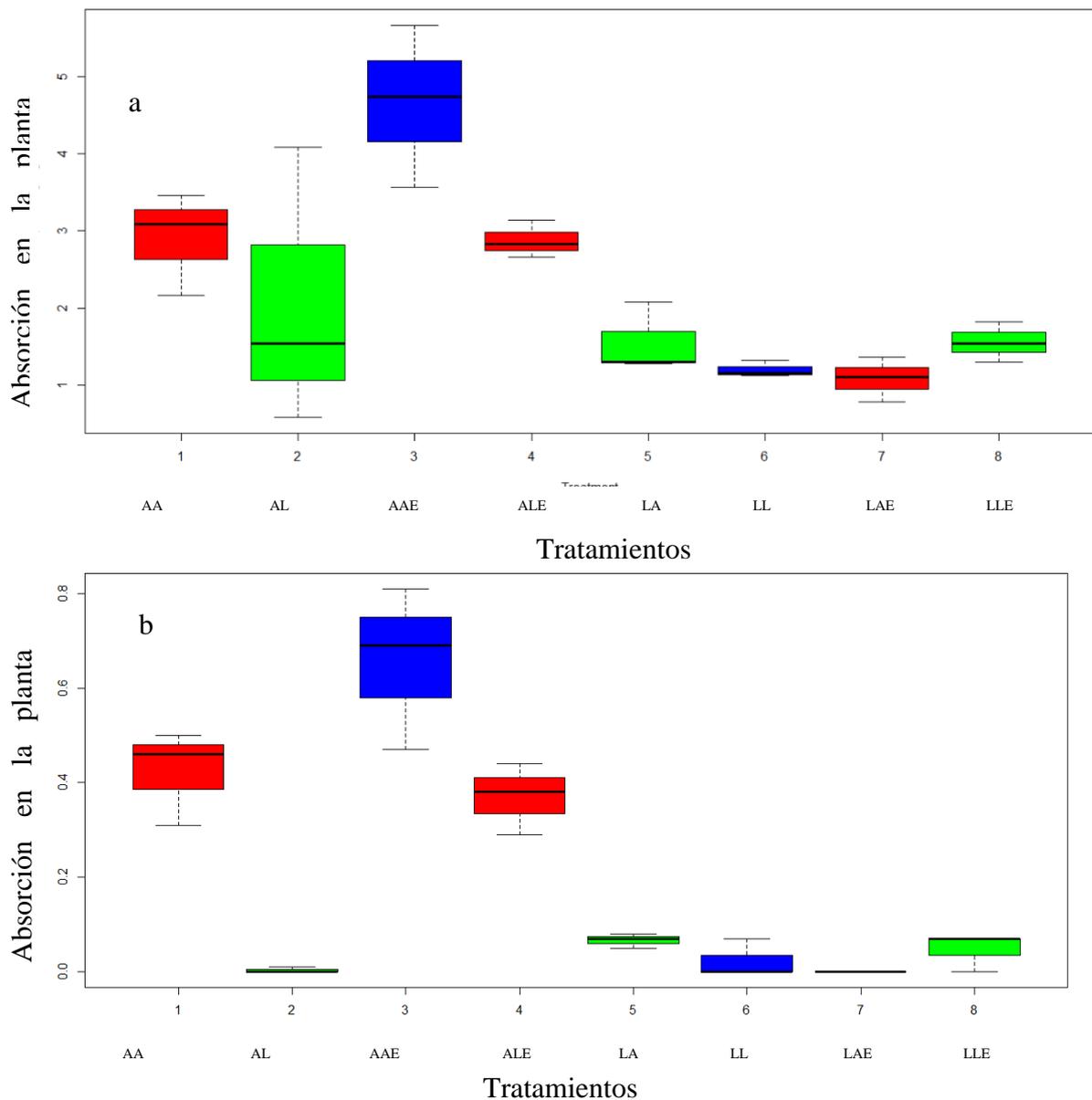


Figura 16. Cantidad de antibióticos absorbidos por las plantas en los diferentes tratamientos. Tetraciclina (a), cloranfenicol (b). AA (*Azolla* y Arena), AL (*Azolla* y limo), AAE (*Azolla*, arena y el componente eléctrico), ALE (*Azolla*, Limo y el componente eléctrico),

LA (*Lemna* y arena), LL (*Lemna* y limo), LAE (*Lemna*, Arena y componente eléctrico), LLE (*Lemna*, limo y componente eléctrico).

4.3.4 Producción eléctrica en los humedales experimentales

Se realizaron series de mediciones diarias comparativas de electricidad en las cuatro combinaciones de humedales para analizar la generación de electricidad (Türker & Yakar, 2017). Los resultados se muestran en la *Figura 17*. Los watts en los 4 tratamientos fueron similares durante los primeros días, y tiene un incremento en la parte final del experimento en todos los tratamientos, lo que indica que el humedal se recupera del efecto del estrés ocasionado por los antibióticos.

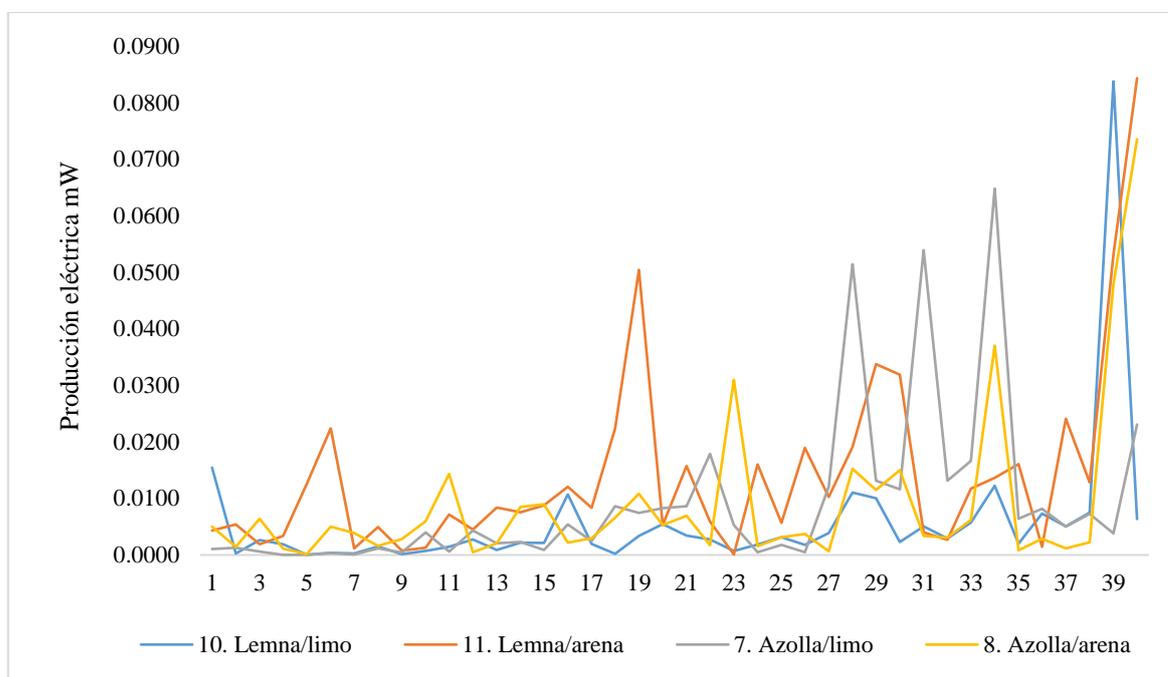


Figura 17. Registro de producción eléctrica en los 4 humedales, durante 40 días.

En relación a la producción eléctrica en los humedales, este factor influyó positivamente en la conversión de materiales de desecho en energía, y simultáneamente remover residuos de antibióticos, tal como lo evidenció el crecimiento de las plantas y la fito acumulación de antibióticos en ellas. Se obtuvo un máximo de energía de 0.246 mW por humedal por día en el humedal de *Lemna* y arena. En otros estudios en los que se usó humedales artificiales con este componente, también se halló resultados eficientes de remoción de antibióticos y de producción eléctrica (Wang et al., 2017) a pesar del continuo incremento de la concentración de antibióticos (Wang

et al., 2017), de manera similar, en otro estudio se probó tres concentraciones de antibióticos, en el que hubo mayor producción eléctrica en el humedal con menor concentración de antibióticos (Wen et al., 2020). Por lo que es una técnica sostenible para aplicarlo en zonas de escasos recursos (Kumar et al., 2019), incluso se obtiene beneficio doble, la producción eléctrica y la remoción de compuestos tóxicos.

4.3.5 Parámetros fisicoquímicos

En relación a los parámetros fisicoquímicos, también el tratamiento ha influenciado positivamente, dado que los valores de pH, ORP y OD mejoraron en referencia al valor inicial de los tratamientos (*Figura 18*).

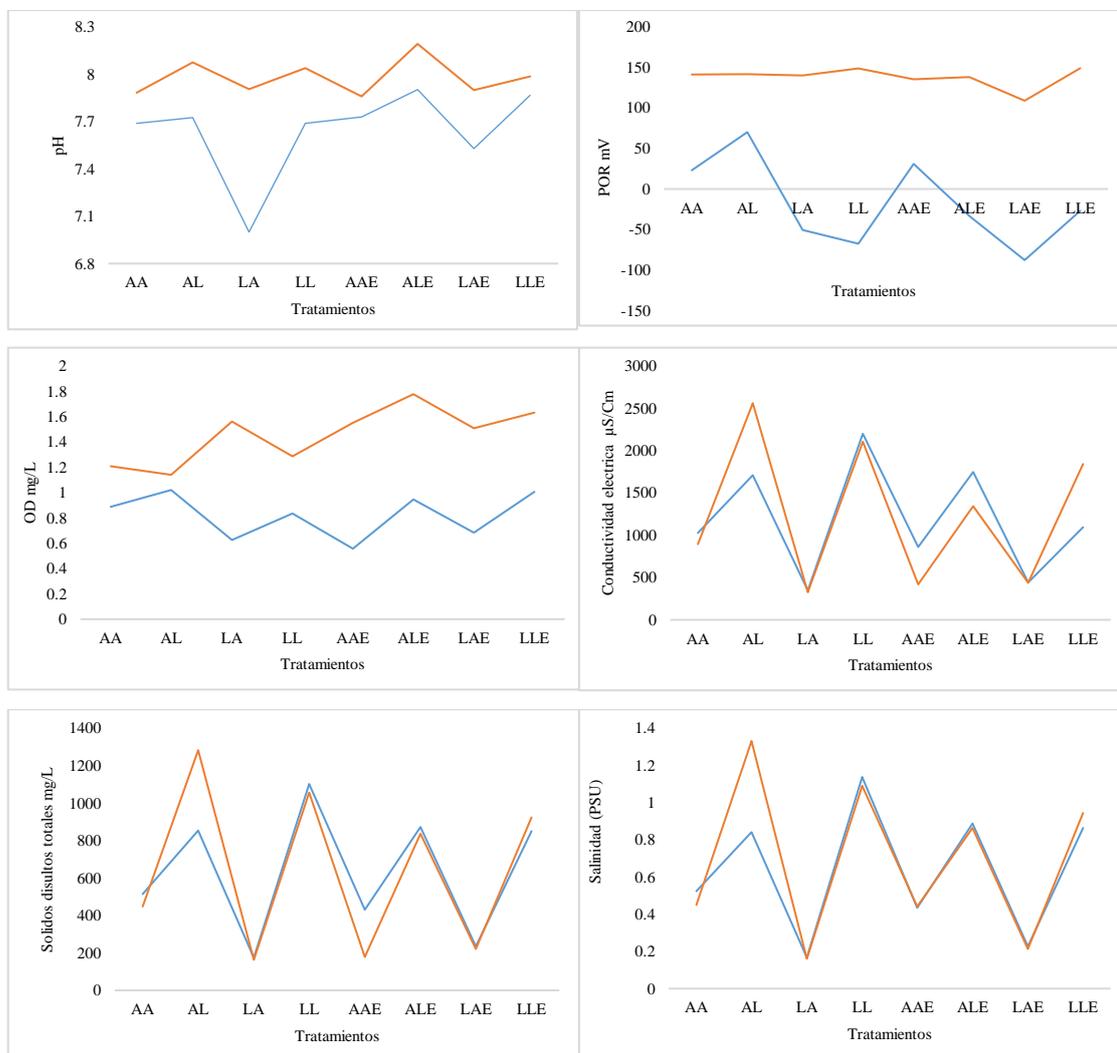


Figura 18. Parámetros físico químicos antes (—) y después (—) del tratamiento del humedal. a) pH, b) POR (Potencial oxido-reducción), c) OD (Oxígeno disuelto), d) Conductividad eléctrica, e) Sólidos disueltos totales y f) salinidad. AA (Azolla y Arena), AL



(Azolla y limo), AAE (Azolla, arena y el componente eléctrico), ALE (Azolla, Limo y el componente eléctrico), LA (Lemna y arena), LL (Lemna y limo), LAE (Lemna, Arena y componente eléctrico), LLE (Lemna, limo y componente eléctrico).

Con respecto a la conductividad, solidos disueltos y la salinidad, se vieron más influenciados por el limo, debido a que en los experimentos con este sustrato se tiene incremento de los valores en contraste con la arena; sin embargo, también se visualiza una leve mejora al finalizar el tratamiento. Esto pudiera estar influenciado por la disolución de sales que pudiera contener el limo, pues en condiciones normales estos valores debieran disminuir, tal como evidencian estudios de tratamiento de aguas residuales con *Lemna* y *Azolla*, en el que se halló que estos parámetros disminuyeron en el tiempo del tratamiento (30 días) (Amare et al., 2018). De manera similar, otro estudio que duró 12 semanas de experimentación, se halló que los parámetros fisicoquímicos se estabilizaron al finalizar el estudio (Carvalho et al., 2013), contribuyendo con la disminución de la toxicidad propia del agua residual, lo que también mejora la calidad del agua (Dan et al., 2020).

CONCLUSIONES

Este estudio permite identificar la presencia de tetraciclina y cloranfenicol los antibióticos presentes en aguas residuales.

Adicionalmente, se evidencia que *Lemna* remueve la tetraciclina en un 84%; y el factor de mayor influencia es el tiempo de contacto; respecto al cloranfenicol se remueve en menor porcentaje (64%). De manera similar, *Azolla* remueve mejor tetraciclina alcanzando un 100 %, mientras que cloranfenicol solo alcanza como máximo 70% y las variables que mayor influencia tienen son: tiempo de contacto en días, para tetraciclina y para cloranfenicol día, biomasa y concentración. Referido a las variables consideradas, de forma general se ve que valores intermedios de biomasa, tiempo y menores valores de concentración de antibióticos, ofrecen mejores resultados. En relación al incremento de biomasa *Lemna*, evidencia mejores resultados que *Azolla*. De manera similar, en el caso del factor de bioconcentración también tetraciclina es menos bioacumulada que cloranfenicol, y en el caso de ambos antibióticos, *Azolla* acumula mayor cantidad que *Lemna*.

En los humedales experimentales, mostraron que todas las combinaciones tienen eficiencia de remoción de estas concentraciones. Adicionalmente, la *Azolla* asimiló mayor cantidad de antibióticos. En relación a la producción eléctrica, los humedales con arena evidencian ligeramente mejor producción que las demás unidades experimentales.



RECOMENDACIONES

- Se halló elevada capacidad de remoción de antibióticos con las especies usadas, por lo que se recomienda su uso en estudios piloto a fin de que pueda proponerse a escala real, principalmente en la etapa secundaria o terciaria de tratamiento.
- Adicionalmente, se recomienda el uso de *Azolla* para degradar antibióticos de aguas residuales con previo tratamiento.
- Se recomienda el uso de *Lemna* para tratar residuos antibióticos de aguas residuales no tratadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R. (2009). Estudio de la cuenca altoandina del río Cañete (Perú): distribución altitudinal de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos y caracterización hidroquímica de sus cabeceras cársticas. Universidad de Barcelona.
- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., & Barcelò, D. (2012). Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, 438, 15-25.
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Capparelli, A. L., & Marino, D. J. G. (2019). Behavior of ionophore antibiotics in aquatic environments in Argentina: The distribution on different scales in water courses and the role of wetlands in depuration. *Environment International*, 133, 105144.
- Amare, E., Kebede, F., & Mulat, W. (2018). Wastewater treatment by *Lemna minor* and *Azolla filiculoides* in tropical semi-arid regions of Ethiopia. *Ecological Engineering*, 120, 464-473.
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Morel, M. C., Prado, B., Bourdat-Deschamps, M., Vince, E., Aviles, G. F., & Martins, J. M. F. (2017). Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Science of the Total Environment*, 576, 671-682.
- Arnanz, J. M. (2018). Análisis de Pesticidas en Muestras De Alimentos: Tratamiento de la muestra y determinación por LC y GC acopladas a MS.
- Ávila, C., Pedescoll, A., Matamoros, V., Bayona, J. M., & García, J. (2010). Capacity of a horizontal subsurface flow constructed wetland system for the removal of emerging pollutants: An injection experiment. *Chemosphere*, 81(9), 1137-1142
- Babić, S., Mutavdžić Pavlović, D., Asperger, D., Perisa, M., Zrncić, M., Horvat, A., & Kastelan-Macan, M. (2010). Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, 1185-1194.
- Baciak, M., Sikorski, Ł., Piotrowicz-Cieślak, A. I., & Adomas, B. (2016). Content of biogenic amines in *Lemna minor* (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline. *Aquatic Toxicology*, 180, 95-102.

- Balarak, D., & Mostafapour, F. (2016). Batch Equilibrium, Kinetics and Thermodynamics Study of Sulfamethoxazole Antibiotics Onto *Azolla filiculoides* as a Novel Biosorbent. En *British Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 13, Número 2, pp. 1-14).
- Balarak, D., Mostafapour, F., Akbari, H., & Joghtaei, A. (2017). Adsorption of Amoxicillin Antibiotic from Pharmaceutical Wastewater by Activated Carbon Prepared from *Azolla filiculoides*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 18(3), 1-13.
- Balarak, D., Mostafapour, F., & Khatibi, A. (2018). Nonlinear Isotherms and Kinetics and Application Error Functions for Adsorption of Tetracycline on *Lemna Minor*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 23(2), 1-11.
- Barra Caracciolo, A., Topp, E., & Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 25-36.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., & Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science and Technology*, 43(3), 597-603.
- Besharati, N., Alizadeh, N., & Shariati, S. (2021). Removal of tetracycline from aqueous solution by *Azolla*, fig leaves, eggshell and egg membrane modified with magnetite nanoparticles. *Desalination and Water Treatment*, 225, 214-224.
- Bhattacharjee, M. K. (2016). *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs* (Springer (ed.)). Springer International Publishing.
- Bianchi, E., Biancalani, A., Berardi, C., Antal, A., Fibbi, D., Coppi, A., Lastrucci, L., Bussotti, N., Colzi, I., Renai, L., Scordo, C., Del Bubba, M., & Gonnelli, C. (2020). Improving the efficiency of wastewater treatment plants: Bio-removal of heavy-metals and pharmaceuticals by *Azolla filiculoides* and *Lemna minuta*. *Science of the Total Environment*, 746, 141219.
- Bokhari, S. H., Ahmad, I., Mahmood-Ul-Hassan, M., & Mohammad, A. (2016). Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, 18(1), 25-32. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1058331>
- Bôto, M., Almeida, C. M. R., & Mucha, A. P. (2016). Potential of constructed wetlands for removal of antibiotics from saline aquaculture effluents. *Water (Switzerland)*, 8(10), 1-14. <https://doi.org/10.3390/w8100465>

- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 371-382.
- Burken, J. G. (2004). Uptake and Metabolism of Organic Compounds: Green-Liver Model. *Phytoremediation*, 1, 59-84.
- Cardinal, P., Anderson, J. C., Carlson, J. C., Low, J. E., Challis, J. K., Beattie, S. A., Bartel, C. N., Elliott, A. D., Montero, O. F., Lokesh, S., Favreau, A., Kozlova, T. A., Knapp, C. W., Hanson, M. L., & Wong, C. S. (2014). Macrophytes may not contribute significantly to removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance in model surface constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 482-483(1), 294-304.
- Carrapico, F. (2014). *Azolla* as a Superorganism. Its Implication in Symbiotic Studies. In *Symbiosis and Stress: Joint Ventures in Biology* (pp. 225-241). Springer
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736-757.
- Carvalho, P., Basto, M. C. P., & Almeida, C. M. R. (2012). Potential of *Phragmites australis* for the removal of veterinary pharmaceuticals from aquatic media. *Bioresource Technology*, 116, 497-501.
- Carvalho, P. N., Araújo, J. L., Mucha, A. P., Basto, M. C. P., & Almeida, C. M. R. (2013). Potential of constructed wetlands microcosms for the removal of veterinary pharmaceuticals from livestock wastewater. *Bioresource Technology*, 134, 412-416.
- Carvalho, P. N., Basto, M. C. P., Almeida, C. M. R., & Brix, H. (2014). A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(20), 11729-11763.
- Cha, J., & Carlson, K. H. (2019). Biodegradation of veterinary antibiotics in lagoon waters. *Process Safety and Environmental Protection*, 127, 306-313.
- Chen, J., Wei, X. D., Liu, Y. S., Ying, G. G., Liu, S. S., He, L. Y., Su, H. C., Hu, L. X., Chen, F. R., & Yang, Y. Q. (2016). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from domestic sewage by constructed wetlands: Optimization of wetland substrates and hydraulic loading. *Science of the Total Environment*, 565, 240-248.
- Chen, M., Zhu, M., Zhu, Y., Wang, D., Li, Z., Zeng, G., Zhang, C., Huang, J., & Xu, P. (2019). Collision of emerging and traditional methods for antibiotics removal: Taking

- constructed wetlands and nanotechnology as an example. *NanoImpact*, 15(July), 100175.
- Conkle, J., White, J., & Metcalfe, C. (2008). Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere*, 73, 1741-1748.
- Custodio, M., Chanamé, F., Pizarro, S., & Cruz, D. (2018). Quality of the aquatic environment and diversity of benthic macroinvertebrates of high Andean wetlands of the Junín region, Peru. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 195-202.
- Dan, A., Zhang, X., Dai, Y., Chen, C., & Yang, Y. (2020). Occurrence and removal of quinolone, tetracycline, and macrolide antibiotics from urban wastewater in constructed wetlands. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119677.
- Danner, M. C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 664, 793-804.
- de Castro-Català, N., Kuzmanovic, M., Roig, N., Sierra, J., Ginebreda, A., Barceló, D., Pérez, S., Petrovic, M., Picó, Y., Schuhmacher, M., & Muñoz, I. (2016). Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. *Science of the Total Environment*, 540, 297-306.
- Di Baccio, D., Pietrini, F., Bertolotto, P., Pérez, S., Barcelò, D., Zacchini, M., & Donati, E. (2017). Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for bio-monitoring of emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 584-585, 363-373.
- Dordio, A. V., & Carvalho, A. J. P. (2013). Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. *Journal of Hazardous Materials*, 252-253, 272-292.
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M. C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., & Martins, J. M. F. (2014). Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? *Procedia Earth and Planetary Science*, 10, 370-375.
- Fahid, M., Arslan, M., Shabir, G., Younus, S., Yasmeen, T., Rizwan, M., Siddique, K., Ahmad, S. R., Tahseen, R., Iqbal, S., Ali, S., & Afzal, M. (2020). *Phragmites australis*

- in combination with hydrocarbons degrading bacteria is a suitable option for remediation of diesel-contaminated water in floating wetlands. *Chemosphere*, 240, 124890.
- Fernandes, J. P., Almeida, C. M. R., Pereira, A. C., Ribeiro, I. L., Reis, I., Carvalho, P., Basto, M. C. P., & Mucha, A. P. (2015). Microbial community dynamics associated with veterinary antibiotics removal in constructed wetlands microcosms. *Bioresource Technology*, 182, 26-33.
- Follieri, M. (1977). Classification and phylogeny of living and fossil water ferns of the genus « *Azolla* »: Classificazione e filogenesi delle felci acquatiche fossili e viventi del genere « *Azolla* ». *Webbia*, 31(1), 97-104.
- Forni, C., Cascone, A., Fiori, M., & Migliore, L. (2002). Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: A model for drug remediation. *Water Research*, 36(13), 3398-3403.
- Forni, C., Tel-Or, E., & Grilli, M. (1991). Effects of antibiotic treatments on *Azolla-Anabaena* and *Arthrobacter*. *Plant and Soil*, 137, 151-155.
- Garcia-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., & Salvadó, V. (2015). The influence of *Lemna* sp. and *Spirogyra* sp. on the removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in treated wastewaters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), 2327-2338.
- Gomes, M. P., de Brito, J. C. M., Carvalho Carneiro, M. M. L., Ribeiro da Cunha, M. R., Garcia, 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.
- Gomes, M. P., Gonçalves, C. A., de Brito, J. C. M., Souza, A. M., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Figueredo, C. C., & Garcia, Q. S. (2017). Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. *Journal of Hazardous Materials*, 328, 140-149.
- Gomes, M. P., Moreira Brito, J. C., Cristina Rocha, D., Navarro-Silva, M. A., & Juneau, P. (2020). Individual and combined effects of amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on *Lemna minor* physiology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111025.
- González, S., López-Roldán, R., & Cortina, J. L. (2012). Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environmental Pollution*, 161, 83-92.

- Guan, Y., WANG, B., GAO, Y., LIU, W., ZHAO, X., HUANG, X., & YU, J. (2017). Occurrence and Fate of Antibiotics in the Aqueous Environment and Their Removal by Constructed Wetlands in China: A review. *Pedosphere*, 27(1), 42-51.
- Hájková, M., Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., & Váczi, P. (2019). Diclofenac as an environmental threat: Impact on the photosynthetic processes of *Lemna minor* chloroplasts. *Chemosphere*, 224, 892-899.
- Harrabi, M., Varela Della Giustina, S., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Elleuch, B. (2018). Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10(November 2017), 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.006>
- Hassan, M., Zhu, G., LU, Y., AL-Falahi, A. H., LU, Y., Huang, S., & Wan, Z. (2021). Removal of antibiotics from wastewater and its problematic effects on microbial communities by bioelectrochemical Technology: Current knowledge and future perspectives. *Environmental Engineering Research*, 26(1), 1-15.
- He, Y., Nurul, S., Schmitt, H., Sutton, N. B., Murk, T. A. J., Blokland, M. H., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2018). Evaluation of attenuation of pharmaceuticals, toxic potency, and antibiotic resistance genes in constructed wetlands treating wastewater effluents. *Science of the Total Environment*, 631-632, 1572-1581.
- He, Z., Wang, Y., Xu, Y., & Lu, X. (2018). Determination of Antibiotics in Vegetables Using QuEChERS-Based Method and Liquid Chromatography- Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Food analytical methods*, 11, 2857-2864.
- Holanda, F. H. e., Birolli, W. G., Morais, E. dos S., Sena, I. S., Ferreira, A. M., Faustino, S. M. M., Grace da S. Solon, L., Porto, A. M., & Ferreira, I. M. (2019). Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101200.
- Hu, H., Zhou, Q., Li, X., Lou, W., Du, C., Teng, Q., Zhang, D., Liu, H., Zhong, Y., & Yang, C. (2019). Phytoremediation of anaerobically digested swine wastewater contaminated by oxytetracycline via *Lemna aequinoctialis*: Nutrient removal, growth characteristics and degradation pathways. *Bioresource Technology*, 291, 121853.
- Huang, X., Zheng, J., Liu, C., Liu, L., Liu, Y., Fan, H., & Zhang, T. (2017). Performance and bacterial community dynamics of vertical flow constructed wetlands during the treatment of antibiotics-enriched swine wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 316, 727-735.

- Huang, Y.-H., Liu, Y., Du, P., Zeng, L.-J., Mo, C.-H., Li, Y.-W., Lü, H., & Cai, Q.-Y. (2019). Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistant genes in water and sediments of urban rivers with black-odor water in Guangzhou, South China. *Science of The Total Environment*, 670, 170-180.
- Huber, C., Bartha, B., & Schröder, P. (2012). Metabolism of diclofenac in plants - Hydroxylation is followed by glucose conjugation. *Journal of Hazardous Materials*, 243, 250-256.
- Hussain, S. A., Prasher, S. O., & Patel, R. M. (2012). Removal of ionophoric antibiotics in free water surface constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 41, 13-21.
- Iatrou, E., Gatidou, G., Damalas, D., Thomaidis, N., & Stasinakis, A. (2017). Fate of antimicrobials in duckweed *Lemna minor* wastewater treatment systems. *Journal of Hazardous Materials*, 330, 116-126.
- Ilyas, H., & Hullebusch, E. D. van. (2019). Role of Design and Operational Factors in the Removal of Pharmaceuticals by Constructed Wetlands. *Water* 2019, Vol. 11, Page 2356, 11(11), 2356.
- INEI. (2020). Perú: Estimaciones y Proyecciones de Población por Departamento, Provincia y Distrito, 2018-2020. Inei, 1-110.
- Jafari, E., Hamidian, A. H., Zhang, Y., & Yang, M. (2020). Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment. *Water Environment Research*, 92(2), 177-188.
- Jhansi, S. C., & Mishra, S. K. (2013). Wastewater Treatment and Reuse: Sustainability Options. *Consilience: The journal of Sustainable Development*, 10(1), 1-15.
- Jia, W., Zhang, J., Wu, J., Xie, H., & Zhang, B. (2010). Effect of intermittent operation on contaminant removal and plant growth in vertical flow constructed wetlands: A microcosm experiment. *Desalination*, 262(1-3), 202-208.
- Jiménez, G., Soto, A., & Álvarez, R. (2015). Análisis Del Riesgo Potencial Ambiental Por Alquilfenoles Presentes En Aguas Del Río Cauca a Su Paso Por La Zona Urbana De Cali (Valle Del Cauca, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(1), 43-48.
- Kołodziejska, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Steudte, S., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Stolte, S. (2013). Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere*, 92(9), 1253-1259.

- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., & Vaněk, T. (2010). Phytoremediation of pharmaceuticals-preliminary study. *International Journal of Phytoremediation*, 12(3), 306-316.
- Kumar, S. S., Kumar, V., Malyan, S. K., Sharma, J., Mathimani, T., Maskarenj, M. S., Ghosh, P. C., & Pugazhendhi, A. (2019). Microbial fuel cells (CCMs) for bioelectrochemical treatment of different wastewater streams. *Fuel*, 254(February).
- Kurade, M. B., Xiong, J. Q., Govindwar, S. P., Roh, H. S., Saratale, G. D., Jeon, B. H., & Lim, H. (2019). Uptake and biodegradation of emerging contaminant sulfamethoxazole from aqueous phase using *Ipomoea aquatica*. *Chemosphere*, 225, 696-704.
- Kuroiwa, J. (2009). Water Resources in Peru: a Strategic View. 26. http://167.249.11.60/anc_j28.1/images/stories/agua/waterresourcesjuliokuroiwa.pdf
- Larson, A., Hartinger, S. M., Riveros, M., Salmon-mulanovich, G., Hattendorf, J., Verastegui, H., Huaylinos, M. L., & Mäusezahl, D. (2019). Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca, Peru. *am.J. Trop. Med. Hyg.*, 100(6), 1363-1368.
- Lei, K., Zhu, Y., Chen, W., Pan, H. Y., Cao, Y. X., Zhang, X., Guo, B. B., Sweetman, A., Lin, C. Y., Ouyang, W., He, M. C., & Liu, X. T. (2019). Spatial and seasonal variations of antibiotics in river waters in the Haihe River Catchment in China and ecotoxicological risk assessment. *Environment International*, 130, 104919.
- Leston, S., Nunes, M., Viegas, I., Ramos, F., & Pardal, M. Â. (2013). The effects of chloramphenicol on *Ulva lactuca*. *Chemosphere*, 91(4), 552-557.
- Li, C., Yang, L., Shi, M., & Liu, G. (2019). Persistent organic pollutants in typical lake ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 668-678.
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., & Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, 89(11), 1307-1315.
- Li, Yifei, Zhu, G., Ng, W. J., & Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468-469, 908-932.
- Li, Yiran, Zhang, J., & Liu, H. (2018). Removal of chloramphenicol from aqueous solution using low-cost activated carbon prepared from *Typha orientalis*. *Water (Switzerland)*, 10, 1-16.

- Lissemore, L., Hao, C., Yang, P., Sibley, P. K., Mabury, S., & Solomon, K. R. (2006). An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario. *Chemosphere*, 64(5), 717-729.
- Liu, K., Zhang, D., Xiao, X., Cui, L., & Zhang, H. (2020). Occurrence of quinotone antibiotics and their impacts on aquatic environment in typical river-estuary system of Jiaozhou Bay, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 109993.
- Liu, L., Li, J., Fan, H., Huang, X., Wei, L., & Liu, C. (2019). Fate of antibiotics from swine wastewater in constructed wetlands with different flow configurations. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 140(March), 119-125.
- Liu, L., Liu, C., Zheng, J., Huang, X., Wang, Z., Liu, Y., & Zhu, G. (2013). Elimination of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes from swine wastewater in the vertical flow constructed wetlands. *Chemosphere*, 91, 1088-1093.
- Liu, L., Liu, Y. H., Liu, C. X., Wang, Z., Dong, J., Zhu, G. F., & Huang, X. (2013). Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions. *Ecological Engineering*, 53, 138-143.
- Liu, X., Cao, Z., Yuan, Z., Zhang, J., Guo, X., Yang, Y., He, F., Zhao, Y., & Xu, J. (2018). Insight into the kinetics and mechanism of removal of aqueous chlorinated nitroaromatic antibiotic chloramphenicol by nanoscale zero-valent iron. *Chemical Engineering Journal*, 334(October 2017), 508-518.
- Loayza-Muro, R. (2017). Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: Effect of pH, temperature and metals on filtration rate. *Environmental Pollution*, 149, 209-2015.
- Lu, X.-M., & Lu, P.-Z. (2019). Distribution of antibiotic resistance genes in soil amended using *Azolla imbricata* and its driving mechanisms. *Science of the Total Environment*, 692, 422-431.
- Mahvi, A. H., Mostafapour, F. K., & Balarak, D. (2018). Biosorption of tetracycline from aqueous solution by *Azolla Filiculoides*: Equilibrium kinetic and thermodynamics studies. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(8), 5759-57.
- Maldonado, I., Moreno, E. G., & Zirena, F. (2022). Application of duckweed (*Lemna* sp.) and water fern (*Azolla* sp.) in the removal of pharmaceutical residues in water: State of art focus on antibiotics. *Science of the Total Environment*, 838, 156565.

- Manthiram Karthik, R., & Philip, L. (2021). Sorption of pharmaceutical compounds and nutrients by various porous lowcost adsorbents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104916.
- Matamoros, V., Arias, C. A., Nguyen, L. X., Salvadó, V., & Brix, H. (2012). Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland. *Chemosphere*, 88(9), 1083-1089.
- MVCS. (2013). Protocolo de monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. *El Peruano*, 1-31.
- Nguyen, L. M., Nguyen, N. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, D. T. C., & Tran, T. Van. (2022). Occurrence, toxicity and adsorptive removal of the chloramphenicol antibiotic in water: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 25, 1-35.
- Nieto-Juarez, J., Torres-Palma, R., Botero-Coy, A., & Hernández, F. (2021). Pharmaceuticals and environmental risk assessment in municipal wastewater treatment plants and rivers from Peru. *Environment International journal*, 155, 106674.
- OEFA. (2014). Fiscalización ambiental en aguas residuales. Organismo de Evaluacion y Fiscalizacion Ambiental, 36. https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827
- Pan, M., Wong, C. K. C., & Chu, L. M. (2014). Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the Pearl River Delta, Southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11062-11069.
- Pei, M., Zhang, B., He, Y., Su, J., Gin, K., Lev, O., Shen, G., & Hu, S. (2019). State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants. *Environment International*, 131, 105026.
- Rabello, V. M., Teixeira, L. C. R. S., Gonçalves, A. P. V., & de Sá Salomão, A. L. (2019). The Efficiency of Constructed Wetlands and Algae Tanks for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs): a Systematic Review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(10), 1-12.
- Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C., & Corvini, P. F. X. (2020). Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. *New Biotechnology*, 54, 34-51.
- Rodil, R., Villaverde-de-Sáa, E., Cobas, J., Quintana, J. B., Cela, R., & Carro, N. (2019). Legacy and emerging pollutants in marine bivalves from the Galician coast (NW Spain). *Environment International*, 129(May), 364-375.

- Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112, 429-448. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.011>
- Santos, F., Almeida, C. M. R. de, Ribeiro, I., Ferreira, A. C., & Mucha, A. P. (2019). Removal of veterinary antibiotics in constructed wetland microcosms – Response of bacterial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 894-901.
- Sasmaz, A., & Obek, E. (2012). The accumulation of silver and gold in *Lemna gibba* L. exposed to secondary effluents. *Chemie der Erde*, 72(2), 149-152.
- Sharma, M., Bajracharya, S., Gildemyn, S., Patil, S. A., Alvarez-Gallego, Y., Pant, D., Rabaey, K., & Dominguez-Benetton, X. (2014). A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems. *Electrochimica Acta*, 140, 191-208.
- Singh, V., Pandey, B., & Suthar, S. (2018). Phytotoxicity of amoxicillin to the duckweed *Spirodela polyrhiza*: Growth, oxidative stress, biochemical traits and antibiotic degradation. *Chemosphere*, 201, 492-502.
- Singh, V., Pandey, B., & Suthar, S. (2019). Phytotoxicity and degradation of antibiotic ofloxacin in duckweed (*Spirodela polyrhiza*) system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 179, 88-95.
- Song, C., Wei, Y., Sun, J., Song, Y., Li, S., & Kitamura, Y. (2020). Biodegradation and metabolic fate of thiamphenicol via *Chlorella* sp. utex1602 and L38. *Bioresource Technology*, 296, 122320.
- Sorinolu, A. J., Tyagi, N., Kumar, A., & Munir, M. (2021). Antibiotic resistance development and human health risks during wastewater reuse and biosolids application in agriculture. *Chemosphere*, 265, 129032.
- Thi, H., Thuy, T., Thi, T., & Loan, C. (2014). Degradation of Selected Pharmaceuticals in Coastal Wetland Water and Sediments. *Water Air Soil Pollut*, 1940(225), 1-9.
- Tong, X., Wang, X., He, X., Xu, K., & Mao, F. (2019). Effects of ofloxacin on nitrogen removal and microbial community structure in constructed wetland. *Science of the Total Environment*, 656, 503-511.
- Topal, M., Öbek, E., Uslu Şenel, G., & Arslan Topal, E. I. (2020). Removal of tetracycline antibiotic by *Lemna gibba* L. from aqueous solutions. *Water and Environment Journal*, 34(1), 37-44.

- Topal, M., Senel, G. U., Obek, E., & Arslan Topal, E. I. (2014). Removal of Tetracycline and the Degradation Products by *Lemna gibba* L. Exposed to Secondary Effluent. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33(3), 676-680.
- Topal, M., Uslu Şenel, G., Öbek, E., & Arslan Topal, E. I. (2016). Investigation of relationships between removals of tetracycline and degradation products and physico-chemical parameters in municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Management*, 173, 1-9.
- Türker, O. C., & Yakar, A. (2017). A hybrid constructed wetland combined with microbial fuel cell for boron (B) removal and bioelectric production. *Ecological Engineering*, 102, 411-421.
- Van Tran, T., Nguyen, D. T. C., Le, H. T. N., Bach, L. G., Vo, D. V. N., Hong, S. S., Phan, T. Q. T., & Nguyen, T. D. (2019). Tunable synthesis of mesoporous carbons from $\text{Fe}_3\text{O}(\text{BDC})_3$ for chloramphenicol antibiotic remediation. *Nanomaterials*, 9, 237.
- Vannini, A., Paoli, L., Vichi, M., Bačkor, M., Bačkorová, M., & Loppi, S. (2018). Toxicity of Diclofenac in the Fern *Azolla filiculoides* and the Lichen *Xanthoria parietina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(3), 430-437.
- Vermaat, J. E., & Khalid Hanif, M. (1998). Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Research*, 32(9), 2569-2576.
- Wang, J., He, M. F., Zhang, D., Ren, Z., Song, T. S., & Xie, J. (2017). Simultaneous degradation of tetracycline by a microbial fuel cell and its toxicity evaluation by zebrafish. *RSC Advances*, 7(70), 44226-44233.
- Wang, W., Zhang, Y., Li, M., Wei, X., Wang, Y., Liu, L., Wang, H., & Shen, S. (2020). Operation mechanism of constructed wetland-microbial fuel cells for wastewater treatment and electricity generation: A review. *Bioresource Technology*, 314, 123808.
- Wang, Y., Chen, C., Zhou, D., Xiong, H., Zhou, Y., Dong, S., & Rittmann, B. E. (2019). Eliminating partial-transformation products and mitigating residual toxicity of amoxicillin through intimately coupled photocatalysis and biodegradation. *Chemosphere*, 237, 124491.
- Wen, H., Zhu, H., Xu, Y., Yan, B., Shutes, B., Bañuelos, G., & Wang, X. (2021). Removal of sulfamethoxazole and tetracycline in constructed wetlands integrated with microbial fuel cells influenced by influent and operational conditions. *Environmental Pollution*, 272.

- Wen, H., Zhu, H., Yan, B., Xu, Y., & Shutes, B. (2020). Treatment of typical antibiotics in constructed wetlands integrated with microbial fuel cells: Roles of plant and circuit operation mode. *Chemosphere*, 250, 126252.
- Wu, H., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., Fan, J., & Liu, H. (2015). A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594-601.
- Xiao, L., Li, J., Lichtfouse, E., Li, Z., Wang, Q., & Liu, F. (2021). Augmentation of chloramphenicol degradation by *Geobacter*-based biocatalysis and electric field. *Journal of Hazardous Materials*, 410(October 2020), 124977.
- Xiong, Q., Hu, L. X., Liu, Y. S., Wang, T. T., & Ying, G. G. (2019). New insight into the toxic effects of chloramphenicol and roxithromycin to algae using FTIR spectroscopy. *Aquatic Toxicology*, 207(July 2018), 197-207.
- Xu, W., Yan, W., Li, X., Zou, Y., Chen, X., Huang, W., Miao, L., Zhang, R., Zhang, G., & Zou, S. (2013). Antibiotics in riverine runoff of the Pearl River Delta and Pearl River Estuary, China: Concentrations, mass loading and ecological risks. *Environmental Pollution*, 182, 402-407.
- Yadav, R. K., Chiranjeevi, P., Sukrampal, & Patil, S. A. (2020). Integrated drip hydroponics-microbial fuel cell system for wastewater treatment and resource recovery. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100392.
- Yao, B., Liu, Y., & Zou, D. (2019). Removal of chloramphenicol in aqueous solutions by modified humic acid loaded with nanoscale zero-valent iron particles. *Chemosphere*, 226, 298-306.
- Zhang, C., Deng, Y., Zheng, J., Zhang, Y., & Yang, L. (2019). Trends in Analytical Chemistry The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 517-537.
- Zhang, R., Zhang, G., Zheng, Q., Tang, J., Chen, Y., Xu, W., Zou, Y., & Chen, X. (2012). Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: Impacts of river discharge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 208-215.
- Zhang, S., Song, H. L., Yang, X. L., Huang, S., Dai, Z. Q., Li, H., & Zhang, Y. Y. (2017). Dynamics of antibiotic resistance genes in microbial fuel cell-coupled constructed wetlands treating antibiotic-polluted water. *Chemosphere*, 178, 548-555.



- Zhang, S., Song, H. L., Yang, X. L., Yang, Y. L., Yang, K. Y., & Wang, X. Y. (2016). Fate of tetracycline and sulfamethoxazole and their corresponding resistance genes in microbial fuel cell coupled constructed wetlands. *RSC Advances*, 6(98), 95999-96005.
- Zhao, S., Liu, X., Cheng, D., Liu, G., Liang, B., Cui, B., & Bai, J. (2016). Temporal–spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta, China. *Science of the Total Environment*, 569-570, 1350-1358.
- Zirena, F., Cahui, N., Tejedó, J. R., Alejandro, W., Nely, C., Quiróz, C., & Luiz, V. (2021). Occurrence of residues of veterinary antibiotics in water, sediment and trout tissue (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern area of Lake Titicaca, Peru. *Journal of Great Lakes Research*, 47, 1219-1227.



ANEXOS

ANEXO 1.

Figura 19

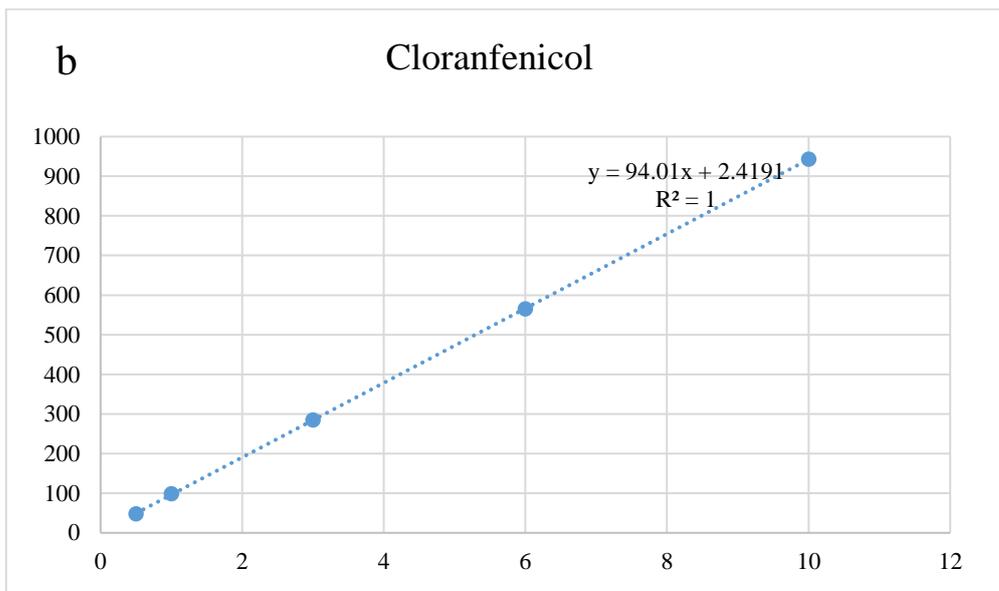
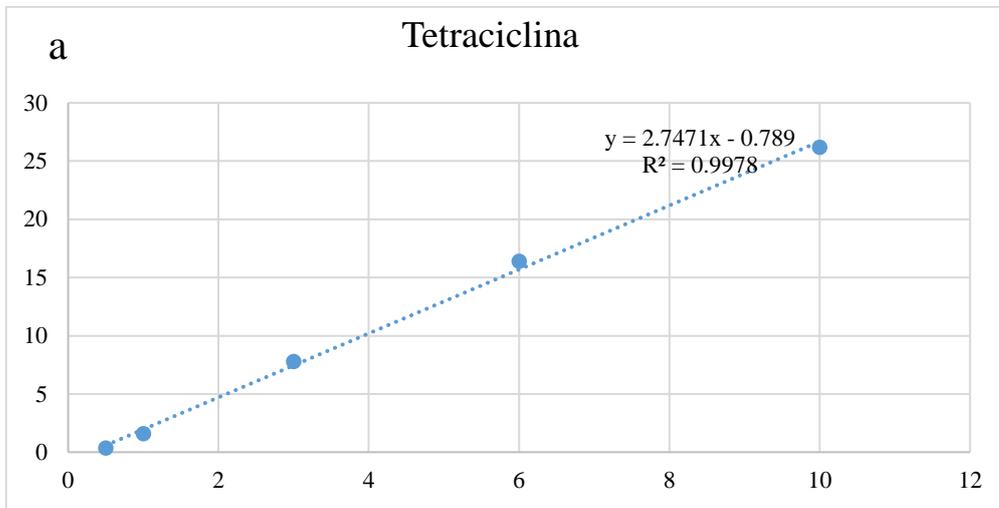
Validación del método de análisis. a. Añadiendo antibiótico al agua destilada para evaluar el porcentaje de recuperación en los cartuchos. b. Cogiendo cierta cantidad del estándar de antibióticos con una micropipeta.



ANEXO 2.

Figura 20

Curva de calibración para agua. a. para tetraciclina y b. Cloranfenicol.



ANEXO 3

Figura 21

Adecuación del método de análisis de antibióticos en plantas a través del método QueChers. a. Moliendo la muestra. b. Vortexando las muestras en los tuvos falcon. c. Centrifugando las muestras. d. Extrayendo el sobrenadante con una micropipeta.



ANEXO 4

Figura 22

Muestreo de aguas residuales en el efluente de la laguna de oxidación de el Espinar



ANEXO 5.

Figura 23

a. Instalación del experimento del humedal. b. Aleatorización de las unidades experimentales.



ANEXO 6.

Figura 24

a. Medición de la electricidad en los humedales artificiales. b. Registro de producción eléctrica.



b

	10/3/22	T° 27.0	11/3/22	T° 26	12/3/22	T° 24.3	13/3/22	T° 22.4	14/3/22	T° 8.5
	Amperios	Voltios								
1	0.190	0.078	0.020	0.038	0.025	0.045	0.062	0.050	0.008	0.010
2	-0.001	-0.038	0.000	-0.058	-0.004	-0.081	-0.025	-0.048	-0.002	-0.003
3	0.030	0.016	0.005	0.079	0.030	0.179	0.010	0.099	0.003	0.036
4	-0.008	-0.014	0.090	0.090	0.110	0.164	0.007	0.071	0.006	0.009
5	0.017	0.038	0.041	0.025	0.056	0.086	0.052	0.098	0.102	0.186
6	0.090	0.088	0.090	0.169	0.025	0.035	0.014	0.013	0.091	0.125
7	0.012	0.068	-0.013	-0.026	0.002	0.003	0.001	0.002	0.005	0.004
8	0.003	0.005	0.004	0.012	0.011	0.012	0.008	0.016	0.015	0.026
9	-0.015	-0.007	0.050	0.069	0.014	0.013	0.001	0.001	0.001	0.002
10	-0.489	-0.094	0.018	0.040	0.035	0.072	0.038	0.094	0.004	0.045
11	0.090	0.049	-0.002	0.001	0.005	0.007	0.061	0.080	0.070	0.108
12	0.056	0.039	0.006	0.009	0.032	0.048	-0.004	-0.011	0.005	0.008

ANEXO 7

Tabla 9

Datos del factor de bioconcentración de antibióticos en plantas.

<i>Lemna</i>		<i>Azolla</i>	
Tetraciclina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Cloranfenicol
0.03	0.37	0.01	0.24
0.03	0.42	0.14	0.45
0.01	0.42	0.02	0.24
0.04	0.40	0.18	0.42
0.02	0.41	0.03	0.29
0.08	0.57	0.23	0.58
0.01	0.22	0.01	0.26
0.03	0.30	0.13	0.41
0.06	0.42	0.14	0.42
0.06	0.42	0.08	0.43
0.02	0.26	0.02	0.34
0.01	0.27	0.02	0.45
0.03	0.40	0.05	0.33
0.02	0.40	0.07	0.36
0.02	0.39	0.07	0.42
0.02	0.41	0.06	0.39
0.01	0.37	0.04	0.40

ANEXO 8.

Tabla 10

Porcentaje de remoción de antibióticos y absorción en plantas

Tratam	TetAg	ClorAg	TetPt	ClorPt
1.00	100.00	99.93	3.46	0.46
1.00	100.00	100.00	3.09	0.50
1.00	99.45	100.00	2.16	0.31
2.00	100.00	97.84	1.54	0.01
2.00	100.00	99.97	4.09	0.00
2.00	100.00	99.75	0.58	0.00
3.00	100.00	99.62	3.57	0.81
3.00	100.00	100.00	5.67	0.47
3.00	100.00	100.00	4.74	0.69
4.00	100.00	100.00	3.14	0.44
4.00	100.00	100.00	2.66	0.29
4.00	100.00	99.32	2.83	0.38
5.00	100.00	99.92	1.30	0.05
5.00	100.00	100.00	2.08	0.08
5.00	100.00	99.96	1.28	0.07
6.00	100.00	99.46	1.12	0.00
6.00	100.00	99.59	1.15	0.07
6.00	100.00	99.33	1.32	0.00
7.00	100.00	98.74	1.36	0.00
7.00	100.00	100.00	1.10	0.00
7.00	100.00	99.56	0.78	0.00
8.00	100.00	100.00	1.30	0.07
8.00	100.00	98.66	1.54	0.00
8.00	100.00	99.80	1.82	0.07

- 1 Anexo 9
- 2 Tabla 11
- 3 Tabla de análisis de la varianza para el modelo generado por RSM. FO: primer orden;
- 4 TWI: interacción bidireccional; PQ: cuadrático puro

	Tetracycline in Lemna					Tetracycline in Azolla					Chloramphenicol in Lemna					Chloramphenicol in Azolla				
	Df	Su m Sq	Me an Sq	F val ue	Pr (> F)	Df	Su m Sq	Me an Sq	F val ue	Pr (> F)	Df	Su m Sq	Me an Sq	F val ue	Pr (> F)	Df	Su m Sq	Me an Sq	F val ue	Pr (> F)
FO(A, B, C)	3	10.594	356.49	15.15	0.0	3	68.9	22.4	15.59	0.00	3	11.02	36.7	16.4	0.0	3	25.59	85.3	13.5	0.0
TWI(A, B, C)	3	36.8	12.3	0.5	0.7	3	4.17	09.58	83.3	06.0	3	7.8	2.6	1.2	0.4	3	83.7	27.9	4.4	0.0
PQ(A, B, C)	3	53.26	177.56	75.5	0.0	3	22.8	76.04	5.01	0.03	3	18.16	60.5	26.9	0.0	3	61.71	205.7	32.6	0.0
Residuals	7	16.47	23.5			7	6.1	15.16			7	15.7	2.2			7	44.2	6.3		
Pure error	3	26.4	8.8			3	0.09	0.03			4	4.5	1.1			4	8.5	2.1		

5