



**UNIVERSIDAD UTE**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E  
INDUSTRIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y MANEJO  
DE RIESGOS NATURALES**

**EFFECTO DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA  
SOBRE VALORACIONES ALOMÉTRICAS Y COMPOSICIÓN  
MICROBIANA EN BIOFILTROS**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA AMBIENTAL**

**PUENTE MADRID MAITE CAMILA**

**DIRECTOR: ING. ROMMEL GRANJA  
CODIRECTOR: ING. ROBERTO GRANDA JARAMILLO**

**Quito, agosto 2020**

© Universidad UTE. 2020

Reservados todos los derechos de reproducción

# FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

## TRABAJO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1725577124
APELLIDO Y NOMBRES:	Puente Madrid Maite Camila
DIRECCIÓN:	Av. 6 de Diciembre y Julio Moreno N53B
EMAIL:	camipnt26@gmail.com
TELÉFONO FIJO:	2245032
TELÉFONO MOVIL:	0995362192

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EFECTO DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA SOBRE VALORACIONES ALOMÉTRICAS Y COMPOSICIÓN MICROBIANA EN BIOFILTROS
AUTOR O AUTORES:	Maite Puente
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Agosto 2020
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Ing. Rommel Granja
PROGRAMA	<b>PREGRADO</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b> <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales
RESUMEN: Mínimo 250 palabras	<p>Se tomó a <i>Schoenoplectus californicus</i> y <i>Eisenia foetida</i> dispuestas en biofiltros como objetos de investigación, para una posible aplicación en contaminación del agua. Este trabajo evaluó las características alométricas que estas especies mostraron ante el efecto de ibuprofeno, cafeína y diclorofenol que se adicionaron a los biofiltros, mismos</p>

que fueron considerados para identificación microbiana. Se analizó el comportamiento de *S. californicus* con la medición de su altura, número de hojas y clorofila de tipo *a* y *b*, en tanto para *E. foetida* se evaluó la densidad poblacional y el peso de estas en cada biofiltro. Los resultados indicaron que después de 16 semanas de monitoreo, tanto el comportamiento de *S. californicus* como el de *E. foetida* no presentaron valores fluctuantes significativos, es decir, las dos especies mostraron rangos de tolerancia estables ante la adición de los contaminantes. El análisis molecular microbiano se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS 3F/4R y 16S F/R, se realizó mediante secuenciación masiva paralela y se identificó a *Alphaproteobacterias* y *Actinobacterias* como los taxones dominantes entre las bacterias; mientras que *Sordariomycetes* fue el taxón más dominante entre hongos. Las variaciones que presentaron los microorganismos durante las semanas de adición de los contaminantes fue la disminución de población, en el caso de hongos, el filo de *Eurotiomycetes* redujo notablemente su número a 0,09% luego de ser añadido el contaminante y en las bacterias, los filos *Alphaproteobacterias* y *Actinobacterias* llegaron a 55% y 35% respectivamente. La población fúngica se mostró con un porcentaje de 77% en relación a la población bacteriana de 23%, indicando que los hongos tuvieron mejor asimilación y adaptabilidad tanto a los contaminantes como a parámetros ambientales de humedad, pH, temperatura, entre otros, que fueron factores críticos para la operatividad de los biofiltros.

<p><b>PALABRAS CLAVES:</b></p>	<p>Contaminantes emergentes, valoraciones alométricas, biofiltros, identificación molecular, microorganismos.</p>
<p><b>ABSTRACT:</b></p>	<p>Focused on water contamination due to emerging pollutants, <i>Schoenoplectus californicus</i> and <i>Eisenia foetida</i> arranged in biofilters were taken as research objects. This work evaluated the allometric characteristics of these species which were showed before the effect of ibuprofen, caffeine and dichlorophenol were added to the biofilters considered for microbial identification. The behavior of <i>S. californicus</i> was analyzed with the measurement of its height, number of leaves and chlorophyll type <i>a</i> and <i>b</i>, while for <i>E. foetida</i> population density and their weight in each biofilter were evaluated. The results indicated that after 16 weeks of monitoring, both the behavior of <i>S. californicus</i> and that of <i>E. foetida</i> did not present significant fluctuating values, that is, the two species showed stable tolerance ranges before the addition of contaminants. Microbial molecular analysis was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the ITS 3F / 4R and 16S F / R primers, was performed by parallel mass sequencing and <i>Alphaproteobacteria</i> and <i>Actinobacteria</i> were identified as the dominant taxa among the bacteria; while <i>Sordariomycetes</i> was the most dominant taxon among fungi. The variations that the microorganisms presented during the weeks of addition of the contaminants was the decrease in population, in the case of fungi, the <i>Eurotiomycetes</i> edge markedly reduced its number to 0.09% after the contaminant was added in the bacteria, the <i>Alphaproteobacteria</i> and <i>Actinobacteria</i> edges reached 55% and 35% respectively. The fungal</p>

	population was shown with a percentage of 77% in relation to the bacterial population of 23%, indicating that fungi had better assimilation and adaptability both to contaminants and to environmental parameters of humidity, pH, temperature, among others, which were critical factors for the operation of biofilters.
<b>KEYWORDS</b>	Emerging contaminants, allometric titrations, biofilters, molecular identification, microorganisms.

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.



---

PUENTE MADRID MAITE CAMILA

CI: 1725577124

## **DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN**

Yo, **PUENTE MADRID MAITE CAMILA**, CI 1725577124 autor/a del trabajo de titulación: **“EFECTO DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA SOBRE VALORACIONES ALOMÉTRICAS Y COMPOSICIÓN MICROBIANA EN BIOFILTROS”** previo a la obtención del título de **INGENIERO AMBIENTAL Y MANEJO DE RIESGOS NATURALES** en la Universidad UTE.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación de grado para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad UTE a tener una copia del referido trabajo de titulación de grado con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, Agosto de 2020



---

**PUENTE MADRID MAITE CAMILA**  
1725577124

## DECLARACIÓN JURAMENTADA POR EL AUTOR

Yo, Puente Madrid Maite Camila, portadora de la cédula N° 1725577124, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad UTE puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la Normativa institucional vigente.



---

PUENTE MADRID MAITE CAMILA  
1725577124



## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor, certifico que el presente trabajo de titulación que lleva por título **“Efecto de ibuprofeno, diclorofenol y cafeína sobre valoraciones alométricas y composición microbiana en biofiltros”** para aspirar al título de **Ingeniero Ambiental y Manejo de Riegos Naturales** fue desarrollado por **Puente Madrid Maite Camila**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y que dicho trabajo cumple con las condiciones requeridas para ser sometido a las evaluaciones respectivas de acuerdo a la normativa interna de la Universidad UTE.



---

Ing. Rommel Granja

**DIRECTOR DEL TRABAJO**

C.I. 1713707303

# CARTA DE CONFORMIDAD DE LA INSTITUCIÓN/EMPRESA AUSPICIANTE

Quito, 20 de agosto de 2020

MSc.  
Gloria Roldán  
**Coordinador de la Carrera de Ingeniería Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales**  
**Universidad UTE**  
Presente.-

De mi consideración:

Con un atento saludo me dirijo a usted, con la finalidad de indicar mi conformidad con la investigación "Efecto de ibuprofeno, diclorofenol y cafeína sobre valoraciones alométricas y composición microbiana en biofiltros" desarrollado por la señorita Maite Camila Puente Madrid, estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales; investigación que forma parte del proyecto "Estudio de la remoción de contaminantes emergentes usando residuos agroindustriales dentro de procesos de filtración como alternativa de saneamiento" desarrollado por la carrera de Ingeniería Ambiental de la Escuela Politécnica Nacional.

El desarrollo de este proyecto cumplió con los objetivos y requerimientos establecidos inicialmente y tuvo una duración de 16 semanas.

Agradezco cordialmente su atención. Recibe conforme el proyecto de investigación:



**Ing. Cristina Almeida, MSc.**  
**Docente de la Facultad de Ingeniería Mecánica**  
**Escuela Politécnica Nacional**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, para ellos todo. Mis triunfos son fruto de su amor, educación, apoyo y cuidado hacia mí.

A mis hermanos, su ejemplo de perseverancia y disciplina me motiva a ser mejor y cumplir con lo que me proponga.

Al Ing. Roberto Granda, quien supo guiarme con mucha paciencia y sabiduría durante todo el proceso de elaboración de este proyecto.

A la Ing. Cristina Almeida, quien compartió su conocimiento conmigo y me brindó la oportunidad de ser partícipe en este trabajo investigativo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
2.1 CONSTRUCCIÓN DE BIOFILTROS .....	12
2.2 DESARROLLO DEL ESTUDIO .....	13
2.3 ANÁLISIS ALOMÉTRICO: MATERIAL VEGETAL Y MATERIAL BIOLÓGICO .....	14
2.3.1. MATERIAL VEGETAL .....	14
2.3.2. MATERIAL BIOLÓGICO (LOMBRICES).....	15
2.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICRORGANISMOS .....	15
2.4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LOS BIOFILTROS .....	15
2.4.2. ANÁLISIS MOLECULAR .....	15
2.4.3. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO DE BACTERIAS Y HONGOS .....	16
2.4.4. AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	16
2.4.5. ELECTROFORESIS.....	16
2.4.6. SECUENCIACIÓN.....	16
2.4.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	17
2.5. OBTENCIÓN DE RESULTADOS .....	17
2.5.1. DATOS ALOMÉTRICOS: MATERIAL VEGETAL Y MATERIAL BIOLÓGICO .....	17
2.5.2. DATOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR.....	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
3.1. RESULTADOS ALOMÉTRICOS PARA <i>Schoenoplectus californicus</i> y <i>Eisenia foetida</i> .....	18
3.1.1. CRECIMIENTO APICAL DE <i>Schoenoplectus californicus</i> .....	18
3.1.2. COMPORTAMIENTO DE CLOROFILA a Y b PARA <i>Schoenoplectus californicus</i> .....	19
3.1.3 NÚMERO DE HOJAS DE INDIVIDUOS DE <i>Schoenoplectus californicus</i> .....	21
3.1.4 <i>Eisenia foetida</i> .....	21
3.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR .....	22

3.2.1. OBTENCIÓN DE ADN.....	23
3.2.2. OBTENCIÓN DE SECUENCIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA .....	25
3.2.3. INFLUENCIA DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN EL RESULTADO TAXONÓMICO DE BACTERIAS.....	26
3.2.4. INFLUENCIA DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN EL RESULTADO TAXONÓMICO DE HONGOS.....	30
3.2.5. EFECTO DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN LA DIVERSIDAD MICROBIANA .....	31
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>34</b>
4.1. CONCLUSIONES.....	34
4.2. RECOMENDACIONES.....	35
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fármacos detectados en agua para consumo humano en otros países.....	6
<b>Tabla 2.</b> Eficiencia depuradora de vermifiltros .....	10
<b>Tabla 3.</b> Número de hojas de individuos <i>Schoenoplectus californicus</i> para cada biofiltro.....	21
<b>Tabla 4.</b> Cantidad de lombrices por filtro.....	22
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones del primer, segundo y tercer muestreo de acuerdo a las lecturas en nanodrop. ....	24
<b>Tabla 6.</b> Primer muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático. .	25
<b>Tabla 7.</b> Segundo muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático. ..	25
<b>Tabla 8.</b> Tercer muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático. ..	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Contaminantes emergentes más tóxicos .....	4
<b>Figura 2.</b> Componentes de humedad artificial.....	9
<b>Figura 3.</b> Características del modelo experimental .....	13
<b>Figura 4.</b> P: medio filtrante y macrófitas ( <i>Schoenoplectus californicus</i> ); LP: medio filtrante, macrófitas ( <i>Schoenoplectus californicus</i> ) y lombrices ( <i>Eisenia foetida</i> ).....	18
<b>Figura 5.</b> Comportamiento de Clorofila a de individuos <i>Schoenoplectus californicus</i> .....	19
<b>Figura 6.</b> Comportamiento de Clorofila b de individuos <i>Schoenoplectus californicus</i> .....	20
<b>Figura 7.</b> Calidad de las secuencias obtenidas para el primer muestreo...	23
<b>Figura 8.</b> Calidad de las secuencias obtenidas para el segundo muestreo.	23
<b>Figura 9.</b> Calidad de las secuencias obtenidas para el tercer muestreo. ....	24
<b>Figura 10.</b> Porcentajes de taxones bacteriales correspondientes a los biofiltros LP1, LP2 y LP3.....	27
<b>Figura 11.</b> Porcentajes de taxones fúngicos correspondientes a los biofiltros LP1, LP2 y LP3.....	30
<b>Figura 12.</b> Porcentaje comparativo de la población existente de hongos y bacterias en las muestras analizadas de los biofiltros LP1, LP2 y LP3. ....	32

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1. COLUMNAS DE BIOFILTRACIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO 2. ANÁLISIS CLOROFÍLICO .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 3. ANÁLISIS MOLECULAR.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 4. RESULTADOS ANÁLISIS MOLECULAR.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 5. ANÁLISIS DE PLAGIO.....</b>	<b>56</b>



## RESUMEN

Se tomó a *Schoenoplectus californicus* y *Eisenia foetida* dispuestas en biofiltros como objetos de investigación, para una posible aplicación en contaminación del agua. Este trabajo evaluó las características alométricas que estas especies mostraron ante el efecto de ibuprofeno, cafeína y diclorofenol que se adicionaron a los biofiltros, mismos que fueron considerados para identificación microbiana. Se analizó el comportamiento de *S. californicus* con la medición de su altura, número de hojas y clorofila de tipo *a* y *b*, en tanto para *E. foetida* se evaluó la densidad poblacional y el peso de estas en cada biofiltro. Los resultados indicaron que después de 16 semanas de monitoreo, tanto el comportamiento de *S. californicus* como el de *E. foetida* no presentaron valores fluctuantes significativos, es decir, las dos especies mostraron rangos de tolerancia estables ante la adición de los contaminantes. El análisis molecular microbiano se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS 3F/4R y 16S F/R, se realizó mediante secuenciación masiva paralela y se identificó a *Alphaproteobacterias* y *Actinobacterias* como los taxones dominantes entre las bacterias; mientras que *Sordariomycetes* fue el taxón más dominante entre hongos. Las variaciones que presentaron los microorganismos durante las semanas de adición de los contaminantes fue la disminución de población, en el caso de hongos, el filo de *Eurotiomycetes* redujo notablemente su número a 0,09% luego de ser añadido el contaminante y en las bacterias, los filos *Alphaproteobacterias* y *Actinobacterias* llegaron a 55% y 35% respectivamente. La población fúngica se mostró con un porcentaje de 77% en relación a la población bacteriana de 23%, indicando que los hongos tuvieron mejor asimilación y adaptabilidad tanto a los contaminantes como a parámetros ambientales de humedad, pH, temperatura, entre otros, que fueron factores críticos para la operatividad de los biofiltros.

**Palabras Clave:** contaminantes emergentes, valoraciones alométricas, biofiltros, identificación molecular, microorganismos.

## ABSTRACT

Focused on water contamination due to emerging pollutants, *Schoenoplectus californicus* and *Eisenia foetida* arranged in biofilters were taken as research objects. This work evaluated the allometric characteristics of these species which were showed before the effect of ibuprofen, caffeine and dichlorophenol were added to the biofilters considered for microbial identification. The behavior of *S. californicus* was analyzed with the measurement of its height, number of leaves and chlorophyll type *a* and *b*, while for *E. foetida* population density and their weight in each biofilter were evaluated. The results indicated that after 16 weeks of monitoring, both the behavior of *S. californicus* and that of *E. foetida* did not present significant fluctuating values, that is, the two species showed stable tolerance ranges before the addition of contaminants. Microbial molecular analysis was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the ITS 3F / 4R and 16S F / R primers, was performed by parallel mass sequencing and *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* were identified as the dominant taxa among the bacteria; while *Sordariomycetes* was the most dominant taxon among fungi. The variations that the microorganisms presented during the weeks of addition of the contaminants was the decrease in population, in the case of fungi, the *Eurotiomycetes* edge markedly reduced its number to 0.09% after the contaminant was added in the bacteria, the *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* edges reached 55% and 35% respectively. The fungal population was shown with a percentage of 77% in relation to the bacterial population of 23%, indicating that fungi had better assimilation and adaptability both to contaminants and to environmental parameters of humidity, pH, temperature, among others, which were critical factors for the operation of biofilters.

**Keywords:** Emerging contaminants, allometric titrations, biofilters, molecular identification, microorganisms.

## **1. INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

La UNESCO destaca al agua dulce como uno de los recursos más importantes para la humanidad, un bien transversal a todas las actividades sociales, económicas y ambientales (UNESCO, 2017). Actualmente uno de los desafíos más grandes a nivel mundial es garantizar la calidad de los recursos hídricos, puesto que se vierten a los ecosistemas acuáticos, desechos industriales y urbanos a través de las aguas residuales. A nivel mundial, más del 80% de estas aguas se vierten sin tratamiento, contaminando el agua de ríos, lagos, zonas costeras y otro tipo de cuerpos hídricos. De acuerdo a un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud se indicó que 5,8% de la población de Latinoamérica estaba expuesta a aguas que no cumplían con los parámetros establecidos por la misma OMS (OMS, 2009).

En Quito, capital del Ecuador, las aguas residuales son de aproximadamente ciento cincuenta y dos milímetros cúbicos por año según una encuesta realizada por la EPMAPS en 2015, de las cuales solo el 5% llegan a ser tratadas por una planta depuradora. De acuerdo al informe de la Organización de las Naciones Unidas en 2006, sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo, la mala calidad del agua tiene consecuencias económicas, frenando su desarrollo y provocando efectos negativos en la salud humana y medio ambiental de una nación.

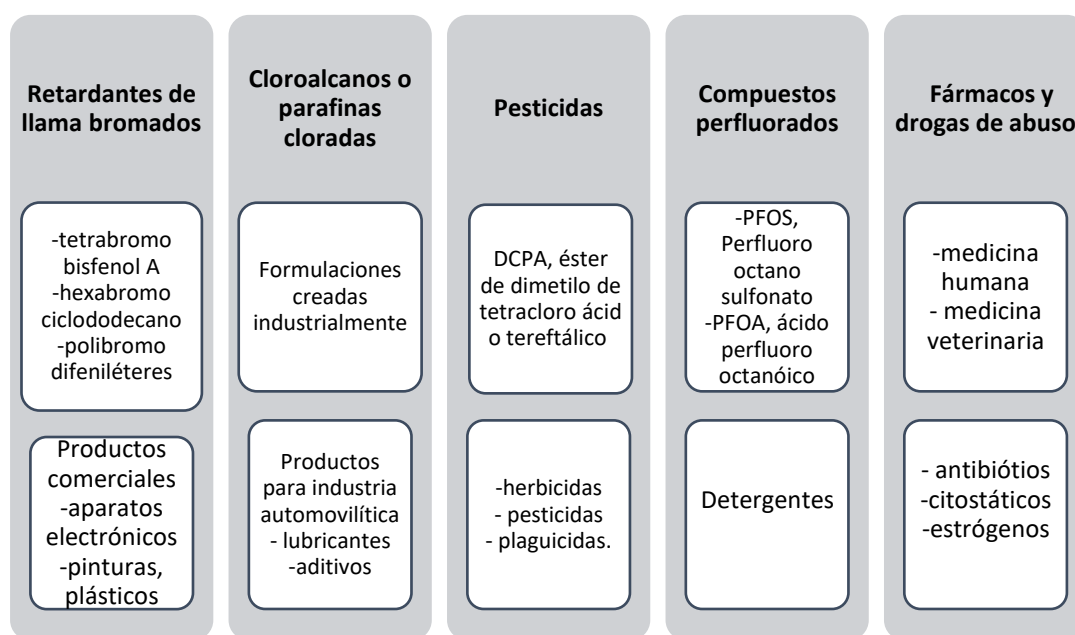
Estos ecosistemas acuáticos se han visto afectados en gran medida por los residuos provenientes de compuestos farmacéuticos, productos de cuidado personal, cosméticos, entre otros, denominados en conjunto como contaminantes emergentes (Zacarías, et al., 2017), siendo un problema sanitario y ambiental que aún no está lo suficientemente investigado ni regulado. Estos contaminantes no suelen ser persistentes; sin embargo, son solubles en agua por lo que son capaces de penetrar en todas las etapas del ciclo del agua (Peña & Castillo, 2015). Estos se han acumulado en los ecosistemas sin necesidad de presentar concentraciones muy altas para causar daño, pueden provocar factores de magnificación trófica, razón por la cual los organismos se han visto afectados de diversas maneras (Haddad, Scott, Burket, & Brooks, 2016).

La preocupación por dichos contaminantes radica en los hábitos de consumo en la sociedad que vierte estas sustancias a partir de aguas residuales después de su eliminación incompleta en las plantas de tratamiento y se mantienen en los ecosistemas, siendo esta contaminación uno de los problemas ambientales más significativos que afectan a nuestra vida cotidiana (Sánchez Ramírez, 2018).

Reinoso, Serrano y Orellana (2017) mencionan que en la mayoría de países de América Latina no existe aún una normativa legal específica que regule este tipo de contaminantes por lo que la disponibilidad de métodos para su análisis es casi nula o limitada; mientras que en Europa, la Directiva del

Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, en 2013, amplió una lista de sustancias prioritarias en el agua, en donde, veinte y uno de las cuarenta y cinco sustancias, son identificadas como peligrosas, reforzando la necesidad de implementar nuevas y mejores alternativas para la eliminación de estas (Gaffney, Cardoso, Rodrigues, Benoliel, & Almeida, 2014).

En las últimas décadas el estudio de los contaminantes emergentes ha ido en aumento, debido a su demandante consumo; estos presentan una amplia variedad de productos de uso diario como domésticos. En la figura 1 se indican algunos de los tipos de contaminantes emergentes que exigen mayor atención debido a las consecuencias eco toxicológicas que estos representan en el ambiente.



**Figura 1.** Contaminantes emergentes más tóxicos (Barcelo, 2008)

De todos los contaminantes emergentes, los productos provenientes de industrias farmacéuticas han sido los que causan mayor preocupación por el autoconsumo que se ha venido dando los últimos años, de igual manera pasa con los antibióticos y drogas de abuso; el consumo de estos se ha estimado en miles de toneladas por año según una investigación de Sánchez en 2018, acerca de los impactos de los contaminantes emergentes.

En cuanto a las afectaciones hacia especies faunísticas, algunos antiinflamatorios, tales como, el ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno han causado efectos inhibidores en el desarrollo sobre algunas funciones en ciertos animales vertebrados e invertebrados, mientras que antibióticos como la tetraciclina y la oxitetraciclina perturban el crecimiento y reproducción de algunos organismos (Peñate, Haza, & Delmas, 2009). Así también los efectos

dañinos al medio ambiente por el uso de drogas de abuso, como la cafeína, la cual, a nivel global, su presencia en ecosistemas está directamente relacionada con la descarga de aguas residuales municipales (Camacho, et al., 2012).

El ibuprofeno es uno de los antiinflamatorios más consumidos e importantes en el mundo, mismo que se encuentra dentro de la lista “*Essential Drugs List*” de la Organización Mundial de la Salud que indica su producción masiva universal (Behera & Park, 2011). En 1984 fue aprobada su venta sin necesidad de una prescripción médica, por tanto, sus ventas se han triplicado en América del Norte y Latinoamérica (Sabri, Hanna, & Yargeau, 2012).

La acción analgésica que causa en el cuerpo este tipo de fármaco es la inhibición de la síntesis de compuestos relacionados en la respuesta inflamatoria (Sabri, Hanna, & Yargeau, 2012), es decir, bloquea la producción y la liberación de sustancias químicas del cuerpo que causan dolor e inflamación. El ibuprofeno es muy utilizado para aliviar síntomas como: cefaleas (dolores de cabeza), dolores postquirúrgicos, mialgias, entre otros, así como también cuadros inflamatorios, los más comunes en artritis; además, ha sido identificado como uno de los fármacos más comunes en plantas de tratamiento de aguas residuales y otros cuerpos hídricos (Sabri, Hanna, & Yargeau, 2012).

La movilidad o efectos del ibuprofeno en el ambiente puede llegar a ser tóxico por su facilidad de bioacumularse ya que tiene un bajo metabolismo y absorción en el cuerpo humano (Behera & Park, 2011), es decir, el organismo solo es capaz de metabolizar un 90% de ibuprofeno ingerido, mientras que el 10% restante es la tasa de excreción de sus ingredientes activos sin metabolizar, mismos que se liberan a través de la orina y heces de la persona en forma de metabolitos solubles en agua (Behera & Park, 2011).

Una vez en la planta de tratamiento, los medicamentos y sus metabolitos pueden degradarse, haciéndolo parcialmente o resistiéndose a los procesos de tratamiento permaneciendo sin cambios; así como también las drogas pueden degradarse a través de procesos bióticos y abióticos (oxidación, hidrólisis o fotólisis) (Gaffney, Cardoso, Rodrigues, Benoliel, & Almeida, 2014). La mayoría de investigaciones se han realizado en países de Europa, EE.UU y Asia. La tabla 1 presenta un resumen de los medicamentos más comunes detectados en el agua para consumo humano, donde se observa las concentraciones respectivas.

**Tabla 1.** Fármacos detectados en agua para consumo humano en otros países.

<b>Tipo de Fármaco</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Concentración máxima detectada (ng/L)</b>	<b>País</b>
<b>Antibióticos</b>	Eritromicina	4,9	EE.UU
	Sulfametoxazol	22	Holanda
		3,0	EE.UU
	Tilosina	1,7	Italia
<b>Anticonvulsivos</b>	Carbamazepina	140-258	EE.UU
		43	Francia
		60	Alemania
	Fenitoína	1,3	EE.UU
<b>Antiinflamatorios</b>	Diclofenaco	6-35	Francia
		2,5	Alemania
	Ibuprofeno	3	Alemania
		0,6	Francia
		8,5	Finlandia
		1350	EE.UU
	Cetoprofeno	8,0	Finlandia
		3,0	Francia
	Fenazona	250-400	Alemania
	Propifenazona	80-240	Alemania
<b>Psico-estimulantes</b>	Cafeína	60-119	EE.UU
		22,9	Francia

Adaptado de (Gaffney, Cardoso, Rodrigues, Benoliel, & Almeida, 2014).

Sustancias psicoactivas como la cafeína también están presentes en aguas residuales, ya que se consume en forma de té, café, bebidas de chocolate, algunos medicamentos y en el tabaco (Peeler & Opsahl, 2006). De acuerdo a Peeler y Opsahl (2006) una persona puede consumir en promedio de 80 a 400 mg de cafeína diariamente.

En Ecuador, Voloshenko-Rossin y colaboradores (2015) analizaron la concentración de algunos contaminantes emergentes en los ríos San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas, los autores reportaron la mayor concentración de cafeína en el Río Machángara Norte. La presencia de cafeína en efluentes no tratados de aguas residuales puede llegar a ser perjudicial para los ecosistemas aledaños a su descarga ya que puede producir un efecto inhibitorio en los microorganismos que se encuentran en los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Thangaraj, Naina, Siddharth, & Suneetha, 2013).

La cafeína en altas concentraciones afecta a la tasa de crecimiento de algunos microorganismos, como es el caso de la bacteria *E. coli* (Thangaraj, Naina, Siddharth, & Suneetha, 2013) y cuando las concentraciones son iguales o superiores a mil miligramos por litro inhibe el crecimiento de otro tipo de

especies microbianas (Gaula & Donegan, 2015). Sin embargo, existe estudios que han demostrado que existe un alto rango de remoción de cafeína por acción microbiológica en las plantas de tratamiento, donde su efectividad de remoción ha sido de 97% (Voloshenko-Rossin, et al., 2015).

El alto consumo y uso generalizado de productos agroindustriales como los compuestos organoclorados, también ha causado mucha preocupación en el ámbito ambiental, ya que al ser compuestos persistentes y altamente solubles en agua, su presencia en aguas residuales industriales y urbanas ha originado problemas graves de contaminación. La utilización y manejo de herbicidas, pesticidas, fungicidas, conservantes de madera, pintura, retardantes de llama, solventes, entre otros ha hecho que los residuos provenientes de estos productos se acumulen en ecosistemas acuáticos interfiriendo en el metabolismo de los seres vivos (Ratola, Botelho, & Alves, 2003).

Los clorofenoles son compuestos extremadamente tóxicos con propiedades carcinógenas, mutagénicas y teratogénicas (defecto congénito durante la gestación del feto). Un ejemplo de compuestos clorofenólicos es el 2,4 diclorofenol (2,4 DCP) que es usado ampliamente en la producción de ácido pentaclorofenol (PCP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (Ratola, Botelho, & Alves, 2003) mismos que son utilizados principalmente en la preparación de herbicidas ácidos y pesticidas. Una característica de estos compuestos es que pueden entrar al medio ambiente durante su producción o cuando se aplican como herbicidas/pesticidas. La mayoría de estos que son liberados en el medio ambiente va al agua y en muy pocas cantidades al aire (Puyol, 2010).

De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) (2003), el límite legal máximo para pentaclorofenol (PCP) y diclorofenol (DCP) en agua potable es de un gramo por litro. El 2,4 DCP se encuentra dentro de la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA y está considerado como uno de los compuestos tóxicos más peligrosos que la misma US-EPA recomienda precaución en su manipulación, principalmente debido a su toxicidad en contacto con la piel.

La diversidad de orígenes de compuestos clorofenólicos ocasiona que puedan contaminar tanto aguas residuales como cauces naturales y aguas subterráneas, por eso desde hace décadas se ha venido investigando varias tecnologías y técnicas para eliminar o disminuir las concentraciones en el agua de clorofenoles (Puyol, 2010).

Una de las técnicas más usadas de depuración para este tipo de contaminantes emergentes (fármacos, drogas de abuso y clorofenoles) son por medio de biofiltración para su detección y eliminación (Carrasco, et al., 2017). Los biofiltros son sistemas no convencionales, de fácil aplicación y bajo costo (de acuerdo al número de habitantes). La composición de los biofiltros



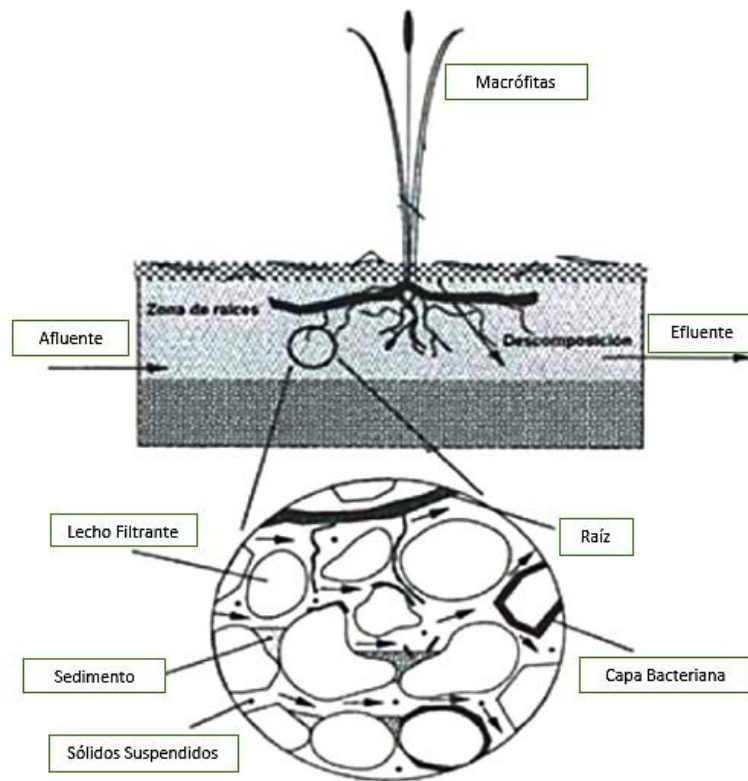
se centra en que están combinados por un lecho filtrante y un componente biótico como microorganismos, plantas y/o lombrices; el lecho filtrante actúa como soporte para micro y/o macro organismos y puede ser de origen orgánico e inorgánico (Garzón, Buelna, & Moeller, 2012).

El aprovechamiento del uso de biofiltros depuradores se da principalmente por la acción de microorganismos como una de las más importantes alternativas de tratamiento (Garzón, et al., 2018). Para estos procesos de biodegradación, los microorganismos se adaptan de manera selectiva a través de la bioaumentación, con el fin de mejorar la capacidad de degradación de la población microbiana (Sarango & Sánchez, 2016). Su eficiencia depende en gran medida de los cultivos de microorganismos que proliferan en el medio del lecho del filtro; tanto bacterias y hongos son muy utilizados para la biodegradación de estos contaminantes.

La biofiltración, favorece la proliferación de microorganismos permitiendo la adsorción y absorción de ciertos contaminantes. Estos sistemas biológicos han demostrado que se mantiene naturalmente el desarrollo de cepas de hongos y bacterias que se alimentan de los residuos a eliminar haciendo del sistema autoregurable (Liñan, 2015).

En la última década, estos sistemas biológicos han ido creciendo de manera exponencial ya que han demostrado, de acuerdo a estudios, que retienen incluso sustancias que no han sido depuradas por sistemas clásicos de tratamiento. En el caso de herbicidas y plaguicidas, la biofiltración actúa eficientemente, tanto en la disminución del contaminante en suelos como en su aplicación, técnica que no necesita de presupuesto muy elevado para implementarla (Castillo, Romero, & Nogales, 2013).

De acuerdo a la tasa de filtración, es decir, la velocidad en que pasa el agua por el medio filtrante, estos pueden ser lentos o rápidos (Payán Gomez, 2016). La combinación de macro organismos (lombrices) y plantas junto con micro organismos (bacterias/hongos) ayudan a acelerar el proceso de estabilización de la materia orgánica. Esta combinación es un tipo de biofiltro, conocido como biofiltro híbrido, estos ayudan al crecimiento de la población microbiana junto con la aceleración de la descomposición de contaminantes orgánicos proporcionando una mejor eficiencia en el proceso de depuración del biofiltro (Garzón, Buelna, & Moeller, 2012). La presencia de materia vegetal en este tipo de tratamientos ha ayudado mucho a la remoción de sustancias tóxicas (Serrano, et al., 2017), ya que pueden ser absorbidas para luego ser metabolizadas por las plantas que crecen sobre el sustrato, siendo a su vez las raíces una interfaz facilitadora del crecimiento de microorganismos apresurando la degradación de compuestos (Albaluz, Prieto, Cárdenas, & Bernal, 2016). En el gráfico 2, se presentan los componentes característicos que suele tener el lecho filtrante durante el paso de las aguas residuales pretratadas en un biofiltro horizontal.



**Figura 2.** Componentes de humedad artificial.  
(WSP-LAC, 2006)

Las plantas más utilizadas para este tipo de sistemas son *Schoenoplectus californicus* llamada también junco o totora, son plantas acuáticas muy comunes en esteros o pantanos. Una característica importante es que es una especie que ha demostrado tener un nivel alto en depuración de aguas residuales debido a su eficiencia en remoción de las mismas (Albaluz, Prieto, Cárdenas, & Bernal, 2016). La totora suele ser muy usada en humedales y de acuerdo a trabajos de investigación de diferentes universidades con este tipo de planta, se ha podido comprobar que los resultados obtenidos en cuanto a remoción de metales pesados, nitrógeno, fosfato, fósforo, coliformes y bacterias han sido muy satisfactorios (Albaluz, Prieto, Cárdenas, & Bernal, 2016). Este tipo de especie vegetal tiene la capacidad de reproducción alta, debido a que sus rizomas conservan la característica de brotar y crecer, aun perdiendo la biomasa aérea; además de intervenir en la absorción de contaminantes del sustrato y almacenar reservas de agua y nutrientes (Blanco, 2018).

Existe otro tipo de biofiltros llamados vermifiltros, cuya característica principal es la utilización de lombrices; estos biofiltros aprovechan la capacidad detritívora de las lombrices (obtienen su alimentación de detritos o materia orgánica en descomposición) que ingieren, trituran y digieren los residuos orgánicos que son descompuestos gracias a sus enzimas digestivas y la microflora anaeróbica y aeróbica presente en el interior de su intestino (Edwards, 1988).

Microorganismos y lombrices crean interacciones complejas, donde los microorganismos proporcionan alimento a las lombrices y estas a su vez determinan la estructura y funcionamiento de las poblaciones microbianas del residuo (Aira, Monroy, & Domínguez, 2007). En la Tabla 2 se puede apreciar la eficiencia de remoción de los vermifiltros en diferentes parámetros, de acuerdo a estudios previos realizados.

**Tabla 2.** Eficiencia depuradora de vermifiltros

<b>Parámetros</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
<b>DQO</b>	92
<b>DBO</b>	99
<b>SST (Sólidos Totales)</b>	97

(Cardoso, Ramírez, Garzón, & Zúñiga, 2014)

Las lombrices más usadas para este tipo de sistemas de vermicomposición son las lombrices rojas californianas (*Eisenia foetida*), es la especie más usada por su cumplimiento como productoras de humus, que es una sustancia sin olor producto de sus excrementos que presentan nitrógeno, potasio, fósforo, calcio, entre otros nutrientes para convertir la materia orgánica en un mejorador del suelo y fertilizante orgánico (Vásquez, 2017). De acuerdo a Domínguez y Gómez (2010), estas lombrices son muy utilizadas por su alta tasa de consumo, digestión y asimilación de materia orgánica, debido a su adaptabilidad alta en condiciones ambientales variables, además, el uso de estas en sistemas de vermicomposición mejora la calidad y diversidad microbiana por actividades enzimáticas entre lombrices y descomposición de materia orgánica (Huang, Li, Wei, Chen, & Fu, 2013).

La identificación molecular de cepas bacterianas y fúngicas en sistemas de biofiltración ha ayudado mucho en el análisis del potencial degradativo de los microorganismos para compuestos tóxicos (Estevinho, Martins, Ratola, Alves, & Santos, 2007). Una de las técnicas más usadas para identificación microbiana a nivel molecular es la Secuenciación Masiva Paralela (NGS) Next Generation Sequencing, por sus siglas en inglés, es un tipo de secuenciación que ha surgido hace algo más de una década y ha revolucionado el campo investigativo permitiendo obtener información genómica de cientos de miles de moléculas de ADN en un solo ensayo o muestra (Hernández, Quijada, & Rodríguez, 2019), esta técnica incluye la extracción del ADN de la muestra o aislado, la preparación de las librerías, es decir, la preparación de los fragmentos que van a ser secuenciados, la secuenciación propiamente dicha, el análisis bioinformático e interpretación de los resultados.

Para la secuenciación bacteriana, se basa en el gen 16S, es decir, del gen que codifica la subunidad menor que el ribosoma (16S ARNr), este gen contiene más de mil pares de bases dependiendo de la especie bacteriana y sobre estas bases se han determinado muchas combinaciones de primers o iniciadores que son cadenas de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN (Caporaso, et al., 2011); en tanto, para la secuenciación fúngica se basa en el gen 18S, 28S o 5,8S dependiendo de las especies de hongos, donde los primers utilizados suelen ser a partir de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) por sus siglas en inglés, que son separadores internos de las secuencias para la transcripción (Kurtzman, 2014). Los primers permiten amplificar un fragmento del ADN de forma inespecífica en todas las especies tanto bacterianas como fúngicas y a su vez realizar la identificación inequívoca de cualquier bacteria u hongo, ya que la secuenciación de la región interna es característica de cada especie (Hernández, Quijada, & Rodríguez, 2019).

El ADN extraído a partir de la muestra es analizado y amplificado por PCR que es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Mullis, 1985), es un método *in vitro* de síntesis de ADN; esta técnica de biología molecular es específica, sensible y variable para la detección de cantidades demasiado pequeñas o ínfimas de ADN facilitando su identificación. Esta reacción consta de varios ciclos repetitivos, la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN con los primers; la temperatura durante este proceso juega un papel importante ya que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs (Baumforth, Nelson, Digby, & Murray, 2004).

La utilización de secuenciación masiva ha permitido la reducción de costes y el tiempo de análisis, así mismo, se puede conocer la situación de la comunidad microbiana en el nicho ecológico estudiado sin necesidad de aislar microorganismos (Hernández, Quijada, & Rodríguez, 2019). La identificación y caracterización del microbiota en sistemas de tratamiento de aguas es importante si se quiere analizar qué tipos de microorganismos están relacionados y son responsables directamente con la remoción de algún contaminante (Mir-Tutusaus, et al., 2017).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de ibuprofeno, 2,4 diclorofenol y cafeína sobre valoraciones alométricas y composición microbiana en biofiltros. Por lo que, se propusieron los siguientes objetivos específicos: analizar el efecto de contaminantes sobre las valoraciones alométricas en los biofiltros; identificar molecularmente especies de cepas o consorcios de microorganismos degradadores de contaminantes emergentes a partir de muestras de biofiltros y analizar la influencia de los contaminantes ibuprofeno, 2,4 diclorofenol y cafeína en la diversidad microbiana de los biofiltros.

## **2.METODOLOGÍA**

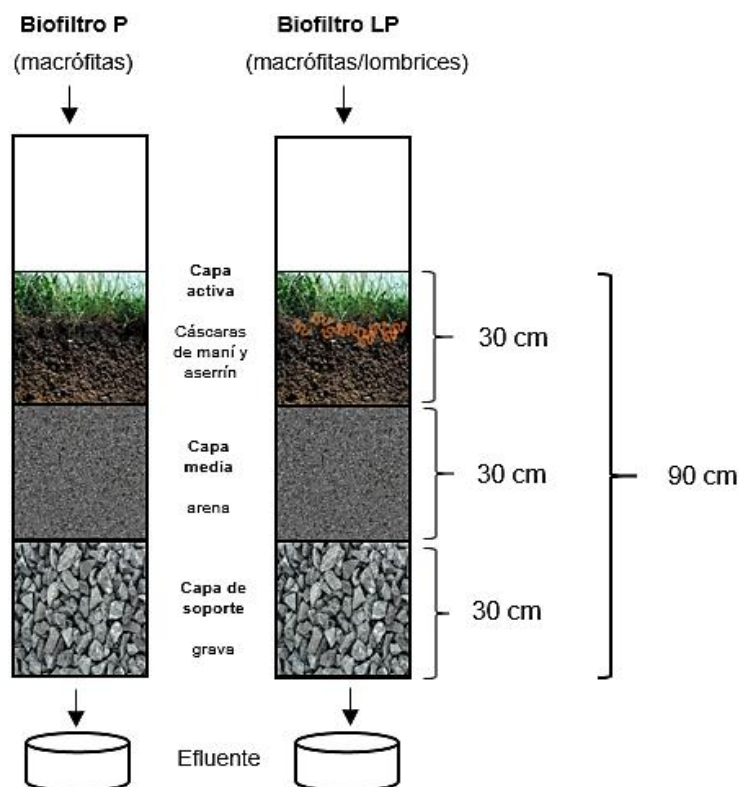
# METODOLOGÍA

## 2.1 CONSTRUCCIÓN DE BIOFILTROS

Los biofiltros fueron montados previamente en el Cuerpo de Ingenieros del Ejército ubicado en la Escuela Politécnica Nacional. Las columnas de biofiltración fueron operadas con agua residual doméstica sintética creada en laboratorio, como plan piloto para su estudio. Se construyeron de acuerdo a la metodología de Tejedor (2019), en donde se utilizaron botellas de plástico de 12 cm de diámetro con una altura de 90 cm para cada biofiltro. Estos fueron forrados con fundas plásticas color negro, evitando así el crecimiento de algas dentro de los filtros; las columnas estuvieron constituidas de tres capas: la primera, capa de soporte formada por grava (2,5 cm de diámetro), la segunda la capa media constituida por arena (0,1 a 0,2 cm de diámetro) y la tercera la capa activa compuesta por cáscara de maní y aserrín (25% de cáscara de maní y 75% de aserrín). La tipología de los biofiltros fue la siguiente:

- Biofiltro P: humedal formado con medio filtrante y material vegetal (*Schoenoplectus californicus*)
- Biofiltro LP: biofiltro híbrido constituido por medio filtrante (cáscara de maní y aserrín), material vegetal (*Schoenoplectus californicus*) y material biológico (*Eisenia foetida*).

En el gráfico 3 se observan las características del modelo experimental de los biofiltros.



**Figura 3.** Características del modelo experimental

Las columnas estuvieron dispuestas como P1, P2, P3, LP1, LP2 y LP3. Los tres últimos fueron los filtros a los que se les adicionó los contaminantes emergentes utilizados en la presente investigación, LP1 (ibuprofeno), LP2 (cafeína) y LP3 (diclorofenol).

## 2.2 DESARROLLO DEL ESTUDIO

Durante la investigación, las columnas de biofiltración fueron reguladas con el agua residual sintética del laboratorio desde un tanque de distribución de 18 litros, controladas y operadas durante 16 semanas, de lunes a viernes ocho horas diarias. Durante este tiempo se monitorearon las regulaciones de caudal (4ml/min), mediciones de pH, temperatura y humedad utilizando un potenciómetro digital modelo pH 6000 (medición de pH) y XH300 Wireless (aparato para mediciones de temperatura y humedad).

Las primeras 3 semanas de operación, se utilizó únicamente el agua residual sintética hasta que los filtros llegasen a la estabilización. A partir de la semana 4 se empezó a añadir los contaminantes emergentes: ibuprofeno, cafeína y diclorofenol a las columnas.

Este estudio se dividió en dos partes: la primera, consistió en el análisis alométrico de las especies que se encontraban en los biofiltros: material vegetal y material biológico; se tomó en cuenta únicamente el monitoreo del

crecimiento de las diferentes especies, conteo de las mismas y en el caso del material vegetal, medición de la absorbancia de clorofila. Estos parámetros permitieron analizar el comportamiento antes, durante y después de la adición de los contaminantes; la segunda etapa se basó en la identificación molecular de microorganismos a partir de muestras recogidas de los filtros.

## 2.3 ANÁLISIS ALOMÉTRICO: MATERIAL VEGETAL Y MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.3.1. MATERIAL VEGETAL

Las especies utilizadas fueron totoras (*Schoenoplectus californicus*) presentes en los seis biofiltros (P1, P2, P3, LP1, LP2 y LP3).

El análisis del comportamiento de *S. californicus* se llevó a cabo a partir de la determinación de clorofila, donde se empleó el método de extracción con etanol, siguiendo el protocolo de Lichtenthaler (1987) mismo que describe cómo los contenidos de clorofila y carotenoides totales se pueden determinar en un extracto de tejido vegetal verde mediante espectroscopia UV-VIS.

En este análisis las muestras de *S. californicus* fueron recolectadas de los seis filtros utilizando como herramienta de extracción una tijera, se cortó 3 cm de la hoja del material vegetal, que posteriormente se almacenó en una funda de cierre hermético (ziploc) pequeña previamente etiquetada y se repitió el proceso con el resto de especies vegetales de los filtros, como se indica en la metodología de Tejedor (2019), misma que se utilizó para la preparación de las muestras; el comportamiento de *S. californicus* se monitoreó una vez por semana y fue evaluado a partir de parámetros alométricos del desarrollo vegetativo de macrófitas, como: altura apical (cm), número de hojas, clorofila a y b; para la determinación de clorofila a y b se midió la absorbancia a 648,6 nm y 664,2 nm utilizando el espectrofotómetro UV-VIS modelo LAMBDA 365 (PerkinElmer, 2017) mediante las siguientes ecuaciones.

$$Ca = \frac{(13,36 A_{664,2} - 5,19 A_{648,6}) \times 8,1}{Dw} (mg * g^{-1} dw) \quad [1]$$

$$Cb = \frac{(27,43 A_{648,6} - 5,19 A_{664,2}) \times 8,1}{Dw} (mg * g^{-1} dw) \quad [2]$$

En donde:

- $A_{664,2}$  = Absorbancia a 664,2 nm
- $A_{648,6}$  = Absorbancia a 648,6 nm
- $Dw$  = Peso seco del tejido vegetal extraído (mg)



### 2.3.2. MATERIAL BIOLÓGICO (LOMBRICES)

El monitoreo del crecimiento y reproducción de las lombrices (*Eisenia foetida*) se realizó a través del peso (g), el número de individuos separando categóricamente por: adultos, jóvenes, pequeñas (desarrollándose) y número de cocones (huevos), a partir de estos datos se pudo calcular la densidad poblacional de lombrices por filtro durante la operación de estos. Las *E. foetida* fueron separadas de los filtros para la cuantificación, determinación del peso y evaluación de sus diferencias morfológicas.

Se calculó la densidad poblacional mediante la siguiente operación determinada por (Arora et al., 2014) y (Kumar et al., 2015):

$$\text{Densidad poblacional lombrices} = D_L = 10\,000 \frac{\text{indv}}{\text{m}^3}$$

$$\text{Número de individuos} = D = \left( \frac{\pi d^2}{4} \times h \right) = 10\,000 \frac{\text{indv}}{\text{m}^3} \left( \frac{\pi d^2}{4} \times h \right) \quad [3]$$

En donde:

- $D$ = densidad
- $d$ = diámetro del filtro (0,12 m)
- $h$ = altura de la capa activa (0,3 m)

## 2.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICRORGANISMOS

### 2.4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LOS BIOFILTROS

Las muestras fueron tomadas de los tres biofiltros híbridos LP1, LP2 y LP3, tres veces durante la investigación (antes, durante y después de la adición de los contaminantes emergentes) a una profundidad aproximada de 40 cm; se consideró esta profundidad ya que en esta parte del filtro se encuentra la división entre la capa activa y la capa media; en la capa activa se encuentran inoculadas *E. foetida* y *S. californicus*, lo que hace que sea una zona rica en nutrientes y en condiciones óptimas para el crecimiento de microorganismos (Samal, Roshan, & Bhunia, 2017).

Para el muestreo se utilizaron mangueras de suero y una pala de jardín como herramientas de ayuda para la extracción de la materia orgánica; se tomaron y almacenaron 10 gramos de muestra por cada filtro donde se homogenizaron en bolsas de cierre hermético y estériles. El transporte de las muestras se hizo en una nevera (cooler) para preservar su frescura; la metodología empleada fue adaptada de Eichorst, Breznak y Schmidt (2007) para caracterización de microorganismos de suelo.

### 2.4.2. ANÁLISIS MOLECULAR

El análisis molecular se lo realizó en el laboratorio IDGEN ubicado en Quito.

### **2.4.3. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO DE BACTERIAS Y HONGOS**

Se utilizaron 500 mg de muestra de cada biofiltro para realizar la extracción de ADN total. Para la extracción del ADN se empleó el kit comercial "PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit" (Invitrogen, 2015). A través de espectrofotometría se lograron cuantificar las moléculas del ADN genómico, se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm y fueron leídas en "NanoDrop 2000 UV-VIS" (ThermoFisher Scientific, EE.UU.).

### **2.4.4. AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de calidad del ADN, la concentración del ADN se diluyó hasta 20ng/μL para la amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR para bacterias se realizó por 32 ciclos repetitivos y para hongos por 40 ciclos repetitivos, donde cada uno constó de tres pasos: ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo a una temperatura de 95°C por 5 minutos; hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los primers, en el caso de bacterias se usó 16S F y R (**F** CCTACGGGNGGCWGCAG; **R** GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Barghouthi, 2011) y para hongos ITS 3F-4R (**3F** GCATCGATGAAGAACGCAGC; **4R** TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Martin & Rygiel, 2005) a una temperatura de 60°C durante 1 minuto, estos sirvieron como punto de partida para la replicación del ADN; por último, la extensión de la longitud de los primers por la polimerasa que se realizó a una temperatura de 72°C (Elkhalil, Gaffar, Siddig, & Osman, 2015).

### **2.4.5. ELECTROFORESIS**

Los productos resultantes de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1,2% a 90 V, teñidos en 0,5 μl/ml de bromuro de etidio durante 1 hora con el fin de evidenciar la amplificación de las secuencias (Elkhalil, Gaffar, Siddig, & Osman, 2015). Los fragmentos de ADN se observaron en bandas de tamaño esperado de 300 pb. Este proceso permitió obtener varias copias de diversos fragmentos de ADN de una muestra determinada para su posterior análisis.

### **2.4.6. SECUENCIACIÓN**

Se realizó el análisis de calidad y creación de librerías para la plataforma Miseq NGS (Illumina, Corea), donde se utilizó un secuenciador que permite aplicaciones genómicas específicas y microbianas; se realizó lecturas "pair end" de 300 pb en cada lado "forward y reverse", secuenciación de lectura pareada que consiste en la secuenciación de fragmentos del ADN en ambos sentidos (Hernández, Quijada, & Rodríguez, 2019).

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas, ensambladas y contabilizadas utilizando software bioinformático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) por sus siglas en inglés, programa de alineamiento de secuencias para ADN Y ARN (Altschul, et al., 2011), con la identificación de hongos y bacterias a nivel de género y especie.

#### **2.4.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

La calidad fue evaluada con PHRED (Phred Quality Score) programa informático para identificar una secuencia de bases como medida de calidad en la identificación de las nucleobases generadas por la secuenciación. Se utilizó la plataforma Miseq NGS (illumina, Corea) para la creación de librerías.

### **2.5. OBTENCIÓN DE RESULTADOS**

#### **2.5.1. DATOS ALOMÉTRICOS: MATERIAL VEGETAL Y MATERIAL BIOLÓGICO**

Los datos alométricos para el comportamiento de *S. californicus* fueron analizados en Excel 2010; se realizó desviación estándar con los datos de clorofila obtenidos. Para *E. foetida*, se obtuvieron valores promedios y desviación estándar de cada medición.

#### **2.5.2. DATOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR**

Los resultados de las secuencias obtenidas de cada muestra, tanto para hongos y bacterias, se visualizaron con discos de Krona (Ondov, Bergman, & Phillipy, 2011), tablas de unidades taxonómicas operacionales y gráficos elaborados en Excel 2010.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

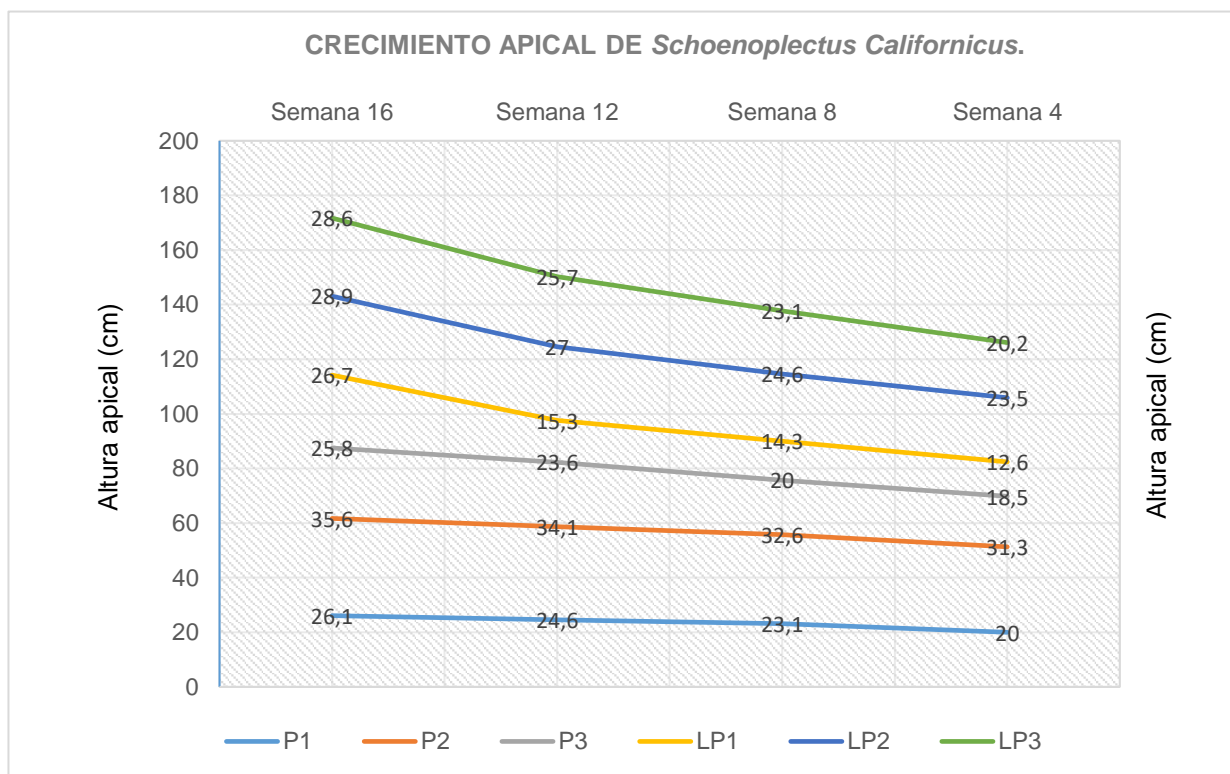
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. RESULTADOS ALOMÉTRICOS PARA *Schoenoplectus californicus* y *Eisenia foetida*

*Schoenoplectus californicus* y *Eisenia foetida* fueron monitoreados por algunos parámetros operacionales dentro de los biofiltros, mencionados en la metodología del presente trabajo. Las dos especies son conocidas por presentar rangos de tolerancia en entornos con diferentes condiciones ambientales (Blanco, 2018).

#### 3.1.1. CRECIMIENTO APICAL DE *Schoenoplectus californicus*

El crecimiento apical para los biofiltros P1, P2, P3, LP1, LP2 y LP3 se muestra en el gráfico 4, los individuos presentaron crecimiento durante las 16 semanas que fueron evaluados.



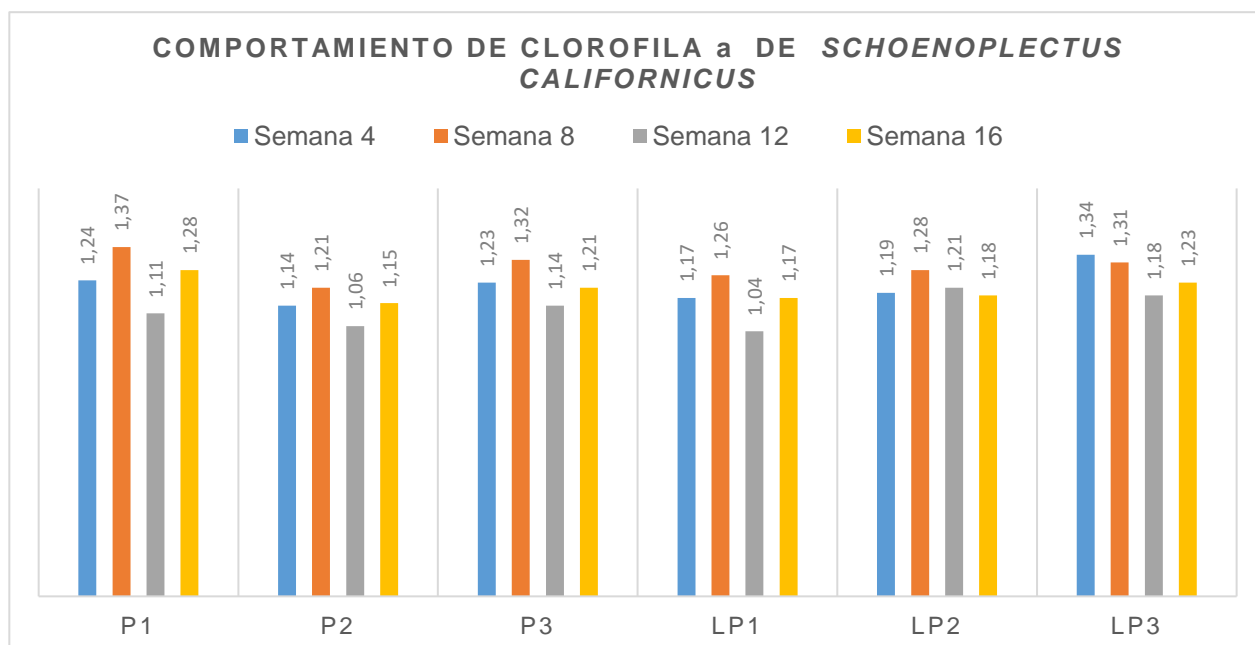
**Figura 4.** P: medio filtrante y macrófitas (*Schoenoplectus californicus*); LP: medio filtrante, macrófitas (*Schoenoplectus californicus*) y lombrices (*Eisenia foetida*).

En los biofiltros P, la mayor altura apical registrada se observó en el biofiltro P2 con 35,6 cm, mientras que los biofiltros P1 y P3 presentaron una altura de 26,1 cm y 25,8 cm respectivamente; en cuanto a los filtros LP, el que presentó mayor altura apical fue LP2 con 28,9 cm, seguido de LP3 con 28,6 cm y LP1

con 26,7 cm al final del ensayo. En el presente trabajo se evidenció que la columna de filtración que más altura alcanzó fue el filtro P2 (35,6 cm), en comparación con el resto de columnas que no presentaron mayores diferencias significativas, lo que indica que posiblemente la estadía de las lombrices dentro de los filtros ayudaron a la preservación de la materia vegetal (*S. Californicus*) evitando el deterioro de las mismas, ya que según la investigación realizada por Xu y colaboradores (2013) en plantas de humedales como *C. indica*, *T. augustifolia* y *P. australis*, indicaron que la adición de lombrices aumentó las raíces, tallos, densidad y biomasa de las plantas mejorando su estructura y composición vegetal como consecuencia de los mecanismos de purificación e interacción con estas.

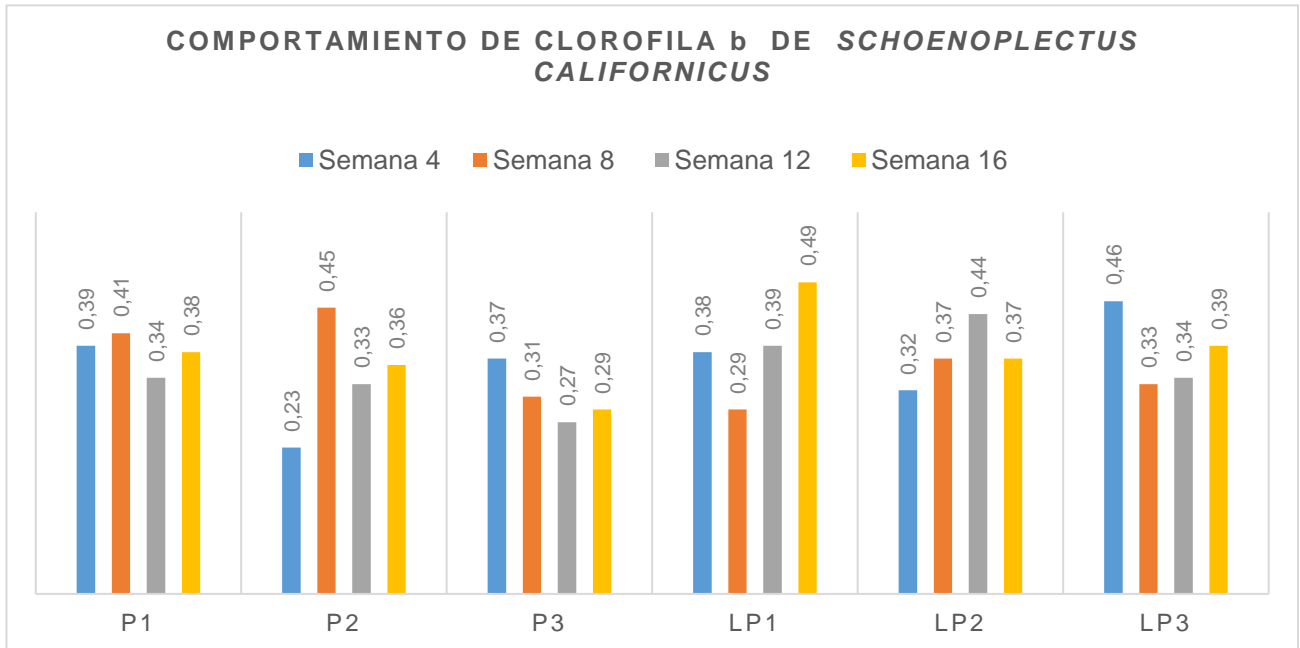
### 3.1.2. COMPORTAMIENTO DE CLOROFILA a Y b PARA *Schoenoplectus californicus*

El gráfico 5 indica el comportamiento de clorofila a que presentaron los individuos de *S. Californicus* en los biofiltros P y LP. En las columnas P se observó el contenido de clorofila a, al finalizar el ensayo no presentaron valores muy fluctuantes, los valores promedio fueron 1,25 mg/g en el filtro P1, 1,16 mg/g en el filtro P2 y en el filtro P3 1,22 mg/g; para los biofiltros LP se presentaron concentraciones promedio de 1,16 mg/g (LP1); 1,21 mg/g (LP2) y 1,26 mg/g (LP3). Las concentraciones promedio entre los biofiltros P y LP no mostraron diferencias significativas.



**Figura 5.** Comportamiento de Clorofila a de individuos *Schoenoplectus californicus*. P: medio filtrante y macrófitas (*Schoenoplectus californicus*); LP: medio filtrante, macrófitas (*Schoenoplectus californicus*) y lombrices (*Eisenia foetida*).

Así mismo, el gráfico 6 muestra el comportamiento de clorofila b que presentaron *S. Californicus* en los biofiltros P y LP. Los biofiltros de tipología P presentaron concentraciones promedio de 0,38 mg/g (P1), 0,34 mg/g (P2) y 0,31 mg/g (P3); los biofiltros de tipología LP presentaron valores promedio de 0,38 mg/g en el filtro LP1; 0,37 mg/g en el filtro LP2 y 0,39 mg/g en el filtro LP3. Tanto en los filtros P como en los LP no hubo diferencias significativas en cuanto a la concentración de clorofila b.



**Figura 6.** Comportamiento de Clorofila b de individuos *Schoenoplectus californicus*. P: medio filtrante y macrófitas (*Schoenoplectus californicus*); LP: medio filtrante, macrófitas (*Schoenoplectus californicus*) y lombrices (*Eisenia foetida*).

De acuerdo a las concentraciones obtenidas de clorofila tipo a y clorofila tipo b, estas no presentan valores fluctuantes significativos, los resultados indican que estos no se vieron afectados por parámetros manejados en los biofiltros como la tasa hidráulica ( $0,5 \text{ m}^3/\text{m}^2$ ) y la diferente tipología de biofiltración utilizada en el presente trabajo investigativo. Sin embargo, el estudio de Xu y colaboradores (2013) indicaron que el contenido de nitrógeno mineral disponible para las plantas como resultado de un aumento de la tasa de desnitrificación, debido a la adición de lombrices de tierra, posiblemente aumente la tasa fotosintética, ya que en su investigación *E. foetida* incrementó la tasa fotosintética de las plantas de humedales utilizadas en su estudio (*C. indica* y *P. australis*), el aumento o la disminución de la tasa fotosintética en plantas puede estar relacionado con el nitrógeno, ya que este es uno de los componentes de la clorofila y puede incidir en la actividad fotosintética (Zhu, Li, & Ketola, 2011).

### 3.1.3 NÚMERO DE HOJAS DE INDIVIDUOS DE *Schoenoplectus californicus*

El número de hojas que presentaron los individuos de *S. Californicus* de cada columna de biofiltración al inicio y finalización del ensayo se observa en la tabla 3.

**Tabla 3.** Número de hojas de individuos *Schoenoplectus californicus* para cada biofiltro.

Número de individuos de <i>Schoenoplectus californicus</i>		
Biofiltros	Número de hojas (semana 4 )	Número de hojas (semana 16)
P1	295	376
P2	309	470
P3	287	378
LP1	110	215
LP2	124	186
LP3	203	248

La tabla anterior indica el número de hojas que fueron contabilizadas en el presente ensayo; para las columnas de biofiltros P, el filtro P1 presentó un aumento del 27% de hojas durante la operación de *S. californicus*, y para los filtros P2 y P3 hubo aumentos de 52% y 31% respectivamente. En los biofiltros LP se observó que hubo un aumento del 95% en el filtro LP1, en el filtro LP2 50% y el filtro LP3 presentó un aumento del 22%.

Todos los biofiltros presentaron incremento en el número de hojas de *S. Californicus*; Xu y colaboradores (2013) informaron que el aumento de la densidad y peso seco de hojas en humedales construidos y proporcionados por *E. foetida*, puede estar relacionado con la actividad de estas que producen un aumento en la porosidad del suelo al ser excavado constantemente, proporcionando un medio favorable para el crecimiento de las raíces.

### 3.1.4 *Eisenia foetida*

Para el comportamiento del material biológico (lombrices), se obtuvo cantidades exactas de lombrices adultas, jóvenes, pequeñas y huevos de cada filtro. En la tabla 4 se observa las cantidades de cada categoría.



**Tabla 4.** Cantidad de lombrices por filtro.

Cantidad lombrices					
Biofiltros	Adultas	Jóvenes	Pequeñas	Huevos	Total
LP1	49	322	345	50	766
LP2	43	335	475	44	897
LP3	36	232	978	46	1292

En cuanto al peso de *E. foetida*, este se realizó previamente a su conteo, para el filtro LP1 el peso total de lombrices fue 78.44 g, para el filtro LP2 fue 81.99 g y para el filtro LP3 78.43 g. La densidad poblacional de *E. foetida* en el filtro LP1 fue de 2,5 individuos/m<sup>3</sup>, el filtro LP2 presentó 3,0 individuos/m<sup>3</sup> y el filtro LP3 4,3 individuos/m<sup>3</sup>.

Los resultados obtenidos podrían estar relacionados directamente con las macrófitas, ya que la actividad de las raíces en el medio ayuda a mantener condiciones aeróbicas en el sustrato proporcionando condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento de lombrices (Samal, Dash, & Bhunia, 2017).

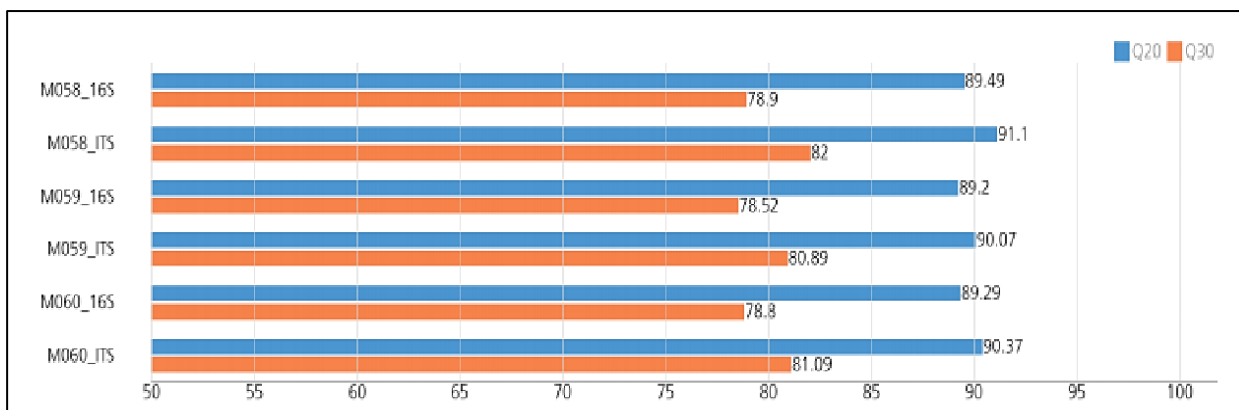
Kumar y otros (2015) también mencionaron que la adición de lombrices (*E. foetida*) para el tratamiento de aguas residuales, produjo cambios positivos en cuanto a mejoras del rendimiento del vermifiltro, dando como resultado agua tratada que puede reutilizarse para fines de riego. También señalan que la presencia de varias enzimas en el intestino de las lombrices promueve la degradación de productos químicos, que pueden no descomponerse en los procesos geo-microbianos, lo que indica la adaptabilidad de estas especies a cambios tóxicos en su entorno.

### 3.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR

Se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniendo un resultado de alta calidad en hongos y bacterias, mostrado en el Anexo 3. Se observó fragmentos de ADN de aproximadamente 300 pb en las muestras amplificadas con primers ITS 3F-4R para hongos y 16S F y R para bacterias.

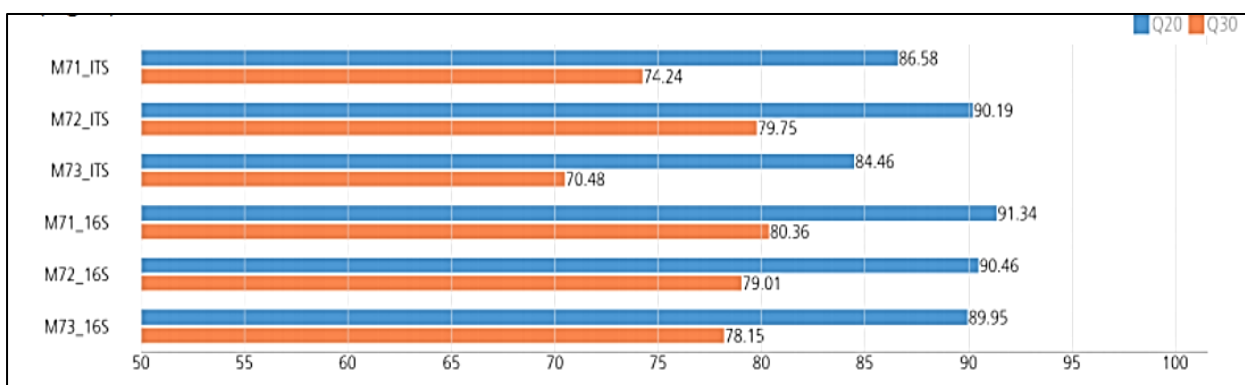
### 3.2.1. OBTENCIÓN DE ADN

Se obtuvieron las secuencias de los tres muestreos que se realizaron a los tres filtros (LP1, LP2 y LP3). Para el primer muestreo se alcanzaron secuencias con un promedio del 89.92% con PRHED score superior a Q20 (1% de probabilidad de error) y de 80.03% con PHRED score superior a Q30 (0.1% de probabilidad de error). En el gráfico 7 se puede observar lo dicho anteriormente.



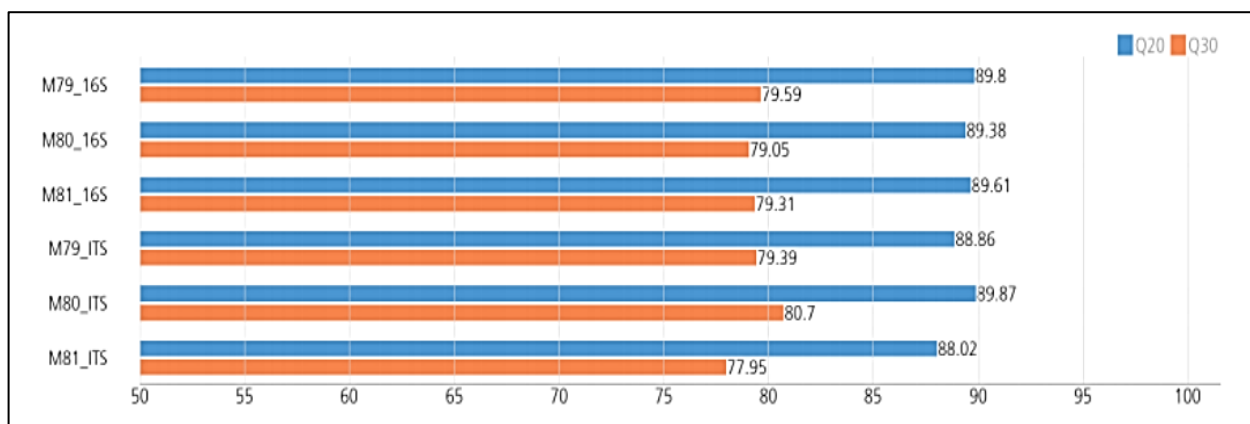
**Figura 7.** Calidad de las secuencias obtenidas para el primer muestreo.

El gráfico 8 representa al segundo muestreo, donde se obtuvieron secuencias con un promedio del 88.83% con PHRED score superior a Q20 (1% de probabilidad de error) y de 77.0% con PHRED score superior a Q30 (0.1% de probabilidad de error).



**Figura 8.** Calidad de las secuencias obtenidas para el segundo muestreo.

En el tercer muestreo las secuencias obtenidas fueron con un promedio del 89.25% con PHRED score superior a Q20 (1% de probabilidad de error) y de 79.33% con PHRED score superior a Q30 (0.1% de probabilidad de error). En el gráfico 9 se puede observar la representación gráfica de lo anteriormente expuesto.



**Figura 9.** Calidad de las secuencias obtenidas para el tercer muestreo.

La calidad de las secuencias que presentan un PHRED score superior a Q10 presenta un 90% de eficacia, es decir, una base mal secuenciada cada 10 y una secuencia con PHRED score de Q30 tiene un 99.9 % de eficacia lo que indica que habrá una base mal secuenciada cada 1.000 (Hernández, Quijada, & Rodríguez, 2019).

El ADN obtenido de las muestras presentó concentraciones superiores a los 244 ng/μL (primer muestreo), 0.232 ng/μL (segundo muestreo) y 166 ng/μL (tercer muestreo). En la tabla 5 se puede observar las concentraciones por filtro.

**Tabla 5.** Concentraciones del primer, segundo y tercer muestreo de acuerdo a las lecturas en nanodrop.

<b>Primera Muestra</b>	Concentración de la muestra (ng/μl)	<b>Segunda muestra</b>	Concentración de la muestra (ng/μl)	<b>Tercera muestra</b>	Concentración de la muestra (ng/μl)
<b>LP1</b>	244.71	<b>LP1</b>	0.232	<b>LP1</b>	170.591
<b>LP2</b>	250.52	<b>LP2</b>	433.939	<b>LP2</b>	166.299
<b>LP3</b>	247.81	<b>LP3</b>	493.104	<b>LP3</b>	397.978

Las concentraciones del ADN extraído fueron adecuadas para la generación de más de 200 000 lecturas en el proceso de secuenciación. Tamay, Ibarra y Velasquillo (2013), indicaron que es de gran importancia una adecuada concentración de ADN, ya que es el elemento principal en la PCR permitiendo una adecuada interacción con los demás componentes como primers, buffers, agua, entre otros.

### 3.2.2. OBTENCIÓN DE SECUENCIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA

En la tabla 6 se aprecian los resultados obtenidos de la secuenciación masiva y el análisis bioinformático del primer muestreo.

**Tabla 6.** Primer muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático.

Muestra	Conc. de las Librerías (ng/μl)	Amplicón (pb)	Total de Lecturas	OTUs*	Número de secuencias
LP1	ITS-Hongos: 60.03	550	229,858	169	14530
	16S-Bacterias: 53.83	577	270,448	423	20511
LP2	ITS-Hongos: 55.51	534	253,950	217	54876
	16S-Bacterias: 54.49	583	266,850	352	13897
LP3	ITS-Hongos: 46.14	538	251,750	167	28261
	16S-Bacterias: 52.26	585	262,368	328	15683

**Conc.:** Concentración

**pb:** pares de bases

**\*Unidades Taxonómicas Operativas (OTU):** Cantidad de especies diferentes encontradas en la muestra

En la tabla 7 se aprecia los resultados obtenidos de la secuenciación masiva y el análisis bioinformático del segundo muestreo.

**Tabla 7.** Segundo muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático.

Muestra	Conc. de las Librerías (ng/μl)	Amplicón (pb)	Total de Lecturas	OTUs*	Número de secuencias
LP1	ITS-Hongos: 28.29	535	273,882	313	84453
	16S-Bacterias: 15.63	613	252,612	319	66162
LP2	ITS-Hongos: 46.98	546	281,528	244	30364
	16S-Bacterias: 39.11	599	227,320	339	2884
LP3	ITS-Hongos: 55.43	509	255,236	126	2928
	16S-Bacterias: 38.36	597	219,768	346	2472

En la tabla 8 se indica los resultados obtenidos de la secuenciación masiva y el análisis bioinformático del tercer muestreo.

**Tabla 8.** Tercer muestreo. Resultados del proceso de extracción de ADN, preparación de librerías, secuenciación masiva y análisis bioinformático.

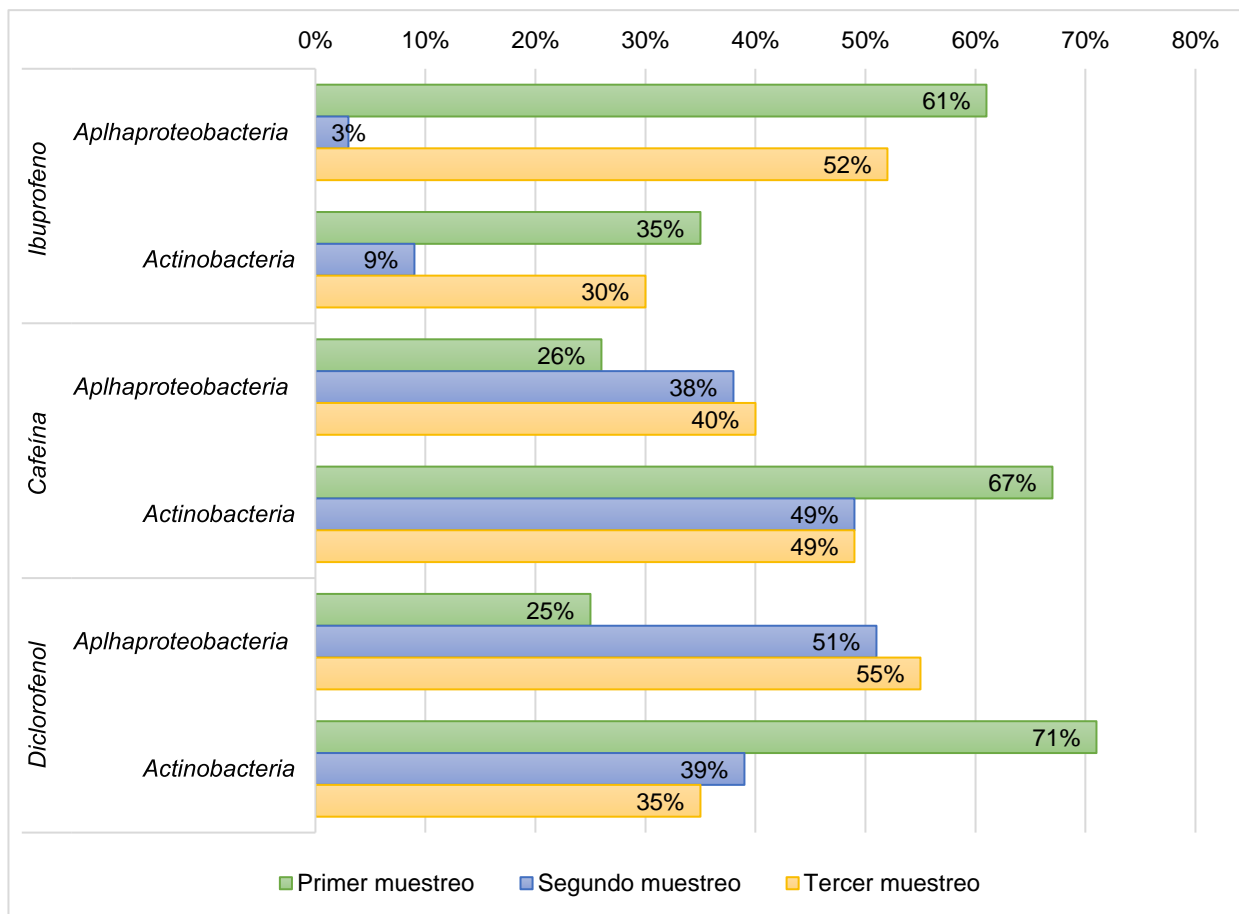
Muestra	Conc. de las Librerías (ng/μl)	Amplicón (pb)	Total de Lecturas	OTUs*	Número de secuencias
LP1	ITS-Hongos: 54.74	529	284,396	342	57553
	16S-Bacterias: 39.82	601	248,132	600	6016
LP2	ITS-Hongos: 43.28	524	298,658	414	54733
	16S-Bacterias: 41.23	602	201,442	422	5593
LP3	ITS-Hongos: 54.48	498	322,312	373	128803
	16S-Bacterias: 45.33	599	209,342	418	3026

Las secuencias finales obtenidas fueron identificadas mediante BLAST y presentaron un índice de identidad del 97% para hongos y 99% de identidad para bacterias. Los valores adecuados para la identificación de un determinado microorganismo en un orden o género deben presentar valores entre QC 99%-100%, según Rodríguez (2013); sin embargo, Blanco (2014) indica que los parámetros aceptables para la identificación de un microorganismo pueden estar entre QC 97%-100%, si los valores de QC están dentro de estos parámetros se puede llegar a la identificación a nivel de especie del microorganismo, caso contrario solo se puede llegar a inferir en el género del microorganismo.

### 3.2.3. INFLUENCIA DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN EL RESULTADO TAXONÓMICO DE BACTERIAS

En las muestras analizadas se observaron una gran variedad de familias, géneros y especies de bacterias, estos se muestran detalladamente en discos Krona mostrados en el Anexo 4. Los discos Krona representaron clasificaciones taxonómicas en orden ascendente hasta el nivel de especie (círculo más externo), mientras que los taxones menos abundantes se enumeran fuera de estos junto con su abundancia relativa (Ondov, Bergman, & Phillippy, 2011).

En el gráfico 10, se exponen los taxones más dominantes que estuvieron presentes durante el primer, segundo y tercer muestreo de los biofiltros: ibuprofeno (LP1), cafeína (LP2) y 2,4 diclorofenol (LP3) respectivamente.



**Figura 10.** Porcentajes de taxones bacteriales correspondientes a los biofiltros LP1, LP2 y LP3.

En la figura anterior las *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria* se mostraron como los dos taxones de bacterias que más abundancia presentaron en las muestras analizadas, estas dos se encuentran dentro del dominio “Bacteria” y tienen como categoría “clase” (Garrity, Bell, & Lilburn, 2006), en taxonomía son las clasificaciones para cada rango de bacterias. En los discos Krona se puede visualizar las familias bacteriales pertenecientes a estas clases como: *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Microbacteriaceae* pertenecientes a la clase *Actinobacteria* y *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Rhizobiaceae* correspondientes a la clase *Alphaproteobacteria*.

En el gráfico 10, se observa que la clase *Actinobacteria* presenta porcentajes más elevados en el primer muestreo en relación a la clase *Alphaproteobacteria*, esto puede ser debido a que las *Actinobacterias* es un grupo extenso y habitan en una amplia gama de nichos ecológicos (Wink, Mohammadipanah, & Hamedi, 2017), y son bacterias que se nutren de residuos y sustancias descompuestas (León, et al., 2011). La presencia de materia orgánica junto con la de materia vegetal que se encuentran conformando los biofiltros ha originado la proliferación de *Actinobacterias* que de acuerdo al estudio de Wang y otros (2016) los hábitats de compost de

residuos orgánicos son los más propicios para el crecimiento y albergue de este tipo de bacterias, revelando su capacidad de promover el crecimiento vegetal debido al comportamiento simbiótico que presentan, incluso a la mejora de biofilms para tratamientos de lodos y calidad de agua, como también explican en su estudio Ortiz y colaboradores (2018).

Por otro lado, la clase *Alphaproteobacteria* se ha identificado por ser un grupo bacterial versátil adaptándose a distintos ambientes (Ettema & Andersson, 2009), presentan un conjunto variado de metabolismos, entre ellos la simbiosis con plantas y la capacidad de metabolizar diversos compuestos (Pini, Galardini, Bazzicalupo, & Mengon, 2011). El ambiente de los biofiltros fue favorable para su proliferación, ya que estas bacterias muestran una buena capacidad de interacción con plantas, esto se le atribuye la familia *Rhizobiaceae* que tiene la característica de asociarse simbióticamente con las raíces de vegetales (Danhorn & Fuqua, 2007). En anteriores investigaciones mencionan que tanto la clase *Alphaproteobacteria* como *Actinobacteria* presentan buenas asociaciones con plantas; sin embargo, las *Actinobacteria* se ha encontrado que pueden producir metabolitos secundarios que ayudan a la actividad biológica de las plantas promoviendo su crecimiento y disminuyendo el estrés ambiental que estas puedan desarrollar (Boersma, Warmink, Andreote, & Dirk, 2009) y (Qin, Xing, Jiang, & Xu, 2011).

Los porcentajes de los taxones durante el segundo y tercer muestreo, presentaron valores fluctuantes en relación a los del primer muestreo, lo que indica cambios en el comportamiento bacteriano ante la adición de los contaminantes emergentes. Wang y otros (2016) explican que puede deberse a diversas propiedades ambientales de su entorno, como temperatura o condiciones aeróbicas débiles que alteran el crecimiento de las bacterias hasta que estas muestren adaptabilidad al medio.

Según el estudio de Mir-Tutusaus y otros (2017) en los tratamientos de remoción de contaminantes farmacéuticos, las cepas bacterianas más encontradas fueron *Actinobacteria* durante las primeras fases operativas de estos tratamientos; mientras que las *Alphaproteobacteria* han sido más dominantes en las etapas medias y finales de la operación. Las dos clases de bacterias estuvieron involucradas en la eliminación de fármacos tratados en plantas de aguas residuales, son bacterias que presentan capacidad de degradación para residuos farmacéuticos (Tiwari, Sellamuthu, Ouarda, & Drogui, 2017); la familia *Microbacteriaceae*, perteneciente a la clase *Actinobacteria*, se encuentran entre los microorganismos que han sido reportados como principales degradadores de compuestos farmacéuticos como el ibuprofeno y algunas sustancias psicoactivas (Kim, Guerra, Shah, Parsa, & Alaei, 2014).

Langenhoff y otros (2013) en su investigación realizada, indicaron que en la degradación de ibuprofeno en un bioreactor hubo presencia de la familia *Sphingomonadaceae* perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria*, mismos que junto con otros microorganismos encontrados como *Firmicutes*,

*Actinobacteria*, *Synergistetes*, hicieron que la degradación de este fármaco fuese más rápida. Los mismos autores señalan que para la presencia y permanencia de consorcios microbianos interfieren varios factores, entre ellos, el tiempo de retención hidráulica y condiciones ambientales como pH, humedad, temperatura, etc. que interfieren en la degradación.

En el estudio de Zhang y colaboradores (2016) se mostró que, durante la remoción de cafeína en sistemas de humedales, se presentaron taxones bacteriales como: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacterias*, que después del enriquecimiento de cafeína fueron los taxones que más tolerancia y adaptación presentaron ante las perturbaciones ambientales. Por otro lado, Dash y Gummadi (2006) explicaron en su investigación que los taxones menos abundantes de la comunidad microbiana pudieron verse reducidos por encontrarse fuera de competencia, ya que la cafeína sirve como fuente de alimento para otras especies o sensibles a la cafeína debido a que esta actúa como un antimicrobiano en concentraciones relativamente bajas provocando la inhibición del crecimiento y la muerte de cepas bacterianas.

En cuanto a la reacción que presentaron las bacterias al diclorofenol, las *Alphaproteobacteria* presentaron un porcentaje más elevado que las *Actinobacterias*, Liu y colaboradores (2011) explicaron en su estudio que este tipo de bacterias se encontraron entre las comunidades bacterianas como potenciales degradadoras de compuestos tóxicos similares al ácido clorofenoxiacético (MCPA) y el ácido diclorofenoxiacético (PPA) que son tipos de herbicidas muy utilizados; en su investigación señalaron que la degradación de MCPA y PPA fue asimilada principalmente por *Alphaproteobacterias* donde se identificó las familias *Bradyrhizobiaceae* y *Sphingomonadaceae* que utilizaron a los herbicidas como fuente de energía y alimento. Otro estudio mencionó que la combinación de lombrices de tierra en tratamientos de remoción de compuestos tóxicos juega un papel esencial y beneficioso ya que estos macro organismos estimulan la degradación de los herbicidas debido al moco en el intestino de la lombriz de tierra que representan “puntos calientes” para la actividad microbiana provocando la biodegradación significativa de pesticidas (Nechitaylo, et al., 2010). Así mismo, el estudio de González y colaboradores (2013) indicaron que los miembros de la familia *Rhizobiaceae* especialmente del género *Rhizobium* han sido relacionados con la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. En estudios posteriores, Wang y otros (2014) probaron que esta familia *Rhizobiaceae* de la clase *Alphaproteobacteria*, puede acelerar la degradación de etoxilatos de nonilfenol que son tensoactivos muy utilizados doméstica, comercial e industrialmente. Las bacterias pertenecientes a la familia *Sphingomonadaceae* del género *Sphingobium*, también pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* se las asocia mucho en la degradación de contaminantes ambientales como pesticidas y organoclorados, ya que han estado muy involucradas en tratamientos de remoción de compuestos tóxicos (Cao, Yang, Liu, Li, & Zhang, 2013).



### 3.2.4. INFLUENCIA DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN EL RESULTADO TAXONÓMICO DE HONGOS

El resultado de las muestras analizadas para cada filtro indicó que los análisis fúngicos también presentaron taxones dominantes en las etapas de adición de los contaminantes. Al igual que en las bacterias, los resultados se mostraron en discos Krona, donde se visualizaron más detalladamente a las clases, familias y géneros de hongos identificados con sus porcentajes respectivos mismos que se encuentran en el Anexo 4.

En el gráfico 11, se puede apreciar los dos taxones de hongos dominantes. A diferencia de los resultados bacteriales, los fúngicos presentan una gran diferencia en cuanto a porcentajes para cada filtro.

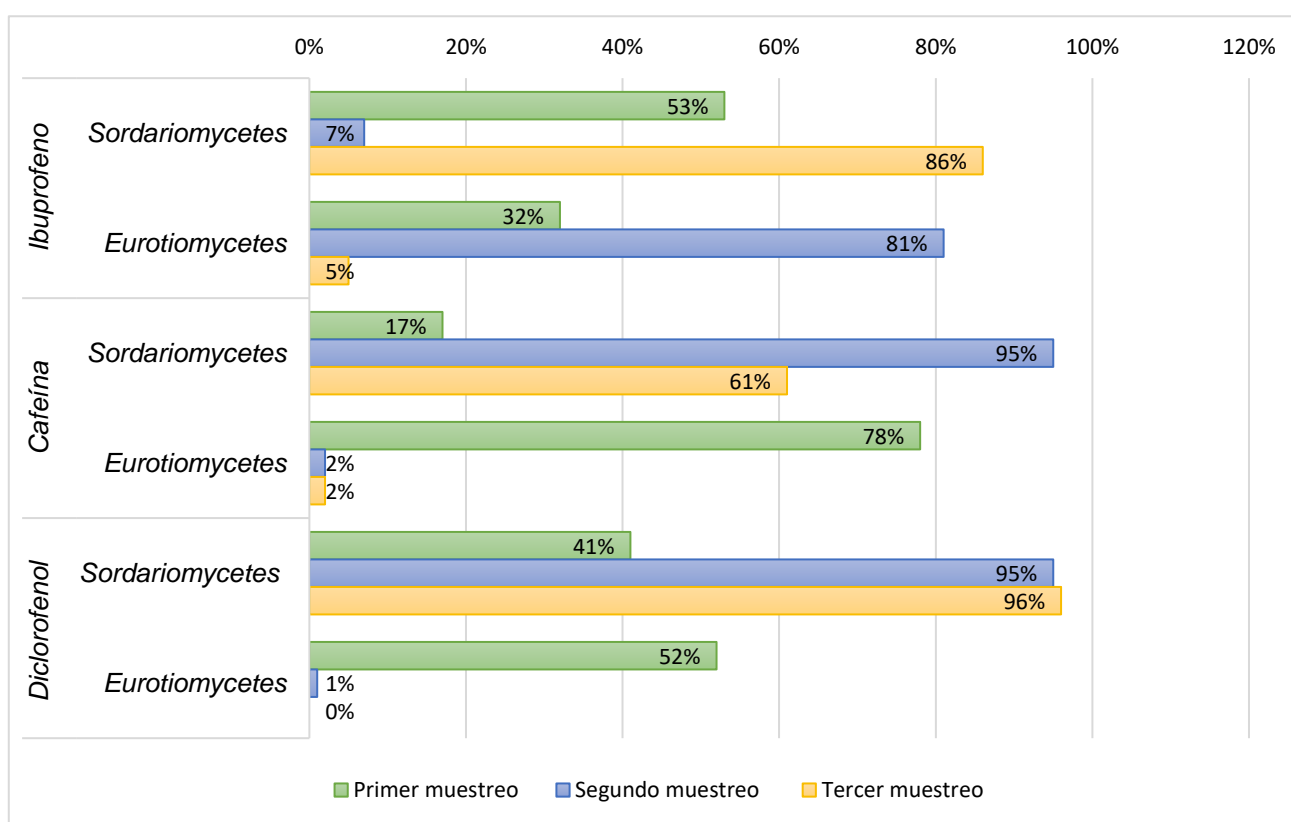


Figura 11. Porcentajes de taxones fúngicos correspondientes a los biofiltros LP1, LP2 y LP3.

Los *Sordariomycetes* mostraron porcentajes más elevados en el segundo y tercer muestreo en comparación con los *Eurotiomycetes* que su porcentaje es relativamente bajo durante la adición de los contaminantes.

Los *Sordariomycetes* son hongos pertenecientes a la segunda clase más grande de la división Ascomycota (Lumbsch, 2000), se encuentran en diferentes nichos, comprendidos en hábitats terrestres y de agua, algunos de ellos llegan a ser endófitos o patógenos para las plantas (Jones, et al., 2015).

En el estudio de Mir-Tutusaus y otros (2017) se encontraron cepas de *Sordariomycetes* en los biofilms en paredes de bioreactores para remoción de contaminantes farmacéuticos, los autores mencionaron que de los dos reactores que se pusieron a prueba, en uno de ellos, medicamentos como el ibuprofeno presentaron resistencia a la biodegradación bacteriana pero no a la degradación por hongos, esto debido a que existieron varios factores que inciden en la reproducción y crecimiento de hongos, como pH que en los sistemas fúngicos. Esto es mencionado también por Borràs y otros (2008) donde en su investigación explicaron que un pH bajo puede afectar al sistema fúngico y su funcionalidad.

Zhang y colaboradores (2016) explicaron que la capacidad degradativa de hongos junto con macrófitas para la remoción de contaminantes farmacéuticos como el ibuprofeno es muy acertada ya que el ibuprofeno puede llegar a ser degradado hasta un 80%. Entre los grupos principales de hongos se encontraron *Exobasidiomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes* que fueron los grupos que asimilaron al contaminante, así mismo, los autores señalaron que el papel desempeñado por las macrófitas podría alterar la estructura microbiana provocando aumentos o disminución de poblaciones fúngicas, ya que posiblemente actúen como “amortiguadores” en la configuración poblacional fúngica contra la perturbación del ibuprofeno.

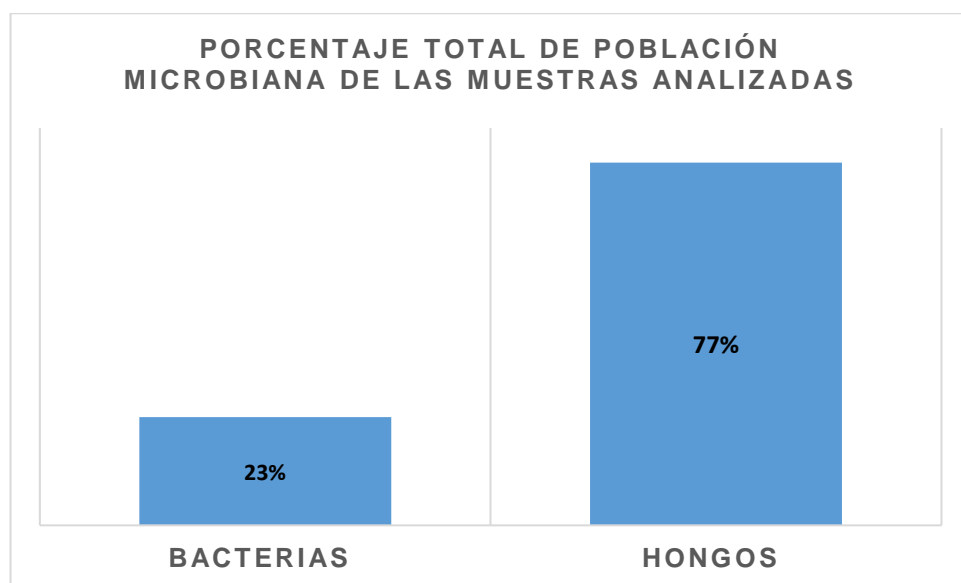
En el filtro LP2 se observa gran diferencia de porcentajes entre *Sordariomycetes* y *Eurotiomycetes*, según Zhang y otros (2016) esto pudo deberse a que el enriquecimiento de cafeína provocó la disminución de cepas fúngicas. La clase de hongos *Eurotiomycetes*, correspondientes a la subdivisión Pezizomycotina (Hibbett, y otros, 2007), durante el tercer muestreo presentó valores demasiado bajos; en el filtro LP3 se observa que su porcentaje es tan bajo que no se visualiza en la gráfica, el porcentaje alcanzado fue de 0.09%, lo que indica que posiblemente no presentaron mucha adaptabilidad al contaminante añadido; sin embargo, es una clase de hongos que junto con los *Sordariomycetes* se les ha asociado con la degradación de herbicidas/pesticidas. Según Milosevic y Govedarica (2002) estos microorganismos han presentado capacidad de degradar herbicidas en el transcurso de los procesos metabólicos, es decir, cuando existe cambios de adaptación por parte de los microorganismos debido a que el herbicida es asimilado como fuente de elementos biogénicos. En posteriores investigaciones, se explicó que son algunos factores los que intervienen en la comunidad fúngica y depende mucho el lugar y las condiciones del mismo de donde se obtenga las muestras para sus análisis, ya que la comunidad fúngica tiende a presentar mucha versatilidad para su crecimiento y adaptación a ambientes tóxicos (Jaboro, Solomon, Barry, & Obayagbona, 2019).

### **3.2.5. EFECTO DE IBUPROFENO, DICLOROFENOL Y CAFEÍNA EN LA DIVERSIDAD MICROBIANA**

En las muestras analizadas se apreció gran variedad tanto de bacterias como de hongos, pero para entender si fueron bacterias u hongos los que

interactuaron mejor con el sistema de biofiltración, se realizó una comparación en cuanto a cantidad tanto de las poblaciones bacterianas como las fúngicas.

El gráfico 12 muestra el porcentaje de bacterias y hongos contabilizados en las muestras de los biofiltros. Se mira claramente que la cantidad de hongos es mayor a la de bacterias. Según estudios, existen varios factores que pueden determinar la estadía microbiana en un sistema; entre ellos el pH es uno de los principales, Anwar y otros (2009) reportaron que este parámetro influye en el microorganismo tanto en su crecimiento como en los procesos metabólicos que estos realicen para degradar compuestos; los autores mencionan que un pH en el rango de 7.0 - 8.0 es estable para el ambiente de los microorganismos, ya que si se presentan valores más bajos o más altos los microorganismos estarían en fase de "adaptabilidad" al entorno y habría posibilidad que reduzcan su número.



**Figura 12.** Porcentaje comparativo de la población existente de hongos y bacterias en las muestras analizadas de los biofiltros LP1, LP2 y LP3.

En el caso del actual trabajo investigativo, se usa la vermicomposición como plan de tratamiento, y este recurso también tiene mucho que ver en cuanto a la población y estructura microbiana de los biofiltros, ya que los productos de vermicompostaje tienden a ser ricos en comunidades microbianas (Jayakumar & Natarajan, 2013).

Huang y colaboradores (2013) analizaron la densidad microbiana durante los procesos de vermicompost y mencionaron que una de las posibles causas para que haya reducción o aumento de microorganismos en este sistema es el agotamiento de la materia orgánica degradable durante los procesos de reacciones bioquímicas; del mismo modo, Gómez y otros (2011) indicaron que las densidades microbianas pueden verse afectadas por las técnicas/procesos asociados al tránsito intestinal de las lombrices, que

incluyen modificaciones que la materia orgánica en descomposición donde los microorganismos sufren durante este tránsito.

En el presente estudio la población de bacterias se presentó relativamente más pequeña que la población fúngica, Shan y otros (2013) también explicaron que esto podría estar relacionado con el hecho de que las lombrices hayan preferido a las bacterias como alimento en lugar de hongos.

En la investigación realizada por Gorra y otros (2007) se analizó la influencia de plantas acuáticas sobre comunidades microbianas y mencionaron que estas no ejercen un fuerte efecto sobre la estructura y diversidad de las comunidades; sin embargo, Calheiros y otros (2009) informaron que las macrófitas podrían tener una presencia significativa influenciando la estructura de poblaciones microbianas. Las plantas acuáticas pueden desempeñar un papel en la configuración de la estructura de la comunidad microbiana, independientemente de la alteración de los contaminantes emergentes añadidos, es decir, la presencia o ausencia de especies de macrófitas puede ejercer un efecto significativo en la composición general de la comunidad microbiana (Weber, Gehder, & Legge, 2008).

## **4.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1. CONCLUSIONES

- Se observó el comportamiento de *Schoenoplectus californicus* y *Eisenia foetida* en los biofiltros a partir del análisis de sus características morfológicas; las dos especies mostraron reacciones favorables durante la adición de los contaminantes emergentes.
- Se evidenció el crecimiento apical de individuos *S. californicus*, concentraciones fotosintéticas estables e incremento en el número de hojas. La interacción con *E. foetida* fue punto clave para el crecimiento de macrófitas.
- Las muestras analizadas de los tres biofiltros híbridos para el análisis molecular mediante la amplificación del ADN con la metodología de la PCR y secuenciación masiva paralela presentaron índices altos de identificación, 99% para bacterias y 97% para hongos presentados interactivamente en discos Krona.
- Los filos *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria* se identificaron como los taxones de bacterias más dominantes en los tres biofiltros, las familias correspondientes a estos filos fueron: *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Rhizobiaceae* correspondientes a *Alphaproteobacteria* y *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Microbacteriaceae* correspondientes a *Actinobacteria*. En hongos los filos dominantes fueron *Sordariomycetes* y *Eurotiomycetes*, los *Sordariomycetes* presentaron los porcentajes más altos en los tres muestreos realizados a los biofiltros.
- La población fúngica se mostró con un porcentaje de 77% en relación a la población bacteriana que presentó 23%; el crecimiento de la comunidad microbiana se vio favorecida por macrófitas y lombrices que ejercen efectos significativos tanto en bacterias como en hongos.
- La identificación de comunidades microbianas indicó que existen bacterias y hongos muy relacionados con la degradación de contaminantes emergentes al presentar capacidad de adaptación y reproducción en ambientes tóxicos e interacción con plantas y lombrices.

## 4.2. RECOMENDACIONES

- Se propone realizar estudios posteriores para evaluar las capacidades degradativas de *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Sordariomycetes* en aguas residuales con presencia de contaminantes emergentes, ya que estos filos de microorganismos presentan géneros y familias que aún no están lo suficientemente estudiados.
- Se recomienda en estudios similares a la presente investigación contar con mejores herramientas para la extracción de muestras de biofiltros, con el fin de facilitar la extracción, optimizar tiempo y calidad en las mismas.
- En cuanto al procedimiento molecular, a la amplificación por PCR se sugiere revisar todos los protocolos empleados como el material utilizado, concentraciones, utensilios de laboratorio, etc., para optimizar tiempo y recursos destinados a este tipo de ensayos.

## **5.BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Aira, M., Monroy, F., & Domínguez, J. (2007). *Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry*, 385, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.06.031>
- Albaluz R. F., Prieto, Naranjo J. M, Cárdenas-Nieto Diana Milena, B.-S. M. S. (2017). *Implementación de un sistema de fitorremediación en zona aledaña a reserva forestal protectora El Malmo , Boyacá , Colombia*. Implementation of a system of phytoremediation in area surrounding to forest protective reserve, 93–103.
- Altschul Stephen F., Madden Thomas A., Schäffer Alejandro A., Jinghui Zhang, Zheng Z., Webb Miller, Lipman David J. (2011). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. Obtenido de: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q. M., Khalid, Z. M., & Iqbal, S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.059>
- Arora, S., & Kazmi, A. A. (2014). *The effect of seasonal temperature on pathogen removal efficacy of vermifilter for wastewater treatment*. *Water Research*, 74, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.001>
- Barghouthi, S. (2011). *A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers*. *Indian journal of microbiology*, 51(4), 430–444. doi:10.1007/s12088-011-0122-5
- Baumforth, K. R.; Nelson, P. N., Digby, J. E., O'Neil, J. D., & Murray, P. G (2004). The polymerase chain reaction. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 28(2), 44–50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>
- Barcelo, D. L. (2008). *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Barcelona: Universidad de Sevilla Ministerio de Medio Ambiente.
- Blanco García E. (2014). *Genómica Computacional*. Barcelona: Ed. UOC. ISBN: 9788490295281. Pag.170.
- Behera, S. K., Oh, S. Y., & Park, H. S. (2011). Sorptive removal of ibuprofen from water using selected soil minerals and activated carbon. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 9(1), 85–94. doi:10.1007/s13762-011-0020-8

- Benhadj, M., Gacemi-kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z. (2018). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem ( Fetzara for enzymes Department of Biochemistry , Faculty of Science , University Badji Mokhtar Annaba , Annaba Departement of Applied Biology , Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences
- Biomolecules and Application Laboratory, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.008>
- Blanco, J. A. (2018). Suitability of Totora (*Schoenoplectus californicus* (C.A. Mey.) Soják) for its use in constructed Wetlands in Areas Polluted with heavy metals. *Sustainability* (Switzerland), 11(1), 1–22.
- Boersma, F. G. H., Warmink, J. A., Andreote, F. A., & Elsas, J. D. Van. (2009). *Selection of Sphingomonadaceae at the Base of Laccaria proxima and Russula exalbicans Fruiting Bodies*. 75(7), 1979–1989. <https://doi.org/10.1128/AEM.02489-08>
- Borràs, E., Blánquez, P., Sarrà, M., Caminal, G., & Vicent, T. (2008). Trametes versicolor pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal*, 42(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.05.014>
- Cao, X.Y., Yang, C., Liu, R.H., Li, Q., Zhang, W., Liu, J.L., Song, C.J., Qiao, C.L., Mulchandani, A., (2013). Simultaneous degradation of organophosphate and organochlorine pesticides by *Sphingobium japonicum* UT26 with surfacedisplayed organophosphorus hydrolase. *Biodegradation* 24, 295e303.
- Calheiros, C. S. C., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2009). *Treatment of industrial wastewater with two-stage constructed wetlands planted with Typha latifolia and Phragmites australis*. *Bioresource Technology*, 100(13), 3205–3213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.017>
- Camacho M., Martín J., D., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2012). *Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal*. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J.; Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F.; Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>
- Cardoso-Vigueros, L., Ramírez-Camperos, E., & Garzón-Zúñiga, M. (2014). *Evaluation of a Pilot Vermifilter for the Treatment of Wastewater. Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 5(2), 33–44. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2013.10.003>
- Castillo, J. M., Romero, E., & Nogales, R. (2013). Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. *Bioresource Technology*, 146, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.093>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Dash, S. S., & Gummadi, S. N. (2006). Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology Letters*, 28(24), 1993–2002. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9196-2>
- De Jesus Gaffney, V., Cardoso, V. V., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M. J., & Almeida, C. M. M. (2014). *Análise de fármacos em águas por spe-uplc-esi-MS/MS. Química Nova*, 37(1), 138–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100023>
- Domínguez J., y Gómez-Brandón, M. (2010). Ciclos de vida de las Lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje. *Acta zoológica mexicana*, 26(SPE 2), 309-320.
- Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Burket, S. R.,... Brooks, B. W. (2016). Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 966–974. <https://doi.org/10.1002/etc.3221>
- Edwards, C.A. (1988) Breakdown of Animal, Vegetable and Industrial Organic Wastes by Earthworms. In: Edwards, C.A. and Neuhauser, E.F., Eds., *Earthworms in Waste and Environmental Management*, SPB Academic Publishing, The Hague, 21-31.
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., & Schmidt, T. M. (2007). *Isolation and characterization of soil bacteria that define Terriglobus gen. nov., in the phylum Acidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2708–2717. <https://doi.org/10.1128/AEM.02140-06>

- Elkhalil, E.; Gaffar, F. Y.; Siddig, M. A. & Osman, H. A. H. (2015). *Isolation and Molecular Characterization of Cellulolytic Bacillus Isolates from Soil and Compost*. American Journal of Microbiological Research, 3(2), 55–58. <https://doi.org/10.12691/ajmr-3-2-2>
- Estevinho, B. N., Martins, I., Ratola, N., Alves, A., & Santos, L. (2007). *Removal of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol from waters by sorption using coal fly ash from a Portuguese thermal power plant*. Journal of Hazardous Materials, 143(1–2), 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.072>
- Ettema, T. J. G., & Andersson, S. G. E. (2009). The  $\alpha$ -proteobacteria: The Darwin finches of the bacterial world. *Biology Letters*, 5(3), 429–432. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0793>
- Franco-Correa, M. (2011). Utilización de los *actinomicetos* en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239–242. <https://doi.org/10.15381/rpb.v16i2.213>
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. (2006). *Alphaproteobacteria* class. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, List no. 107. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1–6.
- Garzón-Zúñiga, M. A., Buelna, G., & Moeller-Chávez, G. E. (2012). *La biofiltración sobre materiales orgánicos, nueva tecnología sustentable para tratar agua residual en pequeñas comunidades e industrias*. Tecnología y Ciencias Del Agua, 3(3), 153–161.
- Garzón Z., Julieta, A. R. A., Esperanza, R. C., Baltazar, E. A. E., Gerardo, B., & Gerardo, D. G. (2018). *Evaluation of Ficus benjamina wood chip-based fungal biofiltration for the treatment of Tequila vinasses*. Water Science and Technology, 77(5), 1449–1459. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.023>
- Gaula, J & Donegan, K. (2015). Caffeine and Its Effect on Bacteria Growth. Department of Biology, Rutgers University, Camden, NJ 08102
- Gómez-Brandón, M., Aira, M., Lores, M., & Domínguez, J. (2011). Epigeic Earthworms exert a bottleneck effect on microbial communities through gut associated processes. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024786>
- González, P.Y.; Alarcón, A.; Ferrera, C.R.; Almaraz, J.J; Martinez, R.E; Cruz S.; Mendoza, L.M.; Ormeño, O. E. (2013). *Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by Rhizobium tropici CIAT 899 in liquid culture medium*. Applied Soil Ecology, 63, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.010>

- Gorra, R., Coci, M., Ambrosoli, R., & Laanbroek, H. J. (2007). *Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1442–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03357.x>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2019). *Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico*. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Zhang, N. (2007). *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Huang, K., Li, F., Wei, Y., Chen, X., & Fu, X. (2013). *Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*, 150, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.006>
- Jaboro Austin G., Solomon E. O., Barry A. O., and Obayagbona N. O., (2019). *Assessment of dominant soil borne fungal phyla and species from amukpe town, delta state, using next generation protocol*. (2019), 4(3), 766–772. Recovered from: <http://www.ftstjournal.com/uploads/docs/43%20Article%2027.pdf>
- Jayakumar, P., & Natarajan, S. (2013). *Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost*. *Applied Soil Ecology*, 70, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.011>
- Jones, E. B. G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A., Abdel-Wahab, M., Boekhout, T., Pang, K. (2015). *Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota*. *Fungal Divers*. 2015; 73:1–72.
- Kim, M., Guerra, P., Shah, A., Parsa, M., Alaei, M., & Smyth, S. A. (2014). *Removal of pharmaceuticals and personal care products in a membrane bioreactor wastewater treatment plant*. *Water Science and Technology*, 69(11), 2221–2229. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.145>
- Kurtzman, C. P. (2014). *Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics*, 325–332. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.054197-0>

- Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, M., Kujawa-Roeleveld, K., & Rijnaarts, H. (2013). *Microbial removal of the pharmaceutical compounds ibuprofen and diclofenac from wastewater*. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/325806>
- León, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. (2011). *Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus Meticilina Resistentes y Enterococcus faecalis Vancomicina Resistentes*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(2), 4–5. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.282.489>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liñan R. (2015). *Desarrollo de Biofiltros de Residuos Orgánicos para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes*. Escuela Politécnica superior de Orihuela. España. Artículo recuperado de: <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/2005/1/TFM%20Li%C3%B1an%20Rodr%C3%ADguez,%20Ismael.pdf>
- Liu, Y. J., Liu, S. J., Drake, H. L., & Horn, M. A. (2011). *Alphaproteobacteria dominate active 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide degraders in agricultural soil and drilosphere*. *Environmental Microbiology*, 13(4), 991–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02405.x>
- Lumbsch, H. T. (2000). *Phylogeny of filamentous ascomycetes*,. 335–342.
- Martin, K., y Rygiewicz, P. T. (2005). *Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts*. *BMC microbiology*, 5, 28. doi:10.1186/1471-2180-5-28
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Llorca, M., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S.; Sarrà, M. (2017). *Pharmaceuticals removal and microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment*. *Water Research*, 116, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.005>
- Nechitaylo, T, Yakimov, M. M., Godinho, M., Timmis, K. N., Belogolova, E., Byzov, B. A.; Golyshin, P. N. (2010). *Effect of the earthworm's lumbricus terrestris and aporrectodea caliginosa on bacterial diversity in soil*. *Microbial Ecology*, 59(3), 574–587. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9604-y>

- Olson, D., McBride, J., Joe Shaw, A., & Lynd, L. (2012). *Recent progress in consolidated bioprocessing*. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.026>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12(September). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Ortiz-Galeana, M. A., Hernández-Salmerón, J. E., Valenzuela-Aragón, B., e losSantos-Villalobos, S. d, Rocha-Granados, M. del C., & Santoyo, G. (2018). Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*vaccinium corymbosum l.*) cv. biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, (ahead)*, 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902018005000403>
- Payán Gómez, S. A. (2016). *Estudio Y Diseño De Biofiltro a Partir De Materia Orgánica Para El Tratamiento De Agua.*, 141. <https://doi.org/10.5465/AME.2002.8540292>
- Peeler, K. A., & Opsahl, S. P. (2006). *Tracking Anthropogenic Inputs Using Caffeine, Indicator Bacteria, and Nutrients in Rural Freshwater and Urban Marine Systems*, 40(24), 7616–7622. *Sci Technol*; 40(24):7616–7622. doi: 10.1021/es061213c
- Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanís, A. (2015). *Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM)*. *Tip*, 18(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>
- Peñate, Q., Haza, J., Javier, U., Peñate, I. Q., Javier, U., Haza, J., Delmas, H. (2009). *Contaminación de las aguas con productos farmaceuticos. Estrategias para enfrentar la problemática*. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 40(3), 173–179.
- Pini, F., Galardini, M., Bazzicalupo, M., & Mengoni, A. (2011). Plant-Bacteria Association and Symbiosis: Are There Common Genomic Traits in Alphaproteobacteria, 1017–1032. <https://doi.org/10.3390/genes2041017>
- Programa de agua y saneamiento América Latina y el Caribe [WSP-LAC]. (2006). *Biofiltro: Una opción sostenible para el tratamiento de aguas residuales en pequeñas localidades*. Honduras: AZER Impresos.
- Pujalte MJ, Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macián MC. (2014). *The family Rhodobacteraceae*. In: *The Prokaryotes, 4th edn, vol. 8. (Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria)*, pp. 439-512. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, E. Stackebrandt, S. Lory and F. Thompson. Berlin, Germany: Springer Verlag

- Puyol Santos, D. (2010). *Biodegradación anaerobia de clorofenoles en aguas residuales*. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Química Física Aplicada. Sección Departamental de Ingeniería Química. España.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J., & Xu, L. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria, 457–473. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2923-6>
- Ratola, N., Botelho, C., & Alves, A. (2003). *The use of pine bark as a natural adsorbent for persistent organic pollutants - Study of lindane and heptachlor adsorption*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78(2–3), 347–351. <https://doi.org/10.1002/jctb.784>
- Reinoso, J. del C., Serrano, C. Y., & Orellana, D. F. (2017). *Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. Emerging contaminants and its impact on the health*. Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Cuenca, 35(2), 55–59. Retrieved from <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/medicina/article/view/1723>
- Robledo Zacarías, V. H., Velázquez Machuca, M. A., Montañez Soto, J. L., Pimentel Equihua, J. L., Vallejo Cardona, A. A., López Calvillo, M. D., & Venegas González, J. (2017). *Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 33(2), 221–235. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.04>
- Rodríguez Tello E. A. (2013). *Alineamiento de pares de secuencias. Cinvestav-Tamaulipas*. Fecha de Revisión: 25 de Septiembre de 2018. Recuperadode:<https://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion05.pdf>.
- Rodríguez W., Leihner D. (2006). *Análisis de crecimiento vegetal. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales*. Costa Rica. Editorial UCR.
- Sabri, N., Hanna, K., & Yargeau, V. (2012). *Chemical oxidation of ibuprofen in the presence of iron species at near neutral pH*. The Science of the Total Environment, 427-428, 382–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.034
- Samal, K., Roshan, R., Bhunia, P. (2017). *Performance assessment of Canna indica assisted vermifilter for synthetic dairy wastewater treatment*. Process Safety and Environmental Protection, 3, 363-374
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1992). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. 1985. Biotechnology (Reading, Mass.), 24, 476–480. <https://doi.org/10.1007/BF00985904>



- Sanchez Ramirez, J. E. (2018). *Contaminantes emergentes en nuestros ecosistemas acuáticos: enemigos invisibles*. *Ingeniería y Región*, 19, 18–21. <https://doi.org/10.25054/22161325.1750>
- Sarango Araujo, O. P., & Sánchez Ramírez, J. A. (2016). Diseño y construcción de 2 biofiltros con *Eichhornia Crassipes* y *Lemna Minor* para la evaluación de la degradación de contaminantes en aguas residuales de la extractora Río Manso EXA S.A. 'Planta la Comuna', Quinindé. Facultad de Ciencias, Bachelor, 83. Retrieved from <http://dspace.epoch.edu.ec/handle/123456789/4930>
- Sarkar, I., Gtari, M., Tisa, L. S., & Sen, A. (2019). *A novel phylogenetic tree based on the presence of protein domains in selected actinobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(1), 101–107. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1154-1>
- Shan, J., Liu, J., Wang, Y., Yan, X., Guo, H., Li, X., & Ji, R. (2013). *Digestion and residue stabilization of bacterial and fungal cells, protein, peptidoglycan, and chitin by the geophagous earthworm *Metaphire guillelmi**. *Soil Biology and Biochemistry*, 64, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.009>
- Serrano B., Madeira, C. A. C., dos Santos Nunes, N. C. L., Dias, D. A. C. M., Godinho, D. M. B., de Jesus Pinto, M. F. de Figueiredo Ligeiro Fonseca, I. M. (2017). Study of the removal mechanism of aquatic emergent pollutants by new bio-based chars. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(28), 22698–22708. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9938-9>
- Sígala Rodríguez, J. Á., González Tagle, M. A., Prieto Ruíz, J. Á., Basave Villalobos, E., & Jiménez Pérez, J. (2016). Relaciones alométricas para predecir biomasa en plantas de *Pinus pseudostrobus* cultivadas en diferentes sistemas de producción en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 37(2), 369–378. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002016000200015>
- Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J. P., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., Göker, M. (2017). *Phylogenomics of Rhodobacteraceae reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats*. *ISME Journal*, 11(6), 1483–1499. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.198>
- Stackebrandt, E., & Ward-rainey, N. L. (1997). Actino bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(34), 479–491.

- Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). México, D.F.
- Tejedor, J. L. (2019). *Estudio del comportamiento de eisenia foetida y schoenoplectus californicus en biofiltros de cáscara de maní para el tratamiento de agua residual doméstica*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.
- Thangaraj, Naina., Siddharth, Sharan., Suneetha, Vuppu. (2013) *Role of Proteus mirabilis in Caffeine Degradation- A Preliminary Bioinformatics Study*. Research Journal of Recent Sciences Vol.2 (ISC-2012), 33-40 (2013)
- Tice, H., Mayilraj, S., Sims, D., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Chen, F. (2010). *Complete genome sequence of Nakamurella multipartita type strain (Y-104 T)*. Standards in Genomic Sciences, 2(2), 168–175. <https://doi.org/10.4056/sigs.721316>
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., & Buelna, G. (2017). *Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach*. Bioresource Technology, 224, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.042>
- UNESCO. (2017). *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017*. Aguas residuales: El recurso desaprovechado.
- US-EPA 816-F-03-016, List of Drinking Water Contaminants & their Maximum Contaminant Level (MCLs), Office of Water (4606M), <http://www.epa.gov/safewater>, June 2003.
- Vasquez, S. (2017). Análisis de la eficiencia de un prototipo de Biofiltro en el tratamiento de aguas residuales para riego en Trapiche, Comas, 2017. *Universidad César Vallejo*. Retrieved from <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/22235>
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Lev, O. (2015). *Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers*. Environmental Sciences: Processes and Impacts, 17(1), 41–53. <https://doi.org/10.1039/c4em00394b>

- Wang, C., Dong, D., Wang, H., Müller, K., Qin, Y., Wang, H., & Wu, W. (2016). *Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: New insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0440-2>
- Wang, Z., Yang, Y., Sun, W., & Xie, S. (2014). Biodegradation of nonylphenol by two alphaproteobacterial strains in liquid culture and sediment microcosm. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 92, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.004>
- Weber, K., Gehder, M., & Legge, R. L. (2008). *Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure*. *Water Research*, 42(1–2), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.055>
- Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamed, J. (2017). Biology and biotechnology of actinobacteria. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, 1–395. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1>
- Xu, D., Li, Y., & Howard, A. (2013). *Influence of earthworm Eisenia fetida on removal efficiency of N and P in vertical flow constructed wetland*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 5922–5929. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1860-1>
- Zhang, D., Luo, J., Lee, Z. M. P., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2016). *Ibuprofen removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Treatment performance and fungal community dynamics*. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 37(12), 1467–1479. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1119201>
- Zhang, D., Luo, J., Lee, Z. M. P., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2016). *Characterization of microbial communities in wetland mesocosms receiving caffeine-enriched wastewater*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), 14526–14539. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6586-4>
- Zhu, L., Li, Z., & Ketola, T. (2011). *Biomass accumulations and nutrient uptake of plants cultivated on artificial floating beds in China's rural area*. *Ecological Engineering*, 37(10), 1460–1466. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.03.010

## **6. ANEXOS**

## ANEXOS

### ANEXO 1. COLUMNAS DE BIOFILTRACIÓN

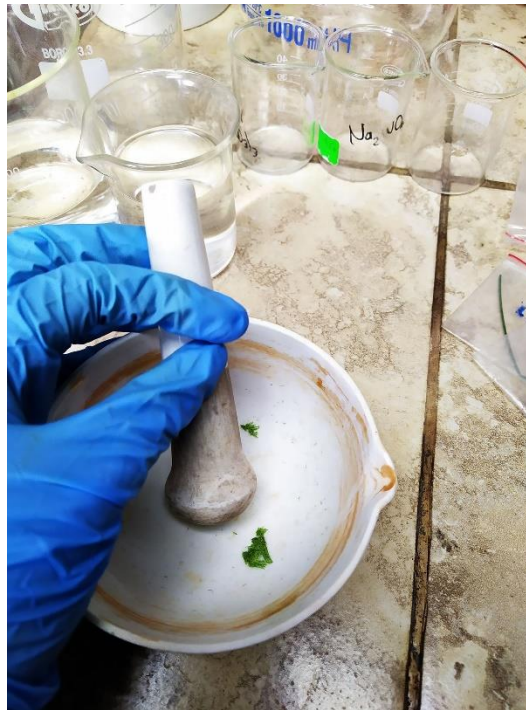


**Figura 13.** Biofiltros de tipología P: medio filtrante y macrófitas



**Figura 14.** Biofiltros de tipología LP: medio filtrante, macrófitas y lombrices.

## ANEXO 2. ANÁLISIS CLOROFÍLICO



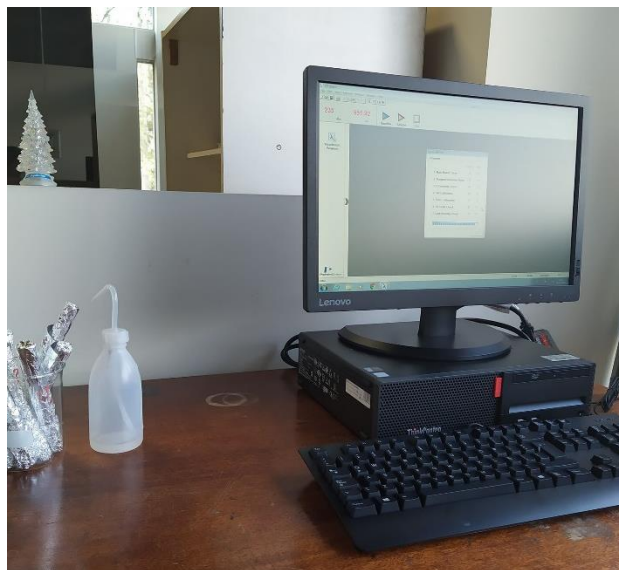
**Figura 15.** Preparación de las muestras de macrófitas.



**Figura 16.** Adición de etanol a las muestras. Extracción del pigmento.

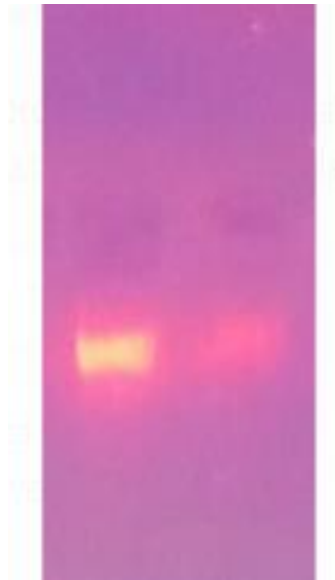


**Figura 17.** Muestras de macrófitas, extracto de clorofila almacenado para posterior análisis.



**Figura 18.** Utilización de UV-VIS para lecturas de concentraciones de clorofila.

### ANEXO 3. ANÁLISIS MOLECULAR



**Figura 19.** Visualización en gel agarosa 1,2% de amplicones. Fragmentos de aproximadamente 300 pb amplificados con primers ITS 3F-4R.

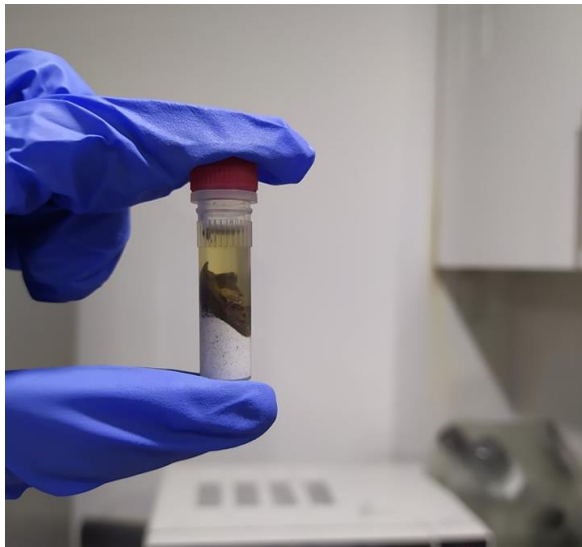


**Figura 20.** Visualización en gel agarosa 1,2% de amplicones. Fragmentos de aproximadamente 300 pb amplificados con primers 16S F y R.

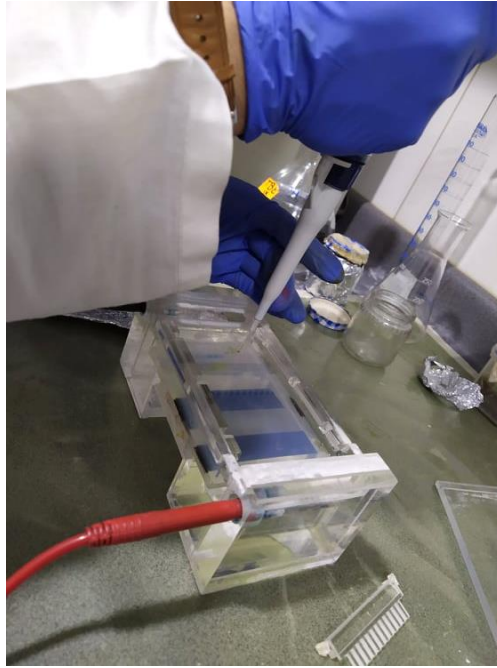




**Figura 21.** Toma de muestras para la extracción del ADN.



**Figura 22.** Separación de membranas (Lisis celular) de la muestra LP1.

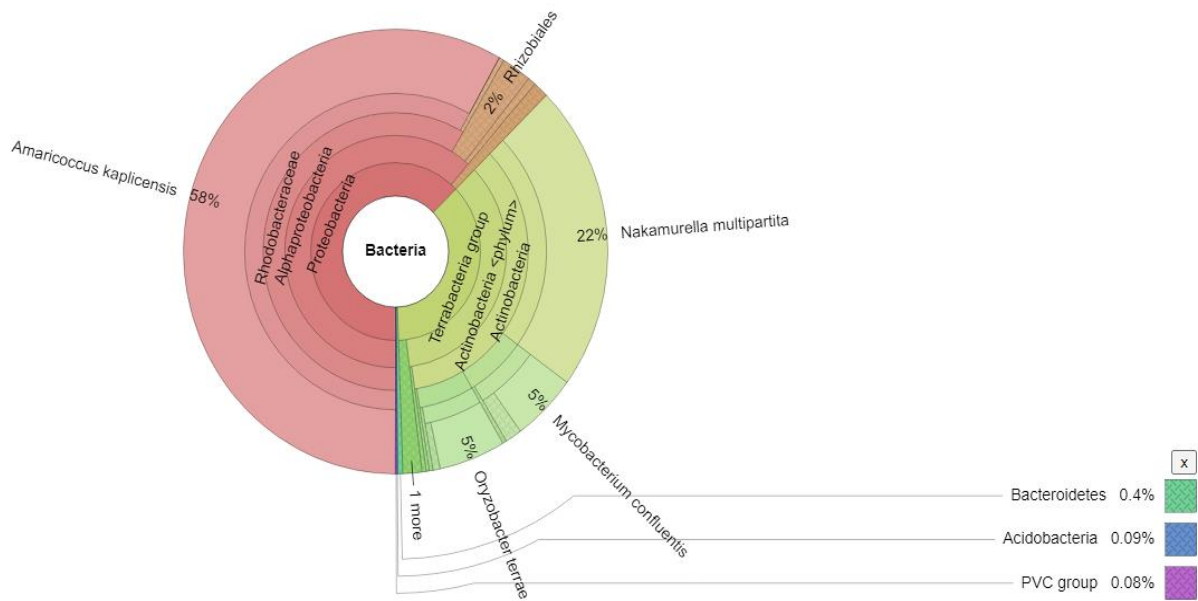


**Figura 23.** Gel agarosa.

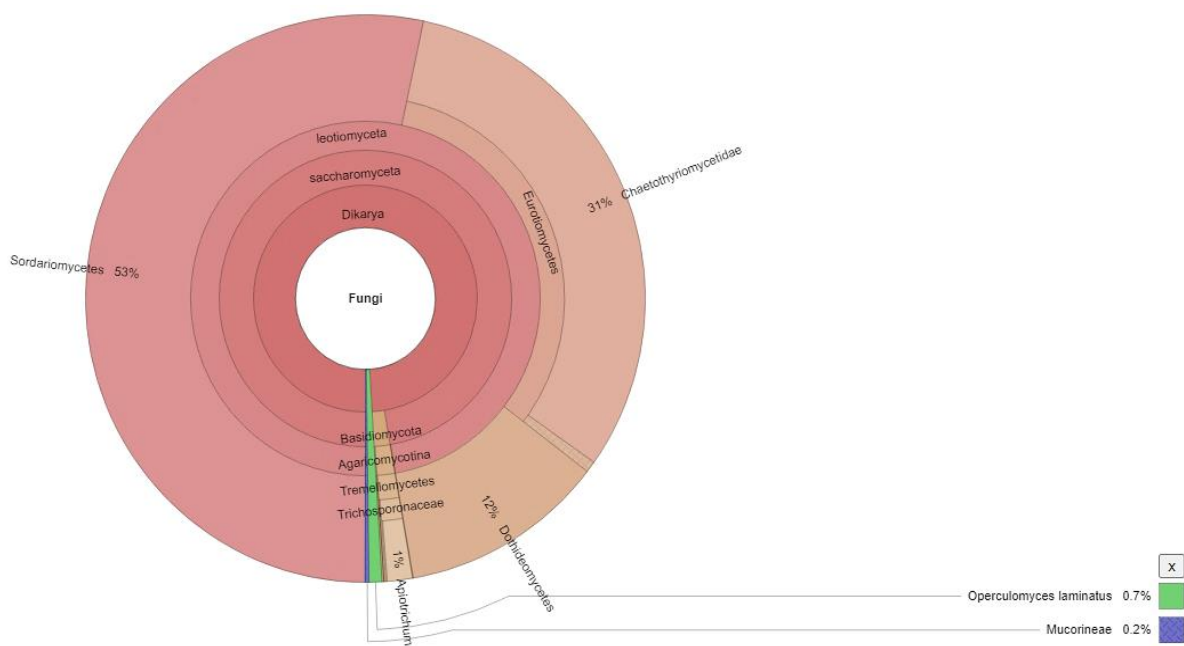


**Figura 24.** Cámara electroforesis y fuente de poder VWR.

## ANEXO 4. RESULTADOS ANÁLISIS MOLECULAR



**Figura 25.** Visualización de discos Krona para bacterias. Primer muestreo a los filtros.



**Figura 26.** Visualización de discos Krona para hongos. Primer muestreo a los filtros.

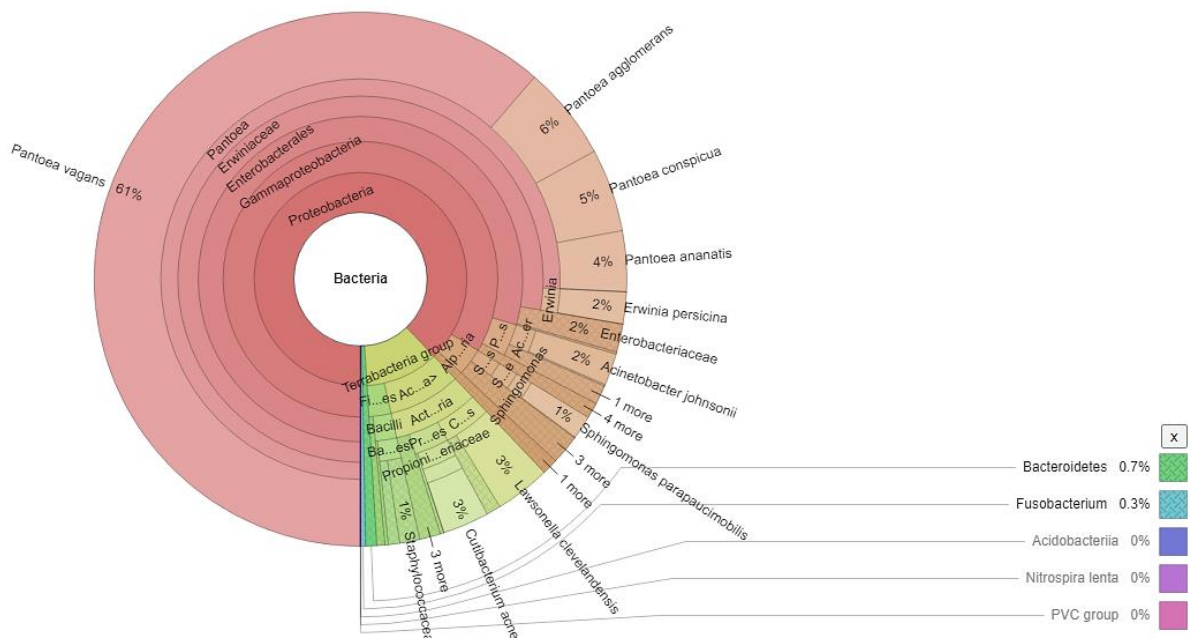


Figura 27. Visualización de discos Krona para bacterias. Segundo muestreo a los filtros.

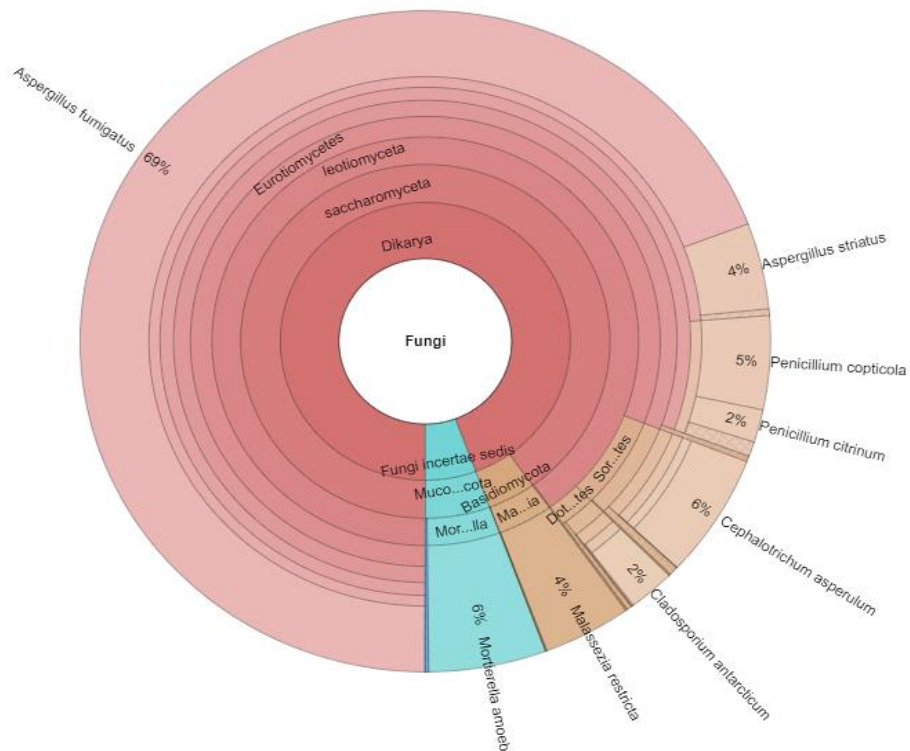


Figura 28. Visualización de discos Krona para hongos. Segundo muestreo a los filtros.

Amount: 6016

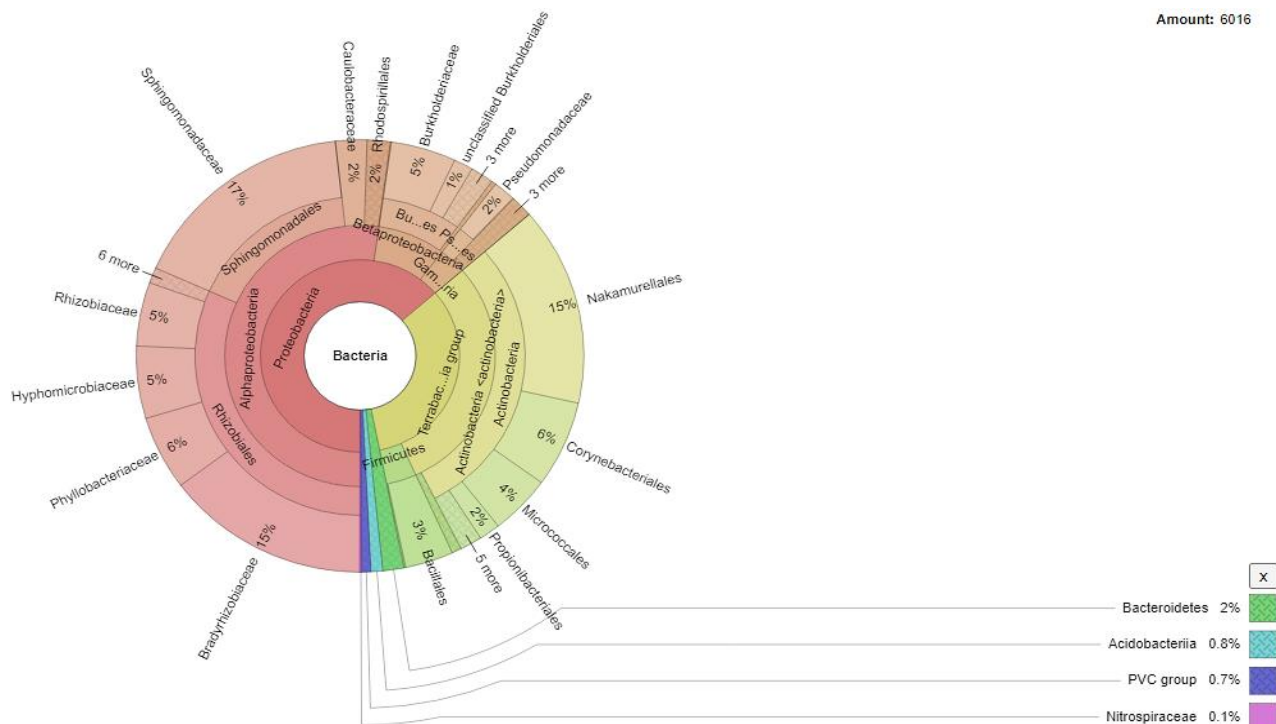


Figura 29. Visualización de discos Krona para bacterias. Tercer muestreo a los filtros.

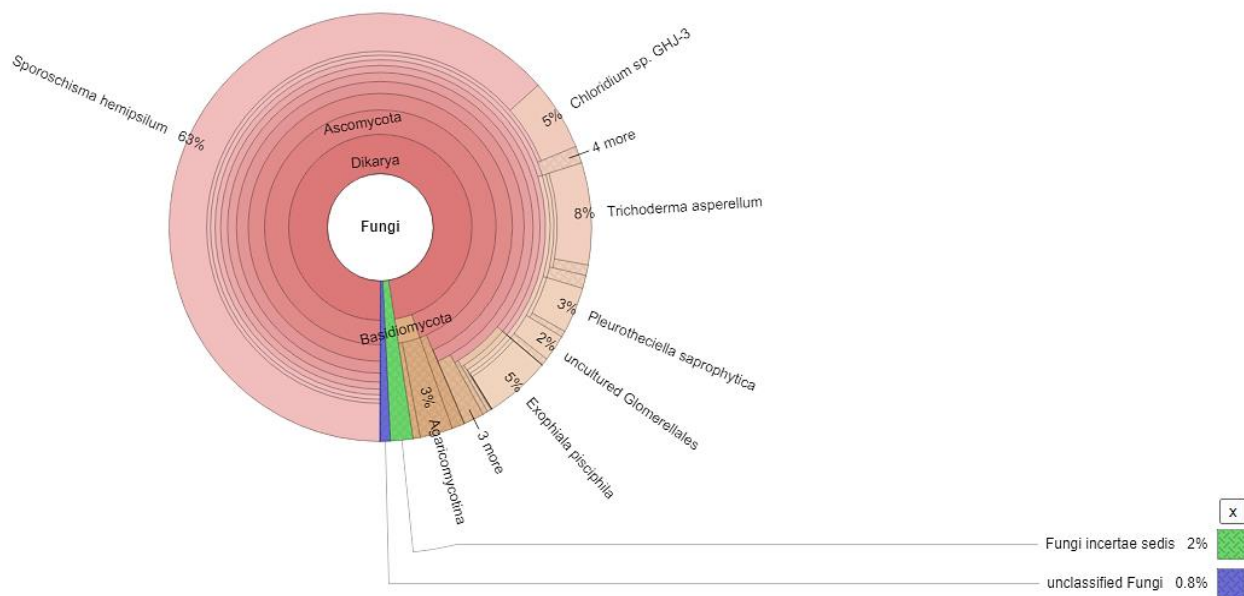


Figura 30. Visualización de discos Krona para hongos. Tercer muestreo a los filtros.

## **ANEXO 5. ANÁLISIS DE PLAGIO**

<https://secure.arkund.com/view/74776230-783575-649862#/>