



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



**TESIS**  
**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS**  
**Y EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA MICROBIANA A**  
**ANTIBIÓTICOS EN AGUAS DEL RÍO HUATANAY, CUSCO**

**PRESENTADA POR:**

**TATIANA DEL CASTILLO DE LOAYZA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

**PUNO, PERÚ**

**2022**



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

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS**  
**Y EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA MICROBIANA A**  
**ANTIBIÓTICOS EN AGUAS DEL RÍO HUATANAY, CUSCO**

**PRESENTADA POR:**

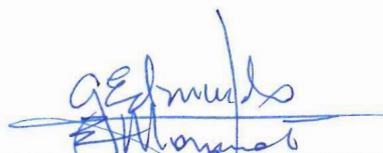
**TATIANA DEL CASTILLO DE LOAYZA**  
**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**



APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

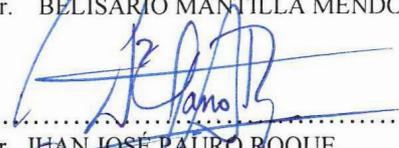
PRESIDENTE

  
.....  
Dr. EDMUNDO GERARDO MORENO TERRAZAS

PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Dr. BELISARIO MANTILLA MENDOZA

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
Dr. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

ASESOR DE TESIS

  
.....  
Dr. FRANZ ZIRENA VILCA

Puno, 20 de octubre del 2022

**ÁREA:** Ciencias Biológicas y ambientales

**TEMA:** Identificación y cuantificación de residuos de antibióticos y evaluación de la resistencia microbiana a antibióticos en aguas del río Huatanay, Cusco

**LÍNEA:** Contaminación ambiental



## DEDICATORIA

Al Divino hacedor y su Reyna madre mi inspiración; y a mis padres.

Con infinito amor a mis hijos Stephanie, Luis y a mi esposo José Luis.

Con profundo cariño, en memoria de Edilberto Yáñez Herbozo.



## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento al Dr. Franz Zirena Vilca, Asesor de esta tesis por toda la ayuda, enseñanzas y apoyo incondicional que me ha brindado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Luis Kanashiro Chinen, por su valiosa contribución representando al Laboratorio Medifarma. S.A.

Al Qco. Jorge Choquenaira Pari, por su ayuda y soporte técnico en los ensayos cromatográficos.

A todos los docentes que me formaron y enseñaron.

Al Gerente de SEDA QOSQO y personal del laboratorio de planta en la PTAR Cusco, por permitirme el acceso a las instalaciones para realizar los estudios y facilitarme todos los datos necesarios.

A la Dra. Ingrid Maldonado por su invaluable ayuda en la última etapa de este trabajo, y a mi familia y amigos, por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1

### CAPÍTULO I

#### REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico	3
1.1.1 Contaminantes Emergentes	3
1.1.2 Antibióticos	4
1.1.3 Tipos de antibióticos	5
1.1.3.1 De acuerdo a la interacción germen-antibiótico.	5
1.1.3.2 Según el espectro de acción	5
1.1.3.3 Según el mecanismo de acción:	6
1.1.4 Efecto de los antibióticos sobre la comunidad bacteriana	6
1.1.5 Resistencia bacteriana	7
1.1.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC	9
1.1.6.1 Principios de la técnica	9
1.1.6.2 Campos de Aplicación de HPLC	9
1.1.7 Antibióticos de mayor uso por la población	10
1.1.8 Contaminación de los ríos con residuos de antibióticos contenidos en las aguas residuales	10



1.1.9 Eficiencia de las plantas de tratamiento en la remoción de residuos de antibióticos	10
1.2 Antecedentes	11
1.2.1 Residuos de antibióticos presentes en aguas residuales	11
1.2.2 Contaminación de aguas superficiales con residuos de antibióticos por vertidos de aguas residuales	13
1.2.3 Presencia de bacterias resistentes a antibióticos en aguas residuales	15

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema	18
2.1.1 Enunciado del problema	19
2.1.1.1 Problema General	19
2.1.1.2 Problemas Específicos	19
2.2 Justificación	19
2.3 Objetivos	20
2.3.1 Objetivo general	20
2.3.2 Objetivos específicos	20
2.4 Hipótesis	21
2.4.1 Hipótesis general	21
2.4.2 Hipótesis específicas	21

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio	22
3.2 Características de la planta	23
3.3 Población	24
3.4 Muestra	24
3.4.1 Tipo de muestreo:	24
3.4.2 Unidad de análisis:	24
3.5 Método de investigación	25

3.5.1	Tipo de investigación	25
3.6	Descripción de métodos por objetivos específicos	25
3.6.1	Identificación y cuantificación de residuos de antibióticos	25
3.6.1.1	Toma de muestras de aguas residuales:	25
3.6.1.2	Análisis por cromatografía líquida	26
3.6.2	Evaluar la sensibilidad o resistencia de las cepas aisladas del río Huatanay de E. coli; Salmonella tiphy y Klebsiella pneumoniae frente a antibióticos encontrados mediante análisis microbiológicos	28
3.6.2.1	Preparación de muestras	28
3.6.2.2	Pruebas de confirmación de E coli	29
3.6.2.3	Pruebas de detección e identificación de Salmonella tiphy	29
3.6.2.4	Pruebas de detección e identificación de Klebsiella Pneumoniae	30
3.6.2.5	Antibiograma	30
3.6.3	Análisis estadístico	31

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Identificar y cuantificar residuos de antibióticos en aguas del río Huatanay Cusco pre y pos tratamiento en la PTAR, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC	32
4.2	Evaluar la sensibilidad o resistencia de las cepas aisladas del río Huatanay de E. coli; Salmonella tiphy y Klebsiella pneumoniae frente a antibióticos encontrados mediante análisis microbiológicos.	37
4.2.1	Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa Escherichia coli	37
4.2.2	Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa Salmonella sp.	41
4.2.3	Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa Klebsiella sp.	43
4.3	Parámetros fisicoquímicos del afluente y efluente de la planta de tratamiento	45
4.4	Impactos en la salud humana, producidos por los residuos de antibióticos en aguas del río Huatanay, opinión de expertos	46



4.5 Influencia de la planta de tratamiento de aguas residuales del rio Huatanay, San Jerónimo Cusco, según opinión de expertos	48
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

1. Presencia de antibióticos y análisis del Test de Wilcoxon en aguas residuales en la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.	33
2. Características fisicoquímicas de antibióticos hallados en muestras de agua residual de la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.	37
3. Susceptibilidad de <i>Escherichia coli</i> , frente a antibióticos hallados en las aguas residuales de la ciudad de Cusco.	38
4. Susceptibilidad de <i>Salmonella</i> sp. frente a antibióticos hallados en el afluyente de las aguas residuales de la ciudad de Cusco.	41
5. Susceptibilidad de <i>Klebsiella</i> sp. frente a antibióticos hallados en el afluyente de las aguas residuales de la ciudad de Cusco.	44
6. Parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua en la planta de tratamiento de Cusco.	45



## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Fuentes de contaminación con residuos de antibióticos. Fuente: (Ben et al., 2019).	5
2. Mecanismos de acción de los antibióticos contra las bacterias. Fuente: (Grenni et al., 2018)	6
3. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias. Fuente: (Cheng et al., 2020).	8
4. Ubicación del área de estudio-la planta de tratamiento en el distrito de San Jerónimo de la ciudad de Cusco y el río Huatanay.	23
5. Esquema de muestreo en la zona de estudio	25
6. Concentración de residuos de antibióticos en el afluente y el efluente.	34
7. Eficiencia de la planta en la remoción de antibióticos.	36
8. Principales impactos de los residuos de antibióticos en el ambiente	47
9. Influencia de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco en la calidad de aguas del río Huatanay.	49



## ÍNDICE DE ANEXOS

1. a) Muestreo de aguas residuales y b) Rotulado de las muestras de agua en la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.	66
2. a) Rotulado de las muestras para su adecuada identificación. b) Muestra rotulada	67
3. Preparación de las muestras para su traslado al laboratorio para su posterior análisis.	68
4. a) Análisis de muestras en el laboratorio de la unsc de cusco. b) Depósito de las muestras en los viales, previo al análisis.	69
5. Picos cromatográficos de los antibióticos analizados	70
6. a) Curva de calibración para amoxicilina y b) lincomicina.	71
7. Analizando las muestras en el cromatógrafo	72
8. Parámetros fisicoquímicos medidos en el afluente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.	73
9. Resultados de residuos de antibióticos en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.	74
10. Resultados de residuos de antibióticos en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.	75

## RESUMEN

Existe creciente interés por estudiar los residuos de antibióticos, debido a los riesgos que representa su presencia en el ambiente. El objetivo del estudio fue identificar y cuantificar los residuos de antibióticos y evaluar la resistencia bacteriana a ellos. Con este fin, se recolectó 40 muestras para analizar los residuos de antibióticos y 12 muestras para evaluar la resistencia bacteriana, durante los meses de abril a octubre, y se analizaron con métodos de cromatografía líquida y métodos microbiológicos estandarizados. Con los datos obtenidos de residuos antibióticos se aplicó el Test de Wilcoxon y para los datos de resistencia bacteriana se empleó la T de student. Los resultados evidenciaron 6 residuos de antibióticos en el afluente (amoxicilina, lincomicina, trimetoprima, sulfametoxazol, dicloxacilina y ceftriaxona) y 3 compuestos en el efluente (ceftriaxona, lincomicina y dicloxacilina). De ellos, los que se hallaron en mayor concentración fueron amoxicilina (91495 y 0  $\mu\text{g/L}$ ) y lincomicina (33970 y 10800  $\mu\text{g/L}$ ); ambos en el afluente y efluente respectivamente. Respecto a las bacterias; *E. coli* demostró resistencia en el efluente a cefalexina y azitromicina. Respecto a *Salmonella* sp. fue resistente para amoxicilina, dicloxacilina, lincomicina, ceftriaxona, cefalexina y ciprofloxacino. Finalmente, la *Klebsiella* sp. fue sensible a amoxicilina, ceftriaxona y cefalexina. Concluyendo que las aguas residuales de la ciudad de Cusco, contienen residuos de antibióticos; asimismo, el tiempo de permanencia de las bacterias en la planta de tratamiento influyó en el desarrollo de resistencia bacteriana en muestras del efluente.

### Palabras clave:

Aguas residuales, Residuos de antibióticos, Contaminación, Resistencia Bacteriana.

## ABSTRACT

There is growing interest in studying antibiotic residues, due to the risks that their presence in the environment represents. The objective of the study was to identify and quantify antibiotic residues and to evaluate bacterial resistance to them. To this end, 40 samples of the effluent from the Cusco wastewater treatment plant that enters the Huatanay River were collected to analyze antibiotic residues and 12 samples to evaluate bacterial resistance, during the months of April to October, and analyzed by liquid chromatography and standardized microbiological methods. With the data obtained from antibiotic residues, the Wilcoxon test was applied and the bacterial resistance data were analyzed with the Student's t-test. The results showed 6 antibiotic residues in the effluent: amoxicillin, lincomycin, trimethoprim, sulfamethoxazole, dicloxacillin and ceftriaxone and 3 compounds: ceftriaxone, lincomycin and dicloxacillin in the effluent. Of these, those found in the highest concentration were amoxicillin (91495 and 0  $\mu\text{g/L}$ ) and lincomycin (33970 and 10800  $\mu\text{g/L}$ ), in the influent and effluent, respectively. Regarding bacteria, *E. coli* showed resistance in the effluent to cephalexin and azithromycin. While *Salmonella sp.* it was resistant to amoxicillin, dicloxacillin, lincomycin, ceftriaxone, cephalexin, and ciprofloxacin. Finally, *Klebsiella sp.* was sensitive to amoxicillin, ceftriaxone and cephalexin. We conclude that wastewater from the city of Cusco contains antibiotic residues. Likewise, the residence time of the bacteria in the treatment plant influenced the development of bacterial resistance in effluent samples.

**Keywords:** Wastewater, Antibiotic residues, Pollution, Bacterial resistance.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de agua dulce son cada vez más afectados por la presencia de contaminantes emergentes (CE) vertidos conjuntamente con las aguas residuales (Almeida et al., 2017; Petrovic et al., 2013). Estos compuestos no solo degradan la calidad de las aguas, sino también afectan a toda la comunidad biológica presente en estos ecosistemas debido a efectos directos e indirectos que ocasionan en los seres vivos (Almeida et al., 2017). Uno de los grandes problemas que ocasionan es la generación de resistencia bacteriana en las bacterias locales (Cheng et al., 2020; Sorinolu et al., 2021). Este hecho, junto con la presencia de residuos de antibióticos representa riesgos para la salud humana, considerando que estos recursos hídricos se usan para diversas actividades como el regadío, acuicultura, incluso para el consumo humano, en tramos más abajo de la descarga de aguas residuales (Pan et al., 2014; Sorinolu et al., 2021). Esto representa gran riesgo para la salud humana, debido a que estos compuestos pueden llegar a ser consumidos a través de los alimentos y el agua de consumo (Carvalho & Santos, 2016)

El río Huatanay es un curso de agua muy importante en la región de Cusco, atraviesa la ciudad, y es impactada por las actividades que en esta se realizan, tales como, el vertimiento de residuos sólidos y aguas residuales. Las aguas del río Huatanay son afluente de la cuenca del Río Vilcanota, la misma que recorre varios distritos y centros poblados, donde se desarrollan actividades principales: turismo, agricultura, acuicultura, ganadería, comercio (INGEMET, 2011), y recibe monitoreo de calidad por la DIGESA-DIRESA-CUSCO en 15 sub estaciones a lo largo de su recorrido; de igual manera las aguas residuales del río Huatanay son aguas utilizadas en riego y pastoreo en las orillas en la zona sur del Cusco, reciben tratamiento en una planta solo en un 60 a 70% de su caudal, para luego ser vertidas nuevamente a su cauce, con la consiguiente contaminación (Nieto-Juarez et al., 2021). Por lo que se requiere de manera urgente, determinar los residuos de antibióticos y las concentraciones que existen en el efluente de las aguas residuales y en muestras de agua de este río (Ferhi et al., 2016), a fin de que las autoridades pertinentes tomen las medidas necesarias para la protección de la salud humana.

El objetivo de este trabajo de investigación fue identificar y cuantificar los residuos de antibióticos en aguas del río Huatanay Cusco pre y pos tratamiento en la planta de tratamiento de aguas PTAR, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta



resolución HPLC, y evaluar la sensibilidad o resistencia bacteriana mediante análisis microbiológicos. Este trabajo de investigación pertenece al área de Ciencias Biológicas y Ambientales, línea de Contaminación Ambiental.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 Marco teórico

##### 1.1.1 Contaminantes Emergentes

Los contaminantes emergentes (CE) es una denominación que generalmente se utiliza para referirse a sustancias de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera importante en términos de distribución y/o cantidad (Petrovic et al., 2013), principalmente por el desconocimiento de su presencia en el ambiente. No obstante, en estudios recientes están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de ocasionar un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Carvalho & Santos, 2016; Stuart et al., 2012).

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que existe una introducción continua en el ambiente (Carvalho & Santos, 2016). Se ha establecido que estos compuestos ingresan al ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Daughton, 2004; Fent *et al.*, 2006), de restos derivados de plantas en los que se dan tratamiento a las aguas residuales (Kolpin et al., 2002), de los efluentes hospitalarios (Kümmerer, 2001; Loudermilk et al., 2022), de las actividades agrícolas y ganaderas (Petrovic et al., 2013; Watanabe et al., 2010). Las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminar completamente este tipo de compuestos (Gerzabek et al., 2007; Pal *et al.*, 2010); motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras (Kaštelan-Macan et al., 2007).

Los CE incluyen una gran cantidad de compuestos químicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes así como aditivos industriales (Matamoros et al., 2016; Murray et al., 2010). Este tipo de sustancias no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas; por lo que existe limitada información disponible sobre su presencia y el efecto que puede causar en la salud humana y el ambiente (Daughton, 2004; Elorriaga et al., 2012; Prieto-Rodriguez et al., 2012; Smital, 2008). Por estas razones, hay mayor probabilidad de hallar estos compuestos en muestras de agua superficial (Carvalho & Santos, 2016), ya que estas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de contaminantes emergentes que las aguas subterráneas (Lapworth *et al.*, 2012; Stuart et al., 2012).

### **1.1.2 Antibióticos**

Son sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias o incluso las elimina completamente (Bhattacharjee, 2016; Camacho Assef, 2010; Grenni et al., 2018). Lamentablemente su uso se ha incrementado, debido que se emplea no solo en hospitales sino también por personas practicantes de la medicina o la automedicación (Kümmerer, 2001). Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo (Bacteriostático, bactericida, Etc.) (Grenni et al., 2018). Ejerciendo mayor impacto principalmente sobre las bacterias nativas; así como, efectos tóxicos sobre otras especies acuáticas y las células humanas (Kołodziejska et al., 2013; Lili Liu et al., 2018; Xiong et al., 2019).

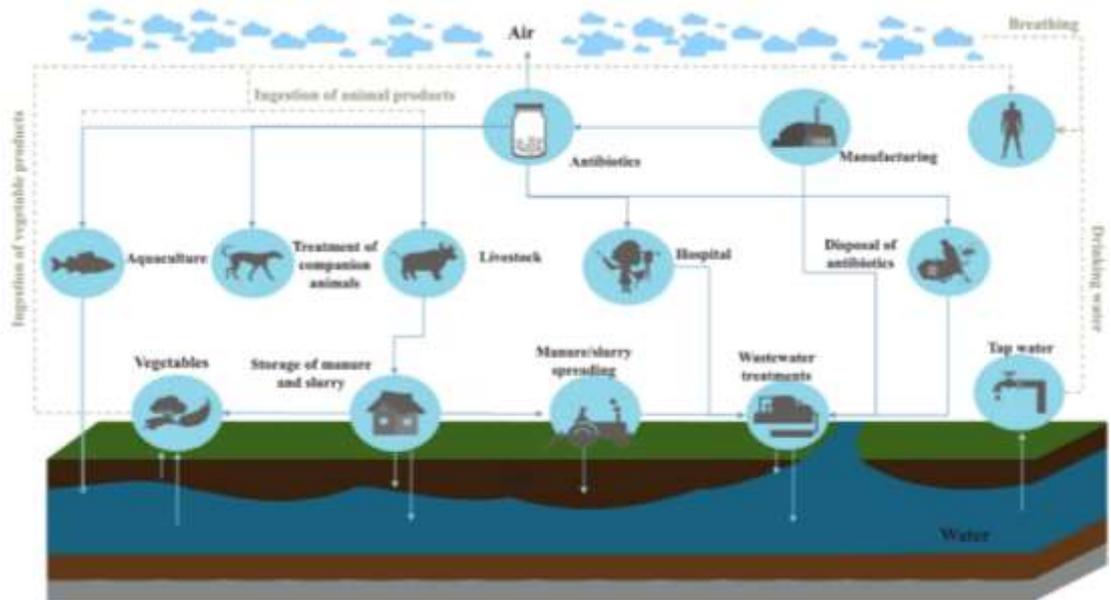


Figura 1. Fuentes de contaminación con residuos de antibióticos. Fuente: (Ben et al., 2019).

### 1.1.3 Tipos de antibióticos

#### 1.1.3.1 De acuerdo a la interacción germen-antibiótico.

Estos antibióticos pueden dividirse en:

- Bactericidas: Su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana (Jafari et al., 2020).
- Bacteriostáticos: Impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruirlas (Martínez-Alcalá et al., 2020).

#### 1.1.3.2 Según el espectro de acción

- Antibióticos de espectro amplio: Como aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes, bacterias principalmente gram positivas y negativas, como por ejemplo cloranfenicol y oxitetraciclina (Martínez-Alcalá et al., 2020).
- Antibióticos de espectro reducido: Antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies (penicilinas) (Bhattacharjee, 2016).

### 1.1.3.3 Según el mecanismo de acción:

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en:

- Inhibidores de la formación de la pared bacteriana.
- Inhibidores de la síntesis proteica.
- Inhibidores de la duplicación del DNA.
- Inhibidores de la membrana citoplasmática
- Inhibidores de vías metabólicas (Bhattacharjee, 2016; Upmanyu & Malviya, 2020).

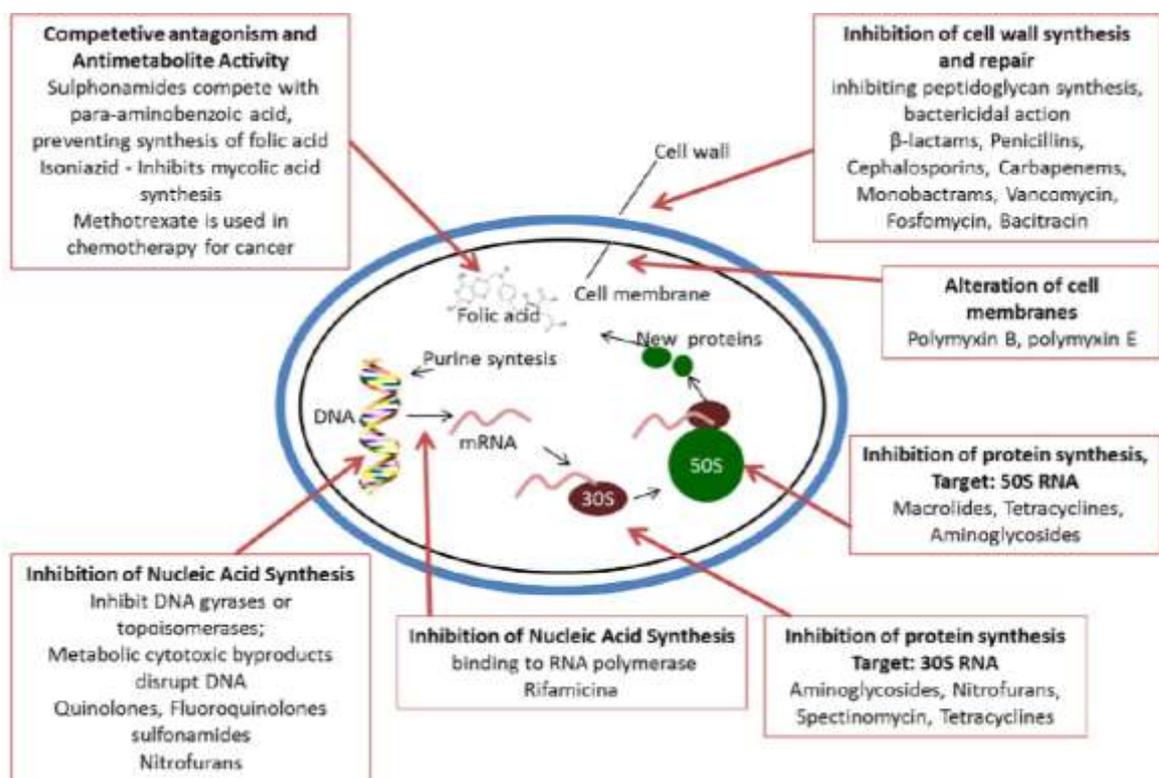


Figura 2. Mecanismos de acción de los antibióticos contra las bacterias. Fuente: (Grenni et al., 2018)

### 1.1.4 Efecto de los antibióticos sobre la comunidad bacteriana

La fuente principal de la presencia de residuos de antibióticos en el ambiente, especialmente en los ecosistemas acuáticos, son las aguas residuales. Estos se vierten de manera continua siendo una fuente permanente de contaminación de antibióticos

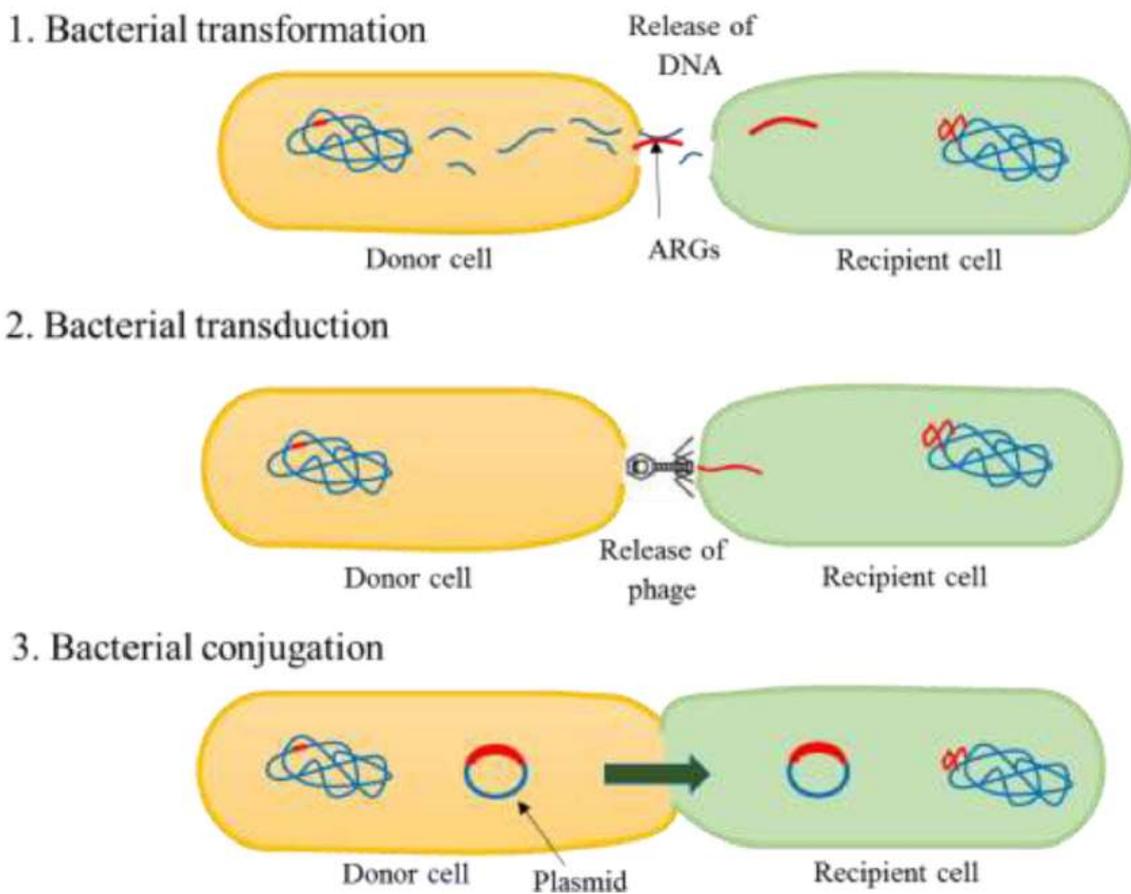
(Chen, 2014). El uso excesivo de fármacos por la población tales como los antibióticos, repercute en el incremento de residuos que llegan hasta los ecosistemas acuáticos, lo que plantea grandes riesgos para la salud humana (Ben et al., 2019). El principal efecto de los antibióticos sobre las bacterias, es la alteración de la comunidad bacteriana. Pues en entornos naturales, el contacto extendido y a dosis mínimas de residuos de antibióticos trae como consecuencia la proliferación selectiva de bacterias (Cheng et al., 2020), eliminando a aquellos que son más susceptibles y sobreviviendo los más resistentes incluso los que son patógenos (Archundia et al., 2017; Ben et al., 2019). Asimismo, es conocido que la exposición a los antibióticos, aunque sea una sola vez, es capaz de generar resistencia bacteriana tal como se demostró con *E. coli* expuesta a un mix de antibióticos en un estudio experimental; por lo que la presencia transitoria de un evento de contaminación tiene el potencial de afectar a toda la comunidad bacteriana (Helt et al., 2012). Adicionalmente, en otro estudio se evaluó el efecto de generación de resistencia bacteriana en un periodo de 10 días, después de ese periodo, se evidenció que todas las bacterias eran resistentes a la oxitetraciclina en un 100% (Samuelsen et al., 1992).

Por otro lado, los antibióticos no solo afectan a las bacterias que son el microorganismo objetivo, sino también a otras especies acuáticas tales como, fitoplancton, zooplancton y peces (Kumar et al., 2019). En las algas pueden ocasionar alteraciones en el crecimiento y desarrollo, así como alteración en los componentes bioquímicos (Xiong et al., 2019). Según la capacidad de daño que originan, incluso pueden afectar la diversidad de especies en los ecosistemas acuáticos (Matamoros et al., 2016), por lo que es necesario que se preste la debida importancia a fin de evitar mayores daños a los ecosistemas acuáticos que tan vulnerables son por este tipo de contaminación.

### **1.1.5 Resistencia bacteriana**

Es la insensibilidad bacteriana ante la presencia de antibióticos, evidenciando diferentes acciones de mutación u otro mecanismo que le permiten mitigar los efectos de los antibióticos (Bhattacharjee, 2016; Kümmerer, 2004), los que hacen que con el tiempo estos medicamentos se vuelvan ineficaces en el control de enfermedades, lo cual incrementa el riesgo de propagación a otras personas (WHO, 2018). Por ello, la resistencia bacteriana ha sido declarada una amenaza de escala global, lo que ha impulsado a crear el Plan de Acción Global de la Organización Mundial de la Salud

en 2015 (WHO, 2015), la Asamblea General de la Naciones Unidas en 2016, y por la Asociación de Naciones del Sudeste Asiático en 2017.



*Figura 3.* Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias. Fuente: (Cheng et al., 2020).

Las inquietudes relacionadas a la resistencia de antibióticos, provienen de lo que estos representan. La presencia de residuos de antibióticos puede alterar el microbioma humano y promover la aparición y selección de la resistencia de las bacterias; así como alteración del microbioma ambiental y dar lugar a reservorios de ARGs (genes de resistencia a los antibióticos) y ARBs (bacterias resistentes a los antibióticos) referidos como resistencia a los residuos de antibióticos ambientales (Ben et al., 2019; Diwan et al., 2010; Helt et al., 2012). La resistencia bacteriana, se da de forma general por medio de cuatro mecanismos, a través de la inactivación o modificación del antibiótico por medio de enzimas bacterianas, expulsión o eliminación de la célula, generando inmunidad y desviación de la sustancia, finalmente la destrucción catalítica por enzimas (Bhattacharjee, 2016; Kumar et al., 2019; Wright, 2010). Una vez que se

genera la resistencia bacteriana, estas son capaces de transferir esos genes a sus bacterias hijas o a otras bacterias por diferentes mecanismos (Figura 3).

### 1.1.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC

#### 1.1.6.1 Principios de la técnica

El método cromatográfico es una técnica de separación y análisis basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre un fluido (fase móvil) y un adsorbente (fase estacionaria) (Cahui, 2019). La fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*) no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra.

La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular (Meyer, 2010). Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa.

La HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación (Snyder et al., 2010).

#### 1.1.6.2 Campos de Aplicación de HPLC

- Fármacos: Antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos
- Bioquímica: Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
- Productos de alimentación: Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
- Productos de la industria química: Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes.
- Contaminantes: Fenoles, Pesticidas, herbicidas, PCB, antibióticos
- Química forense: Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
- Medicina clínica: Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos (Meyer, 2010; Snyder et al., 2010; J. Wang et al., 2020).

### **1.1.7 Antibióticos de mayor uso por la población**

A nivel mundial, el consumo de antibióticos se incrementó un 36% (Gaceta Medica, 2015). El amplio uso en servicios hospitalarios (Narvaez & Jimenez, 2012), el uso inapropiado (Gómez et al., 2014), la incidencia de la pandemia del COVID 19 (Gonzalez-Zorn, 2021), uso veterinario y su empleo como promotores del crecimiento en la cría de animales, la piscicultura y otros campos (Kümmerer, 2004); son factores que influyen en el incremento de residuos en el ambiente.

En las investigaciones relacionadas a la presencia de residuos de antibioticos en los ecosistemas acuáticos resaltan los correspondientes a los 7 grupos de antibióticos, dentro de estos grupos tenemos, Amoxicilina (AMX), Dicloxacilina (DCX), Ceftriaxona (CFT), Lincomicina (LCM), sulfametoxazol (SMX), trimetoprim (TMP), (Archundia et al., 2017; Carvalho & Santos, 2016; Duwig et al., 2014). Y la fuente principal de estos contaminantes son las aguas residuales.

### **1.1.8 Contaminación de los ríos con residuos de antibióticos contenidos en las aguas residuales**

Los antibióticos son sustancias químicas con efectos tóxicos y genotóxicos para el ambiente (Paz *et al.*, 2008) . Durante los últimos años, se han identificado numerosos compuestos farmacéuticos y sus metabolitos tanto en aguas residuales como en ríos y otras corrientes superficiales e incluso en muestras de agua potable (R. Zhang et al., 2012). El control de estos contaminantes resulta particularmente difícil debido a la gran dispersión de sus fuentes de emisión que van desde los residuos domésticos, hospitalarios e industriales hasta los vertidos procedentes de la actividad agrícola y ganadera (Cahui, 2019).

### **1.1.9 Eficiencia de las plantas de tratamiento en la remoción de residuos de antibióticos**

Los antibióticos son vertidos constantemente al ambiente y, además, los sistemas habituales de depuración no están diseñados para eliminarlos; por lo que sus niveles en el medio pueden alcanzar fácilmente valores elevados (Nieto-Juarez et al., 2021). Este problema se da debido a que porcentajes entre el 30% y el 90% de los antibióticos consumidos por los seres humanos y animales se eliminan como residuos mediante la orina y heces, y los tratamientos convencionales de las aguas residuales los degrada

parcialmente (Carvalho & Santos, 2016). Pues la presencia de residuos de antibióticos influencia negativamente en el normal funcionamiento de la planta debido a la alteración de la comunidad bacteriana (Almeida et al., 2017). Por ello, aún existen residuos de antibióticos en el efluente de aguas residuales que se descargan en el ambiente.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Residuos de antibióticos presentes en aguas residuales

En numerosos estudios en los que se analizaron residuos de antibióticos en muestras de aguas residuales, se evidenció la presencia de estos compuestos antibióticos (K. Wang et al., 2021). En España se realizó un estudio en el que se evaluaron la presencia de 17 residuos de antibióticos en 11 efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en los que se detectaron tres residuos de antibióticos en todas las muestras analizadas (azitromicina, ciprofloxacina y ofloxacino) (Martínez-Alcalá et al., 2020). De manera similar, en un estudio en China en el que se evaluó la presencia de residuos de antibióticos en aguas residuales que se usan para riego de campos de cultivo, se hallaron 6 residuos de antibióticos (tetraciclina, sulfametoxazol, norfloxacina, eritromicina y cloranfenicol), los que lamentablemente también se encontraron en muestras de suelo y de los cultivos, lo que representa un grave riesgo de salud pública debido a que esos productos se destinan para el consumo humano (Pan et al., 2014).

En otro estudio realizado en España, se analizaron muestras de aguas residuales provenientes de una planta de tratamiento que tiene incorporado un tratamiento biológico secundario; los resultados evidenciaron la presencia de 52 contaminantes emergentes a través de cromatografía (HPLC-QTRAP-MS), dentro de ellos se encontraron residuos de antibióticos como azitromicina (69 ng/L), carbapenem (114 ng/L), ciprofloxacino (305 ng/L), claritromicina (54 ng/L), eritromicina (78 ng/L), lincomicina (192 ng/L), norfloxacina (29 ng/L), ofloxacina (1614 ng/L), sulfadiazina (36 ng/L), sulfametazina (236 ng/L), sulfametoxazol (999 ng/L), sulfapiridina (131 ng/L) y trimetoprima. Aunque el tipo y la concentración de residuos de antibióticos varían de día en día, los mencionados fueron los que con frecuencia se hallaron en las muestras de agua residual (1661 ng/L) (Prieto-Rodríguez et al., 2012).

En este mismo contexto en otra investigación se evidenciaron 13 residuos de antibióticos de 56 antibióticos analizados, dentro de ellos se encuentra ofloxacino, ciprofloxacina, enrofloxacino, ampicilina, cefalexina, azitromicina, espiramicina, lincomicina, sulfametoxazol, sulfapiridina, trimetoprima. Las concentraciones variaron de 23.30 (cefalexina) a 690.50 ng/L (espiramicina) en el afluente de la PTAR y de 7.50 (cefalexina) a 37.04 ng/L (espiramicina) en el efluente de la PTAR. Adicionalmente, se halló el riesgo ambiental de cada compuesto; del cual, los residuos de antibióticos que mayor riesgo representan para el ambiente fueron, ciprofloxacino, azitromicina ofloxacino y sulfametoxazol (Harrabi et al., 2018), así se confirma la presencia de este tipo de compuestos en las aguas residuales en diversos lugares del mundo.

No solo las aguas residuales municipales tienen contenido de residuos antibióticos, sino también otras fuentes tales como, aguas residuales industriales dedicadas a la producción de fármacos, en los que usualmente los residuos de antibióticos y la cantidad de agua usada en la producción de fármacos, son elevados. En un estudio realizado en el efluente de aguas industriales del taller de producción de una fábrica de producción farmacéutica, se mantuvieron altas concentraciones de cefalexina y cefradina, observándose la mayor concentración de cefradina (1328 mg/L). Asimismo, se realizaron pruebas eco toxicológicas con especies acuáticas, en los que se evidenciaron la elevada toxicidad de estas aguas con respecto a las especies consideradas en el estudio (*Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*), demostrado así, que esta actividad es otra fuente importante de contaminación de residuos de antibióticos en los ecosistemas acuáticos (Xue et al., 2022).

También en aguas provenientes de granjas de crianza animal, lo señala un estudio en el que se analizaron muestras provenientes de granjas, y encontraron 19 compuestos de 76 fármacos en las aguas residuales crudas y tratadas de cuatro principales mataderos de la ciudad de Pekín. Se hallaron residuos de antibióticos como los macrólidos (kitasamicina, tilosina, eritromicina), las fluoro-quinonas (ofloxacino, pefloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacino), las sulfonamidas (sulfanilamida, sulfametoxazol), y las tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina) fueron los que se registraron con mayor periodicidad, con niveles más altos de hasta  $\sim 3 \mu\text{g/L}$  en las aguas residuales no tratados de los mataderos y  $\sim 1 \mu\text{g/L}$  en las aguas residuales

tratadas. Adicionalmente, estos compuestos también se hallaron en el río que recepciona estas aguas de matadero, con un valor máximo de hasta 0,2 µg/L (Shao et al., 2009).

Desafortunadamente, nuestro país no es ajeno a esta problemática, pues recientemente se realizó un estudio en el que se analizaron muestras de aguas residuales en cuatro de las ciudades principales del país (Lima, Cusco, Puno y Juliaca), en los cuales se hallaron 38 compuestos farmacéuticos, dentro de ellos 17 residuos de antibióticos. En relación a la ciudad de Cusco se encontraron 13 compuestos, de los cuales claritromicina (5060 ng/L) y clindamicina (130 ng/L in) fueron las que mostraron elevado riesgo ambiental (Nieto-Juarez et al., 2021).

### **1.2.2 Contaminación de aguas superficiales con residuos de antibióticos por vertidos de aguas residuales**

Son numerosas las actividades que generan residuos de antibióticos que finalmente llegan al ambiente, cuyo destino afecta las aguas superficiales, tal como evidencia un estudio que se realizó en China en seis ríos urbanos de la región de Guangzhou, en el sur de China, los que son impactados con aguas residuales. Se analizaron la presencia de nueve compuestos, de los cuales se registró mayores valores de norfloxacino y ciprofloxacina en las muestras de agua y sedimentos, lo que muestra que efectivamente las aguas residuales influyen en este aspecto de contaminación (Huang et al., 2019).

De manera similar en otro estudio en el que se evaluó muestras de agua del delta del río Pearl, así como en el mar sur de China, se detectaron concentraciones de residuos de antibióticos pertenecientes a tres grupos (macrólidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas) donde las concentraciones variaron de 0.7 a 127 ng/L, demostrando que la contaminación ocasionada por las aguas residuales municipales y la acuicultura realizado en las zonas cercanas a los ríos, impacta la calidad de esta zona de China (Xu et al., 2013).

De esta manera, diversos trabajos alrededor del mundo señalaron la existencia de residuos de antibióticos en aguas residuales, así se refieren estudios realizado en otros lugares de China; como los realizados en el estuario del río del valle de Jiaozhou, China, en el que se muestrearon sedimentos superficiales y plantas de humedales del río Yang. Los resultados evidenciaron amplia presencia de los residuos de antibióticos

quinolonas, con un rango de 1.34-8.69 ng/g (media de 4.46 ng/g) en el río Yang y 0.99-10.86 ng/g (media de 3.92 ng/g) en su estuario, respectivamente. El volumen de carga de cada antibiótico del río Yang en su estuario fue de 11.73 a 391.59 g/año, muy por debajo de las de otras regiones estuarinas de todo el mundo, lo que hasta cierto punto es bueno; sin embargo, la presencia de estos residuos de antibióticos en este ecosistema no es noticia alentadora, debido a los efectos negativos que conlleva para este tipo de ecosistemas (K. Liu et al., 2020),

En un estudio llevado a cabo en el río amarillo en el que se analizaron muestras de agua y sedimentos de las zonas intermareales del río amarillo; durante dos estaciones, se detectaron 8 residuos de antibióticos del grupo de las tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Las concentraciones totales de estos compuestos fueron de 82.94-230.96 ng/L y 40.97-207.44 ng/g, en las muestras de agua y sedimentos respectivamente. La oscilación estacional fue afectada principalmente por la frecuencia de uso de los antibióticos y los factores ambientales (Zhao et al., 2016),

Otra investigación en la misma región en la cuenca del río Haihe, da cuenta que durante los años 2016-2017, los antibióticos estudiados fueron de uso veterinario y animal. Los resultados obtenidos en este estudio se compararon con los resultados obtenidos anteriores y se evidenció que la cantidad y concentración de residuos de antibióticos probablemente esté incrementándose en torno a la cuenca. La suma de las concentraciones de residuos de antibióticos varió entre 414 y 1951 ng/L, mostrando una media de 821 ng/L. Las principales fuentes de contaminación por residuos de antibióticos fueron las plantas de tratamiento de aguas residuales. La carga de antibióticos en las aguas del río fue mayor durante las estaciones húmedas que durante los periodos secos. La cantidad de residuos de antibióticos se incrementaron continuamente en dirección a los tramos inferiores de los ríos. La carga total anual de ingreso de residuos de antibióticos a partir del río Haihe, así como del río Yongdingxin en dirección a la bahía de Bohai estuvo representado por una cantidad elevada de 5008 kg/año. Los antibióticos predominantes fueron la trimetoprima, ofloxacina anhidra, eritromicina, lincomicina, y el florfenicol, mientras que la ofloxacina, amoxicilina anhidra, eritromicina, norfloxacin y la enrofloxacin pueden representar un elevado riesgo ecotoxicológico para la salud del ecosistema investigado. Lamentablemente, bastantes residuos de antibióticos encontrados en el estudio se hallaron por primera

vez, lo que es muestra de la continua contaminación en esta cuenca. Asimismo, este estudio brinda información relevante a los tomadores de decisiones a fin de contribuir con la mejora de la gestión y control de vertidos contaminantes en estos ecosistemas (Lei et al., 2019) y muchos otros ejemplos más que dan a conocer el gran problema de contaminación por residuos de antibióticos en los ríos del mundo.

En nuestro país también existen estudios de contaminación de las aguas superficiales, tal como lo evidencia Cahui (2019), quien realizó un estudio en el lago Titicaca, en el que se analizaron muestras de agua, sedimentos en zonas cercanas a la actividad acuícola de crianza de truchas. Los resultados demostraron la presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en las muestras analizadas, especialmente para fluoroquinolonas (3739.3 ng g<sup>-1</sup>) y tetraciclinas (3082.9 ng L<sup>-1</sup>). En muestras de agua superficial las concentraciones más altas fueron en fluoroquinolonas de hasta 408.2 y 652.7 ng L<sup>-1</sup> en época seca y lluviosa respectivamente (P>0.01). Incluso en el agua de consumo humano.

### **1.2.3 Presencia de bacterias resistentes a antibióticos en aguas residuales**

La presencia de residuos de antibióticos impacta negativamente en el ambiente principalmente por la alteración de la comunidad bacteriana, tal como lo revelaron en un estudio en el que se analizaron el cambio de la estructura de la comunidad bacteriana en el sustrato de un humedal construido una planta de tratamiento a lo largo de 10 años, cuyos resultados demostraron que efectivamente hubo cambios en la estructura bacteriana. En el tercer año de marcha, la biomasa microbiana logró valores máximos en dos franjas de vegetación con *Aegiceras corniculatum* y *Kandelia obovata*, y luego se estabilizaron o disminuyeron en el noveno y décimo año de funcionamiento. La composición de la comunidad microbiana varió en gran manera durante el periodo de explotación. Los análisis de estadísticos como el de componentes principales (PCA) y de redundancia (RDA) evidenciaron que las composiciones de la comunidad microbiana estaban significativamente correlacionadas con el contenido de materia orgánica, especialmente en el 9° y 10° año de funcionamiento, lo que implica que la comunidad microbiana del sustrato en el humedal de manglar construido es sensible a las características del sustrato y puede utilizarse como indicador del rendimiento a largo plazo de los humedales artificiales (Tian et al., 2020).

La presencia de residuos antibióticos influye en la generación de resistencia bacteriana. Diversos estudios evidenciaron este impacto como, por ejemplo el de Walia et al., (2016) en el que aislaron bacterias para luego evaluar su resistencia a los antibióticos, y hallaron que aproximadamente entre un 40 y un 65% fueron resistentes a cefotaxima, entre un 25 y un 40% al cloranfenicol, entre un 30 y un 40% a la tetraciclina, entre un 25 y un 65% a la ciprofloxacina y finalmente entre un 30 y un 50% a la gentamicina. Las muestras para el análisis bacteriológico, se tomaron del hospital William Beaumont (Royal Oak, MI, USA) y como punto control se usó un parque recreativo. Se encontraron bacterias *Stenotrophomonas maltophilia*, *Kytococcusse dentarius*, *Streptococcus gordonii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomona fluorescens*, *Shawanella putrefacians*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. En muestras provenientes del hospital, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*.

La crianza de animales también contribuye con la generación de bacterias resistentes a antibióticos, como las que provienen de las granjas de cerdos (Savin et al., 2020). En un estudio en el que analizaron muestras de aguas residuales de una granja porcina, se encontraron presencia de residuos de antibióticos y genes resistentes, principalmente a tetraciclina; allí se detectaron elevadas concentraciones de genes resistentes tales como, *tet M*, *tet W* and *tet O* (Lin Liu et al., 2016). De la misma forma, en otra publicación se halló genes resistentes a tetraciclina y sulfonamidas, en una proporción de 2000 veces más genes en muestras del suelo que en muestras de agua (Luo et al., 2010). Adicionalmente, en un estudio en el que se analizaron sedimentos en cajas donde se medicaron a los peces con oxitetraciclina durante 10 días. Después del experimento, se encontró que el 100% de las muestras presentaron bacterias resistentes a antibióticos (Samuelsen et al., 1992) lo cual representa un gran riesgo para el ambiente.

Tras 10 días de medicación con oxitetraciclina, se tomaron muestras del sedimento marino bajo tres jaulas seleccionadas (jaulas 1, 2 y 3) en una piscifactoría durante un periodo de 18 meses, con el fin de detectar cualquier cambio en la concentración de oxitetraciclina en el sedimento, el número de bacterias y la resistencia de éstas al fármaco. La mayor parte de la oxitetraciclina desapareció durante las primeras semanas, pero persistió en el sedimento en concentraciones más bajas durante bastante



tiempo después de la medicación. La vida media ( $t_{1/2}$ ) de la oxitetraciclina en el sedimento se midió como 125, 144 y 87 días en las jaulas 1, 2 y 3, respectivamente. Al final de la medicación, los tres sedimentos tenían  $> 100\%$  de bacterias resistentes a la oxitetraciclina. Este valor descendió al 20% después de 72 días y se estabilizó en niveles de entre el 10 y el 50%. El cambio en el número de bacterias, descrito como recuento total y en placa, fue debido a las variaciones estacionales más que a la medicación.

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1 Identificación del problema

Durante los últimos años, se han identificado numerosos compuestos farmacéuticos y sus metabolitos tanto en aguas residuales como en ríos y otras corrientes superficiales e incluso en aguas potables tratadas (Zirena et al., 2021). El control de estos contaminantes resulta particularmente difícil debido a la gran dispersión de sus fuentes de emisión que van desde los residuos domésticos, hospitalarios e industriales (Xue et al., 2022) hasta los vertidos procedentes de la actividad agrícola y ganadera (Lin Liu et al., 2016). Aunque ocurre la degradación por reacciones fisicoquímicas o por la acción de microorganismos capaces de metabolizarlos (Gautam et al., 2007; Matamoros et al., 2016). De forma general, algunos antibióticos no se degradan fácilmente y persisten a lo largo del tiempo (Martínez-Alcalá et al., 2020).

El problema, es que las plantas de tratamiento son ineficientes en el la remoción completa de estos compuestos de las aguas residuales, por lo que aún existen en el agua de descarga (Gautam et al., 2007). En el país, de un total de 143 plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), pocos son los proyectos que puedan llamarse exitosos. Ello se debe, por un lado, a la visión sesgada de las EPS que no llega a descubrir el potencial socio económico de las aguas residuales tratadas, pues existe ausencia de una cultura de protección del ambiente como parte de la misión de las EPS. El resultado es la contaminación de los cuerpos de agua que reciben tanto los efluentes de insuficiente calidad de las PTAR como los vertimientos de aguas residuales crudas provenientes de los sistemas de alcantarillado.

La falta de cumplimiento normativo, legislación incompleta, sumados a la inadecuada operación con tecnología insuficiente y falta de mantenimiento de tales inversiones, e incluso fallas de diseño, impide lograr estos objetivos en 67 ecosistemas de igual número de cuerpos receptores, lo que además pone en riesgo la salud pública por el riego sin control (SUNASS, 2008), que a su vez pueden ser perjudiciales para la salud (Peña-Álvarez & Castillo-Alanís, 2015) así como, para los sistemas acuáticos (Oller et al., 2011); por lo que, en este trabajo se identificó y cuantificó residuos de antibióticos en aguas residuales del río Huatanay Cusco, se validó el método de detección y cuantificación y se evaluó el impacto sobre la resistencia a antibióticos de bacterias que con frecuencia son causantes de infecciones y son de interés clínico.

### **2.1.1 Enunciado del problema**

#### **2.1.1.1 Problema General**

¿Qué residuos de antibióticos, en que concentración están presentes y cuál es la resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco?

#### **2.1.1.2 Problemas Específicos**

- ¿Qué residuos antibióticos y en que concentración están presentes en las aguas del Río Huatanay, Cusco?
- ¿Cuál es la resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco?

### **2.2 Justificación**

El agua del río Huatanay es afluente de la cuenca del Río Vilcanota, el mismo que recorre varios distritos y centros poblados, así como la ciudad del Cusco; donde se desarrollan diversas actividades como, turismo, agricultura, acuicultura, ganadería, comercio. A pesar de que es una fuente que cuenta con monitoreo de calidad de agua, en 15 subestaciones en todo su recorrido, su calidad es mínima. Dado que, la planta no es eficiente en la remoción de los compuestos tóxicos, lo cual afecta la calidad de sus aguas (Masco, 2017).

Se conoce que este río, posee una carga elevada de todo tipo de residuos emergentes entre ellos tóxicos y genotóxicos de origen farmacéutico como los antibióticos (Nieto-Juárez et al., 2021). Estos compuestos provienen de diferentes fuentes hospitalarias y aguas de

residuos domiciliarios ya sea a través de la emisión de excretas o descarte de algún tipo de antibiótico no administrado que no reciben tratamiento alguno. Adicionalmente, existe un elevado e indiscriminado uso de antibióticos en la prevención y eliminación de agentes patógenos causantes de enfermedades en hospitales, uso ambulatorio y automedicación, lo que incrementa este tipo de residuos en las aguas residuales (Gautam et al., 2007).

Los riesgos se dan debido a que estos compuestos pueden llegar a los seres humanos a través de la bioacumulación y la biomagnificación. Otro riesgo proveniente de estos compuestos es la generación de genes resistentes a antibióticos, los que representan un grave problema de salud pública (Cheng et al., 2020), considerando que este río se usa para diversas actividades humanas, ya mencionadas en el párrafo anterior.

Realizada la búsqueda bibliográfica, no se encontró información sobre la regulación o legislación de límites permisibles de estos contaminantes emergentes, a falta de un inventario de los mismos, de la disposición de técnicas analíticas estandarizadas para su identificación y cuantificación y el desconocimiento sobre el riesgo que representa su presencia en el ambiente.

Por estas razones se realizó un estudio en las aguas residuales de la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco ubicado en el distrito de San Jerónimo, allí se determinó el tipo y concentración de residuos de antibióticos presentes en muestras de aguas pre y postratamiento de la PTAR. Adicionalmente, se aisló bacterias para identificar la capacidad de resistencia a antibióticos evaluados en la planta.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo general**

Identificar los residuos de antibióticos, la concentración en las que están presentes y evaluar la resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco.

### **2.3.1 Objetivos específicos**

- Identificar los residuos de antibióticos y en que concentración están presentes aguas residuales del Río Huatanay, Cusco.
- Evaluar la resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco.



## 2.4 Hipótesis

### 2.4.1 Hipótesis general

Los residuos de antibióticos están presentes en diferentes concentraciones y ejercen influencia en la generación de resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco.

### 2.4.2 Hipótesis específicas

- Los residuos de antibióticos están presentes en diferentes concentraciones en aguas del Río Huatanay, Cusco.
- Los residuos de antibióticos ejercen influencia en la generación de resistencia microbiana en aguas del Río Huatanay, Cusco.

## CAPÍTULO III

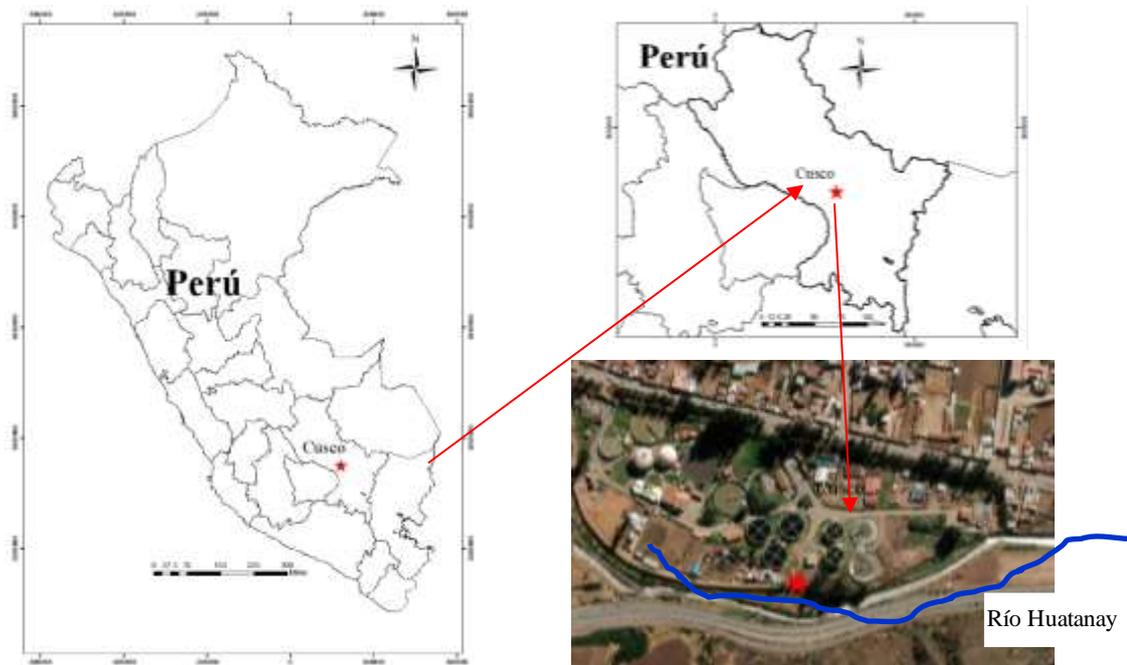
### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el departamento de Cusco, provincia de Cusco, distrito de San Jerónimo a 20 Km al sur de la ciudad a 3245 msnm, con un área de 502 Km<sup>2</sup> (Masco, 2017; Nieto-Juarez et al., 2021). En este lugar, se ubica la planta de tratamiento de aguas residuales que viene operando desde el año 2014, bajo la administración de SEDACUSCO (*Figura 4*). La contaminación del río se origina por la descarga de los desechos industriales, comerciales y domésticos que se generan en la ciudad y por el vertimiento del efluente de la planta de tratamiento en cuyo contenido aún se hallan residuos tóxicos como restos de antibióticos, dado que solo trata el 85% de las aguas residuales que corresponden a 428.450 habitantes (Nieto-Juarez et al., 2021).

El río Huatanay se encuentra contaminado desde la estación de monitoreo en el distrito de Santiago hasta la localidad de Huambutío en el distrito de Lucre, esto debido a que en el trayecto existen numerosos puntos de vertimiento de aguas residuales domésticas (DIGESA, 2006). Adicionalmente, el manejo y tratamiento de las aguas residuales es deficiente, limitándose los pobladores en muchos puntos, a verterlas directamente al cauce del río, con el consiguiente incremento de la contaminación y riesgos para los pobladores (Masco, 2017). La PTAR San Jerónimo permite el tratamiento físico, químico y biológico de las aguas residuales con un caudal máximo promedio de 580 litros por segundo, de los distritos de Cusco, San Jerónimo, San Sebastián, Santiago y Wánchaq que descargan en el río Huatanay, beneficiando a más de 386 mil habitantes de estos distritos (Masco, 2017).

La planta de tratamiento recepciona entre un 60 a 70% del caudal del río Huatanay, que está contaminado con vertidos de aguas residuales domésticas, hospitalarias, industriales de actividades ganaderas y de un camal de la ciudad de Cusco, las que son procesadas en esta planta de tratamiento, para luego ser vertidas en el mismo río (*Figura 5*).



*Figura 4.* Ubicación del área de estudio-la planta de tratamiento en el distrito de San Jerónimo de la ciudad de Cusco y el río Huatanay.

### 3.2 Características de la planta

La PTAR está diseñada e implementada con tecnología de punta, utilizando filtros percoladores y tratamiento de lodos anaeróbicos con componentes ecológicos al servicio de la salud y el bienestar público, con el siguiente detalle:

**LÍNEA DE LÍQUIDOS:** Sistemas de cribado con rejillas gruesas y finas, desarenador aireado, filtros percoladores primarios y secundarios, cámaras de bombeo, sedimentadores primarios y secundarios, desinfección (Toledo & Toledo, 2010).

**LÍNEA DE LODOS:** Cámaras de bombeo, espesadores, digestor anaeróbico, tanque de almacenamiento de lodos, edificio de deshidratación, tanque de almacenamiento para cal (Masco, 2017; Nieto-Juarez et al., 2021).

**LÍNEA DE GASES:** Purificador de  $H_2S$  cámara de condensados y antorcha (COSAPI, 2014).

### 3.3 Población

Aguas residuales del río Huatanay. Cuenca del río Huatanay (que según la clasificación Pfafstetter corresponde a N7 4994774), se encuentra en el Región de Cusco, Provincias de Cusco y Quispicanchi, con un área de 503 km<sup>2</sup>, que incluye a la ciudad de Cusco. Comprende 3 zonas:

- a. Zona Alta (3393 – 3288 m): Desde la confluencia del Chocco - Huancaro, hasta Corpac.
- b. Zona Media (3281 – 3203 m): Desde la altura del Puente Quispiquilla hasta antes de la PTAR.
- c.-Zona Baja (3186 – 3079 m): Desde la PTAR hasta Huambutío (Calvo, J; Polo, Z. 2017)

### 3.4 Muestra

Se recogieron muestras de 500 ml, en principio se tomaron 10 para realizar la curva de calibración, luego 10 muestras adicionales para determinar el porcentaje de recuperación de la muestra, lo cual correspondió al desarrollo de la metodología de análisis cromatográfico. Para el análisis de residuos de antibióticos en las muestras de agua del río Huatanay, objeto de estudio, se tomaron 10 muestras en el afluente y el efluente de la PTAR Cusco por duplicado (ANEXO 1-3) (*Figura 5*). El periodo de muestreo fue durante los meses de abril a octubre del 2021, de los cuales las muestras abril a setiembre fueron para el desarrollo metodológico, y las muestras para el estudio propiamente dicho fueron tomadas en octubre.

#### 3.4.1 Tipo de muestreo:

No probabilístico por conveniencia definido por los investigadores.

#### 3.4.2 Unidad de análisis:

Aguas residuales asociadas a la planta de tratamiento en el pre y postratamiento (*Figura 5*), las cuáles fueron posteriormente analizadas en el laboratorio de Cromatografía de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

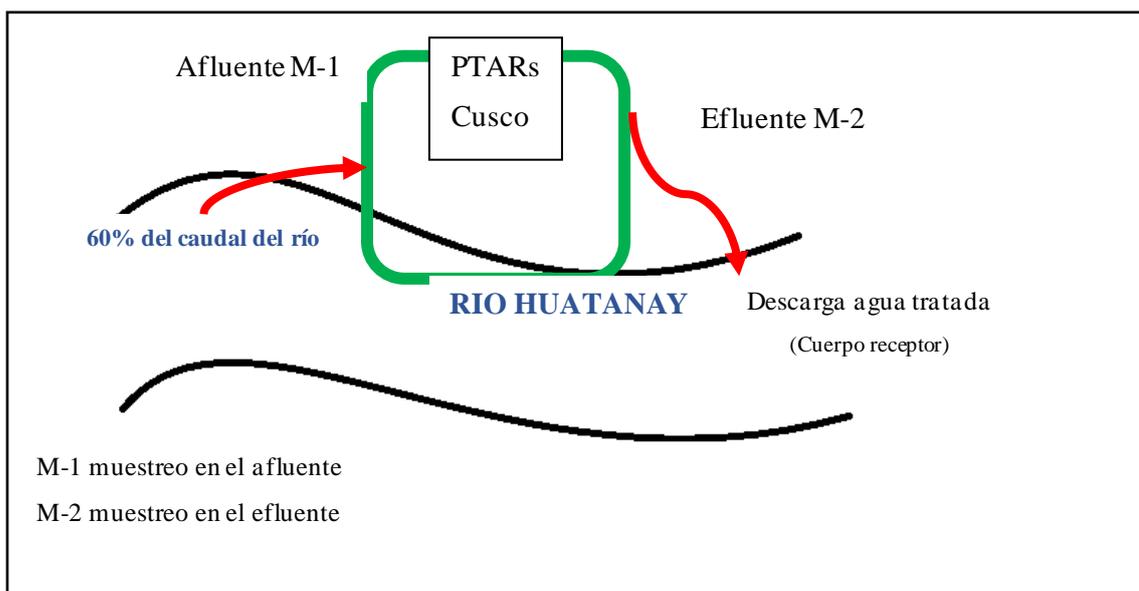


Figura 5. Esquema de muestreo en la zona de estudio

### 3.5 Método de investigación

#### 3.5.1 Tipo de investigación

La investigación fue de tipo descriptivo no experimental, para el primer objetivo; dado que, es un estudio descriptivo de los residuos de antibióticos y las concentraciones halladas en las muestras de agua residual que se evaluaron. En el segundo objetivo, fue de tipo experimental a fin de identificar las bacterias resistentes a los antibióticos. Adicionalmente, se obtuvo los datos de aforamiento de caudales de aguas residuales del río Huatanay, registrados en la PTAR, analizando la relación causa y efecto sobre la presencia de residuos de antibióticos.

### 3.6 Descripción de métodos por objetivos específicos

#### 3.6.1 Identificación y cuantificación de residuos de antibióticos

##### 3.6.1.1 Toma de muestras de aguas residuales:

Para el muestreo se utilizó frascos estériles de polietileno, con capacidad de 500 ml, que fueron envueltos con papel Kraft y una bolsa de polietileno para aislamiento. Las muestras se recogieron en el afluyente y el efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR). Las muestras fueron tomadas considerando un espacio vacío de 2.5 cm. Se mantuvo la muestra refrigerada con hielo a 4 °C hasta la llegada al laboratorio, en un tiempo no mayor a 2 horas. Para estabilizar las

muestras de efluente se añadió ácido ascórbico al 1 % según volumen. Las muestras fueron etiquetadas con la información necesaria de la muestra, como el tipo de muestra, persona encargada de tomar la muestra y otras observaciones adicionales (Anexo foto).

La fórmula a aplicarse para identificar el porcentaje de remoción es la siguiente:

$$\% \text{ de remoción} = (Ca - Ce / Ca) * 100 \dots \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde Ca es la concentración de antibióticos en el afluente, Ce es la concentración de antibióticos en el efluente (Nieto-Juarez et al., 2021).

### 3.6.1.2 Análisis por cromatografía líquida

- **Reactivos**

Los insumos químicos y reactivos usados en los análisis tales como, metanol, acetonitrilo, ácido fórmico, Na<sub>2</sub>EDTA, ácido cítrico monohidratado, ácido ortofosfórico, citrato de sodio dihidratado y ácido clorhídrico fueron adquiridos de la empresa MERCK de grado HPLC. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> de J.T. Baker. Los estándares de los antibióticos tales como, ciprofloxacino (CIP), amoxicilina (AMX), cefalexina (CFX), azitromicina (AZT), dicloxacilina (DCX), ceftriaxona (CFT), cotrimoxazol (CTMX) y lincomicina (LCM), también fueron de grado HPLC, del laboratorio Medifarma S.A.

- **Preparación de los estándares**

Para la curva de calibración se utilizaron 8 estándares (MEDIFARMA Lotes: AMX trihidrato MP-00019653, LIN clorhidrato MP-00020388, CFT sódica MP-00019655, CFX monohidrato MP-00019218, SMT MP-000017701, TMP MP-00013788, Clorhidrato de CIP MP-18215, DCX sódica MP-000144201). Se preparo una solución madre de 2000 µg/ml de cada fármaco AMX, CFT, TMP, CFX, CIP, SMT DCX, y LIN en un solvente apropiado de acuerdo a referencias (Tie et al., 2019). Para el primer punto de la curva de calibración, se tomó 10 µl de cada uno de los 7 estándares más 40 µl de LIN en vial de 20 ml, luego se añadió la diferencia de agua tipo HPLC para completar a 2.0 ml, se homogenizo y se transfirió a un vial HPLC. Se procedió de la misma forma para obtener las siguientes concentraciones de 20, 40, 80 y 160 µg/ml para AMX, CFT, TMP, CFX, CIP, SMT

DCX y LIN 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ .

- **Las separaciones cromatográficas**

Los análisis se realizaron en un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, Agilent Technologies, Serie 1100/1200, USA) equipado con un detector UV-DAD y una columna Agilent Zorbax XDB-C8 (con 4.6 mm de diámetro, 75.0 mm de largo, tamaño de partícula 3.5  $\mu\text{m}$ , Pre Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 12.5 mm x 5  $\mu\text{m}$ , a una temperatura constante de 40°C, un inyector automático, una bomba binaria, un desgasificador de vacío y un compartimento de columna termostatazado (ANEXO 7). Se utilizó un programa de gradiente con la fase móvil, combinando el solvente A (agua ultrapura Barnstead con Ácido Fosfórico al 0.1%) y solvente B (Acetonitrilo) de la siguiente manera: 0 % B (3 min), 0–15 % B (5 min), 15-50 % B a 12 min, 50–60 % B a 14 min, 60-70 % B a 15 min, 70-100 % B a 21 min a un flujo de 0.6 ml/min. La detección se monitorizo a 202 nm (CFX, AMX, CFT, TMP SMT DCX LMC) y 280 nm (CIP), el volumen de Inyección fue de 10.0  $\mu\text{l}$ . La adquisición de datos se realizó mediante el software Chemstation V03.02.

- **Preparación de muestras previas a la extracción en fase sólida (SPE)**

De los 500 ml de muestra recogidos de aguas residuales de la PTAR de Cusco, las muestras se filtraron a través de filtros de algodón, para preservar de la degradación se añadió 1g de Acido ascórbico y se almacenaron a 4 °C, los análisis se ejecutaron en menos de 24 horas desde el muestreo. Se transfirió 100 mL de muestra a una pera de separación junto con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , y 0.5g de  $\text{CaSO}_4$  se homogenizo, luego se mezcló con 3ml de cloroformo, se descartó la fase orgánica y la fase acuosa se filtró al vacío a través de un embudo con algodón comprimido a un matraz Kitasato.

- **Método de extracción en fase sólida SPE**

En un sistema de extracción en fase solida de 10 posiciones al vacío Agilent se acondiciono dos cartuchos C18 de 0.5g con 6 ml de metanol seguido de 10 ml de HCl 0.01%, luego en uno de ellos se cargaron con 100 ml del filtrado del afluyente y en el otro con el efluente, al finalizar se pasó 10 ml de HCl 0.01% para lavar, luego se eluyó los analitos retenidos con 2 ml acetonitrilo y se dividió a 1 ml en dos

viales para el análisis, este procedimiento se repitió durante ocho días para el análisis estadístico (ANEXO 4-5).

- **Recolección de datos del análisis fisicoquímico**

Las mediciones de los parámetros fisicoquímicos, se realizaron en las mismas fechas de muestreo de las aguas residuales pre y postratamiento, según protocolos de la Planta de tratamiento de aguas Cusco (PTAR-Cusco). Las variables consideradas fueron; DBO<sub>5</sub>, coliformes termo-tolerantes, pH, temperatura, conductividad, sólidos totales, nitritos, nitratos, turbidez y caudal, estas mediciones fueron realizadas con las técnicas estandarizadas por APHA y otros métodos estandarizados (ANEXO 8).

### **3.6.2. Evaluar la sensibilidad o resistencia de las cepas aisladas del río Huatanay de *E. coli*; *Salmonella tify* y *Klebsiella pneumoniae* frente a antibióticos encontrados mediante análisis microbiológicos**

#### **3.6.2.1 Preparación de muestras**

Para este objetivo se realizaron dos tomas de muestra del agua residual del río Huatanay en la PTAR San Jerónimo, durante los meses de abril y mayo del 2021, puntualmente en dos días, tanto del afluente como del efluente de la planta por triplicado. Los envases conteniendo las muestras se transportaron al Laboratorio de microbiología manteniendo las condiciones establecidas por norma y cadena de frío.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio en su envase perfectamente cerrado y debidamente identificado, se guardó en condiciones adecuadas hasta el ensayo. Para el análisis microbiológico se trabajó en una cámara de seguridad biológica clase 2A. Se desinfectó todas las áreas con alcohol al 70%, luego homogenizó la muestra a través de la agitación manual. Una vez abierto el envase, se esterilizó la boca a la llama de un mechero Bunsen, y se agitó nuevamente para homogenizar. En las muestras muy contaminadas, se realizaron diluciones al 1/10, 1/100, con agua desionizada estéril. En las muestras no muy contaminadas (efluente), se sembraron sin diluir, en una serie de tubos elegido según la correspondiente tabla del NMP (número más probable). Se consideraron positivas si hubo turbidez del medio y si

las colonias fermentaron la lactosa con producción de gas (más del 20% en las campanas Durham colocadas en cada tubo con caldo brila) (APHA, 2017).

### 3.6.2.2 Pruebas de confirmación de *E coli*

#### Lecturas:

Las bacterias contenidas en el primer tubo correspondiente y positivo de la prueba de NMP, fueron cultivadas en medio Agar EMB para aislamiento y luego se procedió a las pruebas de identificación y confirmación bioquímicas de bacterias gram negativas.

La prueba de confirmación de *Escherichia coli* fue positiva cuando hubo crecimiento de colonias verde metálicas a negras. A partir del crecimiento en el Agar EMB se pudo realizar las restantes pruebas bioquímicas y tinciones mediante sub cultivos en los medios: Agua de Triptona (un asa del cultivo), citrato Simmons (siembra en la superficie del agar) y Tinción Gram (APHA, 2017).

### 3.6.2.3 Pruebas de detección e identificación de *Salmonella tiphy*

Para el aislamiento se tomó dos muestras, puntualmente en dos días tanto del afluyente como del efluente de la PTAR. con hisopos estériles, Se fijaron los puntos de muestreo, y se dejaron remojando durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se recogieron los hisopos en bolsas herméticas y estériles, colocadas luego en un contenedor de transporte aislado con paquetes de gel congelado para mantener las muestras frías.

En primer lugar, con la muestra recibida en agua peptonada ( 0.1 %) se realizó el pre-enriquecimiento, para rehabilitar las células de *Salmonella*; luego se procedió al enriquecimiento, en caldo base de tetrionato (Merck) para aumentar el número de bacterias de *Salmonella* e inhibir otros microorganismos en la muestra; a continuación se procedió al aislamiento, en agar entérico Hektoen (Merck) observándose colonias azul verdosas a azules con y sin centros negros; y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Merck) donde se distinguieron colonias rosadas con y sin centros negros, ambos medios permiten ver colonias sospechosas de *Salmonella*; y finalmente se realizó la identificación bioquímica que nos permitió determinar la actividad metabólica de esta bacteria, en agar Urea (Merck), agar

hierro lisina (LIA, Merck) y agar hierro triple azúcar (TSI ,Merck). Además, se inocularon tubos con medio indol ácido sulfhídrico para sulfuro, indol y movilidad (SIM Merck) (FDA, 2022).

#### **3.6.2.4 Pruebas de detección e identificación de *Klebsiella Pneumoniae***

Se cogió el primer tubo positivo de la prueba de NMP, de allí se tomó una asada la que fue cultivada en medio MacConkey agar 24 horas a 35°C para aislamiento, buscando *Klebsiella sp.* como colonia mucosa lactosa positiva con crecimiento en extensión.

A continuación, se realizaron las pruebas de identificación y confirmación bioquímicas para bacterias gram negativas: agar hierro triple azúcar (TSI, Merck), agar hierro lisina (LIA, Merck) y agar Urea (Merck). Además, se inocularon tubos con medio indol ácido sulfhídrico para sulfuro, indol y movilidad (SIM Merck) (APHA, 2017).

#### **3.6.2.5 Antibiograma**

Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión en agar Mueller Hinton (Merck) y de acuerdo a la técnica de Kirby y Baüer. Se usaron discos de sensibilidad de Cefalosporinas, Aminoglucósidos, Lincomicinas, Fluoroquinonas, Penicilinas y Macrólidos (DIFCO). La técnica seguida indicó primero seleccionar, aislar e identificar las especies bacterianas que se estudiaron. Luego se preparó y estandarizó el inóculo, para ello: se seleccionó de 3 a 5 colonias de las cepas en estudio del medio MacConkey que se obtuvo en el aislamiento e identificación previos, se transfirió estas colonias en 3 ml de caldo de soya Tripticasa y se incubó a 35°C por un tiempo de 2 horas hasta que se observó un crecimiento con una turbidez visible. Se diluyó el cultivo con solución salina estéril hasta obtener una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland, se comparó con el patrón McFarland y para corroborar esta escala se leyeron y midieron ambos tubos en el espectrofotómetro a 625 nm de longitud de onda. A continuación, se sumergió un hisopo estéril dentro del tubo que contiene solución salina de la bacteria en estudio, se sembró el inóculo uniformemente en tres direcciones sobre la superficie del medio Mueller Hilton, se dejó secar un tiempo de 20 minutos y se procedió a colocar los discos de los antibióticos con un asa estéril en el agar.



Se procedió a incubar a 35° por 24 horas; luego se midieron los halos de inhibición correspondientes, comparando los diámetros con los halos obtenidos de cepas estándar como la *E. coli* ATCC 25922, y las especificadas por el CLSI, se interpretó el resultado que luego se informó sobre la sensibilidad o resistencia (Birošová et al., 2014; Cavalieri et al., 2005).

### 3.6.3 Análisis estadístico

Con los datos de concentración de residuos de antibióticos en el afluente y el efluente se realizó el test de Wilcoxon, debido a que no cumplía los supuestos requeridos para aplicar análisis paramétricos. Para el caso de las bacterias que se aislaron del afluente y efluente, se aplicó el test estadístico T de Student, previa comprobación de los supuestos requeridos por el análisis. EL manejo de datos y los análisis, se realizaron en la hoja de cálculo Excel y R Studio versión 4.0.0.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1 Identificar y cuantificar residuos de antibióticos en aguas del rio Huatanay Cusco pre y pos tratamiento en la PTAR, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC**

Se verificó la presencia de residuos de antibióticos en las aguas residuales de la ciudad de cusco, de los ocho residuos de antibióticos evaluados, solo se halló seis de ellos en el afluente a la planta de tratamiento (Tabla 1). Adicionalmente se cuantificó la concentración de cada antibiótico registrado, de ellos, los que se encontraron en mayor cantidad fueron amoxicilina (9150  $\mu\text{g/L}$ ) y lincomicina (3398  $\mu\text{g/L}$ ). a menudo en estudios similares se reporta que de todos los antibióticos evaluados, solo algunos se hallan en los residuos, esto principalmente debido a que sólo son unos de mayor uso por la población, y los demás antibióticos están en concentraciones tan mínimas que son indetectables (Diwan et al., 2010).

A pesar de que la concentración hallada de amoxicilina es elevada en el afluente, en el efluente se reduce su concentración a un valor promedio de 1081  $\mu\text{g/L}$  (Figura 6). Otros estudios reportaron resultados similares en relación a amoxicilina, pues es un metabolito predominante en muestras de agua residual (Binh et al., 2018; Díaz-Cruz & Barceló, 2006; Diwan et al., 2010; Nieto-Juarez et al., 2021). Estos resultados pueden ser debido a que es un antibiótico ampliamente usado para tratar infecciones respiratorias y sus síntomas, incluso es automedicado por la población, más aún en el contexto de la pandemia del COVID 19 (Gonzalez-Zorn, 2021). Por lo tanto, se detectan con frecuencia sus residuos en muestras de aguas residuales.

Tabla 1

*Presencia de antibióticos y análisis del Test de Wilcoxon en aguas residuales en el afluente y efluente de la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.*

Antibiótico	Abreviatura	Fuente	Media µg/L	p-valor	Diferencia de medias	Promedio de % de remoción
Ceftriaxona	CFX	Afluente	7940.0	9.53E-05	7350.00	93.3
		Efluente	590.0			
Amoxicilina	AMX	Afluente	91495.0	1.91E-06	91495.00	100.0
		Efluente	0.0			
Trimetoprima	TMP	Afluente	2815.0	9.46E-05	2815.00	100.0
		Efluente	0.0			
Sulfametoxazol	SMT	Afluente	1195.0	0.000141	1195.00	100.0
		Efluente	0.0			
Dicloxacilina	DCX	Afluente	350.0	9.26E-05	-1445.00	-229.7
		Efluente	1795.0			
Lincomicina	LMC	Afluente	33970.0	9.56E-05	23170.00	65.5
		Efluente	10800.0			

En relación a lincomicina, también se halló en elevadas concentraciones en el afluente (33970 µg/L). Es frecuente la presencia de este antibiótico en muestras de agua residual, ya que también se ha registrado en estudios similares  $60.7 \pm 0.44$  (ng/L) (Chen, 2014). En otra investigación en la que se analizaron residuos de antibióticos en el mismo lugar, se encontró lincomicina (0.28 µg/L), una concentración mucho más baja que la hallada en este estudio (Nieto-Juarez et al., 2021), esta diferencia puede deberse a que los estudios mencionados se realizaron antes o a principios de la pandemia, mientras que los resultados de este estudio provienen del periodo propio de la pandemia, en los que se reporta el amplio uso de antibióticos como lincomicina para combatir enfermedades respiratorias como la neumonía, que fue una complicación del COVID 19 (Forestieri et al., 2021).

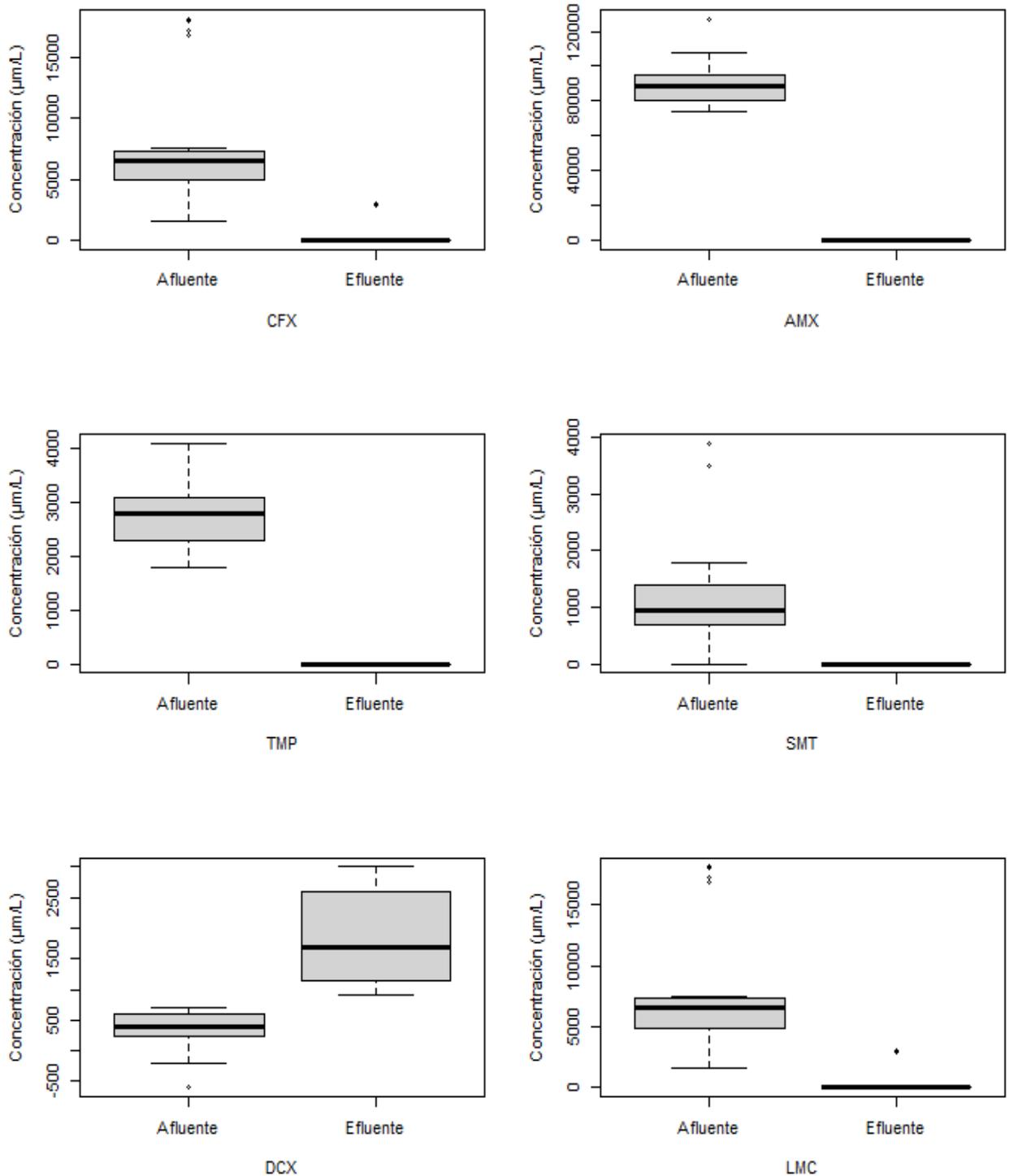


Figura 6. Concentración de residuos de antibióticos en el afluente y el efluente.

En cuanto a ceftriaxona, se halló en promedio 7940 µg/L. En un estudio se evidencia que el consumo de este antibiótico en contraste con el 2020 se incrementó en un 204% (Gonzalez-Zorn, 2021). Ello corrobora su incremento en el consumo por la población en el contexto de la pandemia, lo que ha contribuido en la mayor cantidad de residuos en las

aguas residuales. Asimismo, ya desde antes del COVID 19, este antibiótico se hallaba con frecuencia en las aguas residuales de América latina (Reichert et al., 2019)

La cantidad de residuos de trimetoprima en el afluente de la planta de tratamiento de agua de la Ciudad Cusco (PTAR) es en promedio 2815  $\mu\text{g/L}$ , después del tratamiento de las aguas residuales no se detecta este antibiótico, lo cual es positivo. Este es un antibiótico de uso en la acuicultura, ganadería, hospitales, fabricación de productos farmacéuticos y consumo doméstico (Binh et al., 2018). Asimismo, este antibiótico así como el sulfametoxazol son considerados efectivos contra bacterias gram positivas y negativas (Upmanyu & Malviya, 2020), por lo que su uso se incrementa aún más.

El sulfametoxazol se halló en menores concentraciones (1195  $\mu\text{g/L}$ ) en el afluente, y en el efluente no se detectó su presencia, lo que evidencia la eficiencia de la planta en la remoción de este compuesto. En un estudio que se realizó en una cuenca afluente al lago Titicaca, se evaluó la presencia de sulfametoxazol y trimetoprima, y se hallaron elevadas concentraciones en puntos cercanos a las zonas urbanas (46 a 106  $\text{ng/L}$ ) en la estación seca, mientras que en la estación húmeda se incrementa los valores (145 a 312  $\text{ng/L}$ ), para luego disminuir con el recorrido del río (Archundia et al., 2017) lo que evidencia que los factores ambientales también influyen en su concentración.

Como se ha descrito anteriormente, en la mayoría de los compuestos se tiene un descenso en la concentración en el afluente incluso no hallándose en algunos casos (*Figura 6*), lo que representa eficiencia por parte de la planta de tratamiento. Sin embargo, en el caso de la dicloxacilina se halló en un promedio de 350  $\mu\text{g/L}$  en el afluente, mientras que en el efluente se registró mayores concentraciones teniendo como promedio 1795  $\mu\text{g/L}$ . Los factores que pudieran explicar esto pueden incluir la eliminación de antibióticos adsorbidos en el material particulado durante el procesamiento de la muestra y el tiempo de retención hidráulica no contabilizado durante el muestreo. Cambios fisicoquímicos durante el proceso de tratamiento que influyen en el comportamiento de adsorción de los antibióticos y, por lo tanto, afectan la relación de partición entre las fases acuosa, suspendida y sedimentaria, y entre la concentración del afluente y efluente (*Figura 6*). La acumulación de ingredientes farmacéuticos activos, la disolución biótica o abiótica, así como la transformación inversa y la desconjugación de los productos metabólicos de regreso a los compuestos originales, pueden llevar a un aumento de las concentraciones medidas en efluente (Haddad et al., 2015).

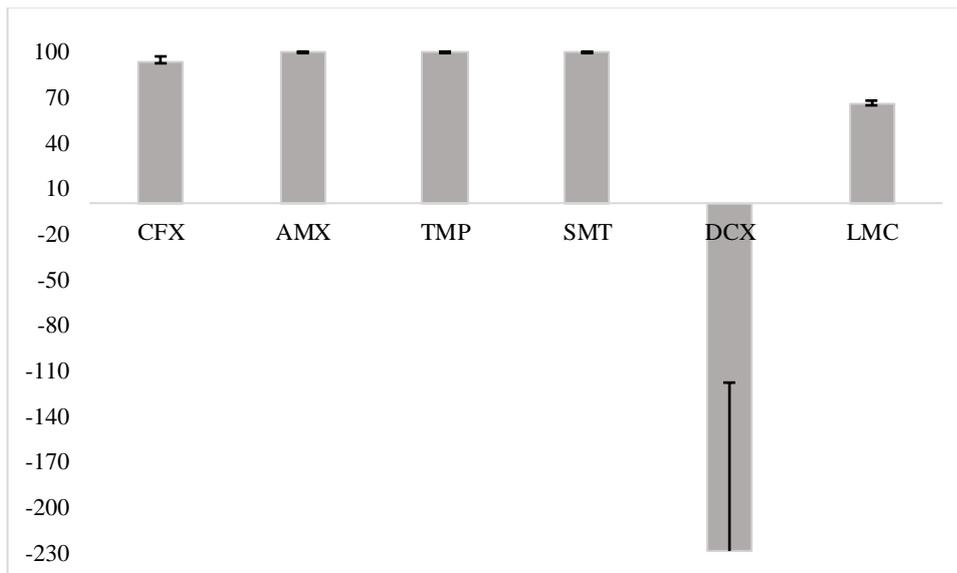


Figura 7. Eficiencia de la planta en la remoción de antibióticos.

Respecto a la remoción de residuos de antibióticos en las aguas residuales contenidas en el río Huatanay, con el test de Wilcoxon al 95% de confianza se halló que el tratamiento de las aguas residuales en la PTAR influyen significativamente en la remoción de ceftriaxona ( $p=0,000$ ) eliminando el 93.3% de esta sustancia, amoxicilina ( $p=0,000$ ) eliminando el 100%, trimetoprima ( $p=0,000$ ) eliminando el 100%, sulfametoxazol ( $p=0,002$ ) eliminando el 100% y lincomicina ( $p=0,000$ ) eliminando el 65.5% de las aguas residuales del río Huatanay. Porque en cinco de los seis residuos de antibióticos fueron removidos en buenos porcentajes, incluso tres de ellos se removieron al 100% (amoxicilina, ceftriaxona, trimetoprima y sulfametoxazol) (Figura 7). Evidenciando así la eficiencia de esta planta de tratamiento en la remoción de residuos de antibióticos. Sin embargo, en el caso de dicloxacilina la planta influyó en su incremento en el efluente, lo que no es novedad, pues en otros estudios se ha hallado resultados similares en relación a otros antibióticos (Nieto-Juarez et al., 2021). Esto debido principalmente a fuertes efectos matriciales (principalmente supresión de la ionización), lo que llevaría a notificar concentraciones más bajas en el afluente y más altas en el efluente (Botero-Coy et al., 2018; Gracia-Lor et al., 2012).

Por lo que, se evidenció que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) juegan un papel importante en la eliminación de residuos de antibióticos. No obstante, se requiere un tratamiento terciario adicional para la eliminación completa de estos compuestos (Carvalho & Santos, 2016). Ya que como se evidenció en este estudio, el tratamiento existente no es suficiente para remover completamente estos compuestos del medio

acuático. Una alternativa sostenible y económicamente viable puede ser los humedales artificiales (Almeida et al., 2017), ya que su instalación no requiere de elevada tecnología o elevados costos (Chen, 2014).

Adicionalmente, antes del diseño de algún tratamiento, es necesario considerar las características fisicoquímicas de la muestra, dado que estas influenciarán en que los residuos de antibióticos se depositen en los sedimentos o estén más diluidos en el agua (Jafari et al., 2020). Dado que, el ciclo de vida de los antibióticos en el ambiente se rige por procesos biológicos y fisicoquímicos en los sistemas suelo-agua, particularmente la estabilidad, la sorción, la lixiviación y la degradación, que dependen de las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos (Tabla 2), y de otros factores ambientales (Carvalho & Santos, 2016). Por lo que es necesario considerar estas características cuando se vaya a diseñar una planta de tratamiento a fin de que sea eficiente en el proceso de remoción.

Tabla 2

*Características fisicoquímicas de antibióticos hallados en muestras de agua residual de la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.*

Antibiótico	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/L)	Log Kow	PKA
Amoxicilina	365.41	3,430	0.87	3.2 y 11.7
Ceftriaxona	554.58	105		
Dicloxacilina	470.327			2.50–2.80
Lincomicina	406.538			7.6
Sulfametoxazol	253.28	610	0.89	5.4
Trimetoprima	290.32			

**4.2 Evaluar la sensibilidad o resistencia de las cepas aisladas del río Huatanay de *E. coli*; *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae* frente a antibióticos encontrados mediante análisis microbiológicos.**

**4.2.1 Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa *Escherichia coli***

Al 95% de confiabilidad de la prueba T de student se concluye que el tratamiento de las aguas residuales en la PTAR no influye significativamente en la resistencia

microbiana de las cepas aisladas de aguas del río Huatanay frente a los antibióticos: amoxicilina, dicloxacilina y ciprofloxacino ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3).

Tabla 3

*Susceptibilidad de Escherichia coli, frente a antibióticos hallados en las aguas residuales de la ciudad de Cusco.*

Antibiótico	Conc. µg	Fuente	Sensible		Intermedio		Resistente		T de student (p-valor)
			Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	
Amoxicilina	15	Afluente	0	0	6	100	0	0	1
		Efluente	0	0	6	100	0	0	
Dicloxacilina	1	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	
Gentamicina	10	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.014
		Efluente	0	0	6	100	0	0	
Lincomicina	2	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.014
		Efluente	0	0	6	100	0	0	
Ceftriaxona	30	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.014
		Efluente	0	0	6	100	0	0	
Cefalexina	30	Afluente	0	0	6	100	0	0	0.014
		Efluente	0	0	0	0	6	100	
Ciprofloxacino	5	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	
Azitromicina	15	Afluente	0	0	6	100	0	0	0.014
		Efluente	0	0	0	0	6	100	

La mayoría de la contaminación con genes y bacterias resistentes a antibióticos proviene de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Ben et al., 2019; Novo et al., 2013; Reichert et al., 2019). Por lo que en gran parte de ríos que se hallan impactados por este tipo de descargas se hallarán este tipo de bacterias (Luo et al., 2010). Dentro de ellas *Escherichia coli* es una bacteria que se usa ampliamente para realizar pruebas de sensibilidad (Ben et al., 2019). Las bacterias pueden desarrollar resistencia a través de diversos mecanismos, tales como bomba de eflujo TolC en *E. coli*, así como la modificación de los antibióticos y sus metabolitos por enzimas (Kumar et al., 2019).

Los resultados en este estudio evidenciaron que *E. coli* no muestra resistencia a antibióticos a estos hallazgos (amoxicilina, dicloxacilina y ciprofloxacino). Sin embargo, es conocido que la amoxicilina es un antibiótico ampliamente estudiado por

su capacidad de generación de resistencia bacteriana (Reichert et al., 2019). Asimismo, en otro estudio con *E. coli*, se examinó la capacidad multiresistente de esta bacteria, hallándose en 90.6% como susceptible, 6% de intermedio, y 3.4% como resistente a la amoxicilina+ácido clavulánico (Larson et al., 2019). Adicionalmente, Sakkas et al., (2019) encontraron que *E. coli* evidenció capacidad resistente en un 79.2% de las muestras (n=24) a los antibióticos amoxicilina +ácido clavulánico (20/10 µg). Respecto a la amoxicilina, aquí no se demostró la resistencia bacteriana de *E. coli*; aunque los estudios referenciados dan a conocer que si puede generar esta resistencia. De la misma forma, en otro estudio en el que se aisló *E. coli* de aguas residuales hospitalarias, mostró capacidad de multi-resistencia a antibióticos como ampicilina (81.8%), y amoxicilina+ácido clavulánico (72.7%) (Dires et al., 2018). Asimismo, otro estudio evidenció que un solo evento puede tener la capacidad de generar resistencia bacteriana tal como lo demostraron con *E. coli* expuesta a diversos antibióticos, dentro de ellos ciprofloxacina (Helt et al., 2012)

De manera similar, otros estudios evidencian que la dicloxacilina generó resistencia bacteria en *E. coli* a 2450 y 4000 µg/L (Rivera-Gutiérrez et al., 2020). Esto puede ser debido a que las bacterias del estudio son provenientes de un efluente hospitalario, en el cual se encuentra usualmente mayor cantidad de antibióticos, mientras que las bacterias de este estudio fueron aisladas de la planta de tratamiento, en donde de forma general la concentración de antibióticos es menor. En relación a amoxicilina, en esta investigación no se refiere respuesta de resistencia al antibiótico a 15 µg. Sin embargo, en otro estudio se evaluó la sensibilidad de *E. coli* a diferentes antibióticos, dentro de ellos amoxicilina, en el primer estudio se halló que era sensible e intermedio, mientras que, en un segundo muestreo, después de cuatro meses, ya eran resistentes e intermedios a 10 µg/L (Lopes et al., 2016).

Por lo tanto, el hecho de que en este estudio aún no se haya encontrado resistencia, no implica que no haya riesgos, dado que probablemente esto puede cambiar en un futuro, tal como lo reporta un estudio realizado en Cajamarca- Perú, en el que se analizaron 266 muestras que incluyeron muestras de embalses, agua potable de los hogares. De ellos, en el 92.8% de muestras de los embalses se detectó *E. coli* y el 30.8% mostró resistencia a antibióticos principalmente a tetraciclina. Asimismo, se encontró *E. coli* en 57.1% de muestras de agua de hogares, de los que el 18.6% evidenciaron capacidad

multirresistente (Hartinger et al., 2021), demostrando así que esta problemática se va generalizando en el país.

Por otra parte, residuos del antibiótico gentamicina, influyen significativamente en la resistencia microbiana de las cepas aisladas de aguas del río Huatanay, observándose en muestras del afluente sensibilidad y en el efluente un cambio a intermedio. De manera similar, un estudio evidenció que la presencia de gentamicina (10 µg), en las aguas residuales alteró a *E. coli*, siendo considerada antes como sensible (Lopes et al., 2016).

Respecto a lincomicina: *E. coli* demostró sensibilidad en el afluente y en el efluente un cambio a intermedio; con Ceftriaxona: se observó en la afluente sensibilidad y en el efluente un cambio a intermedio; con Cefalexina: mostró en el afluente ser intermedio y en el efluente un cambio a resistente; finalmente con Azitromicina: en el afluente demostró ser intermedio y en el efluente cambió a resistente.

De la misma forma, en un estudio en el que se evaluó la resistencia de *E. coli* a diferentes antibióticos, fue considerada como una bacteria multirresistente debido a que evidenció características de susceptibilidad a antibióticos como ampicilina, cefoxitina, Cefaclor Imipenem, Gentamicina, ciprofloxacina, Norfloxacina y cloranfenicol (sensible) y para amoxicilina, cefalotina y estreptomina (intermedio), lo que muestra que la zona evaluada estaba contaminada con aguas residuales, de las que provino esta bacteria, así como con los residuos antibióticos que generaron esa resistencia (Lopes et al., 2016).

Adicionalmente, el efluente de las aguas residuales puede contaminar los recursos hídricos con las bacterias resistentes, tal como se reportó en este estudio. Al respecto, en un artículo en el que se analizaron muestras de agua potable en la Cajamarca-Perú, se halló *E. coli* resistente a antibióticos (tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, y ácido nalidixico) (Larson et al., 2019). Lo que representa gran riesgo para la salud.

#### 4.2.2 Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa *Salmonella sp.*

La *salmonella sp.* es una especie de amplia distribución en aguas contaminadas con aguas residuales, quien también al estar en contacto con residuos de antibióticos ha desarrollado resistencia, principalmente a amoxicilina (Bhattacharjee, 2016). Los resultados de este estudio demuestran que la resistencia microbiana de las cepas aisladas de *Salmonella sp.* en las aguas del río Huatanay frente a los residuos de antibióticos: amoxicilina, dicloxacilina, lincomicina, ceftriaxona, cefalexina y ciprofloxacino antes del tratamiento en la PTAR, en un 100% de las muestras son resistentes (Tabla 4). Adicionalmente, en otro estudio en el que se sometió a *salmonella* a antibióticos como ciprofloxacina, evidenció que mayores concentraciones pueden tener efectos tóxicos en la *salmonella* (25 µg/l) (Ao et al., 2018), debido a que este es un antibiótico de tipo bactericida (Kumar et al., 2019).

Tabla 4

*Susceptibilidad de Salmonella sp. frente a antibióticos hallados en las aguas residuales de la ciudad de Cusco.*

Antibiótico	Conc. µg	Fuente	Sensible		Intermedio		Resistente	
			Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Amoxicilina	15	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Dicloxacilina	1	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Gentamicina	10	Afluente	0	0	6	100	0	0
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Lincomicina	2	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Ceftriaxona	30	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Cefalexina	30	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacino	5	Afluente	0	0	0	0	6	100
		Efluente	0	0	0	0	0	0
Azitromicina	15	Afluente	6	100	0	0	0	0
		Efluente	0	0	0	0	0	0

Adicionalmente, cabe resaltar que esta especie es también conocida como multi-resistente debido a su respuesta de resistencia frente a varios antibióticos, tal como lo refirió un estudio en el que aislaron esta especie del excremento animal, del cual el 18% de las muestras aisladas tuvieron respuesta de multi-resistencia, es decir que fueron resistentes a varios antibióticos (Palhares et al., 2014). Adicionalmente, en otro estudio en el que se aisló *Salmonella* de aguas residuales hospitalarias, se halló que esta especie tenía capacidad de multi-resistencia a antibióticos como ampicilina, doxiciclina, eritromicina, ceftazidima, cefoxitina, y cloranfenicol (Dires et al., 2018).

De manera similar, en otro estudio en el que se aisló *Salmonella* de varios efluentes de agua residual, presentaron resistencia a numerosos antibióticos, como a betalactamasas, cloranfenicol y quinolonas (Masarikova et al., 2016). Adicionalmente, en otra investigación en la que también se aisló *Salmonella* de muestras de aguas residuales, esta bacteria mostró multi-resistencia a antibióticos, para tetraciclina (47.5% de las bacterias aisladas) y sulfametoxazol (38.5%), seguido de ampicilina (25.3%), estreptomina (17.6%), cloranfenicol (CHL, 15.4%), gentamicina (11.3%) y una baja resistencia respecto a norfloxacin (0.45%), ciprofloxacina (0.9%) y cefotaxima (0.9%) (Zhang et al., 2019), lo que evidencia que esta especie tiene la capacidad de resistir la presencia de antibióticos simultáneamente.

Existen factores que contribuyen en el desarrollo de esta resistencia, dentro de ellos los más conocidos son dos mecanismos. Primero disminuir la concentración del antibiótico a un nivel inferior a la CIM de forma que no tenga un efecto inhibitor significativo sobre la bacteria. Segundo alterar la diana del antibiótico de manera que ya no le afecte el antibiótico a la bacteria (Bhattacharjee, 2016). Adicionalmente, en *Salmonella* es la presencia de integrones, que son plataformas genéticas que posibilitan a que las bacterias capten genes de resistencia a los antibióticos, tal como lo evidencia Zhang et al., (2019), en el que hallaron que las bacterias que tenían integrones desarrollaron mayor resistencia bacteriana que las que no las tuvieron. Adicionalmente, en otro estudio también se halló integrones en las bacterias resistentes (Masarikova et al., 2016). Demostrando así, que la presencia de integrones es uno de los mecanismos de resistencia bacteriana.

Por otra parte, frente al antibiótico gentamicina antes del tratamiento la cepa de *Salmonella* sp. es de sensibilidad intermedia y con respecto a la Azitromicina es

sensible; sin embargo, después del tratamiento en el efluente no se aisló esta cepa por lo que no se pudo evaluar si hubo cambios en la susceptibilidad a los antibióticos antes mencionados. El tratamiento de las aguas servidas del río Huatanay en la PTAR con cloro, antes de evacuar el agua tratada al lecho del río nuevamente, es posible que haya causado la ausencia la cepa *Salmonella sp* en las muestras de agua analizadas del efluente. Por lo tanto, esto evidenciaría la efectividad del tratamiento de la planta de tratamiento en relación a esta cepa bacteriana.

#### **4.2.3 Variaciones en la susceptibilidad a antibióticos encontrados en el río Huatanay de la cepa *Klebsiella sp*.**

La *Klebsiella* es otra bacteria que se aísla frecuentemente en muestras de agua residual y fuentes contaminadas con aguas residuales, principalmente contaminadas con aguas residuales hospitalarias (Loudermilk et al., 2022), y además demostró multi-resistencia a antibióticos (Ben et al., 2019; Kumar et al., 2019). Al 95% de confiabilidad de la prueba de T de student se demuestra que el tratamiento de las aguas residuales en la PTAR; influyen significativamente ( $p < 0.05$ ) en el perfil de susceptibilidad microbiana de las cepas aisladas de *Klebsiella sp*. de aguas del río Huatanay frente a los antibióticos analizados (Tabla 5).

En relación a la amoxicilina: en el afluente la *Klebsiella* presenta sensibilidad y en el efluente un cambio a resistente. De manera similar, en el sur de Brasil se encontró que la presencia de amoxicilina en las aguas residuales influyó en la aparición de resistencia bacteriana (Lopes et al., 2016). Adicionalmente, en otro estudio se halló que *K. pneumoniae* mostró resistencia en un 75% de las muestras con amoxicilina+ácido clavulánico (Sakkas et al., 2019), pues la amoxicilina es un antibiótico frecuentemente presente en las aguas residuales y no solo causa resistencia en *E. coli* y *Klebsiella*, sino también en otras bacterias entéricas (Novo et al., 2013). Adicionalmente *Klebsiella* vive en el ambiente manteniendo su capacidad de resistencia, por ello se puede hallar en ecosistemas acuáticos contaminados con aguas residuales, demostrando esa resistencia (Hartinger et al., 2021).

Tabla 5

*Susceptibilidad de Klebsiella sp. frente a antibióticos hallados en el afluente de las aguas residuales de la ciudad de Cusco.*

Antibiótico	Conc. μg	Fuente	Sensible		Intermedio		Resistente		T de student (p-valor)
			Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuenci a	%	
Amoxicilina	15	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.001
		Efluente	0	0	0	0	6	100	
Dicloxacilina	1	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.001
		Efluente	0	0	6	100	0	0	
Gentamicina	10	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	
Lincomicina	2	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	
Ceftriaxona	30	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.001
		Efluente	0	0	0	0	6	100	
Cefalexina	30	Afluente	6	100	0	0	0	0	0.001
		Efluente	0	0	0	0	6	100	
Ciprofloxacino	5	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	
Azitromicina	15	Afluente	6	100	0	0	0	0	1
		Efluente	6	100	0	0	0	0	

Respecto a los demás antibióticos, se tiene a la dicloxacilina: observándose en la afluente sensibilidad y en el efluente un cambio a intermedio. Y en relación a ceftriaxona y cefalexina se halló sensibilidad en el afluente y en el efluente un cambio a resistente. Por otra parte, no influyó significativamente ( $p > 0.05$ ) en la susceptibilidad microbiana de las cepas aisladas de *Klebsiella sp.* de aguas del río Huatanay frente a los antibióticos: gentamicina, lincomicina, ciprofloxacino y azitromicina. En una investigación en la que se usó las mismas concentraciones de antibióticos empleadas en este estudio, también se observó el desarrollo de la capacidad de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* en diferentes porcentajes un 100% para ceftriaxona (30 μg), 87.5% para ciprofloxacino (5 μg).

Como se ha descrito, esta bacteria es multirresistente, lo que también es corroborado por la información científica existente (Kumar et al., 2019). Especie que se ha hallado hasta en muestras de agua potable con esa capacidad resistente a antibióticos

(Betalactamasas) (Larson et al., 2019). Incluso esta especie ha mostrado cierta resistencia a fosfomicina, que es un antibiótico que se usa para combatir las bacterias multirresistentes a antibióticos (Kumar et al., 2019), por lo que también representa riesgos para el ambiente y la salud humana. Las aguas residuales son una fuente importante de bacterias resistentes a antibióticos (Masarikova et al., 2016), dentro de ellos, las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Streptomyces* sp. son las que con frecuencia se aíslan de este tipo de aguas, principalmente si estas están contaminadas con residuos hospitalarios, tal como se comprobó en este estudio.

### 4.3 Parámetros fisicoquímicos del afluente y efluente de la planta de tratamiento

En relación a los parámetros fisicoquímicos de la planta, de forma general en el ingreso se aprecia parámetros que indican una mala calidad del agua; sin embargo, en el efluente se percibe una mejora en los parámetros fisicoquímicos. Estos parámetros fueron comparados con los valores considerados para ecosistemas acuáticos (ríos) por los estándares de calidad ambiental del Perú (MINAM, 2017). Esta información puede visualizarse en la Tabla 6, donde aún los parámetros para el efluente están por encima de los valores considerados en los ECAs, aunque si mejoró la calidad en contraste con el afluente.

Tabla 6

*Parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua en la planta de tratamiento de Cusco.*

Parámetros	Afluente	Efluente	ECAs	Unidad
DBO <sub>5</sub>	537.25	307.75	10	mg/L
Coliformes				
termotolerantes	35500000	3132.5	0.0001	mg/L
pH	8.37	7.92	6,5 a 9,0	
Temperatura	16.9	17.1	Δ 3	°C
Conductividad	1721.3	1609.65	1 000	uS/cm
Solidos totales	1468.5	896.5	≤ 25	mg/L
Nitritos	0.024	0.2285		mg/L
Nitratos	2.095	2.115	13	mg/L
Turbidez	502.6	30.65		NTU
Caudales	754.875	637.265		L/s

En los estudios en los que se evalúa sobre la eficiencia de remoción de las plantas de tratamiento de aguas residuales, en la mayoría de casos, las plantas de tratamiento mejoran la calidad de las aguas residuales (Lopes et al., 2016; Prieto-Rodriguez et al., 2012), aunque no con los valores esperados por la legislación (MINAM, 2017), por lo que como resultado se tiene aún mala calidad de aguas en el efluente, tal como también lo reportó otro estudio en la misma planta (Masco, 2017). Por ejemplo, en el caso del  $DBO_5$ , aunque no cumple con los estándares exigidos por las leyes nacionales (537.25 mg/L), disminuye en gran manera a comparación del afluente (307.75 mg/L). Lo mismo en relación a los coliformes termotolerantes, disminuye de 35500000 UFC del afluente a 3132.5 UFC en el efluente, de tal manera que esto sea algo aceptable para el ambiente. De manera similar ocurre con la conductividad y los sólidos totales. Los únicos valores que cumplen con la legislación nacional es el valor de nitratos y el pH tanto en el afluente y efluente. Por lo que de forma general la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco genera mejor calidad de agua y remoción de antibióticos en comparación con las plantas de tratamiento existentes en la ciudad de Lima (Nieto-Juarez et al., 2021).

#### **4.4 Impactos en la salud humana, producidos por los residuos de antibióticos en aguas del río Huatanay, opinión de expertos**

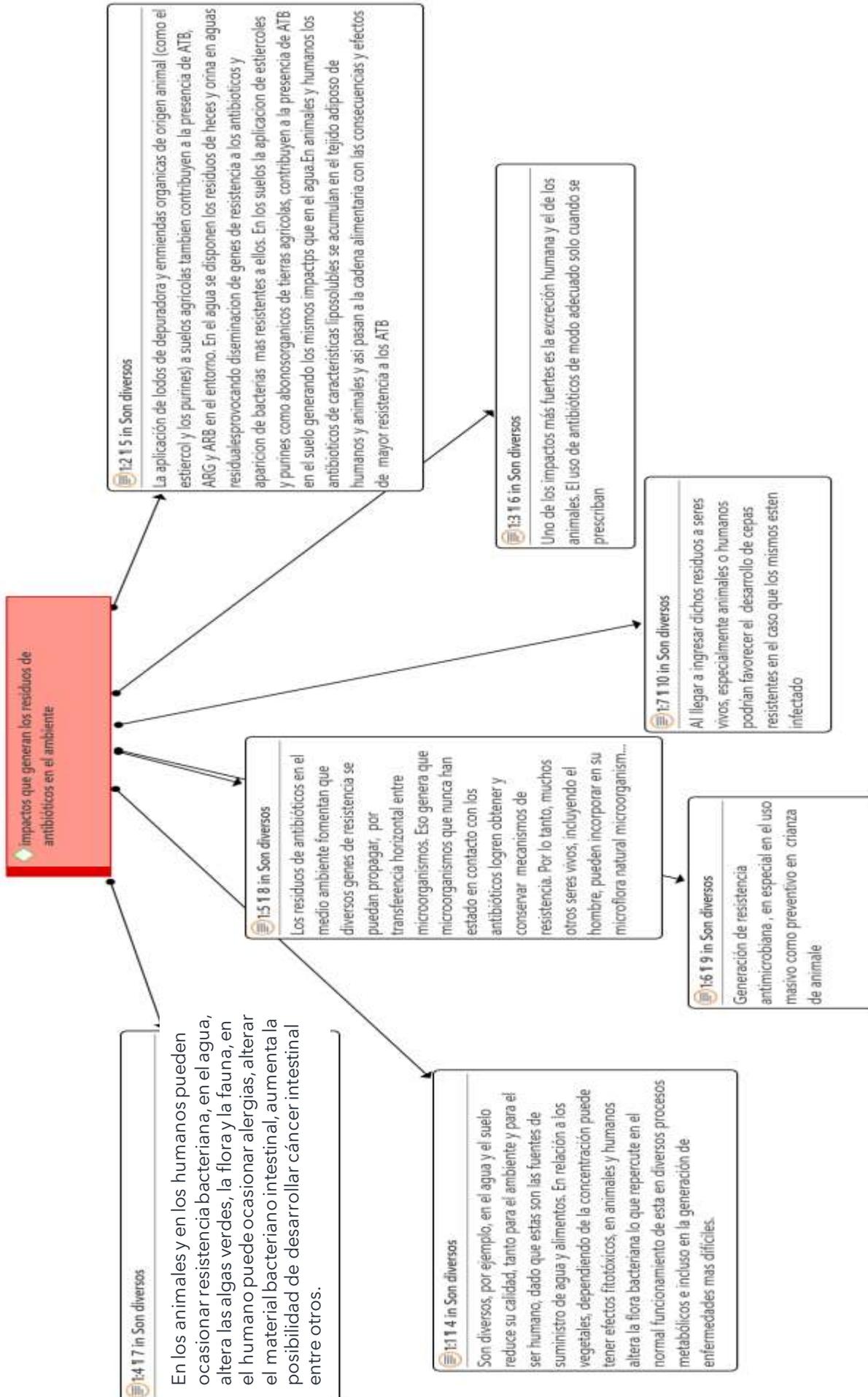


Figura 8. Principales impactos de los residuos de antibióticos en el ambiente

Ciertamente en opinión de los expertos, la presencia de residuos de antibióticos en las aguas residuales, son de especial interés debido a los riesgos relacionados a la salud humana, de animales, plantas y los ecosistemas acuáticos (*Figura 8*). Reconocen que sobre todo su presencia en el medio ambiente influye en la aparición e incremento de resistencia microbiana, con efectos por ejemplo en humanos y animales en el cambio de flora normal, promoviendo la aparición de cepas resistentes, genes de resistencia con alta posibilidad de transmisión, que dificultan el tratamiento de infecciones causadas por ellos, siendo un problema de salud pública. O en plantas refieren la fitotoxicidad. Y sobre la acumulación en suelos mencionan que los riesgos potenciales relacionados con el medio ambiente y la salud humana son innegables, como ejemplo pueden generar cambios de pH de los suelos, nutrientes y salinidad que favorecen la aparición de bacterias resistentes e inducen resistencia a los antimicrobianos en bacterias sensibles.

De la revisión bibliográfica concluimos entonces que la razón principal para explicar la presencia de fármacos en las aguas se encuentra en su amplio consumo y en la remoción incompleta en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR); por lo tanto, los residuos de medicamentos llegan a las aguas superficiales (SO) (Couto et al., 2019; Peña-Guzmán et al., 2019), aguas subterráneas y agua de mar (Hernández et al., 2019a; Alygizakis et al., 2016) con el consiguiente impacto en su calidad. Dentro del amplio grupo de compuestos farmacéuticos, los antibióticos son los que más preocupan debido a los impactos negativos que pueden generar sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana, por ejemplo, el desarrollo de cepas de resistencia microbiana provocadas por el vertido de aguas residuales a los cuerpos de agua (Kairigo et al., 2020; Ben et al., 2019). Ilustrativa de esta preocupación, como referencia es la inclusión de varios productos farmacéuticos en la Watch List de la Unión Europea (UE), recientemente actualizada (UE, 2020). En esta lista se incluyen nueve fármacos y un metabolito, de los cuales cuatro son antibióticos (amoxicilina, ciprofloxacina, sulfametoxazol, trimetoprima).

#### **4.5 Influencia de la planta de tratamiento de aguas residuales del río Huatanay, San Jerónimo Cusco, según opinión de expertos**

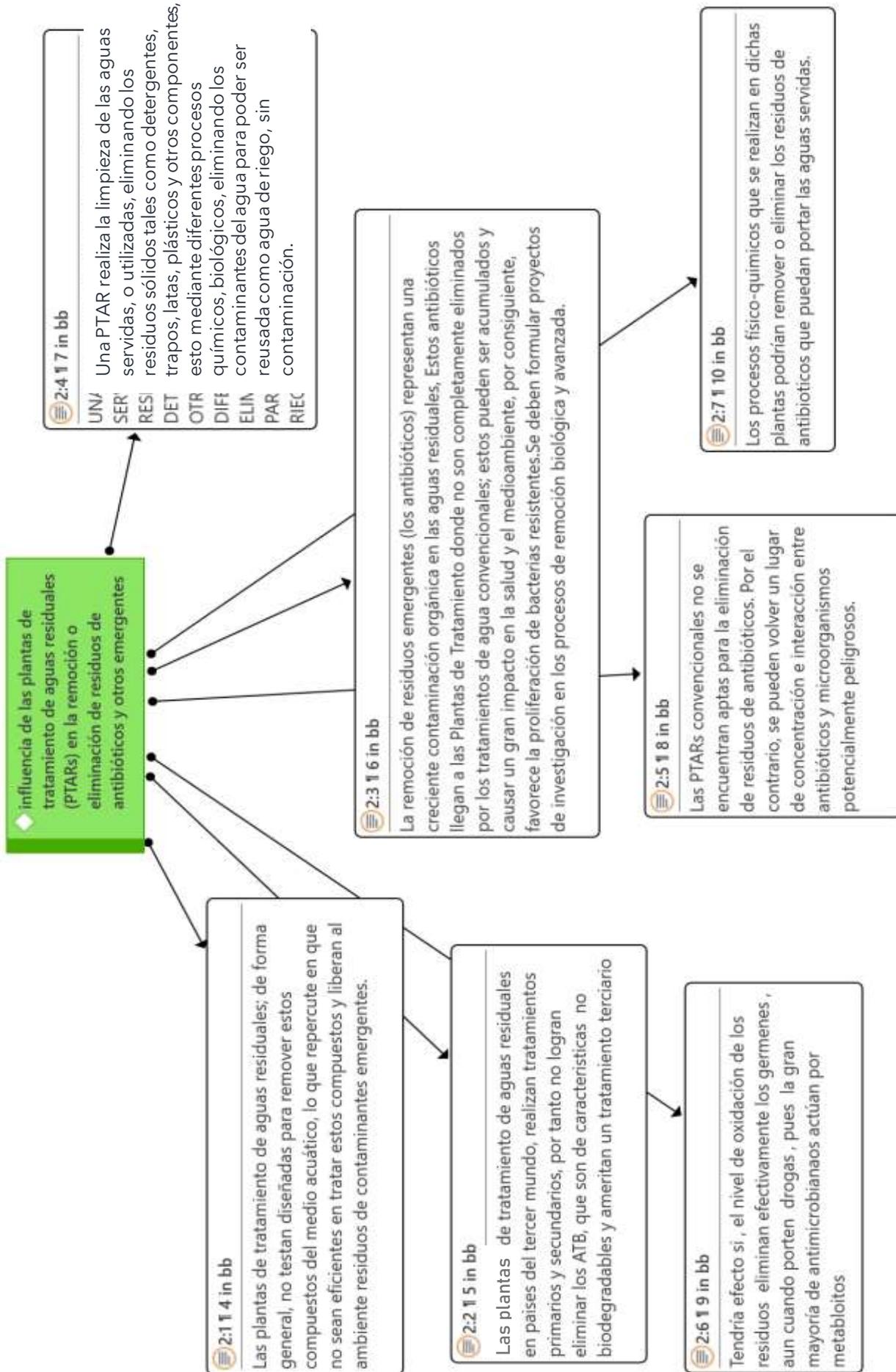


Figura 9. Influencia de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco en la calidad de aguas del río Huatanay.



Basados en la opinión de expertos, sobre la influencia del tratamiento de aguas residuales en la PTAR y la presencia o ausencia de residuos de antibióticos en cantidades importantes con efecto sobre el medio ambiente y la salud humana. Plantean que se produce una remoción parcial o ineficiente de estos residuos emergentes, así como sus metabolitos y productos de biodegradación, y que se requiere la aplicación de tecnologías de tratamiento avanzadas y específicas para la mayor tasa de eliminación y opciones de reutilización de agua segura (*Figura 9*). Independientemente del hecho de que estas plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para eliminar este tipo de sustancias.

## CONCLUSIONES

1. Los análisis de las muestras de agua provenientes de la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco, muestran que están contaminadas con residuos de antibióticos. Registrándose valores medios en el afluente de: amoxicilina, (91495  $\mu\text{g/L}$ ); lincomicina (33970  $\mu\text{g/L}$ ); ceftriaxona (7940 $\mu\text{g/L}$ ) trimetoprima (2815  $\mu\text{g/L}$ ); sulfametoxazol (1195  $\mu\text{g/L}$ ) y dicloxacilina (350 $\mu\text{g/L}$ ). Los antibióticos que se encuentran en mayor concentración son: amoxicilina y lincomicina; mientras que trimetoprima, sulfametoxazol, ceftriaxona y dicloxacilina, son los que se registran en menor cantidad. En relación al efluente, solo se hallan ceftriaxona dicloxacilina y lincomicina en menor concentración, lo que evidencia que la planta de tratamiento es eficiente en remover la mayoría de los antibióticos.
2. Respecto a la generación de resistencia antibióticos, las bacterias muestran capacidad de resistencia en el efluente mas no en el afluente. La bacteria *Escherichia coli* es resistente en el efluente a cefalexina y azitromicina. *Salmonella* sp. es resistente a amoxicilina, dicloxacilina, lincomicina, ceftriaxona, cefalexina y ciprofloxacino. Finalmente, en relación a *Klebsiella* sp. es sensible en el efluente a Amoxicilina, Ceftriaxona y Cefalexina. Esto evidencia que el tiempo de contacto entre los residuos de antibióticos y las bacterias locales, ejerce influencia en la generación de bacterias con resistencia a antibióticos.



## RECOMENDACIONES

Incluir en los monitoreos de calidad de aguas del efluente los análisis de residuos de antibióticos. Así como un tratamiento que implique la remoción de estos compuestos de aguas residuales según presupuesto.

Incluir monitoreos de calidad de aguas, análisis de identificación de bacterias resistentes a antibióticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, C. M. R., Santos, F., Ferreira, A. C. F., Lourinha, I., Basto, M. C. P., & Mucha, A. P. (2017). Can veterinary antibiotics affect constructed wetlands performance during treatment of livestock wastewater? *Ecological Engineering*, *102*, 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.02.035>
- Ao, X., Liu, W., Sun, W., Cai, M., Ye, Z., Yang, C., Lu, Z., & Li, C. (2018). Medium pressure UV-activated peroxymonosulfate for ciprofloxacin degradation: Kinetics, mechanism, and genotoxicity. *Chemical Engineering Journal*, *345*(March), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.133>
- APHA. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd edition* (23rd ed.).
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Morel, M. C., Prado, B., Bourdat-Deschamps, M., Vince, E., Aviles, G. F., & Martins, J. M. F. (2017). Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Science of the Total Environment*, *576*, 671–682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.129>
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, *169*, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Bhattacharjee, M. K. (2016). *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs* (Springer (ed.)). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40746-3>
- Binh, V. N., Dang, N., Thi, N., Anh, K., Ky, L. X., & Thai, P. K. (2018). Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. *Chemosphere*, *197*, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.061>
- Birošová, L., Mackuľak, T., Bodík, I., Ryba, J., Škubák, J., & Grabic, R. (2014). Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Science of the Total Environment*, *490*, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.030>
- Botero-Coy, A. M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, R. J., Castillo, N., Arias-Marín, L. P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R., Moncayo-Lasso, A., & Hernández, F. (2018). An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Science of the Total Environment*, *642*,

- 842–853. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.088>
- Cahui, N. (2019). Detección y cuantificación de residuos de antibióticos de uso veterinario en muestras de sedimento en zonas productoras de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y en agua potable de la zona sur de la ciudad de Puno. Universidad Nacional del Altiplano de Puno.
- Camacho Assef, V. J. (2010). Los antimicrobianos en la práctica médica. *Medicina Intensiva*, 272.
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. In *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.  
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Chen, J. (2014). Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in rural wastewater by an integrated constructed wetland. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 1794–1803. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2800-4>
- Cheng, D., Hao Ngo, H., Guo, W., Wang Chang, S., Duc Nguyen, D., Liu, Y., Zhang, X., Shan, X., & Liu, Y. (2020). Contribution of antibiotics to the fate of antibiotic resistance genes in anaerobic treatment processes of swine wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 299, 122654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122654>
- COSAPI. (2014). *Nueva Planta de Tratamiento de Aguas Residuales en Cusco*.  
<https://www.cosapi.com.pe/Site/Index.aspx?aID=924>
- Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7–8), 711–732.  
<https://doi.org/10.1016/J.EIAR.2004.06.003>
- Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2006). Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 973–985.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z>
- Dires, S., Birhanu, T., Ambelu, A., & Sahilu, G. (2018). Antibiotic resistant bacteria removal of subsurface flow constructed wetlands from hospital wastewater. *Journal*

- of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4265–4272.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.034>
- Diwan, V., Tamhankar, A. J., Khandal, R. K., Sen, S., Aggarwal, M., Marothi, Y., Iyer, R. V., Sundblad-Tonderski, K., & Stålsby-Lundborg, C. (2010). Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health*, 10(1), 414. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-414>
- Duwig, C., Archundia, D., Lehembre, F., Spadini, L., Morel, M. C., Uzu, G., Chincheros, J., Cortez, R., & Martins, J. M. F. (2014). Impacts of Anthropogenic Activities on the Contamination of a Sub Watershed of Lake Titicaca. Are Antibiotics a Concern in the Bolivian Altiplano? *Procedia Earth and Planetary Science*, 10, 370–375.  
<https://doi.org/10.1016/j.proeps.2014.08.062>
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., & Ronco, A. E. (2012). *Emerging pollutants: pharmaceuticals in the environment*.
- FDA. (2022). *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. FDA.  
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferhi, S., Bourdat-Deschamps, M., Daudin, J. J., Houot, S., & Nélieu, S. (2016). Factors influencing the extraction of pharmaceuticals from sewage sludge and soil: an experimental design approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(22), 6153–6168. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9725-3>
- Forestieri, S., Pintus, R., Marcialis, M. A., Pintus, M. C., & Fanos, V. (2021). COVID-19 and developmental origins of health and disease. *Early Human Development*, 155, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2021.105322>
- Gaceta Medica. (2015). *El consumo de antibióticos en el mundo aumenta un 36% en la última década*. [https://gacetamedica.com/hemeroteca/el-consumo-de-antibioticos-en-el-mundo-aumenta-un-36-en-la-ultima-decada-frlg\\_907763/](https://gacetamedica.com/hemeroteca/el-consumo-de-antibioticos-en-el-mundo-aumenta-un-36-en-la-ultima-decada-frlg_907763/)
- Gautam, A. K., Kumar, S., & Sabumon, P. C. (2007). Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environmental Management*, 83(3), 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.009>
- Gerzabek, M. H., Barceló, D., Bellin, A., Rijnaarts, H. H. M., Slob, A., Darmendrail, D.,

- Fowler, H. J., Négrel, P., Frank, E., Grathwohl, P., Kuntz, D., & Barth, J. A. C. (2007). The integrated project AquaTerra of the EU sixth framework lays foundations for better understanding of river–sediment–soil–groundwater systems. *Journal of Environmental Management*, 84(2), 237–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.10.014>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., Bonillo, C., Hernández, A., Bermejo, M., & Canteras, M. (2014). Autovaloración sobre prescripción de antibióticos en un hospital universitario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(8), 507–510.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.03.009>
- Gonzalez-Zorn, B. (2021). Antibiotic use in the COVID-19 crisis in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(4), 646–647.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.055>
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R., & Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 87(5), 453–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025>
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Haddad, T., Baginska, E., & Kümmerer, K. (2015). Transformation products of antibiotic and cytostatic drugs in the aquatic cycle that result from effluent treatment and abiotic/biotic reactions in the environment: An increasing challenge calling for higher emphasis on measures at the beginning of the pipe. *Water Research*, 72, 75–126.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.12.042>
- Harrabi, M., Varela Della Giustina, S., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Elleuch, B. (2018). Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10(November 2017), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.006>
- Hartinger, S. M., Medina-Pizzali, M. L., Salmon-Mulanovich, G., Larson, A. J., Pinedo-Bardales, M., Verastegui, H., Riberos, M., & Mäusezahl, D. (2021). Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural andean peru: Exploring dissemination pathways through the one health lens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4604.

<https://doi.org/10.3390/IJERPH18094604/S1>

- Helt, C. D., Weber, K. P., Legge, R. L., & Slawson, R. M. (2012). Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. *Ecological Engineering*, 39, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.11.007>
- Huang, Y. H., Liu, Y., Du, P. P., Zeng, L. J., Mo, C. H., Li, Y. W., Lü, H., & Cai, Q. Y. (2019). Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistant genes in water and sediments of urban rivers with black-odor water in Guangzhou, South China. *Science of the Total Environment*, 670, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.168>
- INGEMET. (2011). *Evaluación del río Huatanayen el tramo Puente Agua Nueva y urbanización Cachimayo* (Vol. 1, Issue 69).
- Jafari, E., Hamidian, A. H., Zhang, Y., & Yang, M. (2020). Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment. *Water Environment Research*, 92(2), 177–188. <https://doi.org/10.1002/wer.1237>
- Kaštelan-Macan, M., Ahel, M., Horvat, A. J. M., Jabučar, D., & Jovančić, P. (2007). Water resources and waste water management in Bosnia and Herzegovina, Croatia and the State Union of Serbia and Montenegro. *Water Policy*, 9(3), 319–343. <https://doi.org/10.2166/wp.2007.003>
- Kołodziejaska, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Steudte, S., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Stolte, S. (2013). Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere*, 92(9), 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.057>
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), 1202–1211.
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124(December 2018), 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.065>
- Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review.

- Chemosphere*, 45(6–7), 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8)
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 311–320. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>
- Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., & Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287–303. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2011.12.034>
- Larson, A., Hartinger, S. M., Riveros, M., Salmon-mulanovich, G., Hattendorf, J., Verastegui, H., Huaylinos, M. L., & Mäusezahl, D. (2019). Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca, Peru. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*, 100(6), 1363–1368. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0776>
- Lei, K., Zhu, Y., Chen, W., Pan, H. Y., Cao, Y. X., Zhang, X., Guo, B. B., Sweetman, A., Lin, C. Y., Ouyang, W., He, M. C., & Liu, X. T. (2019). Spatial and seasonal variations of antibiotics in river waters in the Haihe River Catchment in China and ecotoxicological risk assessment. *Environment International*, 130, 104919. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104919>
- Liu, K., Zhang, D., Xiao, X., Cui, L., & Zhang, H. (2020). Occurrence of quinotone antibiotics and their impacts on aquatic environment in typical river-estuary system of Jiaozhou Bay, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 109993. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109993>
- Liu, Lili, Wu, W., Zhang, J., Lv, P., Xu, L., & Yan, Y. (2018). Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica*, 38(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.006>
- Liu, Lin, Liu, Y., Liu, C., & Huang, X. (2016). Accumulation of antibiotics and tet resistance genes from swine wastewater in wetland soils. *Environmental Engineering and Management Journal*, 15, 2137–2145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122450>
- Lopes, T. R., Costa, I. L., Periotto, F., & Pletsch, A. L. (2016). Antibiotic resistance in *E. coli* isolated in effluent from a wastewater treatment plant and sediments in receiver body. *International Journal of River Basin Management*, 14(4), 441–445. <https://doi.org/10.1080/15715124.2016.1201094>
- Loudermilk, E. M., Kotay, S. M., Barry, K. E., Parikh, H. I., Colosi, L. M., & Mathers, A.

- J. (2022). Tracking *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene as an indicator of antimicrobial resistance dissemination from a hospital to surface water via a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 213, 118151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118151>
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & Alvarez, P. J. J. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science and Technology*, 44(19), 7220–7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>
- Martínez-Alcalá, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas*, 29(3), 2070. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2070>
- Masarikova, M., Manga, I., Cizek, A., Dolejska, M., Oravcova, V., Myskova, P., Karpiskova, R., & Literak, I. (2016). *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. *Science of the Total Environment*, 542, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.069>
- Masco, M. L. (2017). Determinación de contaminantes tensioactivos tipo ácido dodecibenceno sulfónico lineal en aguas del Río Huatanay - Cusco. *Repositorio Institucional UNA-Puno*, 1–125.
- Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., & Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.050>
- Meyer, V. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (Wiley (ed.); 5th ed.). John Wiley and Sons.
- MINAM. (2017). Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua. In *El Peruano* (pp. 6–9). <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- Murray, K. E., Thomas, S. M., & Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12), 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2010.08.009>
- Narvaez, J. F., & Jimenez, C. (2012). Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. *Vitae*, 19(1), 93–108.
- Nieto-Juarez, J., Torres-Palma, R., Botero-Coy, A., & Hernández, F. (2021).

- Pharmaceuticals and environmental risk assessment in municipal wastewater treatment plants and rivers from Peru. *Environment International Journal*, 155, 106674. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106674>
- Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2013). Antibiotic resistance, Antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47(5), 1875–1887. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.010>
- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 409, Issue 20, pp. 4141–4166). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.061>
- Pal, A., Gin, K. Y.-H., Lin, A. Y.-C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment*, 408(24), 6062–6069. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.09.026>
- Palhares, J. C. P., Kich, J. D., Bessa, M. C., Biesus, L. L., Berno, L. G., & Triques, N. J. (2014). *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. *Science of the Total Environment*, 472, 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.052>
- Pan, M., Wong, C. K. C., & Chu, L. M. (2014). Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the Pearl River Delta, Southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11062–11069. <https://doi.org/10.1021/jf503850v>
- Paz, M., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., & Moretton, J. (2008). Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 24(2), 79–87.
- 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>
- Petrovic, M., Farré, M., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2013). Environmental Analysis: Emerging Pollutants. *Liquid Chromatography: Applications*, 389–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00014-0>

- Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G. L., & Malato, S. (2012). Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, 211–212, 131–137.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2011.09.008>
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Azevedo, J. C. R. (2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255, 113140. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>
- Rivera-Gutiérrez, E., Ramírez-García, J. J., Pavón Romero, S. H., Rodríguez, M. M., Ramírez-Serrano, A., & Jiménez-Marin, A. (2020). Dicloxacillin Degradation with Free-Living Bacteria. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(2), 1–13.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-020-4456-7>
- Sakkas, H., Bozidis, P., Iliá, A., Mpekoulis, G., & Papadopoulou, C. (2019). Antimicrobial resistance in bacterial pathogens and detection of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital wastewater. *Antibiotics*, 8(3), 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics8030085>
- Samuelsen, O. B., Torsvik, V., & Ervik, A. (1992). Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of The Total Environment*, 114, 25–36.  
[https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90411-K](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90411-K)
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., & Kreyenschmidt, J. (2020). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 727.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788>
- Shao, B., Chen, D., Zhang, J., Wu, Y., & Sun, C. (2009). Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1216(47), 8312–8318.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.038>
- Smital, T. (2008). Acute and Chronic Effects of Emerging Contaminants. In *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste* (pp. 105–142). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_105](https://doi.org/10.1007/698_5_105)
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. (2010). *Introduct to Modern Liquid*

- Chromatography* (Wiley (ed.); Third). Wiley.
- Sorinolu, A. J., Tyagi, N., Kumar, A., & Munir, M. (2021). Antibiotic resistance development and human health risks during wastewater reuse and biosolids application in agriculture. *Chemosphere*, 265, 129032.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129032>
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of The Total Environment*, 416, 1–21. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2011.11.072>
- SUNASS. (2008). *Diagnóstico situacional de los sistemas de tratamiento de aguas residuales en las EPS del Perú y propuestas de solución*.  
[http://www.proagua.org.pe/files/de62b65581b727d66847f48aa52fbbfd/Libro\\_PTAR.pdf](http://www.proagua.org.pe/files/de62b65581b727d66847f48aa52fbbfd/Libro_PTAR.pdf)
- Tian, T., Yang, Q., Wei, G., Cheung, S. G., Shin, P. K. S., Wong, Y. S., Li, Z., Chen, Z., & Tam, N. F. Y. (2020). Changes of substrate microbial biomass and community composition in a constructed mangrove wetland for municipal wastewater treatment during 10-years operation. *Marine Pollution Bulletin*, 155(April).  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111095>
- Tie, Y., Vanhee, C., Deconinck, E., & Adams, E. (2019). Development and validation of chromatographic methods for screening and subsequent quantification of suspected illegal antimicrobial drugs encountered on the Belgian market. *Talanta*, 194, 876–887. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.078>
- Toledo, J., & Toledo, J. (2010). *Propuesta de aplicación de la metodología beneficio costo (B/C) para la evaluación económica de proyectos de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR): caso PTAR del Cusco*. 505, 10–12.  
[http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1130/1/lopez\\_gj.pdf](http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1130/1/lopez_gj.pdf)
- Upmanyu, N., & Malviya, V. N. (2020). Antibiotics: Mechanisms of action and modern challenges. In Elsevier (Ed.), *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (pp. 367–382). INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00018-8>
- Walia, S., Murleedham, C., Band, J., Kanwar, M., & Kumar, A. (2016). Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital waste water effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. *Current Medicine Research and Practice*, 6(4), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.cmrp.2016.07.005>
- Wang, J., Xu, J., Ji, X., Wu, H., Yang, H., Zhang, H., Zhang, X., Li, Z., Ni, X., & Qian, M.

- (2020). Determination of veterinary drug/pesticide residues in livestock and poultry excrement using selective accelerated solvent extraction and magnetic material purification combined with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1617.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460808>
- Wang, K., Zhuang, T., Su, Z., Chi, M., & Wang, H. (2021). Antibiotic residues in wastewaters from sewage treatment plants and pharmaceutical industries: Occurrence, removal and environmental impacts. *Science of the Total Environment*, 788.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147811>
- Watanabe, N., Bergamaschi, B. A., Loftin, K. A., Meyer, M. T., & Harter, T. (2010). Use and Environmental Occurrence of Antibiotics in Freestall Dairy Farms with Manured Forage Fields. *Environmental Science & Technology*, 44(17), 6591–6600.  
<https://doi.org/10.1021/es100834s>
- WHO. (2015). *WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*.
- WHO. (2018). *Antimicrobial resistance*.
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biology*, 8, 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Xiong, Q., Hu, L. X., Liu, Y. S., Wang, T. T., & Ying, G. G. (2019). New insight into the toxic effects of chloramphenicol and roxithromycin to algae using FTIR spectroscopy. *Aquatic Toxicology*, 207(July 2018), 197–207.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.017>
- Xu, W., Yan, W., Li, X., Zou, Y., Chen, X., Huang, W., Miao, L., Zhang, R., Zhang, G., & Zou, S. (2013). Antibiotics in riverine runoff of the Pearl River Delta and Pearl River Estuary, China: Concentrations, mass loading and ecological risks. *Environmental Pollution*, 182, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.004>
- Xue, J. J., Lei, D., Zhao, X., Hu, Y., Yao, S., Lin, K., Wang, Z., & Cui, C. (2022). Antibiotic residue and toxicity assessment of wastewater during the pharmaceutical production processes. *Chemosphere*, 291(November 2021).  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132837>
- Zhang, C. M., Xu, L. M., Mou, X., Xu, H., Liu, J., Miao, Y. H., Wang, X. C., & Li, X. (2019). Characterization and evolution of antibiotic resistance of *Salmonella* in municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 251(May), 109547. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109547>



- Zhang, R., Zhang, G., Zheng, Q., Tang, J., Chen, Y., Xu, W., Zou, Y., & Chen, X. (2012). Occurrence and risks of antibiotics in the Laizhou Bay, China: Impacts of river discharge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.002>
- Zhao, S., Liu, X., Cheng, D., Liu, G., Liang, B., Cui, B., & Bai, J. (2016). Temporal–spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta, China. *Science of the Total Environment*, 569–570, 1350–1358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.216>
- Zirena, F., Cahui, N., Tejedo, J. R., Alejandro, W., Nely, C., Quiróz, C., & Luiz, V. (2021). Occurrence of residues of veterinary antibiotics in water, sediment and trout tissue (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern area of Lake Titicaca , Peru. *Journal of Great Lakes Research*, 47, 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.04.012>



## ANEXOS

## ANEXO 1

a) Muestreo de aguas residuales y b) Rotulado de las muestras de agua en la planta de tratamiento de la ciudad de Cusco.



## ANEXO 2

a) Rotulado de las muestras para su adecuada identificación. b) Muestra rotulada



### ANEXO 3

Preparación de las muestras para su traslado al laboratorio para su posterior análisis.



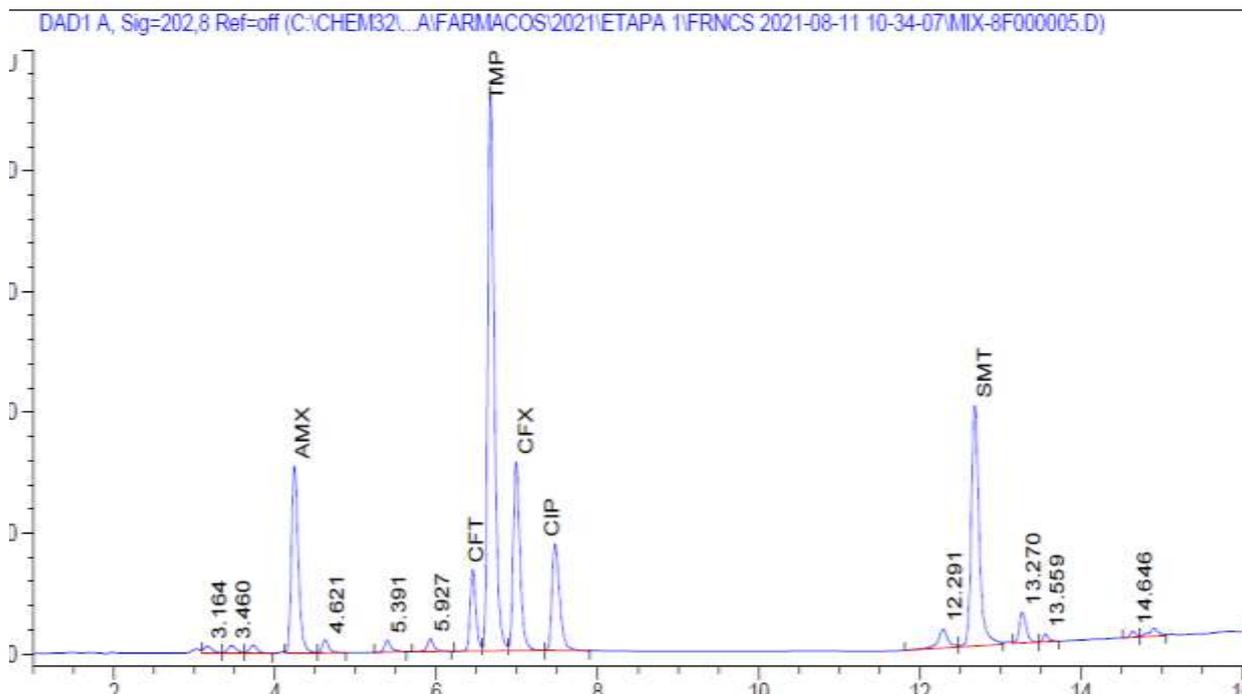
## ANEXO 4

a) Análisis de muestras en el laboratorio de la UNSAAC de Cusco. b) Depósito de las muestras en los viales, previo al análisis.



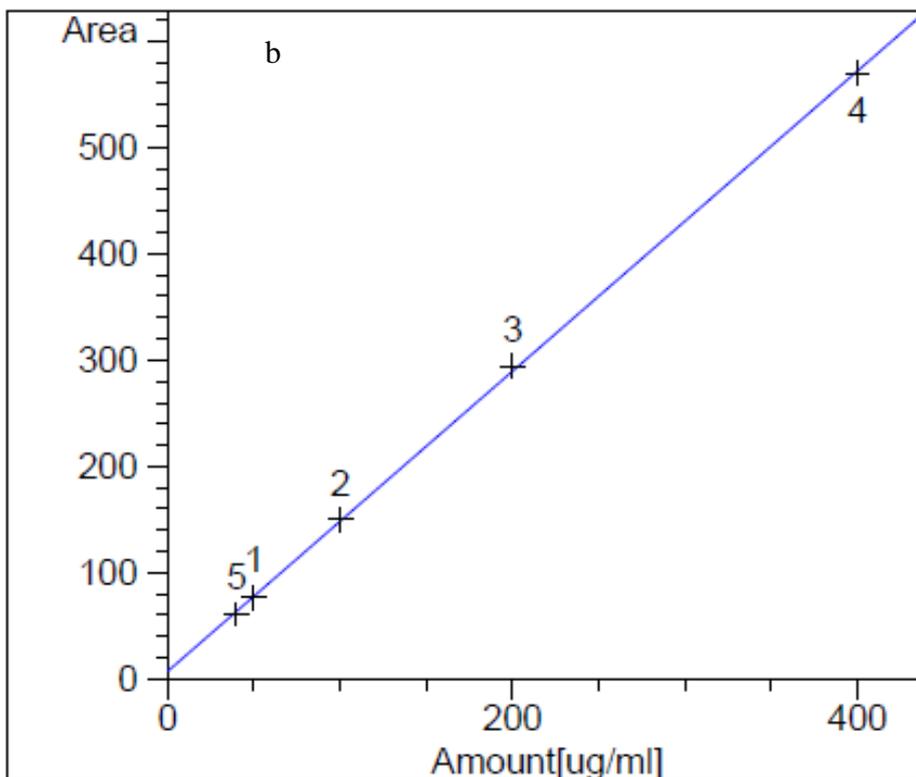
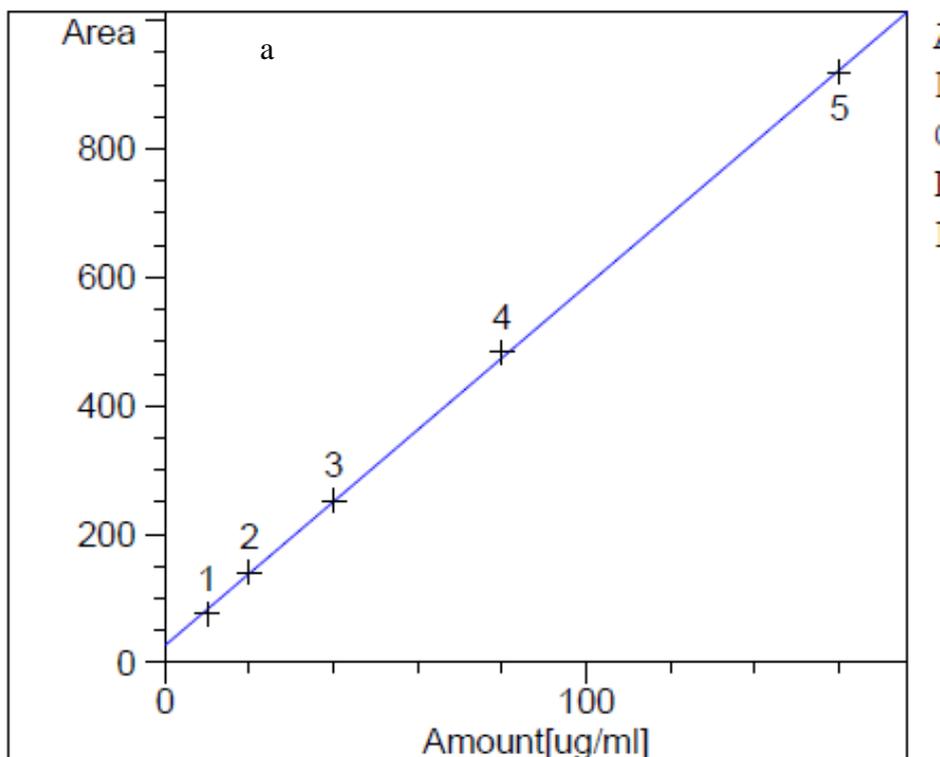
## ANEXO 5.

### Picos cromatográficos de los antibióticos analizados



### ANEXO 6

a) Curva de calibración para amoxicilina y b) lincomicina.



## ANEXO 7

Analizando las muestras en el cromatógrafo.



## ANEXO 8

Parámetros fisicoquímicos medidos en el afluente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.

Parámetro	Método de ensayo	Afluente		Efluente		Unid.
		28 abril 21	05 julio 2021	28 abril 21	05 julio 2021	
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	SMEWW-APHA-AWWA WEF-5210 B-23°ed-2017	500	574.5	41	34.6	mg/L
Coliformes termo-tolerantes	SMEWW-APHA-AWWA WEF-9221 B-23°ed-2017	1.3*10 <sup>7</sup>	5.8*10 <sup>7</sup>	5.4*10 <sup>3</sup>	8.65*10 <sup>2</sup>	mg/L
pH	Medición directa con equipo	8.44	8.3	8.04	7.8	
Temperatura	Medición directa con equipo	18.3	15.5	18.7	15.5	°C
Conductividad	Medición directa con equipo	1749	1693.6	1587	1632.3	uS/cm
Sólidos totales	SMEWW-APHA-AWWA WEF-2540 B-23°ed-2017	1476	1461	908	885	mg/L
Nitritos	HACH	0.010	0.038	0.226	0.231	mg/L
Nitratos	HACH	1.69	2.500	2.21	2.020	mg/L
Turbidez	Medición directa con equipo	487	518.2	31.8	29.5	NTU
Caudales	ESCADA	839.72	670.03	659.29	615.24	L/s

## ANEXO 9

Resultados de residuos de antibióticos en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.



### UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

#### FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA - Pabellón de Control de Calidad.  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto: 973868855

### RESULTADOS

Cusco, 04 de Noviembre del 2021

Solicitantes : Tatiana del Castillo de Loayza  
 Tipo de Análisis : Determinación de Fármacos en aguas residuales  
 Método : Cromatografía Líquida de alta resolución HPLC-DAD  
 Tipo de Muestras : Aguas residuales  
 Cantidad de Muestra : 10 Frascos con a 500 ml de cada uno  
 Almacenamiento : 4 °C.

Afluente		mg/100mL Muestra					
		CFX	AMX	TMP	SMT	DCX	LMC/AMX
AF-01	1	1.81	12.67	0.35	0.35	0.04	3.88
	2	1.80	12.69	0.33	0.39	0.04	4.02
	Prom	1.81	12.68	0.34	0.37	0.04	3.95
AF-02	1	0.58	8.38	0.19	0.00	0.05	2.66
	2	0.58	8.20	0.18	0.01	0.04	2.57
	Prom	0.58	8.29	0.19	0.01	0.04	2.62
AF-03	1	0.70	9.48	0.31	0.02	0.06	3.51
	2	0.67	9.43	0.30	0.02	0.05	3.20
	Prom	0.69	9.46	0.30	0.02	0.05	3.36
AF-04	1	0.41	7.55	0.29	0.09	0.02	3.65
	2	0.41	7.57	0.28	0.09	0.02	3.62
	Prom	0.41	7.56	0.29	0.09	0.02	3.63
AF-05	1	1.72	7.44	0.23	0.18	0.07	4.28
	2	1.68	7.41	0.22	0.16	0.07	4.22
	Prom	1.70	7.42	0.22	0.17	0.07	4.25
AF-06	1	0.75	9.00	0.26	0.14	0.07	6.59
	2	0.71	8.84	0.26	0.13	0.06	6.21
	Prom	0.73	8.92	0.26	0.14	0.06	6.40
AF-07	1	0.66	10.73	0.41	0.14	0.03	2.52
	2	0.64	10.65	0.41	0.14	0.03	2.33
	Prom	0.65	10.69	0.41	0.14	0.03	2.43
AF-08	1	0.16	7.95	0.21	0.13	0.06	2.31
	2	0.64	8.54	0.23	0.10	0.04	2.14
	Prom	0.40	8.25	0.22	0.11	0.05	2.23
AF-09	1	0.57	9.38	0.28	0.08	-0.02	1.99
	2	0.67	9.33	0.27	0.08	-0.02	2.01
	Prom	0.62	9.36	0.27	0.08	-0.02	2.00
AF-10	1	0.35	8.82	0.31	0.07	-0.06	2.83
	2	0.37	8.93	0.31	0.07	0.05	3.40
	Prom	0.36	8.87	0.31	0.07	-0.01	3.11



Quím. Jorge Choquenaira Pari  
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
 Espectrometría - UNSAAC.

## ANEXO 10

Resultados de residuos de antibióticos en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Cusco.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto: 973868855

### RESULTADOS

Efuyente	mg/100mL Muestra			
	CFX	DCX	LMC/AMX	
EF-01	1	0.29	0.26	1.00
	2	0.30	0.26	0.99
	Prom	0.29	0.26	1.00
EF-02	1	0.29	0.26	1.00
	2	0.30	0.26	0.99
	Prom	0.29	0.26	1.00
EF-03	1	0.00	0.10	1.37
	2	0.00	0.09	1.30
	Prom	0.00	0.09	1.33
EF-04	1	0.00	0.19	1.27
	2	0.00	0.19	1.27
	Prom	0.00	0.19	1.27
EF-05	1	0.00	0.20	1.24
	2	0.00	0.20	1.16
	Prom	0.00	0.20	1.20
EF-06	1	0.00	0.13	1.25
	2	0.00	0.13	1.23
	Prom	0.00	0.13	1.24
EF-07	1	0.00	0.30	1.22
	2	0.00	0.29	1.19
	Prom	0.00	0.29	1.21
EF-08	1	0.00	0.10	1.03
	2	0.00	0.10	0.98
	Prom	0.00	0.10	1.00
EF-09	1	0.00	0.15	0.80
	2	0.00	0.15	0.73
	Prom	0.00	0.15	0.77
EF-10	1	0.00	0.12	0.82
	2	0.00	0.11	0.76
	Prom	0.00	0.12	0.79

Nota: La identificación se baso mediante el análisis de los espectros UV de cada pico de la muestra eluido (cromatograma) los cuales fueron comparados mediante el software del sistema con los espectros de 8 estándares, para la cuantificación se uso el área de los picos identificados y la ecuación de la curva de calibración de 8 estándares

Quim. Jorge Choquenaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría – LNSAAC.