

# Efectos de antibióticos en la biomasa, cobertura de área y clorofila de *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*

## Antibiotics Effects on biomass, area coverage and chlorophyll of *Lemna gibba* and *Azolla filiculoides*

Ingrid Maldonado<sup>1\*</sup>, Jesús Miranda-Mamani<sup>2</sup> y Yesica M. Mamani Arpasi<sup>3</sup>

### Resumen

Las concentraciones de residuos de antibióticos en los ecosistemas acuáticos están experimentando un incremento progresivo, lo que está ejerciendo impactos significativos en las especies residentes. Las especies *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* son ampliamente conocidas en estudios de toxicidad, y fitorremediación. Además, se ha observado que estas especies presentan respuestas interesantes frente a la exposición a compuestos antibióticos. En este estudio se evaluó los efectos de azitromicina, ciprofloxacina, amoxicilina, cefalexina, ampicilina y clindamicina (0.00, 2.5, 5, 7.5 mg/L) en la biomasa, Ratio de Crecimiento Relativo (RCR), porcentaje de área y clorofila, durante 7 días. Se recolectaron datos de biomasa para calcular el RCR, y se realizaron capturas de imágenes diarias de cada unidad experimental para estimar el porcentaje de cobertura y las bandas RGB, con el propósito de calcular los niveles de clorofila. Los resultados revelaron efectos de toxicidad de las concentraciones en relación al grupo control, observándose una mayor susceptibilidad en *Azolla* que en *Lemna*. Y en relación al porcentaje del área de cobertura, influenciaron los días de experimentación en *Azolla* (p-valor = <2e-16); mientras que en *Lemna*, influenciaron negativamente tanto la concentración de antibióticos como los días, p-valor = 0.00161 y 2.1e-11 respectivamente. En cuanto a los niveles de clorofila, no se detectaron alteraciones significativas frente a las concentraciones evaluadas. Estos hallazgos evidencian que, a pesar de los efectos adversos de los antibióticos, las especies investigadas aún demuestran capacidad de supervivencia y capacidad de eliminación de los antibióticos.

**Palabras clave:** Área, clorofila, cobertura de área, fitorremediación, toxicidad.

### Abstract

The concentrations of antibiotic residues in aquatic ecosystems are experiencing a progressive increase, which is exerting significant impacts on resident species. The species *Lemna gibba* and *Azolla filiculoides* are widely known in studies of toxicity and phytoremediation. Furthermore, these species have been observed to exhibit interesting responses to exposure to antibiotic compounds. In this study, the effects of azithromycin, ciprofloxacin, amoxicillin, cephalexin, ampicillin, and clindamycin (0.00, 2.5, 5, 7.5 mg/L) on biomass, Relative Growth Rate (RGR), percentage of area, and chlorophyll were evaluated over a period of 7 days. Biomass data were collected to calculate RGR, and daily images of each experimental unit were captured to estimate the percentage of area coverage and RGB bands for chlorophyll calculation purposes. The results revealed toxic effects of the concentrations compared to the control group, with *Azolla* showing greater susceptibility than *Lemna*. Concerning the percentage of area coverage, the experimental days significantly influenced *Azolla* (p-value = <2e-16), while both the antibiotic concentration and the duration of exposure negatively affected *Lemna*, with p-values of 0.00161 and 2.1e-11, respectively. As for chlorophyll levels, no significant alterations were detected in response to the evaluated concentrations. These findings demonstrate that despite the adverse effects of antibiotics, the investigated species still exhibit survival and antibiotic removal capabilities.

**Keywords:** Area, chlorophyll, area cover, phytoremediation, toxicity.

**Recibido:** 06/05/2023

**Aceptado:** 26/10/2023

**Publicado:** 04/11/2023

**Sección:** Artículo original

\*Autor correspondiente: [ingrid.mj5@gmail.com](mailto:ingrid.mj5@gmail.com)

### Introducción

La presencia de fármacos en las masas de agua plantea la necesidad de implementar métodos de remoción, y en este contexto, se ha comprobado que diversas plantas son exitosas en la remediación de compuestos farmacéuticos (Singh et al., 2018). Entre ellas, el helecho de agua (*Azolla filiculoides*) ha demostrado eficiencia en la remoción de sulfonamidas (Forni et al., 2002), y especies de lenteja de agua (*Lemna gibba*) que también han mostrado eficacia en la remoción de fármacos como el ibuprofeno, diclofenaco, paracetamol, carbamazepina, ácido clofibrico, propranolol y hormonas endocrinas disruptoras como el bisfenol A (García-Rodríguez et al., 2015).

Sin embargo, frente a elevadas concentraciones éstas plantas manifiestan algunos síntomas de estrés, como la reducción en la capacidad fotosintética (Hájková et al., 2019) y alteración en los pigmentos (Sree et al., 2015; Singh, Pandey, & Suthar, 2018). Además, estos compuestos pueden ocasionar cambios histo-bioquímicos internos

<sup>1</sup> Escuela de posgrado de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno. Av. Floral 1153, CP 21001. Puno- Perú. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2281-2299>

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Av. Floral N° 1153, Puno, 21001, Perú. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2289-9208>

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Juliaca. Escuela profesional de Ingeniería Ambiental y Forestal. Juliaca, Puno, Perú. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5643-4516>

**Como citar:** Maldonado Jimenez, I., Miranda-Mamani, J., & Mamani Arpasi, Y. M. (2023). Efectos de antibióticos en la biomasa, cobertura de área y clorofila de *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 25(4), 233-240. <https://doi.org/10.18271/ria.2023.532>



que afectan el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Kummerová et al., 2016), lo cual se refleja en la inhibición del crecimiento y el incremento de la biomasa (Hattink & Wolterbeek, 2001).

No obstante, los efectos de estas sustancias en las plantas no se limitan únicamente a nivel interno; también generan cambios morfológicos, como la disminución en el proceso de crecimiento y desarrollo (Singh et al., 2018), así como pequeñas alteraciones en las hojas, cuyas características fenotípicas pueden ser evaluadas mediante imágenes de las plantas afectadas (Minervini et al., 2016). Además, en situaciones de estrés, se observa una reducción en los colores asociados a las bandas RGB (rojo, verde y azul, en inglés), lo cual puede ser percibido y capturado mediante una cámara fotográfica (Li et al., 2020; Zhu et al., 2020).

Por lo tanto, la aplicación del análisis de imágenes puede contribuir al estudio de los efectos del estrés en las plantas. En este estudio, se analizaron los efectos del estrés en *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides* causados por antibióticos ampliamente utilizados en la población, con el objetivo de determinar las concentraciones que estas especies pueden tolerar o que las afectan.

## Materiales y métodos

### Diseño de investigación

Para analizar los efectos del estrés causado por los antibióticos en las plantas *Lemna gibba* y *Azolla filiculoides*, se utilizó un diseño completo aleatorizado de un factor. Se seleccionaron cuatro concentraciones (0, 2.5, 5, 7.5 mg/L) de antibióticos, que incluyeron azitromicina, ciprofloxacina, amoxicilina, cefalexina, ampicilina y clindamicina. Cada concentración se replicó tres veces, lo que resultó en un total de 12 unidades experimentales por especie y un total de 24 unidades experimentales en total. La asignación de las unidades experimentales en el área de estudio se realizó de manera aleatoria (Singh et al., 2018).

### Cultivo y desarrollo de las macrófitas

La especie *Azolla filiculoides* se colectó del riachuelo del centro poblado de Jayllihuaya – Puno, mientras que *Lemna gibba* se colectó en el Malecón ecoturístico de Puno. Ambas especies fueron cultivadas en un sistema hidropónico en el invernadero de la Oficina de Gestión Ambiental de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno durante un período de seis meses para permitir su adaptación a las condiciones de laboratorio (García-Rodríguez et al., 2015). En el caso de *Azolla filiculoides*, se redujo la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, ya que esta especie tiene la capacidad

de fijar su propio nitrógeno a través de la simbiosis que establece con bacterias fijadoras de nitrógeno (Taghianji et al., 2005).

La solución madre de antibióticos se diluyó en agua y se agregó la concentración requerida en cada unidad experimental, mezclándola con el medio de cultivo hidropónico. En cada unidad experimental se añadieron 2 gramos de *Azolla* y *Lemna*, respectivamente (García-Rodríguez et al., 2015). El ensayo se llevó a cabo a una temperatura promedio de 23 °C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La duración total del estudio fue de siete días. Al finalizar este período, se realizaron las mediciones de biomasa húmeda. A partir de estos datos de biomasa, se calculó el ratio de crecimiento relativo (RCR) utilizando la siguiente fórmula:

$$RCR = \frac{(B_{final} - B_{inicial})}{N} \quad (1)$$

Donde:

Donde:  $B_{final}$  es la biomasa final,  $B_{inicial}$  es la biomasa inicial y N es el número de días (7días) (Kadir et al., 2020).

### Análisis de imágenes

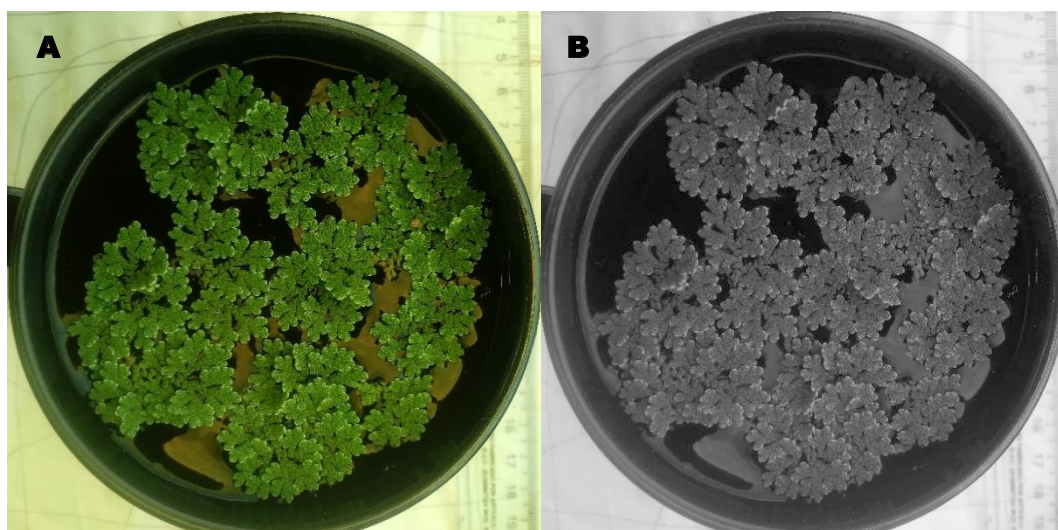
Se tomaron fotografías diarias de cada unidad experimental utilizando una cámara Canon EOS Rebel T100 - 4000D, con el objetivo de evaluar características fenotípicas como la forma, tamaño y color. La captura de imágenes se llevó a cabo durante una semana, bajo condiciones de luz natural y con un fondo negro. Se utilizó una regla milimétrica como referencia para calibrar la escala y tener una referencia del área evaluada.

El análisis de imágenes se llevó a cabo mediante la aplicación de algoritmos (Medina et al., 2010; Minervini et al., 2016), utilizando el software libre ImageJ 1.50b, en un equipo con sistema operativo Windows 10 Home de 64 bits y un procesador Intel(R) Core (TM) i7-7500U CPU @ 2.70GHz 2.90 GHz. Las variables obtenidas durante el análisis incluyeron el área foliar (cm<sup>2</sup>), las bandas RGB y los niveles de clorofila (Riccardi et al., 2014).

Durante el análisis, el área de la planta se determinó mediante la conversión de la imagen en una imagen de 8 bits (Figura 1). Además, las imágenes originales de 24 bits se filtraron en las bandas roja, verde y azul, y se calcularon los valores medios de R, G y B para cada imagen de núcleo. Estos valores se utilizaron para estimar la concentración de clorofila en cada unidad experimental (Ali et al., 2012; Riccardi et al., 2014). La

ecuación utilizada para determinar la concentración de clorofila en las hojas a partir de las imágenes es la

siguiente:  $\text{Clorofila} = (R - B)/(R + B)$ , desarrollada por Kawashima y Nakatani en 1998 (Riccardi et al., 2014).



**Figura 1.** A) Imagen con las bandas RGB y B) Imagen de 8-bit.

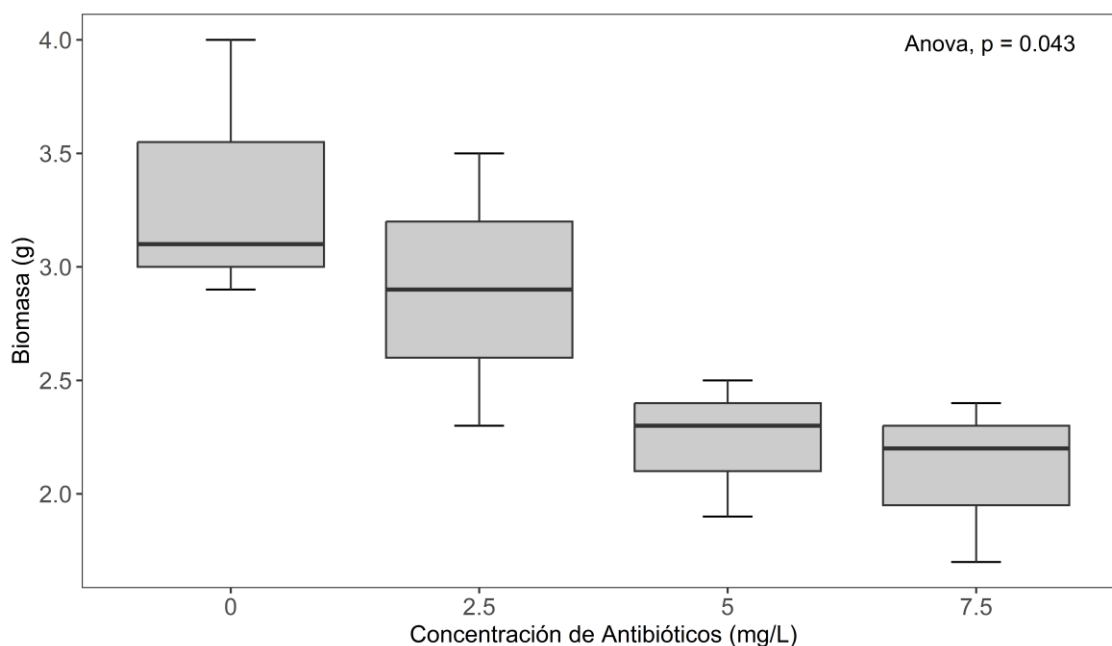
### Análisis estadístico

Para analizar la biomasa en Azolla y Lemna, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía después de verificar los supuestos necesarios. En cuanto al área de cobertura en Azolla y Lemna, se aplicó un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de las concentraciones y los días de estudio. Para analizar el efecto de las concentraciones de antibióticos sobre la clorofila, se utilizó el test de Kruskal-Wallis debido a que no se cumplieron los supuestos requeridos. Todos estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software libre R Studio.

### Resultados

#### Efecto de los antibióticos en la biomasa y el RCR

El análisis de varianza (ANOVA) reveló un efecto significativo de las concentraciones de antibióticos testados en la biomasa de *A. filiculoides* ( $p=0.043 < 0.05$ ) (Figura 2). Se observó una disminución en el porcentaje de biomasa, que varió entre el 13% y el 37%, y aumentó en función de las concentraciones probadas.



**Figura 2.** Diagrama de caja y bigotes de la biomasa de *Azolla* en función de las concentraciones de antibióticos.

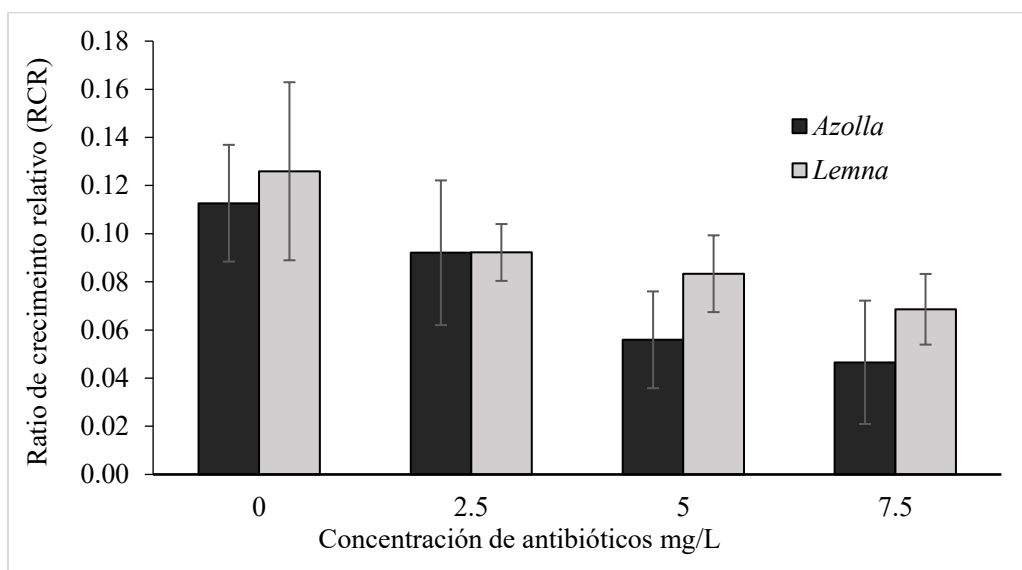
El test de comparación múltiple de Dunnet, muestra que existe diferencia entre el grupo control y la mayor concentración (7.5 mg/L) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resultado del test de Dunnet de la biomasa en las concentraciones de antibióticos en plantas.

Comparaciones	<i>Azolla filiculoides</i>			
	diff	lwr.ci	upr.ci	p-val
2.5-0	-0.433	-1.566	0.699	0.580
5-0	-1.100	-2.232	0.032	0.056
7.5-0	-1.233	-2.366	-0.101	0.034*

Respecto a *L. gibba* el ANOVA indica que la biomasa no es afectada por las concentraciones de antibióticos testeados ( $p=0.065>0.05$ ). No obstante, se observa una leve disminución de la biomasa en función de las concentraciones usadas en el estudio, variando desde 22.5 a 34.2%.

Por otro lado, el RCR muestra un mayor efecto en la inhibición de crecimiento en *Azolla* que en *Lemna*, el cual se acentúa a medida que la concentración del antibiótico se incrementa (Figura 3).



**Figura 3.** Ratio de crecimiento relativo de las plantas en función a las concentraciones testeadas.

### Análisis de imágenes

El análisis de varianza de dos factores reveló que la concentración de antibióticos no tuvo un efecto significativo en el porcentaje del área de cobertura de

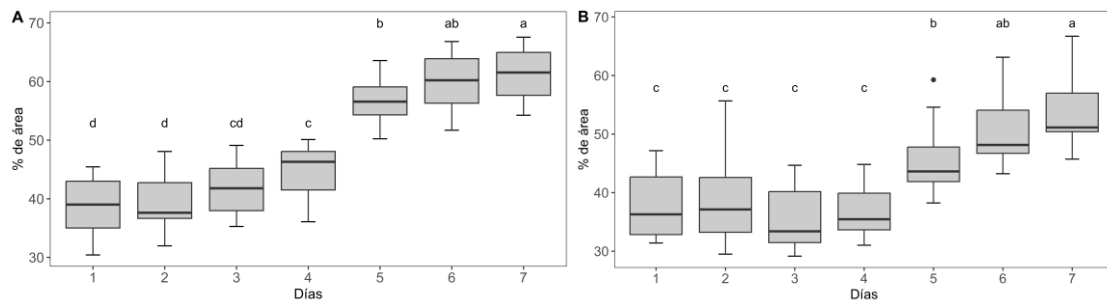
*Azolla* ( $p$ -valor = 0.358), mientras que en *Lemna* sí fue significativo ( $p$ -valor = 0.00161). Por otro lado, se observó que los días de estudio tuvieron una influencia significativa en el porcentaje del área de cobertura en ambas especies (Tabla 2).

**Tabla 2.** ANOVA para analizar la influencia de los antibióticos en la biomasa de las especies de plantas *Azolla* Y *Lemna*.

	Porcentaje del área de cobertura en <i>Azolla</i>				Porcentaje del área de cobertura en <i>Lemna</i>			
	GL	F-valor	P – valor	Sig	GL	F-valor	P valor	Sig
Concentración	3	1.096	0.358		3	5.787	0.00161	**
Día	6	52.210	<2e-16	***	6	17.774	2.1e-11	***
Concentración:Día	18	0.630	0.860		18	0.199	0.99978	
Residuales	56				56			

En cuanto al porcentaje de área de cobertura de *Azolla* y *Lemna*, el análisis de Duncan reveló diferencias significativas entre los días (con letras iguales para medias similares). Estas diferencias se pueden visualizar claramente en los diagramas de caja y bigotes correspondientes a cada día (Figura 4). Además, se

observa que los efectos negativos son más pronunciados en los primeros días, lo que se refleja en una inhibición del crecimiento. Sin embargo, en los días posteriores se observa un incremento en el área de cobertura en ambas especies.



**Figura 4.** Incremento del % de cobertura de área durante los días experimentales (7). A) *Azolla* y B) *Lemna*

Mientras que, en el caso de la clorofila, se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis, cuyo resultado indica que la concentración de antibióticos no existe una influencia significativa sobre este parámetro, con p-valores de 0.8162 y 0.6856 para *Azolla* y *Lemna* respectivamente.

## Discusión

### Efecto de los antibióticos en la biomasa y el RCR

Las concentraciones testeadas mostraron efectos negativos en la biomasa de *Azolla filiculoides* (13-37%), así como el RCR; mientras que, en *Lemna* el impacto es menor (22.5-34.2%). Esta alteración se incrementa en función de la concentración de antibióticos en el medio de cultivo. Del mismo modo Singh et al. (2018) realizaron un estudio con una especie *Spirodela polyrhiza*, en el que analizaron los efectos de 4 concentraciones de amoxicilina (0.0001, 0.01, 0.1 y 1 mg/L), y hallaron que la amoxicilina tuvo efectos tóxicos a mayores concentraciones, influenciando principalmente en la disminución de la biomasa. Asimismo, en otro estudio con *Lemna minuta* en el que se expuso a ofloxacino en concentraciones de un rango de 0.01–1.0 mg/L causó

la disminución de la biomasa entre un 4.8 y 41.3%, y en relación a la RCR los resultados son similares, observándose una disminución en comparación al grupo control.

Sin embargo, según Bianchi et al. (2020), se encontró que concentraciones bajas (1 µg/L) de un antibiótico tuvo efectos positivos en la biomasa de *Lemna*, incluso incrementando la biomasa, y que en *Azolla* tampoco tuvo efectos significativos tanto en la biomasa como en el RCR. Esta diferencia podría atribuirse a la tolerancia de la especie a valores bajos de antibióticos, y como mecanismo de respuesta al estrés, la planta incrementa su biomasa y RCR. Por otro lado, concentraciones más altas, como las utilizadas en este estudio, tienen efectos más pronunciados, lo cual es respaldado por otros estudios (Baciak et al., 2016; Drobniewska et al., 2017; Hájková et al., 2019; Hu et al., 2019; Iatrou et al., 2017; Pomati et al., 2004; Singh et al., 2018) (Tabla 3). Por lo tanto, las concentraciones evaluadas en este estudio tienen un impacto en la disminución de la biomasa, pero no causan efectos perjudiciales en la planta.

**Tabla 3.** Efecto de antibióticos en la biomasa de las plantas

Compuesto	Concentración	Especie	Efecto en biomasa	Autor
Eritromicina	1 mg/L	<i>Lemna minor</i>	Disminución de la biomasa en 20%	(Pomati et al., 2004)
Levofloxacino	1 µg/L	<i>Lemna minor</i> y <i>Azolla filiculoides</i>	Incremento de la biomasa en 20%	(Bianchi et al., 2020)
Oxitetraciclina	3,6,9,10,12,15, 50 y 100 mg/L	<i>Lemna minor</i>	Disminución de la biomasa en función del incremento de la concentración	(Pro et al., 2003)
Sulfametoxazol	500 µg/L	<i>Lemna minor</i>	Disminución de la biomasa	(Grenni et al., 2019)
Amoxicilina, enrofloxacina y oxitetraciclina	2 µg/L, 2 µg/L, 1 µg/L	<i>Lemna minor</i>	Disminución de la biomasa	
Levofloxacina y sulfametoxazol	7, 14, 21, 28, 35	<i>Lemna gibba</i>	Disminución de la biomasa	(Brain, Johnson, Richards, Hanson, et al., 2004)
Lomefloxacina, sulfametoxazol, y clortetraciclina	38 µg/L, 37 µg/L, 114 µg/L	<i>Lemna gibba</i>	Disminución de la biomasa	(Brain, Johnson, Richards, Sanderson, et al., 2004)

La especie más afectada en este estudio fue *Azolla filiculoides*, lo cual es comprensible debido a su simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Anabaena* y *Arthobacter* (Carrapico, 2014; Forni et al., 2002; Taghi ganji et al., 2005), las cuales le confieren capacidad de tolerancia y eliminación de compuestos tóxicos (Bianchi et al., 2020; Forni et al., 2002). Sin embargo, a concentraciones elevadas de antibióticos, *Azolla* se ve directamente afectada, lo que también repercute en la inhibición del aumento de su biomasa. De manera similar, en un estudio en el que se probaron elevadas concentraciones de sulfadimetoxina (50, 150, 300 y 450 mg/L), este antibiótico afectó la tasa de crecimiento (como rendimiento de biomasa por semana), la fijación de N<sub>2</sub> y la frecuencia de heterocistos. A pesar de esto, las plantas fueron capaces de sobrevivir y seguir eliminando el antibiótico, aunque en menor proporción (Forni et al., 2002). En un estudio adicional donde se expuso a *Azolla* a Ciprofloxacino, se observó que este antibiótico tuvo un impacto negativo en la fotosíntesis y la actividad de la nitrogenasa, además de alterar el perfil aminoacídico de la planta, lo que resultó en una disminución del contenido de nitrógeno celular (Gomes et al., 2018).

### Área por concentración y día

En relación al porcentaje del área de cobertura de *Azolla* y *Lemna*, se observaron diferencias significativas a lo largo de los días del experimento. Esto indica que los efectos de inhibición y disminución del área de crecimiento son más pronunciados en los primeros días. Sin embargo, a medida que las especies se adaptan fisiológicamente, se observa un aumento en el área de cobertura, lo que demuestra la capacidad de tolerancia de estas especies a los antibióticos.

Además, otro estudio encontró que, durante los primeros días, tanto *Lemna* como *Azolla* absorbieron una mayor cantidad de antibióticos a través de su estructura, para luego estabilizarse. Este proceso tiene un impacto directo en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Bianchi et al., 2020). Adicionalmente, se realizó otro estudio en el que se expuso a *Azolla* a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 mg/L) de un fármaco llamado diclofenaco. Los resultados revelaron que esta especie no solo fue afectada por las concentraciones más altas del fármaco, sino también por el tiempo de exposición. Esto indica que tanto la concentración como la duración de la exposición son factores importantes que influyen en los efectos negativos observados en *Azolla* (Vannini et al., 2018). Sin embargo, en ambos estudios se observó que las especies evaluadas, tanto *Azolla* como *Lemna*, fueron capaces de sobrevivir y eliminar los compuestos del medio, especialmente en el caso de bajas concentraciones de los fármacos estudiados (Bianchi et

al., 2020; Lu & Lu, 2019). Por lo que, su capacidad de supervivencia y capacidad de eliminar los contaminantes las convierten en candidatas potenciales para su uso en aplicaciones de fitorremediación de aguas contaminadas con residuos de antibióticos.

### Clorofila por imágenes

Los resultados del análisis de imágenes revelaron que las concentraciones de antibióticos no tuvieron un impacto significativo en la concentración de clorofila. Esto concuerda con otro estudio que examinó los efectos del fármaco acetaminofeno en diversas concentraciones (22.5, 45.0 y 90.0 mg/L) y tampoco encontró influencia en la concentración de clorofila (Nunes et al., 2014). Aunque, otros estudios indican que los antibióticos ejercen una influencia negativa en la concentración de clorofila (Gomes et al., 2017; Hu et al., 2019; Singh et al., 2018; Sree et al., 2015). Además, es importante considerar que estos resultados pueden estar influenciados por el proceso de obtención de datos en sí. En el caso de estas macrófitas flotantes, como *Azolla* y *Lemna*, puede ocurrir el solapamiento de las hojas, lo que dificulta la captura de imágenes de todas las hojas presentes. Por lo tanto, es crucial realizar un análisis cuidadoso de la expansión del área y el cálculo de la concentración de clorofila para garantizar resultados precisos (Costa et al., 2019).

### Conclusión

Las concentraciones de antibióticos afectan negativamente a la biomasa y al ratio de crecimiento, siendo en mayor proporción en *Azolla* que en *Lemna*. Adicionalmente, el porcentaje de área de la cobertura de *Azolla* y *Lemna*, muestran que el efecto negativo es más acentuado en los primeros días que en los últimos, lo que demuestra que después de un periodo de adaptación, estas plantas continúan desarrollándose. Respecto a clorofila, en este estudio no se demostró efectos sobre la clorofila de *Azolla* y *Lemna*. Lo que demuestra que, estas especies son capaces de tolerar y sobrevivir a estos contaminantes, siendo candidatas adecuadas para procesos de fitorremediación.

### Referencias

- Ali, M. M., Al-ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. Y. (2012). A New Image Processing Based Technique to Determine Chlorophyll in Plants. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12(10), 1323-1328. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2012.12.10.1917>
- Baciak, M., Sikorski, Ł., Piotrowicz-Cieślak, A. I., & Adomas, B. (2016). Content of biogenic amines

- in *Lemna minor* (common duckweed) growing in medium contaminated with tetracycline. *Aquatic Toxicology*, 180, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.007>
- Bianchi, E., Biancalani, A., Berardi, C., Antal, A., Fibbi, D., Coppi, A., Lastrucci, L., Bussotti, N., Colzi, I., Renai, L., Scordo, C., Del Bubba, M., & Gonnelli, C. (2020). Improving the efficiency of wastewater treatment plants: Bio-removal of heavy-metals and pharmaceuticals by *Azolla filiculoides* and *Lemna minuta*. *Science of the Total Environment*, 746, 141219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141219>
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Hanson, M. L., Sanderson, H., Lam, M. W., Young, C., Mabury, S. A., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2004). Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*, 70(1), 23-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.011>
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 371-382. <https://doi.org/10.1897/02-576>
- Carrapico, F. (2014). *Azolla* as a Superorganism. Its Implication in Symbiotic Studies. En *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology* (pp. 225-241). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9449-0>
- Costa, C. S., Tetila, E. C., Astolfi, G., Sant'Ana, D. A., Brito Pache, M. C., Gonçalves, A. B., Garcia Zanoni, V. A., Picoli Nucci, H. H., Diemer, O., & Pistori, H. (2019). A computer vision system for oocyte counting using images captured by smartphone. *Aquacultural Engineering*, 87(September). <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102017>
- Drobniewska, A., Wójcik, D., Kapłan, M., Adomas, B., Piotrowicz-Cieślak, A., & Nałęcz-Jawecki, G. (2017). Recovery of *Lemna minor* after exposure to sulfadimethoxine irradiated and non-irradiated in a solar simulator. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 27642-27652. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7174-3>
- Forni, C., Cascone, A., Fiori, M., & Migliore, L. (2002). Sulphadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: A model for drug remediation. *Water Research*, 36(13), 3398-3403. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00015-5)
- Garcia-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., & Salvadó, V. (2015). The influence of *Lemna* sp. and *Spirogyra* sp. on the removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in treated wastewaters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), 2327-2338. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0632-x>
- Gomes, M. P., de Brito, J. C. M., Carvalho Carneiro, M. M. L., Ribeiro da Cunha, M. R., Garcia, Q. S., & Figueredo, C. C. (2018). Responses of the nitrogen-fixing aquatic fern *Azolla* to water contaminated with ciprofloxacin: Impacts on biofertilization. *Environmental Pollution*, 232, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.054>
- Gomes, M. P., Gonçalves, C. A., de Brito, J. C. M., Souza, A. M., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Figueredo, C. C., & Garcia, Q. S. (2017). Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. *Journal of Hazardous Materials*, 328, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.005>
- Grenni, P., Patrolecco, L., Rauseo, J., Spataro, F., Di Lenola, M., Aimola, G., Zacchini, M., Pietrini, F., Di Baccio, D., Stanton, I. C., Gaze, W. H., & Barra Caracciolo, A. (2019). Sulfamethoxazole persistence in a river water ecosystem and its effects on the natural microbial community and *Lemna minor* plant. *Microchemical Journal*, 149, 103999. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103999>
- Hájková, M., Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., & Váczi, P. (2019). Diclofenac as an environmental threat: Impact on the photosynthetic processes of *Lemna minor* chloroplasts. *Chemosphere*, 224, 892-899. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.197>
- Hattink, J., & Wolterbeek, H. T. (2001). Accumulation of <sup>99</sup>Tc in duckweed *Lemna minor* L. as a function of growth rate and <sup>99</sup>Tc concentration. *Journal of Environmental Radioactivity*, 57(2), 117-138. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(01\)00015-7](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(01)00015-7)
- Hu, H., Zhou, Q., Li, X., Lou, W., Du, C., Teng, Q., Zhang, D., Liu, H., Zhong, Y., & Yang, C. (2019). Phytoremediation of anaerobically digested swine wastewater contaminated by oxytetracycline via *Lemna aequinoctialis*: Nutrient removal, growth characteristics and degradation pathways.

- Bioresource Technology*, 291, 121853. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121853>
- Iatrou, E., Gatidou, G., Damalas, D., Thomaidis, N., & Stasinakis, A. (2017). Fate of antimicrobials in duckweed *Lemna minor* wastewater treatment systems. *Journal of Hazardous Materials*, 330, 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.005>
- Kadir, A. A., Abdullah, S. R. S., Othman, B. A., Hasan, H. A., Othman, A. R., Imron, M. F., Ismail, N., Izzati, & Kurniawan, S. B. (2020). Dual function of *Lemna minor* and *Azolla pinnata* as phytoremediator for Palm Oil Mill Effluent and as feedstock. *Chemosphere*, 259, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127468>
- Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., & Triska, J. (2016). Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. *Journal of Hazardous Materials*, 302, 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.057>
- Li, D., Li, C., Yao, Y., Li, M., & Liu, L. (2020). Modern imaging techniques in plant nutrition analysis: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 174, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105459>
- Lu, X. M., & Lu, P. Z. (2019). Distribution of antibiotic resistance genes in soil amended using *Azolla imbricata* and its driving mechanisms. *Science of the Total Environment*, 692, 422-431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.285>
- Medina, W., Skurtys, O., & Aguilera, J. M. (2010). Study on image analysis application for identification Quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) geographical provenance. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.010>
- Minervini, M., Fischbach, A., Scharr, H., & Tsafaris, S. A. (2016). Finely-grained annotated datasets for image-based plant phenotyping. *Pattern Recognition Letters*, 81, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2015.10.013>
- Nunes, B., Pinto, G., Martins, L., Gonçalves, F., & Antunes, S. C. (2014). Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3059-5>
- Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D., & Neilan, B. A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, 67(4), 387-396. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.02.001>
- Pro, J., Ortiz, J. A., Boleas, S., Fernández, C., Carbonell, G., & Tarazona, J. V. (2003). Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(2), 290-295. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0208-1>
- Riccardi, M., Mele, G., Pulvento, C., Lavini, A., D'Andria, R., & Jacobsen, S. E. (2014). Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. *Photosynthesis Research*, 120(3), 263-272. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9970-2>
- Singh, V., Pandey, B., & Suthar, S. (2018). Phytotoxicity of amoxicillin to the duckweed *Spirodela polyrrhiza*: Growth, oxidative stress, biochemical traits and antibiotic degradation. *Chemosphere*, 201, 492-502. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.010>
- Sree, K. S., Keresztes, Á., Mueller-Roeber, B., Brandt, R., Eberius, M., Fischer, W., & Appenroth, K. J. (2015). Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor* – Morphology, ion uptake, and starch accumulation. *Chemosphere*, 131, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.008>
- Taghi ganji, M., Khosravi, M., & Rakhshae, R. (2005). Biosorption of Pb, Cd, Cu and Zn from the wastewater by treated *Azolla filiculoides* with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 1(4), 265-271. <https://doi.org/10.1007/bf03325841>
- Vannini, A., Paoli, L., Vichi, M., Bačkor, M., Bačkorová, M., & Loppi, S. (2018). Toxicity of Diclofenac in the Fern *Azolla filiculoides* and the Lichen *Xanthoria parietina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(3), 430-437. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2266-4>
- Zhu, W., Sun, Z., Yang, T., Li, J., Peng, J., & Zhu, K. (2020). Estimating leaf chlorophyll content of crops via optimal unmanned aerial vehicle hyperspectral data at multi-scales. *Computers and Electronics in agriculture*, 178, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105786>