

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Biorremediación de aguas contaminadas con *Escherichia coli* usando
micofiltros de *Trametes versicolor* y *Ganoderma* sp.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en
Ciencias Biológicas**

DAVID VALENCIA PONCE

Quito, 2017

Certifico que la Disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas del Sr. David Valencia Ponce ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Carlos A. Soria, PhD

Director de la Disertación

Quito, 18 de septiembre de 2017

DEDICATORIA

A todos los que me hacen crecer.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres y a mi hermana por brindarme las herramientas para alcanzar mis metas y ser comprensivos durante el camino; son mi inspiración.

Agradecimientos al Doctor Carlos A. Soria, quien me permitió llevar a cabo este proyecto bajo su dirección y en su laboratorio. A las lectoras Doctora Iliana Alcocer y Doctora María Eugenia Ordoñez y en especial al Ingeniero Julio Sánchez Otero, quienes me aportaron ayuda y materiales esenciales para poder completar este trabajo. De igual manera quiero agradecer a los integrantes del Laboratorio de Bioquímica 112, del Laboratorio de Microbiología y de la Sala de Preparaciones, por ayudarme desinteresadamente a lo largo de este proyecto.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su financiamiento para realizar el proyecto según fondos de investigación N13394 asignados al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.1.	LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA Y SU EFECTO EN LA SALUD HUMANA	3
3.2.	CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR PARTE DE HECES BOVINAS Y HUMANAS.....	4
3.3.	TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS EN EL ECUADOR	5
3.4.	LA MICOFILTRACIÓN.....	5
3.5.	<i>Trametes versicolor</i> Y <i>Ganoderma</i> sp.....	6
3.6.	OBJETIVOS	8
3.6.1.	OBJETIVO GENERAL	8
3.6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1.	ELABORACIÓN DE LOS MICOFILTROS	9
4.1.1	INOCULACIÓN DE HONGOS EN AGAR	9
4.1.2	EXPANSIÓN DEL MICELIO	9
4.1.3	CONSTRUCCIÓN DE LOS MICOFILTROS	10
4.2.	FILTRACIÓN	12
4.3.	CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.....	14
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5.	RESULTADOS.....	17
6.	DISCUSIÓN.....	20
6.1.	DIFERENCIAS ENTRE MICOFILTROS Y TRATAMIENTO CONTROL	20
6.1.1	DIFERENCIA EN LA DENSIDAD DEL MEDIO.....	21
6.1.2	PRESENCIA DE NUTRIENTES DENTRO DE LOS FILTROS	21
6.1.3	PREDACIÓN DE BACTERIAS POR PARTE DE MICELIO.....	23

6.1.4	SECRECIÓN DE COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS POR PARTE DEL MICELIO	24
6.2.	DIFERENCIAS ENTRE MICOFILTROS <i>Trametes versicolor</i> Y MICOFILTROS <i>Ganoderma</i> sp.	24
6.3.	COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS DE MICOFILTRACIÓN	28
6.3.1.	DIFERENCIAS METODOLÓGICAS	28
6.3.2.	TIEMPO DE CONTACTO Y VALOR Cf/Vf.....	28
6.3.3.	CORRELACIÓN ENTRE TIEMPO DE FILTRACIÓN Y EFECTIVIDAD DE MICOFILTROS	30
6.3.4.	COMPARACIÓN ENTRE MICOFILTROS <i>Trametes versicolor</i> Y MICOFILTROS PROCEDENTES DE OTROS ESTUDIOS	32
6.4.	MICOFILTRACIÓN Y MICORREMEDIACIÓN	34
6.4.1.	LA CÉLULA DE BIORETENCIÓN DE THOMAS ET AL. (2009).....	34
6.4.2.	EVALUACIÓN DE LA POSIBILIDAD DE MICOFILTROS CON MÚLTIPLES HONGOS	35
6.4.3.	POTABILIZACIÓN Y OTROS USOS DE LA MICOFILTRACIÓN	36
7.	CONCLUSIONES	39
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9.	ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Elaboración de un micofiltro.....	10
Figura 2. Crecimiento del micelio en la superficie de un micofiltro de <i>Ganoderma</i> sp.	14
Figura 3. Micofiltro de <i>T. versicolor</i> después de realizar una filtración.	26
Figura 4. Micofiltro de <i>Ganoderma</i> sp. (detalle de la superficie).	27
Figura 5. Concentración de bacterias en una solución de acuerdo a absorbancia para una longitud de onda de 600 nm.	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de Remoción de Unidades Formadoras de Colonias según el tiempo de Filtración y el número de veces que fue usado el filtro.....	17
Tabla 2. ANOVA de resultados de UFC removidas por distintos tratamientos.....	18
Tabla 3. Prueba de Tukey comparando resultados de UFC removidas por distintos tratamientos	19
Tabla 4. Porcentaje de Remoción de Unidades formadoras de Colonias según el tiempo de Filtración y el Número de veces que fue usado el filtro, Tratamiento control con Yeso.	46
Tabla 5. Concentración de bacterias y absorbancia de una solución según el estándar de McFarland.....	48
Tabla 6. Promedio de porcentaje de remoción de UFC y valores Cf/Vf de varios estudios sobre micofiltración.....	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. El tratamiento control con yeso	46
Anexo 2. Elaboración de las soluciones de 3,5 L con concentración de 100000 UFC/mL	48
Anexo 3. Tabla 6. Promedio de porcentaje de remoción de UFC y valores Cf/Vf de varios estudios sobre microfiltración.....	50

1. RESUMEN

La mayoría de aguas residuales urbanas en el Ecuador no reciben tratamiento antes de ser desechadas a los ríos. Por esto, se han considerado varios ríos como no aptos para diversas actividades humanas. La micofiltración consiste en usar micelio como la membrana de un filtro para retirar contaminantes del agua. Entre estos contaminantes se incluyen bacterias coliformes fecales y nutrientes. El objetivo de este estudio fue observar si micofiltros inoculados con *Trametes versicolor* y *Ganoderma* sp. tienen potencial para remover coliformes fecales del agua. Para crear los micofiltros, se inoculó un medio de aserrín y viruta nutritivo con micelio dentro de tubos de policloruro de vinilo (PVC). La filtración se realizó al percolar una solución salina que fue inoculada con *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en una concentración de 100000 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias/mL) a través de los filtros. Además, se midió el tiempo de duración de cada filtración para comprobar la posible presencia de una correlación entre el tiempo de filtración y la efectividad del filtro. Se obtuvo un promedio de remoción de coliformes fecales de 1,36% para el tratamiento control; 9,19% para el tratamiento *Ganoderma* sp. y de 30,87% para el tratamiento *T. versicolor*. El análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,017$) entre el tratamiento control y el tratamiento *T. versicolor*. El análisis de correlación de Spearman demostró que existe una correlación positiva débil ($R=0,496$) pero estadísticamente significativa ($p=0,012$) entre el tiempo de las filtraciones y la cantidad de coliformes fecales que fueron eliminadas. Se concluye que el diseño de los micofiltros, en conjunto con las cepas de micelio con los que se inoculó, es efectivo en la remoción de coliformes fecales suspendidas en el agua, sobre todo cuando se inoculó al micofiltro con *T. versicolor*. Además, parece existir una correlación positiva entre el tiempo de contacto, aquí representado como el tiempo de filtración, y la efectividad de los filtros.

Palabras clave:

Biorremediación, Coliformes fecales, *Ganoderma* sp., Micofiltración, *Trametes versicolor*.

2. ABSTRACT

In Ecuador, most urban wastewater is discharged into rivers without receiving any treatment. Because of this, some rivers in this country have been ranked as nonapt for multiple human activities. Mycofiltration consists in using mycelium as the filtrating membrane to remove water pollutants. Among the pollutants that are removed by mycofiltration are fecal coliform bacteria and nutrients. The objective of this study is to see if mycofilters inoculated with *Trametes versicolor* and *Ganoderma* sp. have potential in removing fecal coliform bacteria from water. To create the mycofilters, a nutritive sawdust and woodchip media was inoculated with mycelium inside polyvinyl chloride (PVC) tubes. The filtration was made by percolating a saline solution that was previously inoculated with *Escherichia coli* strain ATCC 25922 in a 100000 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) concentration through the filters. Besides, the filtration time was registered to test the possible correlation between filtration time and the filter's effectiveness. The control group got a mean removal of fecal coliforms of 1,36%; the *Ganoderma* sp. filters got a mean removal of 9,19%; and with *T. versicolor* treatment got a mean removal of 30,87%. Statistical analysis showed statistical significance ($p=0,017$) between the control treatment and the *T. versicolor* treatment. A Spearman correlation test showed a weak positive ($R=0,496$) but statistically significant ($p=0,012$) correlation between filtration time and the effectiveness in removing fecal coliforms. It is concluded that the mycofilter design, in conjunction with the mycelium strains that it contained, is effective in suspended fecal coliform removal, especially when the *T. versicolor* mycelium was present. There also seem to be a positive correlation between contact time, here represented by filtration time, and the effectiveness of filters.

Keywords:

Bioremediation, Fecal coliform, *Ganoderma* sp., Mycofiltration, *Trametes versicolor*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA Y SU EFECTO EN LA SALUD HUMANA

La contaminación se define como la introducción de un compuesto dañino al ambiente por parte del ser humano (van der Perk, 2013). La cantidad de contaminación ambiental ha ido creciendo a la par que la población humana durante las últimas décadas (van der Perk, 2013). A nivel mundial, la contaminación ha generado daños en la naturaleza, al cambiar la composición de varios ecosistemas incluyendo cuerpos de agua dulce y salada. La contaminación afecta, directa o indirectamente, a prácticamente todos los seres vivos de dichos ecosistemas. El ser humano no es una excepción pues la contaminación que puede también generar daños a múltiples poblaciones en todo el mundo, influyendo negativamente en su salud y causando a veces hasta la muerte (van der Perk, 2013). La lista de contaminantes que se desechan al agua es amplia y comprende a pesticidas, fertilizantes, nutrientes (van der Perk, 2013) así como desperdicios de origen animal, desperdicios de tanques sépticos, sales, virus y bacterias (Mcnabb y Keeley, 1977).

En el agua contaminada con heces puede vivir una multitud de microorganismos. Entre estos encontramos a virus, bacterias, parásitos y protozoos (Gómez, 2002). Estos pueden ser patógenos para el ser humano y causar una variedad de enfermedades como el cólera, la diarrea (Gómez, 2002) o la poliomielitis (Manahan, 2006). El potencial de contaminación de estos microorganismos es proporcional a su capacidad de sobrevivir el mayor tiempo posible en el agua y así permanecer activos un lapso más amplio, permitiéndoles atravesar mayores distancias para llegar a sus potenciales hospederos (Mcnabb y Keeley, 1977). Sin embargo, la sobrevivencia de estos organismos está influenciada por varios factores como el pH del medio, la temperatura del agua, la presencia de predadores o de antibióticos (Mcnabb y Keeley, 1977) detergentes u otros químicos que están presentes en el ambiente de manera natural.

Las enfermedades causadas por ingerir agua contaminada han sido causa de la muerte de millones de personas a lo largo de la historia, y aunque el problema ha sido controlado en países desarrollados, se siguen presentando hasta la actualidad casos aislados y epidemias ocasionales de varias enfermedades transmitidas por el agua (Manahan, 2006).

Sin embargo, estas enfermedades siguen siendo relevantes en los países en vías de desarrollo, en especial en las naciones bajo el nivel de pobreza extrema de la ONU (Faruque, 2012).

3.2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR PARTE DE HECES BOVINAS Y HUMANAS

Las heces de bovinos son una parte importante en el problema que es la contaminación del agua. El estiércol contiene diversos contaminantes que comprenden nutrientes, sales, materia orgánica y microorganismos entre los que se incluyen patógenos como bacterias, hongos, virus, nemátodos, protozoos y parásitos (Spellman y Whiting, 2007).

En 2016, la industria ganadera del Ecuador contaba con 4,12 millones de cabezas de ganado vacuno, 1,14 millones de cerdos y 50,19 millones de aves (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2016). Un vacuno produce entre 0,82 y 1 pie cúbico de estiércol al día (Herring, 2014). Se ha estimado que cada pie cúbico de estiércol vacuno contiene $3,2 \times 10^{11}$ coliformes totales de los cuales $1,4 \times 10^{11}$ son coliformes fecales (Spellman y Whiting, 2007). Con estos valores se calcula aproximadamente 6×10^{17} coliformes fecales liberadas al ambiente cada día, solo contando el ganado vacuno.

Las heces de los seres humanos pueden también ser vehículos de microorganismos patógenos. En la actualidad, la mayoría de desperdicios humanos son evacuados de las ciudades a través del alcantarillado, que típicamente terminan en los ríos. De esta manera las heces humanas llegan a otros cuerpos de agua dulce y son también responsables de la propagación de enfermedades. En pruebas conducidas en Estados Unidos y Canadá se ha encontrado que en aguas de desecho urbano, hay presencia de una variedad de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhosa*, entre otras (Pitt, Clark y Parmer, 1994). En Ecuador también se han encontrado coliformes totales y fecales posiblemente patógenas en las descargas de aguas residuales de centro urbanos (Reinoso, 2015).

3.3. TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS EN EL ECUADOR

En el Ecuador, la mayoría de las ciudades desechan sus aguas residuales en ríos y corrientes menores de agua sin ningún tipo de tratamiento (Reinoso, 2015). Por ejemplo, la ciudad de Quito arroja el 76% de sus aguas residuales al río Machángara, y el 24% restante a otros ríos como el río Monjas, el río San Pedro y el río Guayllabamba (Reinoso, 2015). Por esta extensa contaminación con residuos humanos, el agua del Machángara ha sido clasificada como no apta para todo tipo de uso de estas aguas con la excepción del uso para generación hidroeléctrica y de asimilación de desechos (Peñañiel, 2012) debido al riesgo de condiciones extremas de pH y temperatura y presencia de una gran variedad de contaminantes como sulfatos, detergentes, sedimentos, grasas, metales pesados, biocidas, tensoactivos, hidrocarburos, halogenados, ácidos orgánicos, fenoles entre otros (Reinoso, 2015). Sin embargo, a pesar de este alarmante diagnóstico y de haber sido clasificada como no apta para varios usos, se han otorgado concesiones que permiten el uso de aguas provenientes de ríos como el Machángara, Guayllabamba, Monjas y San Pedro con propósitos de riego, abrevadero, uso doméstico, empleo para agua potable, explotación piscícola, entre otros (Reinoso, 2015).

Para enfrentar el problema de la contaminación del agua dulce con desechos orgánicos, sean estos de origen humano, vacuno u otros, existen varias alternativas que van desde la prevención de vertimiento de desechos al agua hasta el de la remediación de aguas contaminadas. En esta investigación se analizará la utilización del micelio de hongos como factores descontaminantes, también llamada micofiltración o micorremediación.

3.4. LA MICOFILTRACIÓN

Los hongos pertenecen al reino Fungi y tienen una multitud de funciones en la naturaleza. Se dividen en tres grupos según su ecología: las micorrizas, que tienen relaciones mutualistas con las raíces de plantas; las parasíticas, que viven nutriéndose y perjudicando a hospederos; y las saprófitas, que descomponen la materia orgánica muerta (Stamets, 2011).

La micofiltración es el uso del micelio, la red celular de los hongos, como el elemento principal de un filtro. La idea fue inicialmente concebida por Paul Stamets en la década de 1970 y aplicada de una manera anecdótica, al filtrar agua contaminada por heces de su ganado vacuno a través de una mezcla de viruta con micelio de *Stropharia rugosoannulata* (Stamets, 2005). El propósito original era el de cultivar estos hongos para emplearlos como alimento, sin embargo, Stamets (2005) observó que se había reducido la cantidad de bacterias coliformes fecales del arroyo contaminado, a pesar de que había aumentado la cantidad de ganado en su terreno.

A partir del descubrimiento de Stamets (2005), se han conducido varios estudios para determinar la capacidad de filtrar y purificar el agua utilizando el micelio de varias especies de hongos. El micelio corresponde a la etapa vegetativa del ciclo de vida de los hongos; consiste en una red de células llamadas hifas, que se van expandiendo en el medio en que habitan, que en el caso de hongos saprófitos, puede ser madera en descomposición o en el suelo (Stamets, 2005). Esta red celular se expande mediante el crecimiento de nuevas hifas con varios objetivos, como encontrar recursos para sostenerse y seguir multiplicándose (Stamets, 2005). La micofiltración ha sido usado para filtrar una amplia gama de materiales orgánicos e inorgánicos incluyendo limo (Stamets, 2005), patógenos (Stamets, 2005; Harris, 2012; Rogers, 2012; Flatt, 2013), nitratos, fosfatos, cloruros y sulfatos (Sanyaolu y Alonge, 2014).

En la actualidad, *Pleurotus ostreatus* ha sido la especie más usada para la micofiltración y ha brindado resultados positivos en varias ocasiones (Harris, 2012; Rogers, 2012; Flatt, 2013). Otras especies que han sido probadas para la micofiltración pertenecen a los géneros *Irpex* (Flatt, 2013), *Stropharia* (Flatt, 2013; Taylor et al., 2014) y *Aspergillus* (Sanyaolu y Alonge, 2014).

3.5. *Trametes versicolor* Y *Ganoderma* sp.

Basados en estos reportes, se intentó probar la efectividad de la micofiltración mediante el uso de 2 especies procedentes de géneros que aún no han sido probadas en la micofiltración: *Ganoderma* sp. y *Trametes versicolor*. Este par de hongos pertenecen a Basidiomycota, una división del reino Fungi que se caracteriza por la presencia de basidios,

células maciformes con cuatro puntas en su ápice del cual están unidas las basidioesporas (Petersen, 2013). A su vez, ambas pertenecen a la orden Polyporales dentro de la clase Agaricomycetes a donde pertenecen la mayoría de hongos saprófitos con un cuerpo fructífero en forma de “bracket” o “paréntesis”, también llamados “hongos repisa” (Kendrick, 2017).

Ganoderma es un genero que pertenece a la familia Ganodermatacea, fue descrita por primera vez en 1881 y consiste en más de 300 especies que son mayoritariamente saprófitas, aunque en algunos casos pueden ser parasíticas (Flood, Bridge y Holderness, 2000). Sus cuerpos fructíferos, parte reproductiva del ciclo de vida de los hongos, suelen tener colores pardos y una textura dura (Packer, Wachter-Galor, Ong y Halliwell, 2004). Además, el cuerpo fructífero puede ser dimítico o trimíticos (Flood et al., 2000), lo que significa que tiene 2 o 3 tipos de células: hifas generativas en conjunto con hifas envolventes y, en el caso de las trimíticos, también con hifas esqueléticas (Kendrick, 2017). Están distribuidos en todo el mundo y una gran cantidad de especies han sido usadas en la medicina tradicional por el hombre para tratar todo tipo de enfermedades (Packer et al., 2004)

T. versicolor pertenece a la familia Polyporaceae y se encuentra en bosques templados de todo el mundo (Halpern, 2007). *T. versicolor* también ha sido utilizado en la medicina tradicional para tratar tumores e infecciones (Braun y Cohen, 2015). Es saprófito y su cuerpo fructífero es trimítico y se reconoce por tener anillos concéntricos de distintos colores por lo que se lo conoce en inglés como el hongo “cola de pavo” (Stephenson, 2010). Además el cuerpo fructífero es duro y fibroso por lo es categorizado como no comestible (Stephenson, 2010) por esto, se lo suele secar y moler para hacer infusiones (Braun y Cohen, 2015).

Ganoderma sp. y *T. versicolor* comparten características con géneros usados anteriormente en la micofiltración (*Pleurotus*, *Irpex*, *Stropharia*) en su ecología saprofítica (Stamets, 2005), es decir, consumen madera muerta como principal fuente de alimento. *Ganoderma* sp. y *T. versicolor* son además de pudrición blanca, puesto que consumen la lignina de la madera dejando la celulosa de color blanco como residuo (Stamets, 2005).

3.6. OBJETIVOS

3.6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de micofiltros de *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. en la remoción de la bacteria coliforme fecal *E. coli*.

3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Medir el grado de remoción de *E. coli* a través de filtros control y de micofiltros inoculados con *T. versicolor* y *Ganoderma* sp.

Comparar la eficacia de los distintos micofiltros según la especie de hongo con la que fueron inoculados y colonizados.

Comprobar la posible existencia de correlación entre la velocidad del paso del agua a través de los filtros y su eficacia en la remoción de *E. coli*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ELABORACIÓN DE LOS MICROFILTROS

Los microfiltros que se emplearon en este estudio consistieron de un tubo policlorurovinilo (PVC) lleno de un medio nutritivo a base de aserrín de madera de la especie *Guarea cartaguenya*. Este medio nutritivo fue inoculado con las especies antes mencionadas, *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. Cada microfiltro solo fue inoculado con una especie de hongo. Antes de inocular el medio de aserrín presente en el filtro, el micelio pasó por dos etapas previas, con el propósito de disminuir la posibilidad de contaminación y mantener un crecimiento rápido y vigoroso. Se resume todo este proceso en la Figura 1.

4.1.1 INOCULACIÓN DE HONGOS EN AGAR

Se inocularon de cajas Petri de 100 x 15 mm de agar Difco™ Malt Extract y Extracto de Levadura Difco™ (1 g por cada 500 mL de agar) con el micelio de las especies *T. versicolor* o *Ganoderma* sp. Los micelios provenía a su vez de otras cajas Petri previamente inoculadas o de un stock mantenido a -20 °C o 4 °C. Se dejó crecer al micelio en el agar durante una a dos semanas en la oscuridad a 28 °C.

4.1.2 EXPANSIÓN DEL MICELIO

Luego se inoculó el medio de grano para aumentar la biomasa del micelio y ponerlo en un estado de vigor que le permita colonizar grandes cantidades de medio de una manera rápida (Stamets, 2011). El medio de grano estuvo compuesto por 300 g de avena en cáscara, 280 mL de agua y 4,57 g de yeso, y una proporción de humedad entre en el rango óptimo de 45 a 55% (Stamets, 2011).

El medio de grano fue mezclado en una funda de polyfan especial, línea azul (Indupetra S.A.) y fue puesta a autoclavar durante 90 minutos a 121 °C y 15 psi, para esterilizar su contenido. A continuación, se cortó el micelio de una caja Petri de la primera etapa de crecimiento en cuadrados de 5 mm de lado y se los añadió junto al medio de grano esterilizado en la funda de polyfan. Se agitó la mezcla de grano y micelio para aumentar la

cantidad de superficie de avena expuesta al micelio y así incrementar la velocidad de colonización del micelio. Se dobló sueltamente el extremo de la funda para permitir el paso del aire necesario para el metabolismo del micelio, pero sin dejar una apertura excesiva para evitar contaminaciones provenientes de la atmósfera, y se la incubó a 28 °C en la oscuridad por una a dos semanas.

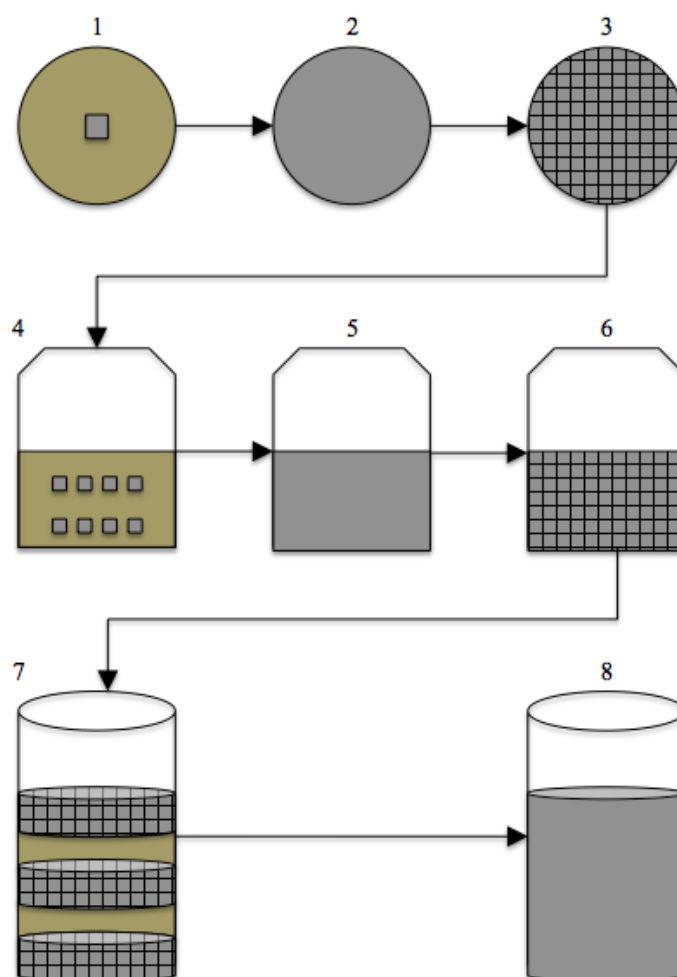


Figura 1: Elaboración de un micofiltro. 1: Inoculación del micelio en agar. 2: Crecimiento del micelio en la placa Petri. 3: Corte del agar con micelio. 4: Inoculación del medio de grano. 5: Crecimiento del micelio en la funda de polyfan. 6: Fracturación del grano inoculado. 7: Construcción del micofiltro. 8: Crecimiento del micelio en el interior del micofiltro.

4.1.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS MICOFILTROS

Para la construcción de los micofiltros se inoculó el medio a base de aserrín dentro del tubo PVC. Para preparar el medio de aserrín se mezcló aserrín, viruta, afrecho de trigo,

yeso y agua en las siguientes proporciones de peso: aserrín (3,5), viruta (6,5), afrecho de trigo (2), yeso (0,7), agua (10). Estos son los materiales presentes en la fórmula del medio “aserrín/afrecho para fructificar” diseñado para el máximo crecimiento de hongos saprófitos (Stamets, 2011). El aserrín y la viruta constituyeron el principal alimento del micelio mientras que los otros elementos sirvieron como suplemento nutricional. Se usó una combinación de aserrín y viruta en proporciones específicas con el objetivo de obtener una estructura óptima del medio, no demasiado compacta para mantener un flujo de aire y no demasiado suelta para que el crecimiento del micelio no se vea interrumpido por espacios vacíos (Stamets, 2011). Este medio fue esterilizado en el autoclave en fundas de polyfan a 121 °C a 15 psi durante 60 minutos para eliminar los posibles contaminantes presentes en los distintos componentes del medio de aserrín.

Los micofiltros fueron elaborados en tubos PVC de 18,5 cm de largo y 10 cm de diámetro. El tubo PVC fue lavado con jabón, vinagre (tres veces) y con alcohol etílico al 70% para esterilizarlo. Luego, se lo dejó en la cámara de flujo con rayos ultravioletas durante 40 minutos. En el día en que se armó el micofiltro, se esterilizó al tubo PVC con fuego y se lo dejó 20 minutos adicionales en la cámara de flujo con rayos ultravioletas para reducir la posibilidad de contaminación. Se colocaron tres cordones de lana, previamente esterilizados en el autoclave, que atravesaron diagonalmente el filtro y quedaron fijos con cinta adhesiva. Estos cordones tienen el propósito de ayudar al paso del agua y de servir de soporte adicional para que el medio de aserrín inoculado con micelio no se desprenda del tubo PVC durante y después de las filtraciones. Se selló la apertura inferior del tubo PVC con papel aluminio y se lo aseguró con cinta adhesiva para que no se riegue el contenido del micofiltro al ser levantado.

Se colocaron capas de grano colonizado por el hongo (que fue previamente fracturado en pequeñas partes) y de medio de aserrín. Se las alternó para aumentar la superficie del medio de aserrín que tiene contacto con el micelio presente en el grano. La primera y la última capa fueron de grano colonizado. Este procedimiento tuvo el objetivo de acelerar la colonización del medio de aserrín por parte del micelio (Stamets, 2005). Después de colocar cada capa de medio de aserrín o grano colonizado, se compactó el medio resultante sacudiendo el tubo PVC con pequeños golpes. Se utilizó una proporción en peso de 1:3 de grano inoculado: medio de aserrín. Se dejó un espacio de alrededor de 5 cm vacío en la parte superior para que contenga el agua al momento de la filtración.

Teniendo esto en cuenta, el volumen del medio inoculado con micelio fue de 1,06 L mientras que el volumen total del tubo PVC fue de 1,45 L. Al terminar de colocar el medio de aserrín y el grano inoculado se selló la apertura superior del micofiltro con papel aluminio para reducir el flujo del aire y reducir la probabilidad de contaminación.

Una vez inoculado el medio de aserrín, se dejó crecer al hongo dentro del micofiltro entre una semana a una semana y media, hasta que el medio de aserrín estuvo completamente colonizado.

Para el tratamiento control se hicieron filtros que se hallaban compuestos por el mismo medio a base de aserrín que se usó en la elaboración de los micofiltros de los otros tratamientos con la excepción del yeso (Anexo 1). El medio del tratamiento control contenía aserrín, viruta, afrecho de trigo y agua en las mismas proporciones que el medio usado en los demás tratamientos. Este medio a base de aserrín, ligeramente modificado, fue puesto en un tubo PVC de las mismas dimensiones mencionadas anteriormente, dejando el mismo espacio vacío de 5 cm que se dispuso para los tratamientos *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. Para realizar la filtración y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), se siguieron idénticas pautas a las que se usaron con respecto a los otros filtros.

4.2. FILTRACIÓN

Las bacterias que fueron usadas como contaminante eran *E. coli* ATCC 25922. *E. coli* es una bacteria modelo y una coliforme fecal. Las coliformes fecales se diferencian de otras coliformes por su capacidad de sobrevivir y multiplicarse a 44 °C (Hranova, 2006). Han sido seleccionadas porque las coliformes fecales son tomadas como indicadores de contaminación fecal ya que sobreviven un mayor tiempo que la mayoría de microorganismos patógenos presentes a causa de contaminación fecal (McNabb y Keeley, 1977).

Se preparó previamente un stock que se mantuvo a -20 °C en una mezcla de caldo “Brain heart infusion” (BHI) (5 mL) y 30% del volumen de glicerol (1,5 mL). Para acondicionar las bacterias se inoculó 1 mL de caldo BHI con las bacterias del stock y se las dejó crecer por 18 horas a 37 °C en la oscuridad. Una vez transcurrido este lapso, se

inocularon placas Petri de 100x15 mm con agar Müeller-Hinton, con arrastrado continuo, y se las dejó crecer por 24 horas a 37 °C en la oscuridad.

Por otra parte, se pusieron 3,5 L de agua destilada en un frasco de vidrio y se los esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Seguidamente se añadió 28,64 g de cloruro de sodio para obtener una solución fisiológica salina al 8,18 g/L. Se inoculó el agua salina con *E. coli* con una concentración final de bacterias de 100000 UFC/mL. El método que se usó para obtener esta concentración bacteriana está detallado en el Anexo 2.

Previo a la filtración se mezcló el agua inoculada con *E. coli* agitándola manualmente por cinco segundos para homogenizar el contenido de las bacterias en el agua. La filtración se realizó al percolar los 3,5 L de agua inoculada con *E. coli* a través de los micofiltros. Se ubicó al filtro sobre una cubeta y se lo sostuvo con soportes de madera previamente esterilizados en el autoclave. Esta previsión tenía el propósito de impedir que el filtro entre en contacto con el agua filtrada. Además, se aplastó un poco en los lados del filtro en la parte de entrada y salida del agua para permitir el paso del agua por las fisuras que se creaban así en los costados. Este ajuste se efectuó debido a que los hongos tienen la tendencia a formar tapones en lugares donde hay altas concentraciones de oxígeno (Figura 2) y, por este motivo, no permiten el paso del agua. Si pese a esta medida los tapones formados por el micelio aún no permitían el paso del agua, se procedió a tensar los cordones de lana para romper la superficie del micelio.

Durante la filtración, se dejó que el agua fluyera por el filtro movida solamente por la gravedad. Como todos los micofiltros poseían un espacio de 5 cm en donde espera el agua hasta filtrarse, la presión del agua generada sobre el filtro fue de 490,5 Pa. El agua recolectada tras la filtración se almacenó en una cubeta localizada bajo el micofiltro. La cubeta fue esterilizada previamente y fue recubierta, previamente a la filtración, con una capa de papel aluminio que la protegía de potenciales contaminantes presentes en el aire. Al concluir cada filtración, se anotó el tiempo que se demoró toda el agua en pasar por el filtro.

Se hicieron filtraciones hasta alcanzar nueve datos, aunque posteriormente se eliminaron dos datos atípicos, uno proveniente del tratamiento *T. versicolor* y otro proveniente del tratamiento *Ganoderma* sp. Se realizaron hasta tres filtraciones con los

micofiltros de los tratamientos *Ganoderma* sp. y *T. versicolor* pero solo uno con los filtros control, se especifica en el Anexo 1 las razones para esto.



Figura 2. Crecimiento del micelio en la superficie de un micofiltro de *Ganoderma* sp. Aquí se puede observar también como la densidad del micelio aumenta hasta cubrir totalmente la superficie del micofiltro formando un sello impermeable.

4.3. CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Para evaluar los resultados de las pruebas se realizó un conteo de UFC en el agua antes y después del paso por los filtros. Después de mezclar el agua filtrada para homogeneizar su contenido, se tomó una muestra de 900 μL de la solución salina inoculada con *E. coli* antes de pasar por el filtro y una muestra de 900 μL de la solución salina inoculada después de haber pasado por el filtro. A estas se realizaron dos diluciones seriadas tomando 100 μL y diluyendo esta muestra en 900 μL de solución salina previa a la inoculación. De esta dilución de 1/100 se tomaron 100 μL y se los distribuyó en una placa Petri 100x15 mm con agar Müeller-Hinton con la técnica “Spread Plate Method”, para poder repartir las bacterias de una manera uniforme y poder contar las unidades formadoras de colonias.

Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias después de incubar las cajas a 37 °C durante 24 horas. Se calculó el porcentaje de unidades formadoras de colonias removidas del agua comparando: (a) la cantidad de unidades formadoras de colonias en la placa inoculada con el agua antes del paso por el filtro, con (b) la cantidad de UFC en la placa inoculada con el agua después del paso por el filtro.

Se calculó este porcentaje con la fórmula:

$$\frac{UFCa - UFCd}{UFCa} \times 100$$

UFCa: Unidades formadoras de colonias antes del paso por el filtro.

UFCd: Unidades formadoras de colonias después del paso por el filtro.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tratamientos que se consideraron para el análisis estadístico consistieron en el tratamiento *T. versicolor*, que contiene los porcentajes de remoción de UFC de las filtraciones en donde se utilizaron los micofiltros inoculados con *T. versicolor*; el tratamiento *Ganoderma* sp. que contiene los porcentajes de remoción de UFC de las filtraciones en donde se utilizaron micofiltros inoculados con *Ganoderma* sp.; y el tratamiento control en donde se toman en cuenta los porcentajes de remoción de UFC de las filtraciones en donde se utilizaron los filtros control que no fueron inoculados con ningún micelio.

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) considerando los resultados obtenidos de los tres tratamientos. Se efectuó también una prueba de significación de Tukey con un nivel de significación de 5% y al 1% porque se presentó significación estadística. El análisis estadístico se realizó haciendo uso del programa SPSS de IBM.

Se calculó el coeficiente de variación con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sqrt{CMe}}{Y} \times 100$$

CV: Coeficiente de variación

Cme: Cuadrados medios del Error Experimental

Y: Media Global

Se evaluó si existe relación entre la cantidad de bacterias que han sido retiradas del agua y la cantidad de tiempo que se demoró el agua en pasar a través del filtro. Esta

evaluación se concretó con una prueba de correlación de Spearman ya que se encontró que no hay normalidad en la serie de datos que corresponden a los tiempos de filtración. Este análisis estadístico también se realizó haciendo uso del programa SPSS de IBM.

5. RESULTADOS

Los valores de remoción de UFC de cada filtración constan en la Tabla 1, con la información adicional del tiempo de filtración y de si se trataba de la primera, segunda o tercera filtración que se realizaba utilizando un filtro en particular. La media general de remoción de coliformes fecales fue de 13,31%. Las medias obtenidas fueron de 1,36% para el control; 30.87% para el tratamiento *T. versicolor*; y de 9,19% para el tratamiento *Ganoderma* sp.

Tabla 1. Porcentaje de Remoción de Unidades Formadoras de Colonias según el tiempo de Filtración y el número de veces que fue usado el filtro

Tratamiento	Usos del Filtro	Tiempo de filtración (Minutos)	UFC en el agua antes de la filtración	UFC en el agua después de la filtración	Remoción de UFC en %
<i>T. versicolor</i>	1	41	75	43	42,67
	1	47	68	53	22,06
	1	16	74	70	5,41
	1	23	86	73	15,12
	1	21	117	92	21,37
	1	93	90	25	72,22
	2	140	140	83	40,71
	2	93	124	92	27,42
<i>Ganoderma</i> sp.	1	85	131	122	6,87
	1	47	49	52	-6,12
	1	58	32	25	21,88
	1	110	88	94	-6,82
	2	100	56	48	14,29
	3	66	68	46	32,35
	3	30	70	76	-8,57
	3	66	56	45	19,64
Control	1	10	129	112	13,18
	1	8	130	157	-20,77
	1	6	117	116	0,85
	1	6	108	103	4,63
	1	5	112	113	-0,89
	1	7	94	91	3,19
	1	8	100	109	-9
	1	5	125	112	10,4
	1	7	113	101	10,62

De los datos originales se obtuvo una varianza de 394,97, una desviación estándar de 19,87 y un coeficiente de variación de 149,34%. Este coeficiente de variación es extremadamente elevado ya que el máximo valor aceptable en pruebas como esta es de 20%. No se pueden considerar confiables a datos con un porcentaje mayor al mencionado.

Debido al elevado coeficiente de variación, se realizó una transformación de datos logarítmica. En la transformación de datos logarítmica, sin embargo, no es posible utilizar valores inferiores a 0. Para solucionar este problema, se tomó el valor absoluto del menor porcentaje (-20,77), se lo multiplicó por 1,1 y se sumó este valor constante a todos los datos. Posteriormente se multiplicaron todos los valores por 10. Con esta transformación de datos se obtuvo un coeficiente de variación de 12,95% el cual es menor a 20% y por lo tanto, aceptable.

Para analizar los datos se realizó un ANOVA (Tabla 2) y se encontró significancia estadística para 0,05. Debido a esta significancia estadística, se realizó un análisis post hoc de Tukey (Tabla 3) y se encontró una diferencia estadística para 0,05 entre el tratamiento *T. versicolor* y el tratamiento control. No se encontró significancia estadística entre los tratamientos *Ganoderma* sp. y el tratamiento control o entre el tratamiento *Ganoderma* sp. y el tratamiento *T. versicolor*.

Tabla 2. ANOVA de resultados de UFC removidas por distintos tratamientos

Fuentes de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculado	F crítico		Significancia
					,05	,01	
Total	2,469	24					
Tratamientos	1,749	22	0,080				
Error Experimental	0,720	2	0,360	4,527*	5,72	3,44	0,023

Los tiempos de filtración que se registraron pueden observarse en la Tabla 1. La media general del tiempo transcurrido en cada filtración fue de 43,92 minutos. Las medias del tiempo que se demoró el agua en pasar por los filtros fue de 59,25 minutos para el tratamiento *T. versicolor*, de 70,25 minutos para el tratamiento *Ganoderma* sp. y de 6,89 minutos para el tratamiento control. Se calculó individualmente el caudal de cada filtración y se obtuvo un caudal promedio de 99,71 mL/min para el tratamiento de *T. versicolor*, un caudal promedio de 58,19 mL/min para el tratamiento de *Ganoderma* sp. y un caudal promedio de 532,207 mL/min para el tratamiento control. La media general de todos los caudales fue de 242,20 mL/min.

Tabla 3. Prueba de Tukey comparando resultados de UFC removidas por distintos tratamientos

Tratamiento	Tratamiento	Significancia
<i>T. versicolor</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	0,470
	Control	0,017*
<i>Ganoderma</i> sp.	<i>T. versicolor</i>	0,470
	Control	0,208

Los resultados de la prueba de correlación de Spearman demostraron que existe una correlación positiva pero baja ($R=0,496$), que es significativa para $p=0,05$ ($p=0,012$). Es decir, entre más tiempo demora una filtración, más alta suele ser la efectividad del filtro para remover bacterias coliformes fecales del agua.

6. DISCUSIÓN

En este estudio, el tratamiento de micofiltros de *T. versicolor* fue el que generó mayor porcentaje de remoción de UFC, con un promedio de 30,87% comparando con el tratamiento de *Ganoderma* sp. que solo alcanzó un promedio de 9,19%. Los filtros control removieron un promedio de 1,37% de las coliformes fecales. Además, el tratamiento *T. versicolor* fue el único que presentó una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control ($p=0,017$). Considerando estos resultados, se toma a *T. versicolor* como el tratamiento más efectivo en la remoción de *E. coli* de este estudio.

Los micofiltros de *T. versicolor* tuvieron indiscutiblemente un mejor desempeño que los filtros control, que no contenían micelio, en la remoción de coliformes fecales. A pesar de que los micofiltros de *Ganoderma* sp. no presentaron significancia estadística en la remoción de coliformes fecales, al compararlos con los filtros control, se puede igualmente observar que hubo retención de UFC al comparar sus resultados con los del control. En efecto, los micofiltros *Ganoderma* sp. eliminaron más de seis veces el porcentaje de coliformes fecales que los filtros control. Por lo tanto, los micofiltros procedentes de ambos tratamientos miceliares retuvieron más bacterias que los filtros control sin micelio.

6.1. DIFERENCIAS ENTRE MICOFILTROS Y TRATAMIENTO CONTROL

La sola presencia del hongo puede ser un factor que mejore la capacidad de filtración de un medio. El medio que se utilizó en este estudio es altamente nutritivo y fue diseñado para facilitar el crecimiento del hongo. Por este motivo, el micelio colonizó el medio a tal punto que hizo que el medio se vuelva de un color blanquecino ocultando completamente el aserrín y la viruta de color café del medio sin inocular (Figura 2). Además, el crecimiento del micelio fue tan intenso que alcanzó una densidad a la que se crearon tapones impermeables cerca de los extremos del micofiltro. Esto hizo que haya una resistencia al paso de líquidos por parte de los micofiltros, circunstancia que no se evidenció en los filtros control, que aumentaba el tiempo de retención del agua en el filtro.

6.1.1 DIFERENCIA EN LA DENSIDAD DEL MEDIO

La diferencia de la densidad entre los filtros control y los micofiltros se puede observar claramente por el tiempo que se demoró el agua en pasar a través de estos (Tabla 1). El tiempo promedio de una filtración a través de los micofiltros de *T. versicolor* fue de 59,25 minutos y el de los micofiltros de *Ganoderma* sp. fue de 70,25 minutos, dando un promedio de 64,75 minutos para realizar una filtración de un micofiltro, incluyendo a ambos tratamientos. Por lo tanto, resulta evidente que el tiempo promedio de filtración de los micofiltros es mucho mayor al tiempo promedio de las filtraciones del tratamiento control, que era inferior a siete minutos.

La colonización del medio por el micelio también tornó al medio presente en el filtro en una masa sólida y compacta. Antes de ser inoculados, el medio de aserrín y viruta, en el mismo estado que se empleó para confeccionar los filtros control, tenía una consistencia tan poco cohesiva que se derramaba si no se lo sostenía con papel aluminio en la apertura inferior del tubo PVC. Al consolidarse los micofiltros por el crecimiento miceliar siguiendo la inoculación, el estado sólido firme resultante podría, como efecto secundario, facilitar el transporte de los micofiltros, en especial, si se llegaran a usar en sitios alejados de donde se los manufacture. Se podría así inocular los micofiltros, esperar a que el micelio colonice el medio en un laboratorio y luego transportar el micofiltro, ya sólido y compacto, al lugar donde se lo usaría sin riesgo de que se desarme o se riegue su contenido.

6.1.2 PRESENCIA DE NUTRIENTES DENTRO DE LOS FILTROS

Además de influir en la consistencia física del filtro, al colonizar el medio y tornarlo sólido el micelio consume los nutrientes presentes en éste. Los nutrientes presentes en el medio podrían ser consumidos por cualquier organismo, incluyendo a las coliformes fecales que se está tratando de eliminar. Por añadidura, la presencia del afrecho de trigo brindaba una rica fuente de nitrógeno al medio (Stamets, 2002), lo que podría ser un factor limitante si solo hubiese aserrín y viruta en el medio ya que estos materiales son pobres en nitrógeno.

La presencia de nutrientes podría además ayudar a explicar los valores negativos en los porcentajes de remoción de coliformes fecales. Los porcentajes negativos indican que aumentó la cantidad de UFC durante la filtración, es decir, el agua filtrada presentaba mayor cantidad de coliformes fecales que la misma agua antes de pasar por el filtro o micofiltro. Al no contener micelio, los filtros del tratamiento control conservarán una cantidad muy alta de nutrientes, además de brindar una plataforma en donde puedan permanecer las coliformes fecales. Por esta razón, en cada filtro del tratamiento solo se realizó una filtración mientras que, en los micofiltros se realizaron hasta tres. No se pudo realizar análisis estadístico para encontrar diferencias entre los resultados de los filtros según el número de filtraciones que se realizaron por insuficiencia de datos, aunque este análisis sería un requerimiento para llevar a los micofiltros a ser usados en vivo.

Por otro lado, el aumento de UFC en las filtraciones permite concluir que, aún sin ser inoculado con micelio, el medio de aserrín y viruta tiene alguna capacidad de retener coliformes fecales presentes en el agua, aunque la cantidad de dicha retención sea desconocida. Además, aún tomando las precauciones de no reusar los filtros control, al pasar por el medio del filtro, las bacterias estarían en contacto con los nutrientes y podrían por ello multiplicarse, aunque en menor cantidad, ya que el tiempo de contacto con los nutrientes es menor: menos siete minutos en promedio, más el tiempo que se tome en hacer las diluciones, en contraposición a los dos días de espera si se volvía a usar los filtros control. Esto daría aproximadamente el tiempo de realizar una división celular para una porción de las bacterias presentes en el agua ya que para *E. coli* el tiempo promedio para la fisión binaria es de 20 minutos (Samaranayake, 2011).

El aumento de UFC en las filtraciones del tratamiento *Ganoderma* sp. podría ser explicado por el hecho de que los micofiltros de ambos tratamientos eran utilizados más de una vez como fue mencionado anteriormente. Por esto, podrían quedar coliformes fecales en el dentro del micofiltro luego de la primera filtración y éstas podrían ser liberadas en siguientes filtraciones. Esto ocurre debido a que las bacterias pueden sobrevivir un tiempo al ser adsorbidas y que la adsorción puede ser revertida (McNabb y Keeley, 1977). De esta manera las coliformes fecales que fueron retenidas en una filtración podrían ser liberadas de vuelta al agua en la siguiente filtración. También existe la posibilidad de que las coliformes fecales se multipliquen dentro del filtro, aunque este crecimiento sería menor que en los filtros control ya que, una parte de los nutrientes, probablemente la mayoría, ya

habría sido consumida por el micelio durante la colonización del medio. Además, las coliformes fecales podrían morir o dejar de ser viables en el tiempo que residan en el micofiltro por varios mecanismos que se mencionan a continuación.

6.1.3 PREDACIÓN DE BACTERIAS POR PARTE DE MICELIO

Existen otros métodos, que no tienen que ver con la estructura física de los filtros, por los cuales el micelio puede influir en la filtración. Estos mecanismos podrían resultar en una reducción de las coliformes fecales presentes en el agua contaminada, así como de las coliformes fecales que queden dentro de los micofiltros después de una filtración.

Cuando un organismo se enfrenta a una condición que le impide crecer a la mayor velocidad posible, se dice que este organismo entra en un estado de estrés (Dighton, Oudemans y White, 2017). Más específicamente en cuanto a su nutrición, cuando un organismo se encuentra con un déficit de algún nutriente que impide su crecimiento a una velocidad óptima, se conoce a este estado como de estrés nutritivo (Dighton et al., 2017). Los hongos, así como otros organismos, tienen que adaptarse al estrés y, para hacerlo, usar estrategias y consumir alimentos distintos a los que consumen en condiciones óptimas (Dighton et al., 2017). Esto sucede con múltiples grupos de hongos, incluyendo a Basidiomycota (Fermor y Wood, 1981), el grupo de donde se encuentran los géneros *Trametes* y *Ganoderma*. Los hongos, en caso de necesidad, pueden colonizar y degradar bacterias para tener acceso a los nutrientes que contienen, notablemente carbón y nitrógeno (Fermor y Wood, 1981). Además, tienen la capacidad de procesar microorganismos como nemátodos y copépodos, y a esporas e hifas de otras especies de hongos si no hay otras fuentes de nitrógeno disponibles (Barron, 1992).

Los hongos que predan las colonias bacterianas tienen la capacidad de localizar sensorialmente la presencia de tales colonias, crecer en dirección de las mismas, secretar compuestos para lizar las bacterias y crecer hifas de una manera “coraloide” a fin de poder asimilar los nutrientes de las bacterias muertas (Barron, 1992). Después de que la colonia de bacterias ha sido consumida, envían los nutrientes excedentes a otras partes del micelio para que puedan ser usados por otras hifas (Barron, 1992). A pesar de que la predación y consumo de bacterias ha sido demostrada en varias especies de hongos, aún no se ha

realizado estudios que demuestren la capacidad de *Ganoderma* sp. o *T. versicolor* para preda bacterias. A fin de poder atribuir la capacidad de remover bacterias de los micofiltros a la acción predatoria del micelio se recomienda realizar estudios para observar si, en las condiciones adecuadas, los hongos usados en nuestro estudio pueden utilizar bacterias como una fuente de nutrientes.

6.1.4 SECRECIÓN DE COMPUESTOS ANTIBIÓTICOS POR PARTE DEL MICELIO

La diferencia entre el desempeño de los micofiltros y los filtros control podría también verse influenciada por la presencia de sustancias antibióticas secretadas por el micelio. En la naturaleza, el micelio produce una amplia gama de sustancias químicas llamadas exudados o metabolitos secundarios (Stamets, 2005). Muchos de estos metabolitos pueden tener propiedades antibacteriales (Stamets, 2005) y las especies de hongos que fueron seleccionadas para este estudio no son la excepción. De hecho, se ha probado numerosas veces que hongos del género *Ganoderma* pueden secretar metabolitos secundarios con propiedades antibacteriales (Yamaç y Bilgili, 2006; Alves et al., 2012; Alves et al., 2013). Entre estos compuestos se encuentran varios tipos de ganomicina (Mothana, Jansen, Jülich y Lindequist, 2000; Stamets, 2005) que presentan actividad antibiótica contra varios tipos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *E. coli* (Mothana et al., 2000; Alves et al., 2012). Adicionalmente, varios estudios han probado las propiedades antibacteriales de metabolitos secundarios de *T. versicolor* (Sakagami et al., 1990; Yamaç y Bilgili, 2006). Entre estos se incluyen la corolina (Stamets, 2005) y el PSK, también llamada Krestina, que genera actividad antibacterial contra *E. coli* (Sakagami et al., 1990).

6.2. DIFERENCIAS ENTRE MICOFILTROS *Trametes versicolor* Y MICOFILTROS *Ganoderma* sp.

Se pueden también mencionar a la presencia de compuestos antibacteriales, a la predación y a diferencias de la estructura física de los filtros, para explicar la diferencia entre el desempeño de los micofiltros de *T. versicolor* y el de los micofiltros de *Ganoderma* sp. La diferencia en la reducción de UFC durante las filtraciones de ambos

tratamientos fue bastante marcada. Los micofiltros inoculados con *T. versicolor* retiraron más del triple de UFC que los micofiltros inoculados con *Ganoderma* sp. Además, los resultados de los micofiltros de *T. versicolor* presentaron una diferencia estadísticamente significativa con relación al control. La diferencia en el rendimiento podría explicarse por las mismas razones que intentan explicar la diferencia de rendimiento con los filtros control, incluyendo a la composición física de los micofiltros, la predación, la presencia diferencial de nutrientes o de compuestos antibióticos. No obstante, surgen problemas si se busca asignar a estos factores como los responsables de los resultados.

Por ejemplo, como se revela en los tiempos de filtración de la Tabla 1, el agua demoró más en pasar por los micofiltros *Ganoderma* sp. que por los de *T. versicolor*. Esto evidencia que hubo una densidad mayor en los micofiltros de *Ganoderma* sp., sin embargo, fueron los filtros de *T. versicolor* los que tuvieron un mejor desempeño. Esto parecería contradictorio si se intenta señalar a este factor como el responsable de las diferencias en el desempeño sin considerar otros que hemos venido señalando en este estudio. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que este incrementado tiempo de retención podría también dar oportunidad a mayor multiplicación bacteriana dentro del micofiltro durante la filtración.

En cuanto a la presencia de nutrientes, no es posible, con los datos proporcionados, establecer si existió una diferencia en la cantidad de nutrientes presentes en los micofiltros de los dos tratamientos. Por lo tanto, se recomienda monitorear la cantidad de nutrientes presentes en el agua, antes y después de pasar por los micofiltros en cada filtración, para así saber si son en parte responsables del desempeño diferencial de los micofiltros dentro de un mismo y en distintos tratamientos.

En cuanto a la destrucción de bacterias por predación atribuida al micelio, se pueden evaluar estos mecanismos de la misma manera que se consideró la presencia de nutrientes dentro del micofiltro. Sin embargo, no se puede asegurar con los datos disponibles si éste es el factor responsable del mejor desempeño de los micofiltros de *T. versicolor*, considerando que esta adaptación existe en otras especies de hongos pero no se han realizado aún estudios para saber si se presenta en *Ganoderma* sp. o en *T. versicolor*. Es necesario, por lo tanto, investigar si han evolucionado estas estrategias en estas especies para poder explicar el funcionamiento y desempeño diferencial de los micofiltros a partir de esta perspectiva.

Ambas especies producen exudados que pueden contener sustancias con propiedades antibacteriales (Sakagami et al., 1990; Mothana et al., 2000; Yamaç y Bilgili, 2006; Alves et al., 2012; Alves et al., 2013). Se observó que el agua que pasó por micofiltros cambiaba de color probablemente debido a la incorporación de los exudados que fueron secretados en el interior y en la superficie de los micofiltros. Cuando el agua pasaba a través de los micofiltros de *T. versicolor*, esta adquiría una coloración amarilla (Figura 3). Esta coloración era más marcada en los micofiltros de *T. versicolor* que en los de *Ganoderma* sp.



Figura 3. Micofiltro de *T. versicolor* después de realizar una filtración. Se puede notar también como el agua filtrada tiene una coloración amarillenta, presumiblemente por la presencia de exudados de *T. versicolor*.

Es posible que los exudados de *T. versicolor* tengan una coloración naturalmente más oscura que los de *Ganoderma* sp. (Figura 3 y Figura 4). Pero, por otro lado, la diferente intensidad del color del agua filtrada podría también indicar que los micofiltros de *T. versicolor* secretaban una mayor cantidad de exudados, lo que podría explicar la diferencia de resultados entre ambos tratamientos. Una manera de explicar la diferente producción de exudados se basa en analizar cómo el micelio invierte sus recursos; en el

caso de *Ganoderma* sp. el micelio siempre colonizó y creció a una velocidad mucho mayor que el micelio de *T. versicolor*. Este hecho se produjo de manera constante en todas las etapas de la construcción de los micofiltros, lo que podría significar que esta cepa de *Ganoderma* sp. invertía más recursos en su expansión en el medio antes que en secretar exudados. Otra posible explicación sería que las distintas especies de hongos reaccionarían con mayor o menor intensidad al estrés que se generó por falta de nutrientes o de espacio.

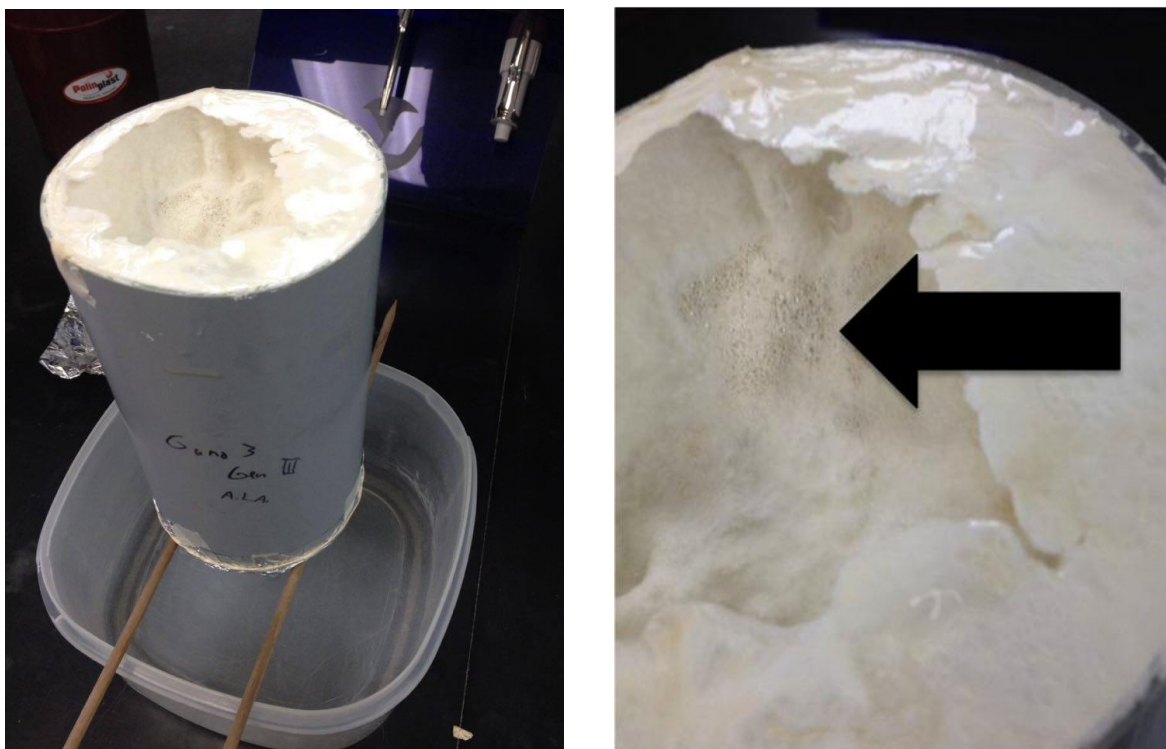


Figura 4. Micofiltro de *Ganoderma* sp. (detalle de la superficie). Se nota en la superficie las gotas de exudados de color transparente.

La composición de los exudados de *T. versicolor* también podrían ser simplemente más ricos en compuestos que contribuyen a la eliminación de *E. coli* que los exudados de *Ganoderma* sp., aún en la misma concentración y volumen. Se recomienda comprobar esto en estudios futuros, incluyendo pruebas del potencial antibiótico de los exudados de *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. Estos compuestos podrían tener varios usos adicionales a la micofiltración y micorremediación.

6.3. COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS DE MICROFILTRACIÓN

6.3.1. DIFERENCIAS METODOLÓGICAS

Se han realizado varias pruebas de microfiltración en el pasado, algunas usando células de bio-retención en vivo (Thomas, Aston, Woodruff y Cullinan, 2009) y otras usando únicamente microfiltración in vitro (Harris, 2012; Rogers, 2012; Chirnside, 2013; Flatt, 2013; Taylor et al., 2014; Umstead, 2016). Cada prueba ha dado diferentes resultados y posee distintas metodologías, por esto se han presentado problemas al tratar de comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios. A pesar de que varios aspectos de la metodología se basaron en el trabajo de Rogers en 2012, como el método de conteo de UFC y la concentración de coliformes fecales en el agua, el diseño de los micofiltros usado en este estudio no es igual a ningún otro usado anteriormente.

Las diferencias metodológicas incluyen el volumen del micofiltro, las especies con las que el micofiltro fue inoculado y la composición nutricional del medio en el que creció el micelio. Los otros micofiltros estaban compuestos de aserrín o viruta pura inoculados, mientras que en nuestro estudio se añadió yeso o afrecho como suplemento nutricional. Otras diferencias metodológicas notables fueron la cantidad de agua que fue filtrada, el caudal, la concentración de coliformes fecales presentes en el agua filtrada y las cepas de *E. coli* con la que se inoculó el agua.

No se encontró información sobre cómo cepas distintas de *E. coli* pueden afectar el resultado de una filtración. Tampoco se encontró información sobre cómo la concentración de bacterias en el agua filtrada puede influir en los resultados de una filtración, aunque se asume estos factores podrían tener algún efecto sobre la efectividad de los filtros. Se recomienda, en futuros experimentos, evaluar si estos parámetros tienen influencia sobre la microfiltración o la filtración en general.

6.3.2. TIEMPO DE CONTACTO Y VALOR Cf/Vf

La gran mayoría de estudios de microfiltración difieren en varios parámetros, entre estos, el caudal y el volumen del filtro. Por este motivo, se creó en nuestro estudio una medida específica para poder comparar los micofiltros a través de estas distintas

metodologías. Esta medida especial se ha denominado “Caudal de filtración por Volumen de filtro” (Cf/Vf) y se calculó a partir del caudal que se usó en la filtración en mL/min, dividido por el volumen del filtro que se usó en L. El Cf/Vf es una medida que refleja el tiempo de contacto entre el agua filtrada y el medio del filtro. Un aumento en el caudal reflejará una disminución en el tiempo de contacto y un aumento en el valor Cf/Vf . Un aumento en el volumen del filtro reflejará, a la vez, un aumento en el tiempo de contacto y una disminución en el Cf/Vf . Por esto se puede decir que un valor de Cf/Vf mayor equivale a un menor tiempo de contacto.

Esta medida especial se diseñó con el objetivo de establecer un enfoque de orden práctico que facilite la comparación entre los resultados obtenidos por filtraciones con distintas metodologías. De esta forma, se podría atribuir la efectividad diferencial para remover bacterias a cambios en otros parámetros más universales, como la especie y cepa de hongo que fue inoculado en el micofiltro o la composición nutricional del medio en el que ha crecido el hongo. A continuación, se explicará el efecto que puede tener el cambio de algunos de estos parámetros dentro de una misma filtración.

En una filtración, el “tiempo de contacto” es la cantidad de tiempo en la que el agua que está siendo filtrada y los contaminantes que ésta contiene, tocan o están en contacto con la membrana filtradora. En los estudios revisados, la membrana filtradora es el medio de aserrín con o sin micelio. La importancia del tiempo de contacto en la efectividad de un filtro es alta y es un factor que ha sido probado en varios estudios de múltiples maneras.

Por ejemplo, Flatt (2013) realizó pruebas para comprobar si al aumentar el volumen del micofiltro, se aumentaba su capacidad de filtración de bacterias coliformes fecales. Sus resultados indicaron que, al tener un mayor volumen, un micofiltro es capaz de remover una mayor cantidad de coliformes fecales que un micofiltro de menor volumen. Esto hace sentido ya que, al tener un mayor volumen de filtro, los elementos que se tratan de aislar del agua estarán en contacto un mayor tiempo con los reactivos o superficies que tratan de matar o retener a las bacterias. Esta tendencia se ha comprobado anteriormente en estudios en donde se filtraban bacterias y esporas bacterianas pero no se ha comprobado aún al tratar de filtrar otros tipos de organismos (Hijnen y Medema, 2010).

Otro factor que influye en la duración del tiempo de contacto es el caudal. El caudal se define como la velocidad a la que el agua pasa a través de un medio. Flatt (2013) comparó la remoción de coliformes fecales en un mismo tipo de micofiltro usando distintos caudales y encontró que, en promedio, cuando el caudal era menor (0,5 L/min frente a 2,2 L/min) el micofiltro tenía un mejor desempeño. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Umstead (2016), que usó tres distintos caudales y observó que no parece haber correlación entre este y la capacidad de remoción de las bacterias.

El contraste de resultados se podría atribuir a las diferencias metodológicas que existen entre ambos estudios. Estas diferencias se refieren a la influencia que tiene en los resultados (a) el orden en que se realizan las filtraciones y al uso de los mismos filtros varias veces (Emelko, 2001); (b) los tiempos de espera entre filtraciones que podrían provocar una posible adaptación por parte del micelio a la presencia de *E. coli* (Stamets, 2005); y, (c) la presencia de bacterias termotolerantes no patógenas dentro de los micofiltros (Umstead, 2016).

Para eliminar este potencial sesgo, se sugiere dejar de reusar los micofiltros cuando se cambia de caudal. Por otro lado se plantea también estudiar la posibilidad de selección artificial de especies o cepas de hongos con la adición de un condicionamiento a la presencia de contaminantes, para así observar si la adaptabilidad de los hongos mejora la efectividad de los micofiltración.

6.3.3. CORRELACIÓN ENTRE TIEMPO DE FILTRACIÓN Y EFECTIVIDAD DE MICOFILTROS

Rogers (2012) realizó una comparación similar a la de nuestro estudio al observar y recopilar datos sobre el tiempo de filtración a lo largo de su experimentación, antes de implementar una metodología exclusiva para comprobar si existe una relación entre el caudal y la efectividad de los micofiltros. Rogers (2012) afirma que el caudal no es un buen parámetro para predecir la abundancia de bacterias en el efluente debido a los valores R bajos: $R=0,1053$ para los micofiltros inoculados con *Pleurotus ostreatus*; y, $R=0,1443$ para el tratamiento control. Estos valores R indican una relación muy baja o casi inexistente entre ambos parámetros. Esta circunstancia contrasta con los datos obtenidos en nuestro estudio ya que se encontró que, aunque la relación es baja ($R=0,496$) fue

estadísticamente significativa. La diferencia entre ambas conclusiones se podría deber a varios factores.

El primer factor que podría explicar la diferencia entre las conclusiones de los dos estudios es de orden metodológico. En nuestro estudio se dejó al agua fluir a través de los filtros, empujada solamente por la gravedad, lo que resultó en que el caudal sea determinado por la porosidad del filtro. En el estudio de Rogers (2012), el caudal era determinado por una bomba peristáltica. A pesar de que el caudal también podía ser limitado por la porosidad de los filtros, la bomba peristáltica daba un valor máximo al caudal. Esto no permitiría que la relación se pueda observar con exactitud y libertad, sobre todo con respecto al tratamiento control en donde generalmente la porosidad es mayor y más influyente.

En lo que corresponde al segundo factor, es necesario tener en cuenta que en nuestro estudio se realizó un análisis estadístico para comprobar la relación entre el caudal y la efectividad de los micofiltros, mientras que Rogers (2012) solo se enfocó en observar los valores de correlación R. También se podría atribuir las diferencias entre los dos estudios a que Rogers (2012) solo observó las relaciones dentro de los distintos tratamientos y no a todos como un conjunto.

Aunque en nuestro estudio hubiera sido preferible realizar un análisis estadístico para comprobar si hay presencia de correlación entre ambos factores, dentro de los distintos tratamientos, el número de datos disponibles en cada tratamiento no fue suficiente para hacer dicho análisis. Sería interesante realizar nuevamente este experimento, analizando si existe la correlación tiempo de filtración y efectividad del filtro entre varios tratamientos y dentro de estos tratamientos.

Tomando todos los factores en cuenta, se puede inferir que un mayor tiempo de contacto entre el agua y el filtro equivaldría a una filtración con mayor remoción de coliformes fecales. Se presenta en la Tabla 6 el porcentaje de bacterias que se removieron del agua durante la filtración, en conjunto con los valores Cf/Vf de varios estudios de micofiltración y de un estudio de biorremediación. Se seleccionó el tratamiento que removió la mayor cantidad de coliformes fecales de cada estudio, para compararlo con los resultados de *T. versicolor*. Los estudios presentes en la Tabla 6 analizaban porcentajes de

remoción de bacterias de la misma manera que en nuestro estudio. Para calcular los valores de Cf/Vf de nuestro estudio se tomó al caudal promedio de cada tratamiento.

6.3.4. COMPARACIÓN ENTRE MICOFILTROS *Trametes versicolor* Y MICOFILTROS PROCEDENTES DE OTROS ESTUDIOS

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento *T. versicolor* demostró tener el mejor desempeño en las filtraciones, con un valor en promedio de 30,87% de remoción de coliformes fecales. Además es superior a los porcentajes de remoción de coliformes fecales obtenidos en otros estudios como por ejemplo el 19,5% de remoción de coliformes fecales usando micofiltros inoculados con *Pleurotus ostreatus* (Rogers, 2012); 22% de remoción con micofiltros inoculados con *Stropharia rugosoannulata* (Taylor et al., 2014); y, usando esta última especie de hongo en sus micofiltros, de 24% de remoción de coliformes fecales en el estudio de Flatt (2013) en su tratamiento con caudal bajo (0,5 L/min). Estos valores, en conjunto a los valores Cf/Vf correspondientes se pueden ver en la Tabla 6.

Los valores Cf/Vf mencionados recalcan la alta eficacia de los micofiltros de *T. versicolor* de nuestro estudio, ya que, además de tener una mayor remoción de coliformes fecales, su valor Cf/Vf era mayor que los de Flatt (2013) y Taylor et al. (2014). Estos hallazgos sugieren también que el tiempo de contacto en el agua y el micofiltro de *T. versicolor* era menor que el tiempo de contacto en los micofiltros de Flatt (2013) y Taylor et al., 2014). Teóricamente, con un mismo tiempo de contacto al de los estudios de Flatt (2013) y Taylor et al. (2014), la diferencia en el desempeño a favor de los micofiltros de *T. versicolor* sería aún mayor.

En cuanto a los resultados de Rogers (2012) se debe observar que, aunque también se hayan obtenido mejores resultados con los micofiltros de *T. versicolor* que con los micofiltros de *Pleurotus ostreatus* empleados por Rogers, el valor Cf/Vf de las filtraciones de Rogers es mayor al obtenido en nuestro tratamiento *T. versicolor*. Esta variación podría indicar que la diferencia entre el desempeño de ambos micofiltros se podría deber, en parte, a los distintos tiempos de contacto. Es posible que, con un mismo valor Cf/Vf los micofiltros de Rogers pudieran tener un rendimiento más cercano, igual o hasta mejor que los micofiltros de *T. versicolor* que se usaron en nuestro estudio.

La explicación que se podría dar para el mejor rendimiento de los micofiltros de *T. versicolor* de nuestro estudio se pueden agrupar en dos ambitos: diferencias metodológicas y diferencias intrínsecas del micelio seleccionado.

Entre las diferencias metodológicas principales se encuentra la composición nutricional del medio en el cual se inoculó el hongo. La composición nutricional del medio utilizado en este estudio es distinta a la de los otros estudios en que se añadió afrecho de trigo y yeso. El afrecho de trigo se empleó como suplemento nutricional ya que contiene altos niveles de nitrógeno, 2,6 g por cada 100 g (Considine y Considine, 2012). Este suplemento permite aumentar la eficacia y velocidad a la que crece el hongo (Stamets, 2011). El yeso, o sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tuvo la función de proveer calcio y azufre a la mezcla, necesarios en el metabolismo de los hongos (Stamets, 2011).

Es posible que, con una disponibilidad de nutrientes amplia, el crecimiento del hongo se haya visto acelerado a tal punto de ocupar todo el espacio disponible y entrar en estado de estrés. En estado de estrés, comenzaría a secretar metabolitos secundarios que ayudarían a eliminar o a bajar la viabilidad de las coliformes fecales. También la disponibilidad de más nutrientes podría equivaler a una producción de distintos metabolitos secundarios. Adicionalmente la colonización acelerada del medio por parte del micelio podría generar una densidad más alta que con un medio menos nutritivo. Esta mayor densidad, como se mencionó antes, podría incrementar la eficacia de los micofiltros. En este sentido, si se llegara a usar micofiltros en la limpieza de aguas servidas, un crecimiento acelerado podría ser beneficioso al disminuir la probabilidad de contaminación y al aumentar la velocidad de producción de los micofiltros.

Otra diferencia metodológica que podría explicar los rendimientos de los micofiltros en nuestro estudio son los minerales presentes en el agua filtrada. La solución salina usada aquí resultó de la mezcla de agua destilada con cloruro de sodio. La añadidura de cloruro de sodio al agua en la que las bacterias se fueron inoculadas tuvo el propósito de que puedan sobrevivir (al contrario de lo que ocurriría si se utilizara una solución hipotónica de agua destilada pura o una solución con rastros de cloro, como el agua de la llave). La concentración de sal de 8,18 g/L deja al agua con una osmolalidad de 280 mosmol/kg que imita el potencial osmótico del suero de la sangre y, que coincide con el

líquido intraluminal del intestino, donde viven las coliformes fecales de manera natural (Maughan y Murray, 2000).

Se ha registrado que *E. coli* puede sobrevivir y multiplicarse en agua con concentraciones de sal de hasta 34 g/L (Gerba y McLeod, 1976), una concentración mucho mayor a la que se usó en este estudio (8,18 g/L), por lo que se asume que la sal no tuvo un efecto bactericida. Lamentablemente no se puede predecir cómo la sal podría tener efecto en la retención de las bacterias, en la predación por parte del micelio o en la acción de los compuestos antibióticos presentes entre los metabolitos secundarios. Por esto se recomienda a futuro usar el mismo procedimiento que usó Flatt (2013) y Taylor et al. (2014) de tomar agua de la llave y declorarla. Como medida adicional se podría esterilizar por autoclavado el agua a fin de asegurar que no haya presencia de microorganismos en el agua a parte de los que fueron inoculados para la experimentación.

Las diferencias intrínsecas del micelio que pueden explicar las diferencias de eficacia entre el tratamiento *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. se han mencionado antes y se pueden aplicar también para explicar las diferencias con las otras especies presentes en los micofiltros de otros estudios. Según la especie y cepa de los hongos con los que se inoculan los micofiltros, podría haber variaciones en la presencia o eficacia predatoria, en la densidad que proporciona el micelio al micofiltro o en la cantidad o tipos de compuestos secretados en los exudados.

No es posible atribuir con seguridad la diferencia entre los resultados de los distintos estudios a las variaciones señaladas en el párrafo precedente, pero sería posible realizar estudios de micofiltración a futuro en donde se midan diversos factores de una manera controlada, incluyendo el factor de que el micofiltro sea inoculado con distintas especies de hongo.

6.4. MICOFILTRACIÓN Y MICORREMEDIACIÓN

6.4.1. LA CÉLULA DE BIORETENCIÓN DE THOMAS ET AL. (2009)

La célula de bio-retención de Thomas et al. (2009) fue un estudio en vivo. Esta célula consistía 75 m³ de “loam” arenoso que incluía materia orgánica, arena y suelo local

con varias especies de árboles, arbustos y herbáceas locales. Se inoculó el loam con una mezcla comercial de ectomicorizas y endomicorizas, en conjunto con *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ulmiatus* y *Stropharia rugosoannulata* mientras que el tratamiento de control no contenía hongos.

Los resultados que se obtuvieron con la célula de bioretención son mejores que los de otros estudios de micofiltración, pues la célula dio un 90% de reducción de coliformes fecales. Sin embargo, hay que mencionar que el tratamiento control, que no contaba con los hongos y por lo tanto sin micofiltración, produjo con una remoción de 66% de coliformes fecales (Thomas et al., 2009). Esto indica que hay elementos de la célula de bioretención aparte del micelio, que fueron en parte responsables de la reducción en la cantidad de coliformes fecales.

Además su valor Cf/Vf fue muy bajo (0,0877) lo que indica que el tiempo de contacto entre el agua y el medio debió ser mucho más elevado que en los otros experimentos. Por lo tanto, aunque se obtuvo una reducción alta de coliformes fecales, se recomienda tratar con una cantidad mayor de especies la célula de bioretención, notablemente con la cepa de *T. versicolor* que se usó en este experimento, y posiblemente también añadiendo los suplementos nutricionales al medio donde creció el micelio.

Pero a pesar del buen desempeño de la célula de bioretención en la remoción de coliformes fecales, la ausencia de coliformes fecales no significa la ausencia de cualquier tipo de patógeno, especialmente de virus (Mcnabb y Keeley, 1977), por esto sería recomendable realizar pruebas con aguas contaminadas con desperdicios de granjas ganaderas y/o escomentía urbana antes de implementar esta tecnología en vivo.

6.4.2. EVALUACIÓN DE LA POSIBILIDAD DE MICROFILTROS CON MÚLTIPLES HONGOS

Thomas et al. (2009) sugirieron otra posible mejora a la micofiltración: la variación de especies de hongos que componen el micelio del micofiltro. Como se ha visto en varios estudios, las distintas especies de hongos tienen acción antibiótica contra diversas especies de bacterias (Yamaç y Bilgili, 2006) y contra distintos microorganismos (Barron, 1992). Por esta razón se podría tratar de realizar micofiltración con varias especies presentes en el

mismo micofiltro o en micofiltros sucesivos como los que se usaron en el estudio de Flatt (2013). Esto sería particularmente beneficioso in vivo ya que permitiría controlar o reducir las poblaciones de una mayor gama de microorganismos. Además, el uso de varias especies de hongos permitiría evitar o retardar el desarrollo de potenciales resistencias a los compuestos antibióticos secretados por el micelio. Esto sería posible ya que la probabilidad de que un microorganismo desarrolle resistencia simultáneamente a varios compuestos antibióticos es mucho menor a que desarrolle resistencia a solo uno de estos.

Sin embargo, también podrían surgir inconvenientes al poner varias especies de hongos en la misma célula de bioretención o micofiltro. Estos estarían relacionados a la posible competencia entre las distintas especies de micelio, sobre todo considerando que, en casos de estrés alimenticio por falta de nitrógeno, el micelio puede recurrir a consumir esporas o hifas de otras especies de hongos (Barron, 1992). En todo caso, se recomienda realizar experimentación comparando micofiltración con micofiltros que contengan varias especies de hongos simultáneas en contraposición a micofiltros de las mismas propiedades y dimensiones que contengan solo una especie de hongo.

6.4.3. POTABILIZACIÓN Y OTROS USOS DE LA MICOFILTRACIÓN

El mejor resultado de la micorremediación, la célula de bioretención de Thomas et al. (2009), removía 90% de las coliformes fecales mientras que el tratamiento *T. versicolor* de este estudio obtuvo una remoción de coliformes fecales de 30,87%. Estos valores son altos considerando otros estudios de micofiltración, pero lamentablemente no son suficientes para cumplir con los estándares de agua potable actuales dictados por la OMS.

Los parámetros sobre la calidad del agua potable que tiene la OMS son muy similares a los parámetros establecidos por la Directrices australianas sobre el agua de consumo (Bartram et al., 2009). Dichas Directrices (National Health and Medical Research Council y la National Resource Management Ministerial Council, 2011) establecen que para catalogar un agua como potable y libre de contaminación fecal, no se debe encontrar ninguna presencia de coliformes fecales termotolerantes, por lo tanto de *E. coli*, en una muestra de 100 mL.

Teniendo en cuenta estos parámetros, la micofiltración y las células de bioretención no podrían ser usadas como método de potabilización en la actualidad, por lo menos sin implementar otros pasos para una eliminación completa de coliformes fecales y de otros posibles contaminantes.

Sin embargo, la micofiltración y las células de bioretención podrían tener otros usos a parte de la potabilización del agua, notablemente en la biorremediación; para reducir la cantidad de coliformes fecales liberadas a cuerpos de agua. Sin embargo, será necesario primero evaluar el posible impacto sobre el ambiente que podría tener la presencia de exudados y otros metabolitos que son secretados por el micelio. Sería interesante, como se planteó previamente, probar la cepa de *T. versicolor* de nuestro estudio en pruebas de micofiltración y micorremediación en vivo, usando agua que provenga de arroyos o ríos locales que hayan sido contaminados con materia fecal de procedencia urbana o de la industria ganadera.

Los contaminantes del agua pueden tener varios orígenes que se pueden agrupar en dos categorías: las fuentes de contaminación puntuales y las fuentes de contaminación no puntuales o difusas. Aunque existan casos difíciles de ubicar en estas dos categorías, se define a una fuente puntual como un lugar discernible y delimitado desde donde proviene la contaminación. Las fuentes puntuales de contaminación son fáciles de identificar e incluyen a tuberías, desagües, cuñetas y drenes (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993).

Las fuentes no puntuales son aquellas que tienen un origen en la escorrentía. La escorrentía es causada por agua de lluvia moviendo contaminantes dispersos en un área de tierra (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993). Los materiales contaminantes son dirigidos por la escorrentía hacia lagos, ríos, arroyos, humedales, estuarios y otras aguas costales o aguas subterráneas (Ryan y American Bar Association, 2003).

Existe un gran desafío cuando se trata de reducir las fuentes no puntuales de contaminación por su naturaleza dispersa. La principal fuente de contaminación no puntual es la agricultura y la ganadería, que afecta de diferente manera a distintos tipos de cuerpos de agua (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación,

1993). Por ejemplo, los ríos y los estuarios, tienen un problema de contaminación por presencia patógenos y nutrientes (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993). Son justamente estos contaminantes los que pueden ser eliminados o reducidos por la micofiltración y las células de biorremediación (Thomas et al., 2009).

Por un lado la contaminación puntual podría tratarse al poner células de bioretención a la salida de desagües, antes de que el agua contaminada entre en contacto con otros cuerpos de agua limpios, de manera similar a lo descrito en el trabajo de Thomas et al. (2009) o por Stamets (2005).

Por otra parte, la contaminación proveniente de fuentes no puntuales podría ser tratada al rodear las áreas de donde proviene la contaminación, con una barrera enterrada de aserrín inoculado con micelio (Stamets, 2005), aunque también se propone llevar esta idea a un siguiente nivel y crear “barreras” de bioretención empleando varios elementos de la célula de bioretención de Thomas et al. (2015) y en donde los resultados de nuestros estudios podrían ser considerados.

Existe un gran potencial para las células de bioretención, por ser un método de limpieza del agua que ocupa relativamente poco espacio, tener un bajo costo y ser fácil de construir y de usar (Flatt, 2013). Teniendo en cuenta que en el Ecuador la mayoría de las aguas servidas de origen urbano no son tratadas de ninguna forma (Reinoso, 2015), debido a los menores cuidados que se tiene en la actividad agropecuaria, es posible inferir que las aguas que son contaminadas por la agricultura y por la ganadería tampoco reciben tratamiento para eliminar sus contaminantes.

Considerando los resultados de nuestro estudio y los argumentos que se han mencionado, es apropiado considerar a la micofiltración como una potencial solución, parcial, al problema de la contaminación de los cuerpos de agua en el Ecuador.

7. CONCLUSIONES

Se determinó que, en este estudio, los micofiltros del tratamiento *T. versicolor* y *Ganoderma* sp. fueron efectivos en la remoción parcial de *E. coli* del agua.

Los micofiltros inoculados con *T. versicolor* presentaron mejores resultados, superando a los resultados de la mayoría de otros estudios de micofiltración en vitro.

Se comprobó la existencia de correlación entre el caudal y la eficacia en cada filtración. Esto indica que existe una relación entre el tiempo de contacto entre el agua contaminada y los filtros con la eficacia de filtros para remover *E. coli* del agua.

La micofiltración no es suficientemente eficaz para poder catalogar el agua filtrada por este medio como agua potable según los estándares de la OMS. Sin embargo, se puede tener en consideración a la micofiltración en otros usos, como en la biorremediación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A. y Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78(16), 1707-1718. Recuperado de <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0032-1315370>
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A. y Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 346-357. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.12196/full>
- Bartram J, Corrales L, Davison A, Deere D, Drury D, Gordon B, Howard G, Rinehold A, Stevens M. (2009) *Manual para el desarrollo de planes de seguridad del agua: metodología pormenorizada de gestión de riesgos para proveedores de agua de consumo*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Barron, G. L. (1992). Lignolytic and cellulolytic fungi as predators and parasites. *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*, 9, 311-326. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=ikJfKaz0IEEC>
- Braun, L. y Cohen, M. (2015). *Herbs and Natural Supplements, Volume 2: An Evidence-Based Guide* (Vol. 2). Elsevier Health Sciences. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=Y951BwAAQBAJ>
- Considine, D. M. y Considine G.D. (2012). *Foods and food production encyclopedia*. Doi: 10.107/978-1-4684-8511-0
- Dighton, J., Oudemans, P. y White, J. F. (Eds.). (2017). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. CRC Press. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=Qt1TjtB1hXgC>

- Emelko, M. B. (2001). Removal of *Cryptosporidium parvum* by granular media filtration (Tesis Doctoral) Universidad de Waterloo, Ontario, Canada.
- Faruque, S. M. (Ed.). (2012). *Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens: Epidemiology, Evolution and Molecular Biology*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=NyQOcHVAZawC>
- Fermor, T. R. y Wood, D. A. (1981). Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. *Microbiology*, 126(2), 377-387. Recuperado de: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/126/2/mic-126-2-377.pdf?expires=1505959449&id=id&accname=guest&checksum=14A07B316FB700A73A9DA56ED59B8EA2>
- Flatt, A. A. (2013). *Removal of Escherichia coli from stormwater using mycofiltration* (Tesis Doctoral) Washington State University, Washington, Estados Unidos.
- Flood, J., Bridge, P. D. y Holderness, M. (Eds.). (2000). *Ganoderma diseases of perennial crops*. CABI. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=0YAfLnGWeHMC>
- Gerba, C. P. y McLeod, J. S. (1976). Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Applied and environmental microbiology*, 32(1), 114-120. Recuperado de: <http://aem.asm.org/content/32/1/114.full.pdf>
- Gómez, O. (2002). *Educación para la salud*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=6u3bekI1egMC>
- Halpern, G. M. (2007). *Healing mushrooms*. Square One Publishers, Inc. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=FlrpouUh740C>
- Harris, J. P. (2012). *Degradation of harmful bacteria in simulated wastewater and stormwater runoff by the white rot fungus Pleurotus ostreatus* (Tesis Doctoral), University of Delaware, Delaware, Estados Unidos.

- Herring, A. D. (2014). *Beef cattle production systems*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=NSExBQAAQBAJ>
- Hijnen, W. A. y Medema, G. J. (2010). *Elimination of micro-organisms by water treatment processes*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=wFCAY297CqsC>
- Hranova, R. (Ed.). (2006). *Diffuse pollution of water resources: Principles and case studies in the southern African region*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=-JFdSaIO-J0C>
- Innovotech (2011). *bioFILM PATM ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY SYSTEM PROCEDURAL MANUAL*. Recuperado de:
<http://www.innovotech.ca/documents/Product-insert-v-16.0-English-Booklet.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Recuperado de:
<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Kendrick, B. (2017). *The fifth kingdom*. Hackett Publishing. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=030zDwAAQBAJ>
- Manahan, S. E. (2006). *Introducción a la química ambiental*. Recuperado de:
<https://books.google.com.ec/books?id=5NR8DIk1n68C>
- Maughan, R. J. y Murray, R. (2000). *Sports drinks: basic science and practical aspects*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=8e3LBQAAQBAJ>
- McNabb, J. F. y Keeley, J. W. (1977). *Nutrient, Bacterial, and Virus Control as Related to Ground-Water Contamination*. Recuperado de:
https://books.google.com.ec/books?id=di7_yQ5CvAQC

Mothana, R. A., Jansen, R., Jülich, W. D. y Lindequist, U. (2000). Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of natural products*, 63(3), 416-418.

National Health and Medical Research Council y National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia (2011) *Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy*. Recuperado de: https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/file/publications/nhmrc_adwg_6_version_3.3_2.pdf

Núñez De Gonzalez, M. T., Keeton, J. T., Acuff, G. R., Ringer, L. J. y Lucia, L. M. (2004). Effectiveness of acidic calcium sulfate with propionic and lactic acid and lactates as postprocessing dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* on frankfurters with or without potassium lactate and stored vacuum packaged at 4.5 C. *Journal of food protection*, 67(5), 915-921.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. (1993). *Prevención de la Contaminación del Agua por la Agricultura y Actividades Afines*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=1-uuxpntvq8C>

Packer, L., Wachtel-Galor, S., Ong, C. N. y Halliwell, B. (Eds.). (2004). *Herbal and traditional medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC Press. Recuperado de : <https://books.google.com.ec/books?id=UxBFTHxVXQwC>

Peñañiel López, J. R. (2012). *Centro de rehabilitación ecológica del Machángara* (Disertación de Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Petersen, J. H. (2013). *The kingdom of fungi*. Princeton University Press. Recuperado de : <https://books.google.com.ec/books?id=UOQGAhg13JAC>

Pitt, R., Clark, S. E. y Parmer, K. (1994). *Potential groundwater contamination from intentional and nonintentional stormwater infiltration*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=kIzoGxF9GvUC>

- Raaska, L. (1990) Production of *Lentinula edodes* mycelia in liquid media: improvement of mycelial growth by medium modification. *Mushroom Journal of the Tropics* (10), 79-92
- Reinoso, I. C. (2015). *Evaluación ambiental del río Machángara* (Disertación de Pregrado) Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Ryan, M. y American Bar Association. Section of Environment, Energy, and Resources (2003) *The Clean Water Act Handbook*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=A7-fnhYyN8wC>
- Sakagami, H., Konno, K., Kurakata, Y., Takeda, M., Sato, T., Harada, H., Ohsawa, N., Fujimaki, M. y Komatsu, N. (1990). Effects of pretreatment with PSK, a protein-bound polysaccharide, on *Escherichia coli* infection in mice. *The Showa University Journal of Medical Sciences*, 2(1), 7-10.
- Samaranayake, L. (2011). *Essential Microbiology for Dentistry E-Book*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=xanRAQAAQBAJ>
- Sanyaolu, A. A. y Alonge, O. S. (2014). The Biofiltration Potentials of a Brewery Effluent Using Two Saprophytic Fungi Species. *Annual Research & Review in Biology*, 4(24), 4004.
- Spellman, F. R. y Whiting, N. E. (2007). *Environmental management of concentrated animal feeding operations (CAFOs)*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=v1fDeiezBPc>
- Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=M9Mz99pAdXMC>
- Stamets, P. (2005). *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. New York: Random House Digital, Inc.

- Stephenson, S. L. (2010). *The kingdom fungi: The biology of mushrooms, molds, and lichens*. Timber Press. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=gSAuff5IUKoC>
- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation technology*, 17(1), 46.
- Taylor, A., Flatt, A., Beutel, M., Wolff, M., Brownson, K. y Stamets, P. (2014). Removal of *Escherichia coli* from synthetic stormwater using mycofiltration. *Ecological Engineering*, 78, 79-86.
- Thomas, S. A., Aston, L. M., Woodruff, D. L. y Cullinan, V. I. (2009). Field demonstration of mycoremediation for removal of fecal coliform bacteria and nutrients in the Dungeness watershed, Washington. Final Report. Recuperado de: <http://lshs.tamu.edu/docs/lshs/end-notes/field%20demonstrations%20of%20mycoremediation%20for%20removal%20of%20fecal%20coliform%20bacteria%20and%20nutrients.pdf>
- Umstead, R. B. (2016). Development of Fungal Bioreactors for Water Related Treatment and Disinfection Applications (Tesis doctoral) Virginia Tech, Virginia, Estados Unidos.
- Van der Perk, M. (2013). *Soil and water contamination*. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=lzQTAgAAQBAJ>
- Yamaç, M. y Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical biology*, 44(9), 660-667.

9. ANEXOS

Anexo 1. El tratamiento control con yeso

Los primeros filtros del tratamiento que se realizaron proporcionaron datos que no fueron usados en los análisis estadísticos de este trabajo. La razón para esto es las filtraciones que se realizaron con estos filtros no proporcionaron datos coherentes (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de Remoción de Unidades formadoras de Colonias según el tiempo de Filtración y el Número de veces que fue usado el filtro, Tratamiento control con Yeso.

Tratamiento	Usos del Filtro	Tiempo de filtración (Minutos)	UFC en el agua antes de la filtración	UFC en el agua después de la filtración	Remoción de UFC en %
Control con Yeso	1	10	105	47	55,24
	1	8	77	68	11,69
	1	6	73	18	75,34
	1	8	159	136	14,47
	1	5	132	100	24,24
	1	7	121	124	-2,48
	2	6	103	1420	-1278,64
	2	5	109	1256	-1052,29
	2	7	75	1024	-1265,33
	2	4	105	603	-474,29
	2	5	110	817	-642,73
	2	5	63	152	-141,27

Como se puede observar, la primera filtración con estos filtros probaba ser bastante efectiva, con un promedio de 29,74% de remoción de bacterias, un valor superior al tratamiento de *Ganoderma* sp. y casi igual al del tratamiento *T. versicolor*. Sin embargo, al usar estos mismos filtros 2 días después, en el transcurso de la filtración, la cantidad de UFC aumentaba más de ocho veces en promedio. Ambas tendencias pueden ser explicadas por la metodología usada.

En cuanto a la primera filtración, el medio que componía estos filtros era igual al medio sin inocular de los micofiltros en los componentes y las proporciones. Estos filtros

control iniciales difieren de los filtros control que fueron utilizados por la presencia de yeso. El yeso pudo causar una reducción de las UFC en la primera filtración por que éste baja el pH del medio (Raaska 1990 en Stamets, 2011) y que, por tanto, cuando se encuentra en condiciones ácidas el yeso puede tener efectos bactericidas (Nuñez de Gonzalez, Keeton, Acuff, Ringer y Lucia, 2004). Sin embargo, luego de la primera filtración la mayoría del yeso se habría ido con el agua filtrada.

Se puede explicar el aumento de coliformes fecales durante la segunda filtración por el hecho de que cada filtración se realizaba con un tiempo de espera mínimo de 2 días. Era necesario ocupar este tiempo en limpiar los materiales usados en la primera filtración y preparar los materiales para la siguiente. Como se indicó anteriormente, *E. coli* puede duplicarse cada 20 minutos (Samaranayake, 2011) por lo que, en una plataforma como el aserrín, y con la presencia de nutrientes abundantes (ya que estos no fueron consumidos por el micelio) la población bacteriana debió aumentar considerablemente y liberarse en la segunda filtración.

Aún así, estos filtros moldearon la metodología al evitar el yeso en el tratamiento control y al plantear un único uso para cada filtro control. Con esto se obtuvo un tratamiento control más independiente.

Anexo 2. Elaboración de las soluciones de 3,5 L con concentración de 100000 UFC/mL

Para obtener la concentración deseada, se utilizó el estándar de McFarland para crear una solución con una concentración de bacterias calculada.

Se tomó en cuenta que los valores del estándar McFarland son proporcionales a la cantidad de bacterias dentro de una solución, es decir, una solución de dos en el estándar de McFarland tendrá el doble de UFC que una solución de uno (Sutton, 2011). Teniendo esto en cuenta, se tomaron valores de la Tabla 5 (Innovotech, 2011) en donde se observa la relación entre la absorbancia de una solución y el estándar de McFarland para crear una curva (Figura 5).

Tabla 5. Concentración de bacterias y absorbancia de una solución según el estándar de McFarland

McFarland Standard número	0,5	1	2	3	4
Concentración de bacterias aproximada (1×10^8 UFC/mL)	1,5	3	6	9	12
Absorbancia (600nm)	0,132	0,257	0,451	0,582	0,669

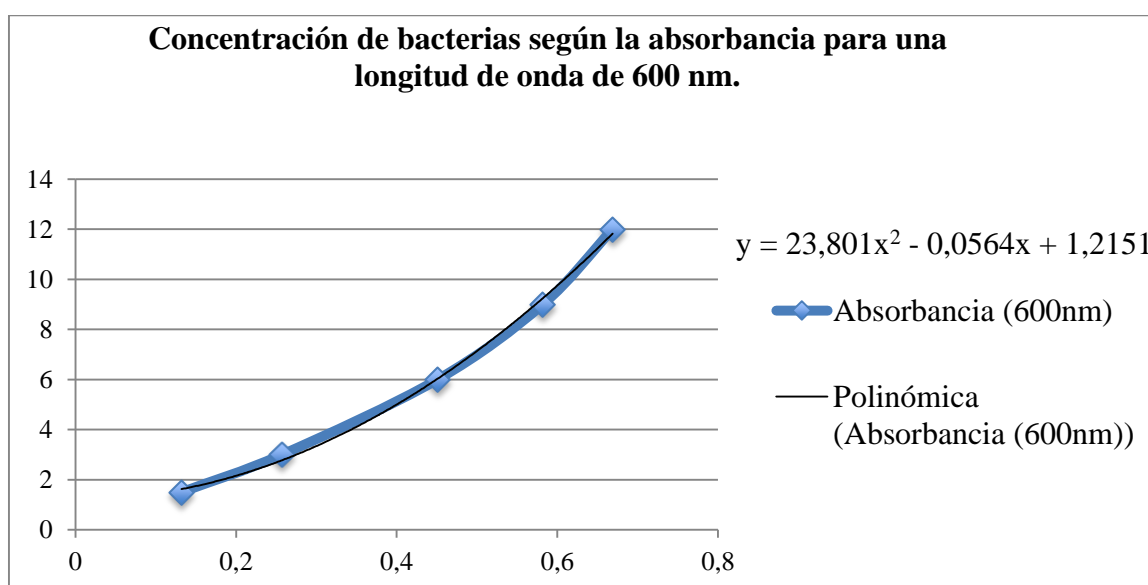


Figura 5. Concentración de bacterias en una solución de acuerdo a absorbancia para una longitud de onda de 600 nm.

A Partir de esta curva se crea una línea de tendencia que se ajusta de manera precisa y nos brinda una ecuación con la que se podrá inocular, con la ayuda de una regla de tres, los 3,5 L de solución salina a 100000 UFC/mL.

$$y = 23,801x^2 - 0,0564x + 1,2151$$

En donde “y” es la concentración de bacterias presentes en la solución, y “x” representa la absorbancia de la solución a 600 nm.

Esta ecuación permite calcular la concentración de bacterias presentes en la solución a partir de la absorbancia de la solución. De esta manera se pudo preparar soluciones salinas con concentraciones conocidas de *E. coli* equivalentes a 100000 UFC/mL.

Se obtuvieron los valores de absorbancia con un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60S calibrado en el modo “cell growth” a una longitud de onda de 600 nm; la misma longitud de onda es también utilizada para el conteo de células en los estándares de McFarland. Se calibró el espectrofotómetro con caldo Müeller-Hinton puro y estéril.

Anexo 3. Tabla 6. Promedio de porcentaje de remoción de UFC y valores Cf/Vf de varios estudios sobre micofiltración

Tabla 6. Promedio de porcentaje de remoción de UFC y valores Cf/Vf de varios estudios sobre micofiltración

Estudio de origen	Tratamiento	Valor Cf/Vf (en mL/min/L)	Promedio de Remoción de UFC (%)
Valencia (2017)	Control	502,27	1,37
Valencia (2017)	<i>T. versicolor</i>	54,90	30,87
Valencia (2017)	<i>Ganoderma</i> sp.	94,06	9,19
Flatt (2013)	<i>Stropharia rugosoannulata</i> “no vigor tested” Caudal bajo. Filtro único (19 L).	26,46	24
Rogers (2012)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	277,42	19,5
Taylor et al. (2014)	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	26,88	22
Thomas et al. (2009)	Célula de bioretención	0,0877	90

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, David Valencia Ponce, con CC. 1713585477, autor del trabajo de graduación intitulado “Biorremediación de aguas contaminadas con *Escherichia coli* usando micofiltros de *Trametes versicolor* y *Ganoderma* sp.”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 16 de octubre de 2017.

David Valencia Ponce

CC: 1713585477