



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS GEOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AMBIENTAL

**"INVENTARIO DE PLANTAS RECOMENDADAS PARA  
FITORREMEDIACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUAS  
NEGRAS".**

**Autor:**

Robert José León Suárez.

**Director:**

Ph.D. Beatríz Pernía Santos

**Co-Directora:**

MSc. Rosa Siguencia

GUAYAQUIL, 2017





**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS GEOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AMBIENTAL

**"INVENTARIO DE PLANTAS RECOMENDADAS PARA  
FITORREMEDIACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN AGUAS  
NEGRAS".**

**Autor:**

Robert José León Suárez.

**Director:**

Ph.D. Beatriz Pernía Santos

**Co-Directora:**

MSc. Rosa Siguencia

GUAYAQUIL, 2017

## **© DERECHOS DE AUTOR**

Según la ley de propiedad intelectual, Art. 5: “El derecho de autor nace y se protege por el solo hecho de la creación de la obra, independientemente de su mérito, destino o modo de expresión... El reconocimiento de los derechos de autor y de los derechos conexos no está sometido a registro, depósito, ni al cumplimiento de formalidad alguna”.

**ROBERT JOSÉ LEÓN SUÁREZ**

**2016**

## **DIRECTOR DE TESIS**

En calidad de Tutor de esta Tesis Certifico que el presente trabajo ha sido elaborado por el señor Robert José León Suarez, por lo que autorizo su presentación.

**Ph-D Beatríz Pernía Santos**

**Tutora de Tesis**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS GEOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

CALIFICACIÓN QUE OTROGA EL TRIBUNAL QUE RECIBE LA  
SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DEL TRABAJO INDIVIDUAL DE TITULACIÓN:  
TESIS DENOMINADO **"INVENTARIO DE PLANTAS RECOMENDADAS  
PARA FITORREMEDIACION DE COLIFORMES FECALES EN AGUAS  
NEGRAS"**

AUTOR: **ROBERT JOSÉ LEÓN SUÁREZ**

PREVIO A OBTENER EL TITULO DE **INGENIERO AMBIENTAL**

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

**CALIFICACIÓN (Números y Letras)**

Ing. Glgo. Victor Narváez B., M.Sc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

Ph.D. Wilson Pozo Guerrero  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

M.Sc. Williams Sánchez Arizaga  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DEL TRABAJO INDIVIDUAL DE TITULACIÓN  
REALIZADA EN EL AUDITORIUM DE LA FACULTAD, EL DÍA

Abg. Jorge Solórzano Cabezas  
**SECRETARIO DE LA FACULTAD**

## DEDICATORIA

De mí, Por mí y para mí

*Robert José León Suárez 24 años.*

*Scout y demás.*

*En memoria de mi hermano; que esta humilde obra perdure en el tiempo, en la nube y lleve nuestras esencias con sí.*

*N. León Bajaña.*

K.H.M.P.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que financiaron esta obra, y por su sacrificio durante mis 18 años de estudio desde la escuela hasta la universidad.

-José Vicente León Bermeo

-Catalina Cecibel Suárez Muñoz

A mis dos queridas tutoras

-Beatríz Pernía

-Rosa Siguencia

A las investigadoras del IIRN por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis

-Mariuxi Mero

-Genoveva Torres

-María Fernanda Arroyo

A mi asistente en el laboratorio Javier Franco

A mis amigos Jorge Talavaria, Belén León

En especial a mis esposas Nadia Franco, Paulette del Valle y

Cindy Campuzano

Que me han soportado estos años y dado su amistad

Y por último a los intelectuales que alargaron mi carrera.

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue encontrar plantas acuáticas con potencial de fitorremediación de agua contaminada con *E. coli* y coliformes totales. Para ello, se realizaron muestreos en Río Guayas, Río Daule y Estero Cedeño, donde se seleccionaron las especies: *Azolla caroliniana* Willd., *Eichhornia crassipes* Solms 1883, *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl. y *Lemna minor*. (Control positivo). Las plantas se reprodujeron in vitro y se realizaron bioensayos para verificar su capacidad de remover *E. coli* y coliformes. Los ensayos se realizaron por triplicado en 0,5 L de agua con fertilizante y se inoculó una cepa de referencia *E. coli* ATCC25922. Como control negativo se inoculó la bacteria sin plantas y control positivo con la planta *Lemna* sp. Después de 7 días se determinó la carga bacteriana remanente. Para los análisis de *E. coli* se utilizó la técnica ISO 9308-1. Se encontró un porcentaje de eliminación de *E. coli* de 99% para *A. caroliniana*, *E. crassipes* y *Lemna* sp. y de 100% para *P. stratiotes* y *S. auriculata*. Se realizaron ensayos con aguas negras en los cuales *S. auriculata* = *A. caroliniana* lograron el 100% de remoción de las coliformes y *E. coli* el resto de plantas tuvieron niveles menores de eficiencia en forma descendente tenemos *C. thalictroides*, *P. stratiotes*, *L. minor*, *S. intermedia*, *E. crassipes*.

Por lo que el inventario de plantas con la capacidad de tratar aguas negras estaría conformado por:

- *Spirodela intermedia* W. D. J. Koch
- *Salvinia auriculata* Aubl.
- *Pistia stratiotes* L.
- *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.
- *Azolla caroliniana* Willd
- *Lemna minor* L.

**Palabras claves:** Potencial de fitorremediación, Remoción, *Escherichia coli*, Coliformes totales.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to find aquatic plants with phytoremediation potential of contaminated water with *E. coli* and total coliforms. For this purpose, the following species were sampled: *Azolla caroliniana* Willd., *Eichhornia crassipes* Solms 1883, *Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl., *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn And *Lemna* sp. (Positive control). The plants were reproduced in vitro and bioassays were performed to verify their ability to remove *E. coli*. Assays were run by triplicate in 0.5 L of water with fertilizer and an *E. coli* ATCC25922 reference strain was inoculated. As negative control the bacteria without plants and positive control were inoculated with the plant *L. minor*. After 7 days, the remaining bacterial load was determined. For the analyze of *E. coli*, the technique ISO 9308-1 was used. A percentage of 99% *E. coli* removal was found for *A. caroliniana*, *E. crassipes*, *C. thalictroides* (L.) Brongn and *Lemna minor*. And 100% for *P. stratiotes* and *S. auriculata*. Subsequent waste water tests were performed in which *S. auriculata* = *A. caroliniana* achieved 100% removal of the coliforms and the remaining lower efficiency levels successively > *C. thalictroides*> *P. Stratiotes*> *L. minor*> *S. intermedia*> *E. Crassipes*.

So the inventory of plants with the capacity to treat sewage would be made up of:

- *Spirodela intermedia* W. D. J. Koch
- *Salvinia auriculata* Aubl.
- *Pistia stratiotes* L.
- *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.
- *Azolla caroliniana* Willd
- *Lemna minor* L.

**Key words:** Phytoremediation potential, Removal, Escherichia coli, Total coliforms.



## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	3
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.3. HIPÓTESIS.....	5
1.4. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
2. MARCO TEORICO.....	6
2.1. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS.....	6
2.1.1. CONTAMINACIÓN NATURAL.....	6
2.1.2. CONTAMINACIÓN ANTROPOGENICA.....	6
2.2. CONTAMINACIÓN POR AGUAS NEGRAS ECUADOR.....	7
2.3. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR AGUAS NEGRAS.....	10
2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	11
2.5. COLIFORMES FECALES.....	13
2.6. COLIFORMES TOTALES.....	14
2.7. FITORREMEDIACIÓN.....	16
2.8. MECANISMOS QUE INFLUYEN EN LA MUERTE DE BACTERIAS PATÓGENAS EN UN SISTEMA.....	17
2.8.2. COMPOSICIÓN DEL AGUA.....	17
2.8.3. REGIMEN HIDRICO.....	17
2.8.4. TIEMPO DE RETENCIÓN.....	17
2.8.5. OXIGENO DISUELTO.....	18
2.8.6. RADIACIÓN SOLAR.....	18

2.8.7.	pH.....	18
2.9.	FITORREMEDIACIÓN DE AGUAS NEGRAS .....	19
2.10.	DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO .....	20
2.10.1.	<i>Spirodela intermedia</i> W. D. J. KOCH .....	20
2.10.2.	<i>Salvinia auriculata</i> AUBL.....	21
2.10.3.	<i>Pistia stratiotes</i> L.....	22
2.10.4.	<i>Eichhornia crassipes</i> (MART.) SOLMS .....	23
2.10.5.	<i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) BRONGN.....	24
2.10.6.	<i>Azolla caroliniana</i> WILLD. ....	25
2.10.7.	<i>Lemna minor</i> L. ....	26
3.	MATERIALES Y METODOS .....	27
3.1.	Mapas y coordenadas UTM.....	27
3.2.	Salidas de Campo.....	29
3.3.	Muestras de aguas negras.....	29
3.4.	Reproducción de las plantas.....	31
3.5.	Bioensayo 1 .....	31
3.6.	Bioensayo 2 .....	32
3.7.	Bioensayo 3 .....	32
3.8.	Análisis de laboratorio.....	33
3.8.1.	Agar Chromocult (CCA).....	33
3.8.2.	Agua de peptona (PW).....	33
3.8.2.1.	Modo de acción.....	33
3.9.	Pruebas confirmatorias .....	35
3.9.1.	Tinción Kovacs Indol .....	35
3.9.2.	Tinción de Gram.....	35

3.9.3. Motilidad.....	36
3.9.4. Prueba de Oxidasa.....	36
4. RESULTADOS .....	38
4.1. Plantas seleccionadas .....	38
4.2. Ensayos de fitorremediación sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	39
4.3. Ensayos de fitorremediación sobre coliformes totales .....	41
4.4. Efectos sobre los parámetros físico-químicos.....	42
4.5. Ensayos de fitorremediación en aguas negras .....	46
4.6. Efecto del tratamiento sobre parámetros físico-químicos .....	49
4.7. Eficiencia de las plantas con menor potencial con otras de mayor potencial. ....	51
5. DISCUSIÓN.....	53
5.1. Posibles mecanismos de eliminación.....	55
6. CONCLUSIONES.....	61
7. BIBLIOGRAFÍA.....	62
8. ANEXOS.....	68
8.1. Pruebas estadísticas y test de normalidad de Anderson - Dailing. ....	69
8.2. Pruebas no paramétricas (Pruebas de comparación).....	72
8.3. Certificados: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, Chromocult, Peptona .....	80
8.4. Registro Fotográfico.....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Sintomatología y epidemiología de los distintos patotipos de <i>E. coli</i> ..	12
Tabla 2 Abreviaturas de los tipos patológicos de <i>Escherichia coli</i> .....	13
Tabla 3 Coliformes por la evolución de su definición .....	14
Tabla 4 Distribución del género coliforme entre heces humanas y animal .....	15
Tabla 5. Especies de plantas acuáticas con potencial de fitorremediación de <i>E. coli</i> y coliformes totales .....	38
Tabla 6 Lugares de colecta de las macrófitas .....	39
Tabla 7 Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre el pH y la temperatura. Los resultados se muestran como medias± desviación estándar. * Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) .....	43
Tabla 8 Análisis de correlación de Spearman entre los parámetros del bioensayo .....	44
Tabla 9 Evolución del pH durante el ensayo con aguas negras .....	49
Tabla 10 Sólidos disueltos totales durante el ensayo con aguas negras .....	50
Tabla 11 Temperatura durante el ensayo con aguas negras .....	50
Tabla 12 pH del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras .....	52
Tabla 13 Sólidos disueltos totales del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras .....	52
Tabla 14 Temperatura del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras .....	52
Tabla 15 Comparación de la eficiencia de la remoción de bacterias por las plantas en estudio frente a otras especies descritas .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Spirodela intermedia</i> .....	20
Figura 2 <i>Salvinia auriculata</i> .....	21
Figura 3 <i>Pistia stratiotes</i> .....	22
Figura 4 <i>Eichhornia crassipes</i> .....	23
Figura 5 <i>Thalictroides ceratopteris</i> .....	24
Figura 6 <i>Azolla caroliniana</i> .....	25
Figura 7 <i>Lemna minor</i> .....	26
Figura 8 Puntos de colecta de <i>L. minor</i> , <i>A. caroliniana</i> y <i>S. auriculata</i> .....	28
Figura 9 Lugar de colecta de <i>P. stratiotes</i> y <i>E. crassipes</i> .....	28
Figura 10 Lugar de colecta de <i>S. intermedia</i> .....	29
Figura 11 Puntos de colecta de aguas negras .....	30
Figura 12 Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de <i>E. coli</i> . Los resultados se muestran como medias± desviación estándar. * Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p<0,05$ ).....	40
Figura 13 Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de Coliformes totales. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. * Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Anova de una vía y test a posteriori de Tukey ( $p<0,05$ ).....	41
Figura 14 Efecto del bioensayo sobre los sólidos disueltos totales (SDT). Los resultados se muestran como medias± desviación estándar. * Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p<0,05$ ). .....	42
Figura 15 Dendrograma de correlación entre los parámetros del bioensayo ...	45

Figura 16 Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de <i>E. coli</i> en las aguas negras. ▪ Indica el porcentaje de eficiencia de cada planta en la eliminación de <i>E. coli</i> . .....	46
Figura 17 Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de Coliformes totales en las aguas negras. ▪ Indica el porcentaje de eficiencia de cada planta en la eliminación de Coliformes totales.....	47
Figura 18 Recipiente de control .....	48
Figura 19 Placa con crecimiento bacteriano cultivo de <i>control</i> .....	48
Figura 20 Nulo crecimiento bacteriano cultivo de <i>S.auriculata</i> .....	48
Figura 21 Recipiente con <i>S. auriculata</i> .....	48
Figura 22 Recipiente con <i>E. crassipes</i> .....	48
Figura 23 Placa con poco crecimiento bacteriano cultivo de <i>E. crassipes</i> .....	48
Figura 24 Evolución del pH durante los 7 días del ensayo con aguas negras .	49
Figura 25 Efecto del bioensayo en la asociación de <i>E. crassipes</i> con <i>P. stratiotes</i> y <i>S. auriculata</i> sobre la concentración de Coliformes totales. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. * Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Anova de una vía y Kruskal Wallis ( $p<0,050$ ).....	51
Figura 26 Frotis del rizoma de <i>E. crassipes</i> . .....	57
Figura 27 Biofilm polisacárido con bacterias con forma bacilar.....	57

## 1. INTRODUCCIÓN

El agua contaminada representa uno de los principales causantes de enfermedades gastrointestinales y la bacteria *E. coli* causa el 40% de las diarreas en niños. Ecuador tiene una deuda muy alta en cuanto a los esfuerzos que se realizan para mejorar la calidad del agua, especialmente del agua que se vierte sin tratamiento producto de actividades domésticas, las consecuencias de la contaminación del agua se reflejan en los altos niveles de parasitosis, enfermedades diarreicas, y pérdida de la biodiversidad acuática relacionadas a la mala calidad del agua (Tratagua Dalag S.A., 2010).

Las aguas residuales son generadas por residencias, industrias e instituciones y estas pueden ser tratadas dentro del sitio en el cual son generadas. Los esfuerzos para recolectar y tratar las aguas residuales domésticas de la descarga están típicamente sujetos a regulaciones y estándares locales.

El servicio de agua es intermitente en la mitad de los centros urbanos. La presión de agua está muy por debajo de la norma, especialmente en barrios marginales. El 30% de los centros urbanos no tienen tratamiento de agua "potable", y un 92% de aguas servidas se descargan sin ningún tratamiento en las zonas rurales, según un estudio de sostenibilidad realizado en 2004, 38% de los sistemas han colapsados, el 20% presenta deterioro grave, 29% leve y solamente 13% son considerados sostenibles (El Universo, 2009).

Como consecuencia del poco o nulo tratamiento de las aguas servidas antes de ser vertidas a ríos y demás cuerpos acuáticos se ha generado contaminación por metales pesados y bacterias coliformes. La denominación genérica coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua.

Tradicionalmente se han considerado a las coliformes como indicadores de contaminación fecal y dentro de los coliformes encontramos a la *Escherichia coli* ya que habitan en forma abundante en el tracto gastrointestinal tanto humano como de animales, razón por la cual su presencia en un cuerpo

acuático nos indica un grado de contaminación de origen fecal por tanto, con su ausencia podría considerarse que el agua es bacteriológicamente segura; asimismo, su número en el agua es directamente proporcional al grado de contaminación fecal (The Environment Agency, 2002).

Para el tratamiento de estas aguas contaminadas por coliformes existen tratamientos tradicionales tales como: filtración UV, cloración, ozono, dióxido de titanio entre otras, que por su alto costo no son viables en poblaciones rurales por lo que se busca alternativas más económicas y que sean eco-amigables. La fitorremediación representa una tecnología alternativa, sustentable, amigable con el ambiente y de bajo costo para la restauración de ambientes y efluentes contaminados (Lenntech, 2016).

La fitorremediación puede definirse como una tecnología sustentable que se basa en el uso de plantas para reducir *in situ* o *ex situ*, la concentración o peligrosidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos de suelos, sedimentos, agua, y aire. Para ello se utilizan plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, reducir, mineralizar, volatilizar, estabilizar, degradar o transformar dichas sustancias a formas menos tóxicas (Paulson, 2014).

Por lo que este estudio se orienta a la búsqueda de las especies de plantas óptimas para el tratamiento de aguas enfocándose en el parámetro de eliminación de coliformes totales y *E. coli*.

## 1.1. ANTECEDENTES.

En Ecuador muchas comunidades dependen del agua superficial no tratada como su fuente primaria de agua potable Rao et al. (2015). Lamentablemente muchas veces el agua superficial es el sumidero de aguas negras que contienen residuos humanos de orina, heces y una gran carga bacteriana, en especial de coliformes fecales.

El agua contaminada representa uno de los principales causantes de enfermedades gastrointestinales Levy, Nelson, Hubbard, & Eisenberg, (2012) y en los países en desarrollo *Escherichia coli* causa el 40% de las diarreas en niños menores de 5 años. Se calcula que anualmente mueren 2,5 millones de niños por diarreas a nivel mundial. En el Noreste de Ecuador la prevalencia de *E. coli* es 8 personas infectadas/1,000 personas Bhavnani et al. (2016) Bhavnani et al. (2016). En la Provincia de Esmeralda se ha reportado la presencia de *E. coli* en los ríos Onzole (1248 MNP/100 mL), Cayapas (474 MNP/100 mL), Santiago (2420 MNP/100 mL) (Rao et al., 2015).

También se han realizado muestreos en las aguas del río Daule de donde Guayaquil se provee el agua para potabilizar y se determinó que sus aguas solo pueden ser consumidas mediante tratamiento convencional y no son aptas para recreación ni natación ya que presentan contaminación por coliformes, por todos los centros urbanos que se encuentran a sus riberas que descargan sin tratamiento sus aguas negras al río, llegando a concentraciones de 1600 NMP/100 mL (El Universo, 2013).

## **1.2. JUSTIFICACIÓN.**

Ecuador tiene una deuda muy alta en cuanto a los esfuerzos que se realizan para mejorar la calidad del agua, especialmente del agua que se vierte sin tratamiento producto de actividades domésticas, las consecuencias de la contaminación del agua se reflejan en los altos niveles de parasitosis, enfermedades diarreicas, y pérdida de la biodiversidad acuática relacionadas a la mala calidad del agua UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, (2009). El servicio de agua es intermitente en la mitad de los centros urbanos.

Es por ello, que este estudio se orienta a la búsqueda de las especies con potencial para el tratamiento de aguas enfocándose en el parámetro de eliminación de coliformes fecales. Dentro de los tratamientos que se han propuesto para saneamiento de las aguas, los sistemas con plantas acuáticas representan una solución económica y eficiente (Valderrama, Campos, Velandia, & Zapata, 1987).

Por lo tanto la determinación de nuevas especies vegetales con potencial de fitoremediación de coliformes fecales sería de gran impacto para el tratamiento de aguas ya que esto implicaría reducción de costos en la compra de químicos para el tratamiento de las mismas reduciendo así el impacto ambiental que causa el no tratamiento de las aguas negras y el impacto medio que causa el tratamiento de las mismas por los químicos que conlleva esa labor y además sería una solución para la potabilización del agua en zonas rurales.

### **1.3. HIPÓTESIS.**

Existen especies vegetales capaces de eliminar coliformes fecales de las aguas servidas

### **1.4. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un inventario de especies vegetales idóneas para la fitorremediación de Coliformes fecales (*Escherichia coli*) en aguas negras.

### **1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Seleccionar en campo plantas con potencial para eliminar Coliformes fecales de aguas residuales.
- b) Realizar ensayos de laboratorio con las plantas seleccionadas para verificar su capacidad de eliminar *E. coli* ATCC 25922.
- c) Estudiar la eficiencia de las plantas en estudio en la eliminación de Coliformes totales y *E. coli* en aguas negras.
- d) Realizar un inventario de plantas con la capacidad de tratar aguas negras.
- e) Probar la eficiencia de las plantas con menor potencial con otras de mayor potencial, asociándolas y evaluar su sinergia, en ensayos in-vitro, utilizando aguas negras.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS

Según Academia Nacional de Ciencias, (2007) dentro de la contaminación de aguas podemos indicar dos grupos:

- Contaminación Natural
- Contaminación Artificial

2.1.1. CONTAMINACIÓN NATURAL.- Es cuando se origina por causas naturales ya sea por índole animal, vegetal, o mineral este último ocurre cuando el cuerpo hídrico atraviesa un determinado sustrato o afloramiento mineral (Academia Nacional de Ciencias, 2007).

2.1.2. CONTAMINACIÓN ANTROPOGENICA. Es la que se origina directa o indirectamente por la acción del hombre en el medio ambiente; dentro de esta contaminación nos enfocaremos en la orgánica, fundamentalmente esta contaminación proviene de descargas de las aguas residuales municipales sin previo tratamiento a los cuerpos hídricos ya sean ríos, mares, lagos o lagunas. Se caracteriza por tener una alta carga orgánica compuesta por nutrientes como nitrógeno, fosforo y potasio en mayor medida y una amplia variedad de microorganismos patógenos (Enciclopedia, 2016).

Entre la amplia variedad de agentes patógenos podemos encontrar notoriedad del grupo de bacterias perteneciente a los Coliformes en este grupo se juntan todas las bacterias entéricas que poseen características bioquímicas, como ser aerobias o anaerobias facultativas, bacilos gran negativos y no ser esporógenas (Sakurai & CEPIS, 1983).

El grupo de las bacterias coliformes poseen forma de bacilos, son gram negativas, fermentadoras de la lactosa con producción de ácido y gas. Dentro de este grupo están los géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* (Sakurai & CEPIS, 1983).

Por lo que cualquiera de estos géneros podría ser usado como bioindicadores en los análisis de contaminación de agua por descargas de aguas negras.

## **2.2. CONTAMINACIÓN POR AGUAS NEGRAS ECUADOR.**

Siempre se han limitado muchos trabajos de manejo de cuencas hidrográficas exclusivamente al aprovisionamiento del agua, es decir, se han centrado en la potabilización y provisión del agua para las diferentes actividades; pero en lo concerniente al tratamiento previo a la descarga, ya que se vierten aguas sin tratamiento alguno a cuerpos hídricos producto de actividades industriales, domésticas y agropecuarias (Ecuador, 2012).

En Ecuador no se disponen de datos actualizados sobre la contaminación de los recursos hídricos en el país, los pocos datos existentes por esfuerzos puntuales realizados por Universidades y ONGs, nos demuestran altos grados de contaminación orgánica relacionada a la presencia de coliformes fecales y sedimentos provenientes de áreas deforestadas. La falta de información no es justificación para la inacción por parte de las autoridades para tomar correctivos pertinentes; Quito, es un ejemplo, ya que no posee ningún sistema de tratamiento de aguas residuales de importancia, como consecuencia, el deterioro de la calidad del agua se refleja en la contaminación que registran en los ríos Machángara, Guayllabamba y la quebrada de Río Grande (Puente, 2015).

Todos los cuerpos hídricos de la ciudad de Quito presentan altos niveles de contaminación, concentrándose en su mayoría en los ríos y quebradas del sur de la ciudad y algunos sobrepasan ampliamente los rangos permitidos de las normas nacionales para que el agua sea considerada potable o para que pueda ser usada para riego o actividades de recreación.

En la zona de la quebrada de Río Grande, está uno de los sitios con mayor contaminación, de acuerdo con los datos del último año, el aire llega a tener olor a sulfuro de hidrógeno (El Universo, 2013). Esto ha causado el aumento de vectores transmisores de enfermedades que se generan en afluencia alrededor del río.

A estos sitios contaminados se suman el Camal Metropolitano, Guajaló, La Recoleta, El Censo, Las Orquídeas y la Quebrada Ortega; el último estudio realizado por la Empresa de Agua Potable y Saneamiento se recogió 2 910 muestras en ríos y sus afluentes, la (DBO) fue uno de los parámetros analizados ya que corresponde como indicador de contaminación orgánica en descomposición (Puente, 2015).

Las zonas que acumularon un mayor índice de DBO fueron la quebrada Ortega, el Camal Metropolitano, La Recoleta y El Recreo, en este último lugar la DBO llegó a 268 mg/L, una cifra alta si se toma en cuenta que en un río sano debería rondar en un valor nominal de los 15 mg/L y la DQO en los ríos Machángara y Monjas es bastante elevada, en la quebrada de Río Grande sobrepasa 521 mg/L; en comparación a muestreos realizados norte de la ciudad, no pasa los 20 mg/l (Puente, 2015).

El análisis de coliformes fecales también fue parte de los parámetros investigados como indicadores de contaminación de heces humanas los mismos que alcanzaron un nivel de  $24 \times 10^6$  UFC/100 mL, en muchos sectores de la ciudad las descargas son directamente a los cuerpos de agua convirtiéndose así en el problema principal de la ciudad capitalina. En el distrito metropolitano Se han descrito tres factores causantes de que haya altos índices de contaminación al sur de la ciudad: la densidad poblacional, el poco tiempo que pasan las aguas en las alcantarillas antes de desembocar en los cauces naturales y la impermeabilidad del suelo, que impide filtrar agua de manera natural a los ríos (El Universo, 2013; Puente, 2015).

En contraposición a Quito que posee alcantarillado y descarga directamente a sus cuerpos acuáticos muchas áreas de Guayaquil carecen de sistemas de alcantarillado y de tratamiento de aguas servidas por lo que las consecuencias de la contaminación del agua se reflejan en los altos índices de enfermedades del tracto gastrointestinal como parasitosis, enfermedades diarreicas, y pérdida de la biota acuática.

Los altos niveles de contaminación del agua ocasiona que los cuerpos hídricos a pesar de tener corrientes en su cauce, el agua no pueda ser utilizada para riego, ganadería o consumo humano; produciendo una escasez de agua limitada por la calidad más no por la cantidad, ocasionando una sobre presión por la demanda del recurso sobre los páramos, bosques húmedos, lluviosos y ecosistemas de altura donde se recoge y genera el agua para las cuencas bajas de los distintos sistemas hidrográficos del país tanto de la costa y oriente; y así poder suplir de agua a las poblaciones locales de las respectivas cuencas (Castrillo, Pernia, De Sousa, & Reyes, 2012).

Se piensa de forma errónea que al desechar los distintos tipos de contaminantes a un río este se los llevará en su cauce y no será más un problema para la población local que vertió los desechos; esto explica y desentraña una de las razones por la que históricamente los poblados se han asentado en las orillas de los ríos para poder aprovisionarse de agua de calidad río arriba y descargar los residuos río debajo de los asentamientos; pero debemos tener en cuenta que el agua contaminada que fluye por los ríos termina en las zonas estuarinas y mares de donde provienen los recursos íctios que consumimos como especie (Castrillo et al., 2012).

Por lo tanto, toda la contaminación que se provoca en las cuencas altas de los ríos afectará tanto a las poblaciones que se encuentran en cuencas mucho más bajas, así como también a nuestras fuentes de alimento por lo que se debe generar un compromiso de los habitantes de las cuencas altas para las cuencas bajas y desembocaduras; y así mitigar las actividades que contaminan los ríos y reducir la contaminación del agua.

### **2.3. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR AGUAS NEGRAS**

Uno de los principales componentes que debe cumplir una bacteria para poder ser usada como bioindicadora en casos de contaminación de cuerpos hídricos por aguas negras, es que debe de estar presente de forma natural en la excreta de la mayor cantidad de individuos tanto a nivel humano como animal (mamíferos); también estar presente en las aguas negras que puedan ser aisladas y detectadas, y que no deben ser encontradas habitando cuerpos hídricos libres de contaminación (The Environment Agency, 2002).

Lo ideal debería ser que las bacterias sean 100% de origen fecal estando presente en todos los individuos, no solo estar presente en individuos afectados con alguna patología debido a la presencia de cierta bacteria.

No todos los géneros de bacterias cumplen satisfactoriamente esta premisa a excepción de la *E. coli* y en menor medida las catalogadas como coliformes totales; ya que la presencia de estos microorganismos en cuerpos de agua conlleva a presumir inmediatamente que el afluente fue contaminado con alguna descarga de origen fecal (aguas negras) (The Environment Agency, 2002).

#### **2.4. *Escherichia coli***

Esta bacteria es uno de los habitantes de mayor prevalencia en los tractos gastrointestinales tanto de los humanos como del resto de mamíferos y aves. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; como habitante pro-biótico del tracto gastrointestinal cohabita en una relación semi simbiótica con su huésped, raramente causa alguna enfermedad, pero hay otras variedades de *E. coli* que pueden causar un gran número de enfermedades (Allocati, Masulli, Alexeyev, & Di Ilio, 2013).

Como microorganismo en una relación cuasi simbiótica con su huésped forma parte del microbioma intestinal de mamíferos pero también puede ser encontrada formando parte del microbioma intestinal de reptiles, aves y peces; así como también puede ser encontrada en alimentos, plantas, tierra y agua (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013).

A más de ser considera una relación cuasi simbiótica la que posee la *E. coli* con su huésped, estaría mejor encasillada considerando esta relación como una relación mutualista. Los tractos gastrointestinales de los mamíferos son usados como albergue por la *E. coli* y esta presta su servicio ayudando a metabolizar la lactosa. La población de *E. coli* puede variar de acuerdo con la dieta, salud, la exposición a diversos antibióticos y también a las interacciones con el resto del microbioma intestinal y viroma del huésped (Kasarjian, Iida, & Ryu, 2003; Shoaie et al., 2013; Virgin, 2014).

También podemos señalar que el cuerpo humano reconoce a la relación mutualista con la *E. coli* como pro-biótica ya que el tracto intestinal secreta inmunoglobulina A la cual facilita la creación de bio-películas en el tracto por parte de la *E. coli* (Bollinger et al., 2003).

Mientras la *E. coli* mantenga una relación mutualista con su huésped este le brindará cobijo proveyéndola de lo necesario para vivir y esta le brinda en beneficio a su huésped la producción de Vitamina B 12, Vitamina K y ayudarlo en la digestión de la lactosa (Blount, 2015).

Las variedades de *E. coli* se clasifican según su factor de virulencia basándose en la sintomatología clínica de las variantes patogénicas por lo que existen al

menos 7 variantes patogénicas para la *E. coli* entérica, mientras 3 variantes de *E. coli* son extraintestinales patogénicas (Allocati et al., 2013).

Podemos encontrar que entre la sintomatología más común de infección por *E. coli* es la diarrea aguda, fiebre y dolor abdominal la que afecta comúnmente a los niños menores de 2 años y dentro de los patotipos más agresivos tenemos (EIEC) *Escherichia coli* entero invasiva que va con síntomas como la diarrea con sangre y cuadros disentéricos y otras más que podemos ver en la **Tabla 1** y la definición de las abreviaturas en la **Tabla 2**.

**Tabla 1** Sintomatología y epidemiología de los distintos patotipos de *E. coli*

<b><i>Escherichia coli</i> Variantes Patogénicas</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Síntomas clínicos</b>	<b>Epidemiología</b>	<b>Serogrupos y serotipos más comunes</b>	<b>Factores de patogenicidad</b>
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
EHEC	Diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre	Niños y adultos por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	STX, A/E, Intimina, pO 157
EIEC	Diarrea con moco y sangre y cuadro disentérico	Niños menores de 6 meses	O28:H, O112acH, O114:H, O152:H, 164:H, O167:H	Invasividad Plásmido de 140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vomito, fiebre baja	Niños menores de 6 meses hasta 2 años	O55, O86, O142, O111:H, O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre persistente	Recién nacidos y niños menores de 2 años	O44:H18	Fimbrina AAF1 y II EAST1 Proteínas Pet y Ptc OMP Plásmido de 60 Mda Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbrina F1845 OMP

**FUENTE:** Salud pública México.

**Tabla 2** Abreviaturas de los tipos patológicos de *Escherichia coli*

<b>Patotipos</b>	
<b><u>EPEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> entero patógena
<b><u>EHEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> entero hemorrágica
<b><u>EIEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> entero invasiva
<b><u>ETEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> entero toxigénica
<b><u>EAEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> entero agregativa
<b><u>DAEC</u></b>	<i>Escherichia coli</i> adherencia difusa

**FUENTE:** Salud pública México.

## 2.5. COLIFORMES FECALES

Estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* al igual que la *E. coli* dentro de los géneros más comunes de este grupo tenemos *Yersinia*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Hafnia*. Son bacilos no esporulentos, no forman esporas al igual que pueden tener un desarrollo tanto aerobio como anaerobio y son gram negativos (The Environment Agency, 2002).

Coliformes fecales es un término que se ha venido usando bastante impreciso ya que se ha utilizado para describir a este grupo al igual que el término de coliformes termo-tolerantes; ya que las descripciones de las bacterias coliformes no es basado en sus características taxonómicas si no en la experiencia práctica cómo podemos ver en la **Tabla 3** nos hace referencia de cómo fueron siendo considerados los coliformes basados en la experiencia práctica (The Environment Agency, 2002).

Dentro de los coliformes podemos diferenciar unos grupos que pueden ser encontrados tanto en agua dulce como sedimento de forma natural, así como en los organismos de los mamíferos y aves en estos casos podemos tener presencia de *Pantoea sp.*, *Kluyvera sp.*, *Cedecea sp.* (Council, 2003).

**Tabla 3** Coliformes por la evolución de su definición

<b>Miembros Coliformes por evolución de definición</b>		
<b>Metaboliza y acidifica lactosa</b>	<b>Acidifica lactosa</b>	<b>Basado en la enzima <math>\beta</math>-D-galactosidasa</b>
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i>
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia</i>
	<u><i>Pantoea</i></u>	<u><i>Pantoea</i></u>
	<u><i>Kluyvera</i></u>	<u><i>Kluyvera</i></u>
		<u><i>Cedacea</i></u>
		<u><i>Ewingella</i></u>
		<u><i>Moellerella</i></u>
		<u><i>Leciencia</i></u>
		<u><i>Rahnella</i></u>
		<u><i>Yokenella</i></u>

**Negrilla:** Coliformes presentes en el ambiente como en heces humanas

**Negrilla y subrayado:** Coliformes principalmente ambientales

## 2.6. COLIFORMES TOTALES

Los coliformes totales como agrupación eran usados como indicadores subrogantes en caso de ausencia de *E. coli* y servían para el propósito de demostrar contaminación por aguas negras esto se originó debido a tres razones principalmente.

- Las coliformes fueron aisladas de heces humanas y de aguas contaminadas por las mismas.
- De los coliformes aislados de las heces humanas la mayoría eran *E. coli*.

- La tecnología disponible a principios del siglo XX no permitía que esto se convirtiera en un análisis rutinario.

Por lo que los coliformes totales llegaron a ser considerados como el cuarto miembro de los géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. En tanto en la **Tabla 4** vemos que no hay una diferencia significativa de los coliformes a partir de su origen animal o humano (Council, 2003).

**Tabla 4** Distribución del género coliforme entre heces humanas y animal

**Distribución del género coliforme entre heces humanas y animal**

Tipo de muestra	% Total de coliformes			Referencia
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Citrobacter</i>	
Heces humanas	96,8	1,5	1,7	Dufour (1977)
	94,1		5,9	Allen y Edberg (1995)
Heces animal	94	2	4	Dufour (1977)
	92,6		7,4	Allen y Edberg (1995)

**Nota:** Una vez que las heces dejan el cuerpo y entran al sistema de colección de aguas negras la porción de coliformes que son *E. coli* cae un 30% y otros coliformes se van a la alza (Geldreich, 1990).

**FUENTE:** Consejo Nacional de Salud e Investigación Médica Gobierno Australiano.

Cuando las coliformes son aisladas de muestras proveniente de los suministros de agua se necesita determinar que especie de coliforme está presente, ya que la detección de coliformes totales no es suficiente para fines investigativos porque solo nos muestra o señala que hay contaminación en el sistema a raíz del contacto del agua con heces fecales y el identificar qué tipo de coliforme es, nos ayuda a determinar de dónde proviene o en que parte de la red pudo haberse originado la infiltración (The Environment Agency, 2002).

## 2.7. FITORREMEDIACIÓN

La esencia de la fitorremediación es el aprovechamiento de los recursos vegetales para la remediación de los problemas ambientales; esta técnica es ampliamente usada para un sin número de aplicaciones como la remediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados (Paulson, 2014).

Las plantas usadas en la fitorremediación tanto en aguas o en suelo, su mecanismo de acción se basa en que puedan tolerar, absorber, acumular, degradar, destruir o inhibir compuestos, contaminantes o microorganismos.

Ya que se han encontrado varias plantas con estas importantes propiedades y en comparación con métodos tradicionales que emplean equipos de alta tecnología y complejas reacciones químicas, la fitorremediación es mucho más barata y fácilmente asequible y por ello se ha extendido ampliamente.

Por lo general las plantas con estas propiedades de remediación crecen cerca o en lugares contaminados o que poseen niveles naturales de cierto tipo de compuestos o elementos, ejemplo en un suelo que posea altos niveles de plomo de forma natural es altamente probable que las plantas que crecen sobre él se hayan adaptado a tolerar esos niveles naturales de polución y entre las adaptaciones que hayan desarrollado alguna de ellas sea el de acumular plomo dentro de su sistema; por lo que también esta planta que se desarrolló en esta área con contaminación basal se pueda adaptar fácilmente a un área donde exista el mismo tipo de contaminación solo que de origen diferente siendo en este caso antropogénico (Castrillo et al., 2012).

Dentro del campo de la fitorremediación engloba a los grupos que se divide basándose en la parte de la fisiología vegetal que desarrollaron las plantas para eliminar determinado contaminante estos grupos son: fitovolatilización, rizofiltración, fitodegradación y fitoextracción (Arias, Betancur, Gómez, Salazar, & Hernández, 2010).

Entre las plantas que podrían ser utilizables para fitorremediación tenemos las descritas por Valderrama, Campos, Velandia, & Zapata, (1987) que realizaron ensayos comprobando la capacidad de eliminación de Coliformes fecales, *E. coli* y colifagos somáticos en aguas negras usando *E. crassipes*, *Lemna* sp., y

*L. laevigatum* con lo que concluyó que la presencia de macrófitas contribuye a la eliminación de los microorganismos, en especial *E. crassipes*.

## **2.8. MECANISMOS QUE INFLUYEN EN LA MUERTE DE BACTERIAS PATÓGENAS EN UN SISTEMA**

Los mecanismos principales por los cuales se eliminan las bacterias patógenas se podrían dividir en los siguientes mecanismos:

### **2.8.1. PRODUCCIÓN DE BACTERICIDAS**

Mientras se desarrolla el rizoma de una macrófita se incrementa el área de acción del cuerpo radicular el cual genera o exuda sustancias bactericidas las cuales también alteran la bioquímica del agua afectando así a futuros brotes bacterianos (Akça, Tunçsiper, & Ayaz, 2012).

### **2.8.2. COMPOSICIÓN DEL AGUA**

Es un factor que influye directamente ya que la probable desinfección del agua contaminada se puede ver afectada por las concentraciones de cargas orgánicas que ingresen al sistema, el mismo que se encuentre carente de nutrientes y el ingreso de un efluente rico en materia orgánica y nutrientes incrementa a el remanente bacteriano presente e impida el proceso de desinfección natural (Díaz, O'Geen, & Dahlgren, 2010).

### **2.8.3. REGIMEN HIDRICO**

El régimen hidráulico es determinante en la eliminación de bacterias aunque no hay una diferencia significativa dentro de sistemas verticales u horizontales si se indica una diferencia de un 2 – 4% del aumento de la eficiencia en un sistema que posea un mecanismo de drenaje rápido en comparación a otros de drenaje corto pero estadísticamente no se mostró diferencia significativa (García, Soto, González, & Bécares, 2008).

### **2.8.4. TIEMPO DE RETENCIÓN**

Estudios han demostrado que un mayor tiempo de exposición de la bacteria a los procesos removedores de un sistema de fitorremediación es beneficioso para que sean eliminadas por completo o en su mayoría aunque también varía su

efectividad dependiendo de las etapas del sistema de tratamiento (Díaz et al., 2010).

#### 2.8.5. OXIGENO DISUELTO

Ensayos realizados tanto por (Fernández, Tejedor, & Chordi, 1992; Pearson, Mara, Mills, & Smallman, 1987) demuestran que hay una correlación en cuanto a mayor cantidad de oxígeno disuelto contribuye a la muerte natural de bacterias en el medio acuático y Fernández et al. (1992) que ha habido un aumento sustancial de 8 a 10 veces de la velocidad de muerte celular en respuesta a tratamientos de oxigenación forzada en periodos de 2 horas diarias.

#### 2.8.6. RADIACIÓN SOLAR

Este parámetro solo tiene incidencia dentro de los tratamientos de aguas horizontales donde hay una mayor superficie de contacto en donde puede incidir los rayos UV más no así en los tratamientos verticales debido a que posee flujos de agua subacuáticos que no son expuestos a la radiación solar Mayo, (2004) también mostró que en sus ensayos la radiación fue responsable del 72.6% remoción bacteriana y que la concentración de *E. coli* se redujo significativamente debido a la contribución solar.

#### 2.8.7. pH

Un pH ácido ayuda a la proliferación de coliformes fecales se ha reportado que su ambiente ideal es entre un pH 5.5 – 7.5 y que su tasa de supervivencia cae rápidamente por encima de este umbral Solic & Krstuloviic, (1992) por lo que valores superiores de pH siendo esta ya un agua alcalina ayuda a la eliminación de las coliformes y el aumento de la temperatura ayuda a la acción del mismo (Mayo, 2004).

## 2.9. FITORREMIEDIACIÓN DE AGUAS NEGRAS

Se han realizado muchas investigaciones en este campo, pero por lo general siempre se analiza el abanico de parámetros que rigen el análisis de agua, pero no siempre se los centra a la eliminación de un solo parámetro.

Así tenemos las especies descritas por Arias et al., (2010) *Hedychium montana*, *Brachiaria montana*, *Brachiaria arrecta* fueron las más eficientes versus a otras especies vegetales que ensayaron, reduciendo parámetros como DBO, nitrógeno orgánico, SST, y carga orgánica a niveles aceptables para la normativa. Se basó en la rizofiltración para la fitorremediación de aguas negras asociándolas en sistemas de humedales artificiales logrando así sus resultados.

Por lo que tenemos que *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes* tienen según Rizzo & Rossa (2012) que durante un tiempo de retención de 14 días mostró que *L. minor* y *E. crassipes* son capaces de eliminar níquel en solución pero que *L. minor* fue más eficiente que *E. crassipes* siempre y cuando se expongan a bajas concentraciones.

También Oquendo & Boada (2016) nos refiere que *E. crassipes* posee potencial para ser usado en la fitorremediación de aguas negras y que es una de las especies de macrófitas ampliamente usadas para la remediación de metales pesados pero que por su crecimiento acelerado no es tan efectiva y expone que *Salvinia molesta*, *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Schoenoplectus californicus*, *Heliantus annus* y *Typha latifolia* poseen similares características para fitorremediación de metales por lo que podrían tener potencial de remediar aguas negras basándose en el precedente de que son fitorreguladoras naturales en los cuerpos hídricos lacustres o cuerpos hídricos lenticos especialmente.

## 2.10. DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

- *Spirodela intermedia* W. D. J. Koch
- *Salvinia auriculata* Aubl.
- *Pistia stratiotes* L.
- *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms
- *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.
- *Azolla caroliniana* Willd
- *Lemna minor* L.

### 2.10.1. *Spirodela intermedia* W. D. J. KOCH

Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Alismatales

Familia: Araceae

Subfamilia: Lemnoideae

Género: *Spirodela*

Especies: *S. intermedia*

Nombre común: Lenteja de agua

Descripción: Herbácea pequeñas de hojas redondeadas (3 - 8 mm.) verde brillante, diámetro: 1 cm. Heladas: Resistente (Forest Service, 2016)



Figura 1 *Spirodela intermedia*

2.10.2. *Salvinia auriculata* AUBL.

Clasificación científica

Reino: Plantae

División: pteridophyta

Clase: Polypodiopsida / Pteridopsida (en disputa)

Orden: Salviniales

Familia: Salviniaceae

Género: *Salvinia*

Especies: *S. auriculata*

Nombre científico: *Salvinia auriculata*

Descripción: Herbácea de hojas opuestas cubiertas de finos pelos que rechazan el agua, es originaria de América desde México hasta Argentina y Chile. Se cultiva como una planta ornamental y se ha convertido como especie natural en estado salvaje en algunos lugares (Forest Service, 2016).

Diámetro: 3-6 mm Heladas: Tolera heladas leves



**Figura 2** *Salvinia auriculata*

2.10.3. *Pistia stratiotes* L.

Clasificación científica

Reino: Plantae

Orden: Alismatales

Familia: Araceae

Subfamilia: aroideae

Tribu: Pistieae

Género: *Pistia* L.

Especies: *P. stratiotes*

Nombre binomial: *Pistia stratiotes* L.

Descripción: Herbácea con follaje esponjoso similar a un repollito.

Diámetro: 5 a 15 cm.

Heladas: Sensible (Forest Service, 2016).



**Figura 3** *Pistia stratiotes*

2.10.4. *Eichhornia crassipes* (MART.) SOLMS

Clasificación científica

Reino: Plantae

Orden: Commelinales

Familia: Pontederiaceae

Género: *Eichhornia*

Especies: *E. crassipes*

Nombre binomial: *Eichhornia crassipes* ( Mart. ) Solms

Descripción: Herbácea de hojas verdes con pecíolos globosos, largas raíces plumosas de color violeta oscuro y hermosas flores azules durante primavera, verano y otoño. Es una de las plantas de más rápido crecimiento conocidos, se reproduce principalmente a través de los estolones, que finalmente forman plantas hijas. Cada planta puede producir miles de semillas cada año, y estas semillas pueden permanecer viables durante más de 28 años. La *E. crassipes* es conocida por duplicar su población en dos semanas (Forest Service, 2016).

Diámetro: 10 a 30 cm. Heladas: Sensible



**Figura 4** *Eichhornia crassipes*

2.10.5. *Ceratopteris thalictroides* (L.) BRONGN.

Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Pteridophyta

Clase: Pteridopsida

Orden: Polypodiales

Familia: Pteridaceae

Subfamilia: Ceratopteridoideae

Género: *Ceratopteris*

Especies: *C. thalictroides*

Nombre binomial: *Thalictroides ceratopteris* (L.) Brongniart

Las especies thalictroides representa una forma de vida especial de los helechos, y es por lo tanto de gran interés botánico. La hoja y tallo se pueden utilizar también médicamente (Forest Service, 2016).



**Figura 5** *Thalictroides ceratopteris*

2.10.6. *Azolla caroliniana* WILLD.

Clasificación científica

Reino: Plantae

División: Pteridophyta

Clase: Polypodiopsida / Pteridopsida (en disputa)

Orden: Salviniiales

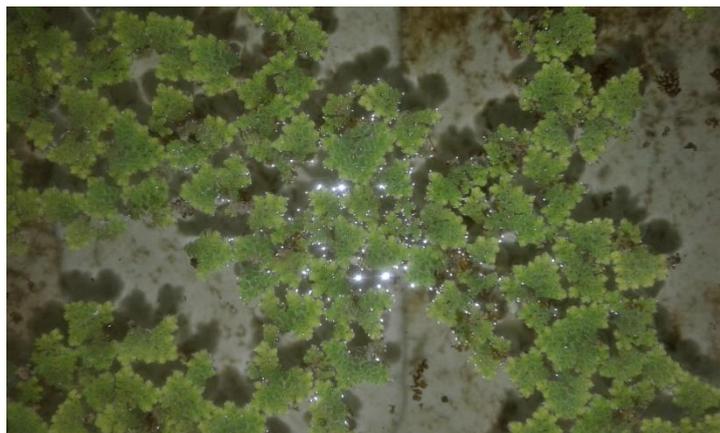
Familia: Azollaceae

Género: *Azolla*

Especies: *A. caroliniana*

Nombre binomial: *Azolla caroliniana* Willd.

Es un helecho acuático de agua dulce, con forma de escamas hojas de 5-10 mm de largo, verde a rojo, lo más a menudo rojizo a la luz fuerte y en invierno. Están cubiertas de pelos finos que le dan la apariencia de terciopelo. Es capaz de fijar el nitrógeno del aire mediante una relación simbiótica con cianobacterias. Puede sobrevivir a las temperaturas del agua de invierno de 5 ° C, con un crecimiento óptimo verano entre 25-30 ° C (Forest Service, 2016).



**Figura 6** *Azolla caroliniana*

2.10.7. *Lemna minor* L.

Reino: Plantae

Orden: Alismatales

Familia: Araceae

Subfamilia: Lemnoideae

Tribu: Lemneae

Género: *Lemna*

Especies: *L. minor*

Nombre binomial: *Lemna minor* L.

Es una planta flotante de agua dulce, con una, dos o tres hojas cada una con una única raíz que cuelga en el agua; a medida que crecen más hojas, las plantas se dividen y se convierten en individuos separados. La raíz es de 1-2 cm de largo. Las hojas son de forma ovalada, 1-8 mm de largo y 0,6-5 mm de ancho, de color verde claro, con tres (cinco raramente) las venas y los espacios de aire pequeños para ayudar a la flotación (Forest Service, 2016).



**Figura 7** *Lemna minor*

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Mapas y coordenadas UTM

Dentro del área de colecta (Los Ríos, Ventanas, Aguas Frías) encontramos que esta región posee un clima tropical o ecuatorial, cuya temperatura media anual varía entre 22 y 26 °C. Se caracteriza por las constantes precipitaciones en forma desigual en los distintos lugares y durante todo el año (**Figura 8**).

Los principales meses de lluvia se sitúan entre diciembre y mediados de mayo, período considerado como de invierno. Esta desigualdad en la precipitación pluvial obedece al efecto de las corrientes marinas de Humboldt y El Niño, siendo esta parte de la zona climática:

Cálida-ardiente-húmeda.

Comprende los territorios de la costa interna hasta los declives de la cordillera Occidental; por estar alejada del mar, su clima es extremadamente caluroso. Tiene una temperatura de 26 °C, con constantes lluvias.

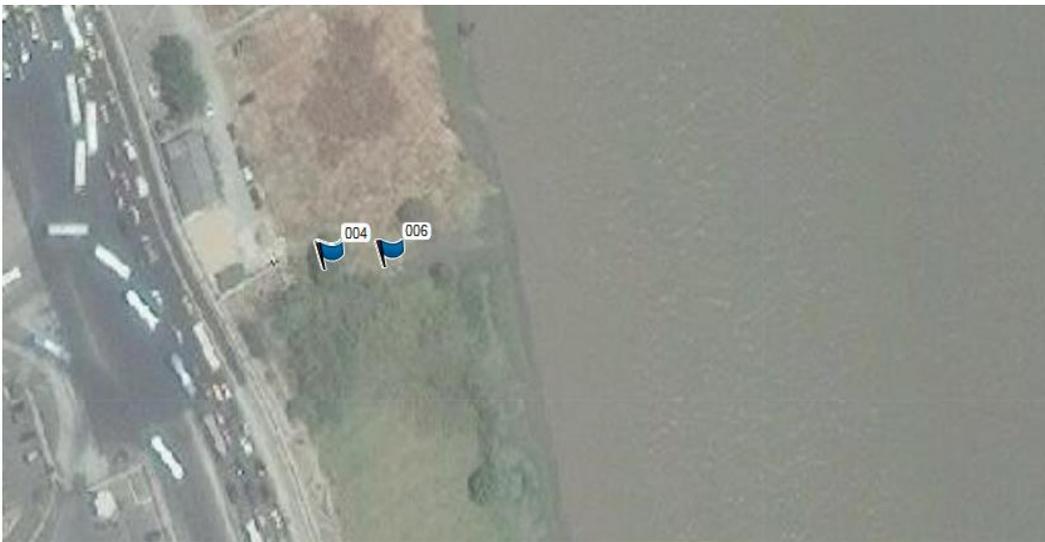
Las lluvias de la temporada invernal causa que se colmaten de agua los cuerpos hídricos, tanto lenticos y estacionarios de esta zona en los cuales proliferan los especímenes de macrófitas que nos propusimos a coleccionar.

Esta otra área aunque está intervenida ampliamente por actividades antropogénicas las especies tanto de flora y fauna que residen aquí están adaptadas a ello y al clima cálido que este lugar presenta por lo caluroso del verano costeño; al tener esta área un gran cuerpo de agua (Río Guayas) en sus orillas encontramos macrófitas para el estudio (**Figura 9 y 10**).



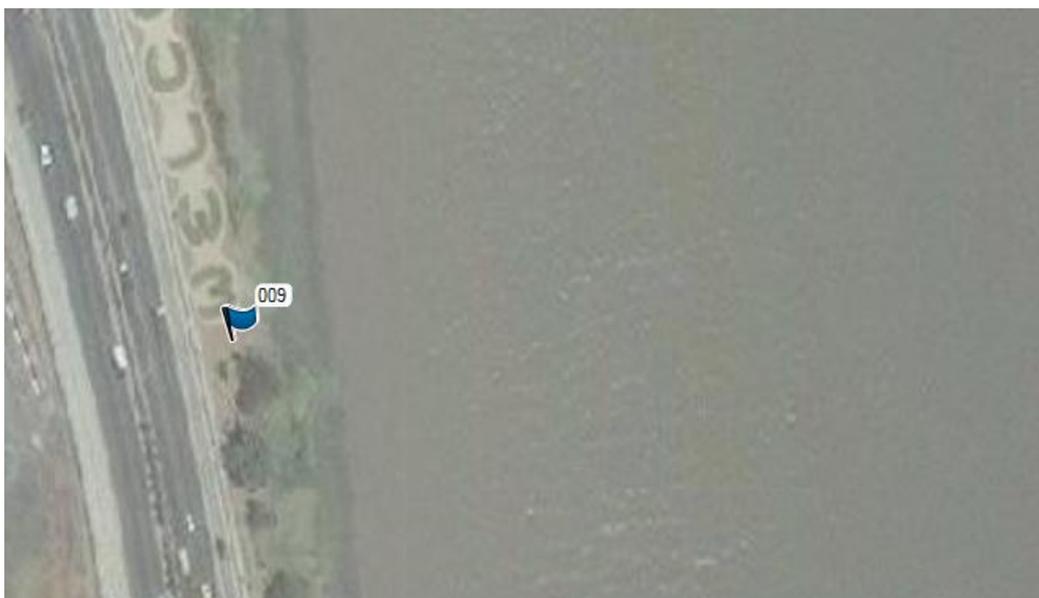
**Figura 8** Puntos de colecta de *L. minor*, *A. caroliniana* y *S. auriculata*

Puntos UTM WGS 84: 668989 – 9849422; 668968 – 9849350; 669056 – 9849597.



**Figura 9** Lugar de colecta de *P. stratiotes* y *E. crassipes*

Puntos UTM WGS 84: 624875 – 9763044; 624945 – 9762737.



**Figura 10** Lugar de colecta de *S. intermedia*

Puntos UTM WGS 84: 620232 – 9762703

### **3.2. Salidas de Campo**

Se realizaron tres salidas de campo una a la orilla del río Guayas a la altura del Terminal terrestre y las otras dos en la provincia de Los Ríos, cantón Ventanas, recinto Aguas Frías en busca de las plantas acuáticas para realizar los bioensayos contra los coliformes totales y *E. coli*. Las especies recolectadas fueron *Azolla sp.*, *Salvinia sp.*, *Pistia sp.*, *Ceratopteris thalictroides*, *Spirodella sp.* y *Eichhornia crassipes*. La especie *Lemna minor* se colectó y fue utilizada como control positivo.

### **3.3. Muestras de aguas negras**

Se establecieron 4 puntos de muestreo a lo largo de la zanja de aguas negras ubicada dentro del campus Mapasingue de la Universidad de Guayaquil. En las coordenadas UTM WGS 84: **M1** 620238 – 9762713; **M2** 620221 – 9762676; **M3** 620210 – 9762652 y **M4** 620203 – 9762635 **Figura 11**.

Se realizó la toma de agua de forma aleatoria, seleccionando dos lugares con corriente de agua y dos sin la misma para obtener una muestra representativa del agua de la zanja; las muestras fueron tomadas en el centro de la zanja.



**Figura 11** Puntos de colecta de aguas negras

Para colecta de las muestras de aguas negras se utilizaron recipiente estéril de 5 gal de capacidad y se sumergieron en el centro de la zanja, luego fueron secados y desinfectado su exterior con alcohol al 70%, posteriormente las aguas de los envases fueron vaciadas en un contenedor con la finalidad de homogenizar la muestra, por un lapso de 4 horas previo a su uso para el ensayo.

### **3.4. Reproducción de las plantas**

Las especies colectadas en el campo fueron puestas en reproducción (en forma vegetativa formando generaciones sucesivas que se adhieren mediante un corto estolón) en envases de plástico transparentes de diámetro 25 cm por 30 cm de altura, con 3L de agua con fertilizante (Multiflor®). El fertilizante es una solución compuesta por Nitrógeno (N 2%), Fosforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 3%), Potasio (K<sub>2</sub>O 2%) y microelementos, de la cual usamos 5 mL por litro de agua en condiciones de temperatura 25<sup>o</sup>-30<sup>o</sup>C y con luz natural.

### **3.5. Bioensayo 1**

Para los bioensayos las macrófitas se lavaron con agua corriente y destilada y se colocaron en envases de plástico en cantidad suficiente (4 g) para cubrir el área superficial de los contenedores.

Posteriormente se montaron los ensayos en vasos de precipitación de 500 ml por triplicado a las cuales se inoculo una cepa de referencia *E. coli* ATCC25922 y coliformes totales con una concentración que se determinó previamente en cada ensayo y con un tiempo de retención de 7 días, después de ese lapso se determinó la carga bacteriana remanente.

También se realizó un control negativo inoculando la bacteria *E. coli* y Coliformes Totales por triplicado en agua destilada sin plantas y un control positivo con *Lemna minor*. A todos estos ensayos se midieron los parámetros pH, SDT y temperatura según las técnicas estandarizadas (APHA/AWWA/WEF, 2012).

### **3.6. Bioensayo 2**

Después de haber determinado las especies vegetales que inhiben el crecimiento de *E. coli*, se realizó la colecta de aguas proveniente de una zanja en las inmediaciones de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil campus Mapasingue.

Previo al ensayo se determinó la presencia de coliformes totales y *E. coli* utilizando el medio de cultivo Agar Chromocult (Merck®) el mismo que inhibe el crecimiento de otras bacterias y tiñe los coliformes con un color malva y a la *E. coli* con un color morado azul violáceo. Se aplicó el método de extendido superficial usando un asa de drigalsky e inoculando la placa con 200 µL de muestra e incubando por 18 - 24 horas a 35 - 37°C, luego de lo cual se realizó tinción Kovacs Indol para confirmación de *E. coli*, también se realizaron las pruebas de tinción de Gram, prueba de Motilidad y Oxidasa; una vez confirmada su presencia se procedió a montar el ensayo.

El ensayo se desarrolló en recipientes con capacidad de 1000 mL y se utilizó 500 mL de aguas negras en cada envase con un tiempo de retención de 7 días. Para determinar la concentración de las bacterias se realizó un cultivo con la técnica de vertido en placa para conteo de UFC presentes en el agua negra a utilizar en el ensayo.

### **3.7. Bioensayo 3**

Se seleccionó la especie vegetal que presentó el más bajo rendimiento; para evaluar su sinergia con las de más alto rendimiento en la inhibición de coliformes totales y *E. coli* durante 7 días en aguas negras después de los cuales se determinó la viabilidad de la población bacteriana. Para el ensayo se pesaron las dos macrófitas a ensayar con un peso uniforme en cada recipiente (4 g), acompañadas de un ejemplar de *E. crassipes* el ensayo se realizó en recipientes de la misma capacidad que el bioensayo 2, con un volumen de 500 mL de aguas negras.

### **3.8. Análisis de laboratorio**

Para los análisis se utilizaron los siguientes medios de cultivos:

#### **3.8.1. Agar Chromocult (CCA)**

Es un medio selectivo para la detección simultánea de coliformes totales y *E. coli* en agua y muestras de alimentos, aprobado por la EPA y la AOAC

El mecanismo de acción de este agar es principalmente la interacción de peptonas cuidadosamente seleccionados además de piruvato, sorbitol y un tampón de fosfato garantiza el crecimiento de colonias de forma rápida.

#### **3.8.2. Agua de peptona (PW)**

Es un medio de enriquecimiento no selectivo de bacterias, particularmente Enterobacteriaceae patógenas como *Coliformes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Cronobacter*, presente en alimentos y piensos para animales, agua y otros materiales.

Este medio de cultivo cumple con las especificaciones dadas por EN ISO 6579, EN ISO / FDIS 6579-1, EN ISO 6785 I IDF 93, EN ISO 19250, EN ISO 21528-1, ISO / TS 22964 I IDF / DRM 210, FDA-BAM, APHA Y EP.

##### **3.8.2.1. Modo de acción**

El caldo es una fuente rica en nutrientes y produce altas tasas de reanimación celular para bacterias sanas como dañadas y un alto crecimiento celular. El sistema de tampón de fosfato previene y atenúa el daño bacteriano causado por cambios en el pH del medio.

La peptona, incluyendo también a la digestión enzimática de la caseína, actúa como una fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, mientras que el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico.

Para los análisis de *E. coli* y coliformes totales se utilizó la técnica ISO 9308-1 aprobado por la EPA y la AOAC agar selectivo para la detección simultanea de coliformes totales y *E. coli* en muestras de aguas y alimentos.

Para los análisis se utilizó la técnica ISO 9308-1 por el método vertido en placa, tanto para las muestras inoculadas con *E. coli* y las muestras de aguas negras. Se tomó 1 ml de la muestra de agua proveniente de cada ensayo a las cuales se realizó diluciones sucesivas de  $1/10^{-1}$ ,  $1/10^{-2}$ ,  $1/10^{-3}$ ,  $1/10^{-4}$ ,  $1/10^{-5}$  en un medio de enriquecimiento (agua de peptona), se tomó 1mL de cada dilución y se sembró en cajas Petri, luego se adiciono 18 mL de agar Chromocult homogenizando la muestra con movimientos en forma de ocho, luego se dejó solidificando durante 10 min posteriormente se incubaron las placas a una temperatura de 35 -37°C por 18-24 horas.

### **3.9. Pruebas confirmatorias**

#### 3.9.1. Tinción Kovacs Indol

Después de haber sido incubado de 18 a 24 horas se procedió a confirmar las colonias de *E.coli*, que crecieron en las placas de Chromocult presentando un color azul oscuro violáceo, a las cuales se les agregó una gota de reactivo de Indol Kovacs, el mismo que dio una reacción positiva por el cambio de color rojo cereza después de unos segundos.

Esta tinción bioquímica produce una reacción del cambio de color de la colonia bacteriana, el cultivo bacteriano puro aislado en la placa de Chromocult, la *E. coli* presentará un color azul oscuro violáceo colonias gracias a las enzimas que reaccionan con Salmón-GAL y Reacción X-glucurónido (Britania, 2010).

#### 3.9.2. Tinción de Gram

La *E. coli* es una bacteria gram negativa por lo cual esta prueba ayudó a la confirmación de los resultados previos.

De cultivos puros se tomaron un par de colonias aisladas y bien diferenciadas con un asa de platino y se las suspendieron sobre un porta objeto con una gota de solución salina al 0.8 % y se fijó utilizando un mechero de alcohol (flameado tres veces aproximadamente).

De igual forma la muestra se fijó con metanol durante un minuto, luego se agregó azul violeta (cristal violeta) y se esperó un minuto, se enjuagó con agua destilada no directamente sobre la muestra, adicionamos lugol y se esperó un minuto aproximadamente.

Posteriormente se agregó alcohol cetona y se esperó 30 segundos. Las gram negativas se decoloran, las gram positivas no; volvemos a enjuagar con agua destilada. Después incorporamos una tinción de contraste agregando safranina y esperamos un minuto. Este tinte dejó de color rosado-rojizo las bacterias

gram negativas y enjuagamos por última vez con agua destilada. Se observó al microscopio a 100x agregando le aceite de inmersión (Gram, 1884).

### 3.9.3. Motilidad

La *E. coli* al ser un bacilo posee un cuerpo celular con flagelos lo que le da motilidad al mismo por lo que el resultado de esta prueba sería positivo si se trata de la presencia de *E. coli*; los flagelos son encontrados principalmente en las formas bacilares y pueden presentarse en número y posición variados (monotricos, peritricos). La base de esta prueba es determinar si la bacteria es móvil o inmóvil.

Con un asa de platino se le colocó en una de las concavidades de la cámara de Koch un poco de muestra y se le agregó una gota de agua destilada, se le colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio incorporando aceite de inmersión. También se realizó una preparación en fresco en 2  $\mu$ L a 2.5 % de salinidad para chequear motilidad usando objetivos de 40, 60 o 100x.

Con este procedimiento pudimos observar las bacterias en este caso los bacilos los cuales presentan movimientos rectilíneos o curvos y en todas direcciones confirmando así la especie *E. coli* (Montoya Villafaç, 2008).

### 3.9.4. Prueba de Oxidasa

Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo oxidasa, se recomienda el asa de platino debido a que el asa de nícrón cromada da un resultado falso positivo.

Para esta prueba usamos el papel impregnado con el reactivo fenilendiamina al 1%, el mismo que se humedeció con agua destilada, y se tomó el inóculo bacteriano y se frotó sobre el papel reactivo.

El desarrollo de un color violeta fuerte dentro de 1 o 2 minutos es positivo pero en este caso fue negativo no se tiñó de ningún color ya que la *E. coli* es oxidasa negativa.

La detección de la enzima oxidasa, es útil en la identificación de bacterias Gram negativas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema

de citocromo-oxidasa, la cual activa citocromos reducidos por oxígeno molecular, por la transferencia de un aceptor al estado terminal del sistema de transferencia de electrones (Montoya Villafaë, 2008).

### **Análisis Estadísticos**

Todos los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar de  $n=3$  muestras. Los gráficos se realizaron utilizando el programa Origin Pro 8.

Para realizar la comparación entre tratamientos se aplicó un test de normalidad de Anderson-Darling y un test de igualdad de varianza de Levene. Para las muestras con distribución normal se aplicó una prueba de Anova de una vía con test a posteriori de Tukey ( $p<0.05$ ). Para las muestras que no presentaron distribución normal se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis.

Finalmente para verificar la relación entre los parámetros físico-químicos y la remoción de coliformes fecales y *E. coli* se realizó un análisis de correlación de Spearman Rho, un dendograma de correlación y un análisis de componentes principales. Para realizar todas las pruebas se utilizó el programa MiniTab versión 17.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Plantas seleccionadas

En el campo se seleccionaron las siguientes plantas acuáticas con potencial para eliminar Coliformes Totales y *E. coli*:

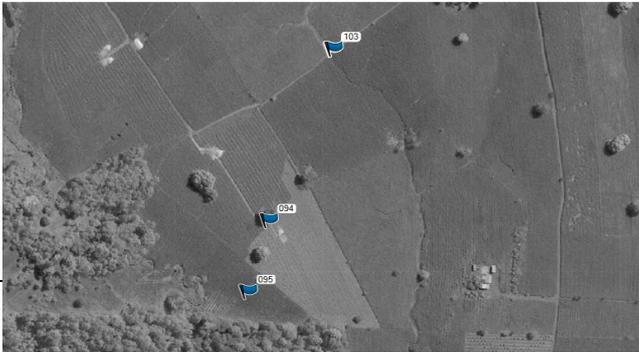
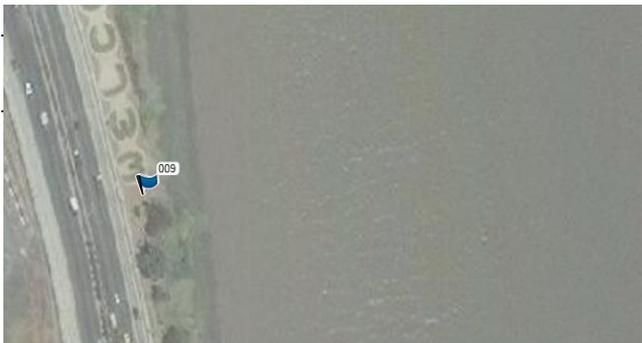
*Spirodela intermedia* W. D. J. Koch, *Salvinia auriculata* Aubl., *Pistia stratiotes* L., *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn., *Azolla caroliniana* Willd y *Lemna minor* L (**Tabla 5**)

**Tabla 5.** Especies de plantas acuáticas con potencial de fitorremediación de *E. coli* y coliformes totales

Nombres científicos	LUGAR DE COLECTA	
	UTM	
<i>Spirodela intermedia</i> W. D. J. Koch	620232	9762703
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	669056	9849597
<i>Pistia stratiotes</i> L.	624875	9763044
<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	624945	9762737
<i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) Brongn.		*
<i>Azolla caroliniana</i> Willd	668968	9849350
<i>Lemna minor</i> L	668989	9849422

\*Adquirida en acuario Kattu (Alborada)

**Tabla 6** Lugares de colecta de las macrófitas

<b>Imagen satelital del lugar de colecta</b>	<b>Especie vegetal colectada</b>
	<b><i>L. minor</i>, <i>A. caroliniana</i> y <i>S. auriculata</i></b>
	<b><i>P. stratiotes</i> y <i>E. crassipes</i></b>
	<b><i>S. intermedia</i></b>

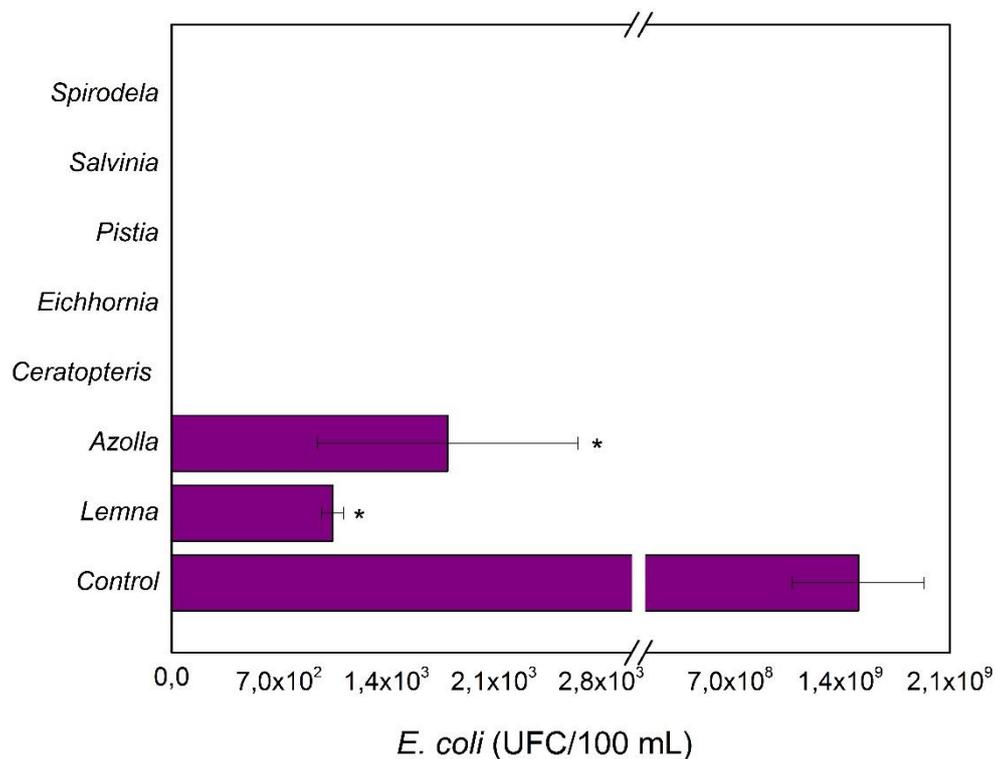
#### **4.2. Ensayos de fitorremediación sobre *E. coli* ATCC 25922**

Una vez que las plantas fueron reproducidas se realizaron ensayos de laboratorio para verificar su capacidad de eliminar *E. coli* ATCC 25922 como bio-indicadora de coliformes fecales.

Después de realizados los ensayos primarios con *Spirodela intermedia*, *Salvinia auriculata*, *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes*, *Ceratopteris*

*thalioides*, *Azolla caroliniana*, y *Lemna minor*, obtuvimos los siguientes resultados:

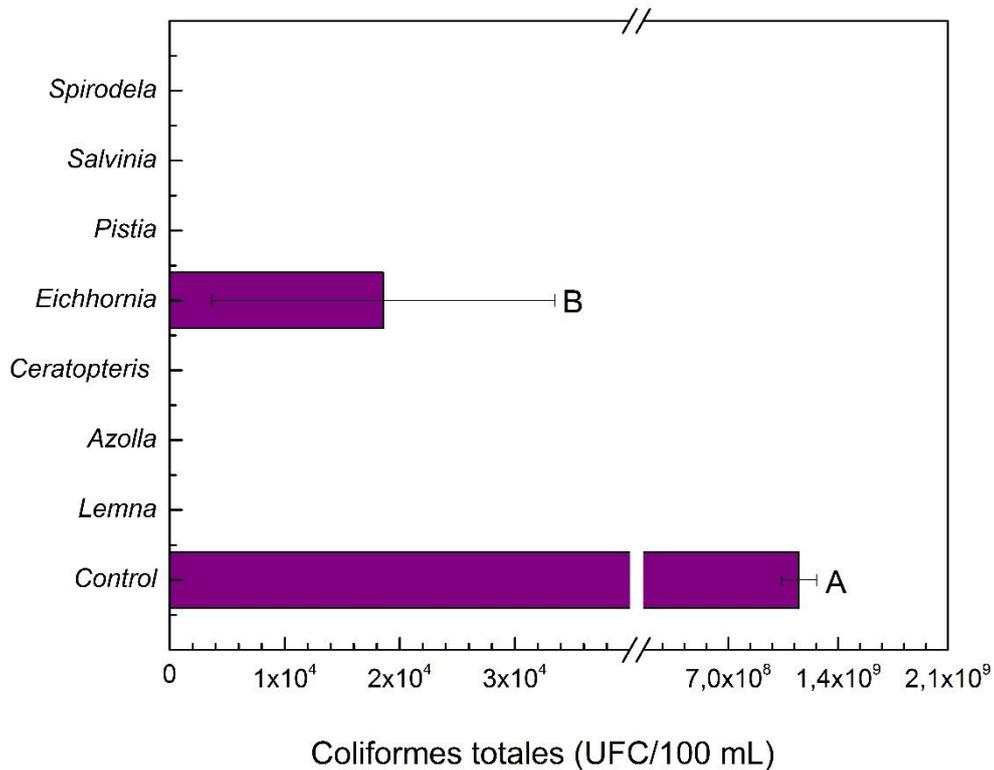
Al realizar el cultivo después de los 7 días encontramos que las especies *S. intermedia*, *S. auriculata*, *P. stratiotes*, *E. crassipes* y *C. thalioides*, eliminaron en un 100% a las *E. coli* (**Figura 12**). Por otro lado, *A. caroliniana*, y *L. minor* redujeron en un 99% la población de *E. coli* en comparación al control  $1.5 \times 10^9/100$  mL UFC. *A. caroliniana* redujo significativamente la concentración de  $1.05 \times 10^3/100$  mL UFC a  $7.07 \times 10^1/100$  mL UFC de *E. coli* y *L. minor* de  $1.8 \times 10^3/100$  mL UFC a  $8 \times 10^2/100$  mL UFC ( $H=7,20$ ;  $p=0.027$ ).



**Figura 12** Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de *E. coli*. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar. \* Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Ensayos de fitorremediación sobre coliformes totales

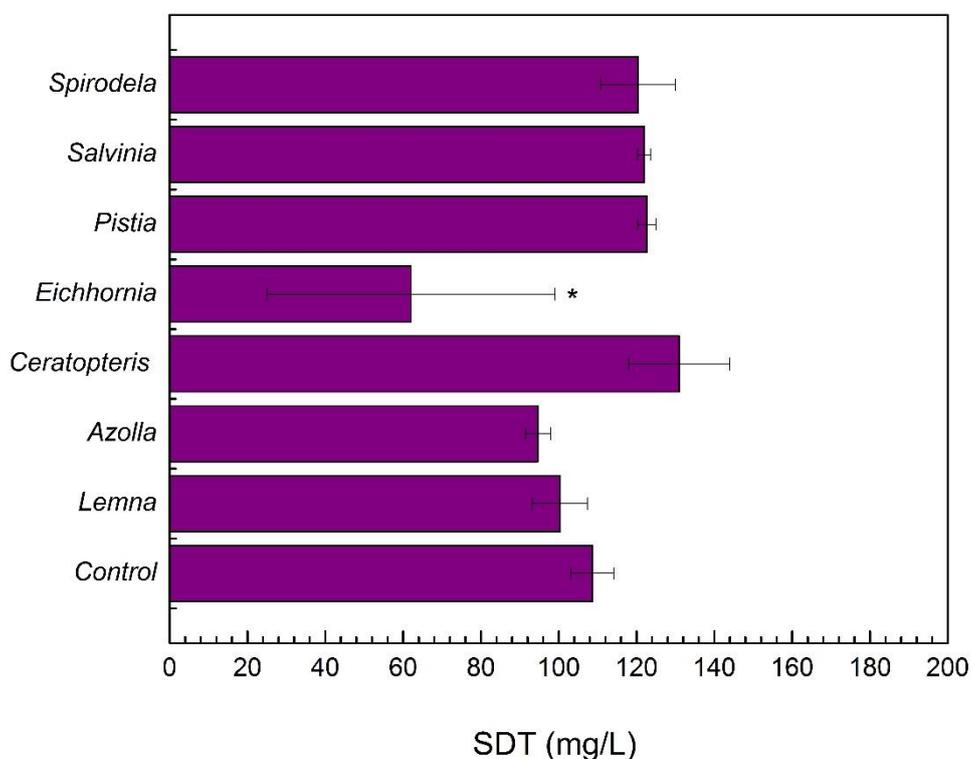
Después de analizar los resultados de los cultivos de coliformes realizados a los 7 días de exposición, encontramos que *E. crassipes* obtuvo la menor tasa de eliminación de coliformes totales en comparación a las otras especies vegetales que eliminaron en un 100% al agente bacteriano, pero hubo una reducción significativa en comparación al blanco ( $F=41,58$ ;  $p=0,003$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13** Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de Coliformes totales. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. \* Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Anova de una vía y test a posteriori de Tukey ( $p<0,05$ ).

#### 4.4. Efectos sobre los parámetros físico-químicos

Dentro de los parámetros de sólidos disueltos, no se apreciaron diferencias significativas para la mayoría de las plantas. *C. thalictroides* generó los niveles más altos de sólidos disueltos inclusive mayores a los del blanco, pero sus diferencias no son significativas según Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). En contraposición la *E. crassipes* tiene los niveles más bajos de TSD 62 ppm ( $F=6.82$ ;  $p=0.001$ ).



**Figura 14** Efecto del bioensayo sobre los sólidos disueltos totales (SDT). Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar. \* Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Los parámetros de pH y temperatura a lo largo del ensayo se mantuvieron con una relativa estabilidad solo mediante el test de Kruskal-Wallis se encontró que poseen diferencias significativas. Las especies *E. crassipes* y *Spirodela* presentaron un pH de  $7,067 \pm 0,643$  y  $7,200 \pm 0,000$ , menor al control  $8,067 \pm 0,058$  ( $H=18,99$ ;  $p=0.008$ ).

Por otro lado, la temperatura del agua se redujo significativamente para la mayoría de las especies para el día 7 del ensayo. Dentro de la **Tabla 6** podemos ver que *C. thalictroides*, *E. crassipes*, *P. stratiotes* y *S. auriculata* presentaron un valor de  $24,00\pm 0,00^{\circ}\text{C}$  significativamente menor al control ( $26,33\pm 0,57^{\circ}\text{C}$ )

**Tabla 7** Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre el pH y la temperatura. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar. \* Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ )

Tratamiento	pH	T °C
Control	$8,067\pm 0,058$	$26,333\pm 0,577$
<i>Lemna</i>	$7,833\pm 0,058$	$25,333\pm 0,577$
<i>Azolla</i>	$8,000\pm 0,173$	$26,000\pm 0,000$
<i>Ceratopteris</i>	$7,733\pm 0,058$	$24,000\pm 0,000^*$
<i>Eichhornia</i>	$7,067\pm 0,643^*$	$24,000\pm 0,000^*$
<i>Pistia</i>	$7,600\pm 0,000$	$24,000\pm 0,000^*$
<i>Salvinia</i>	$7,600\pm 0,100$	$24,000\pm 0,000^*$
<i>Spirodella</i>	$7,200\pm 0,000^*$	$24,333\pm 0,577^*$

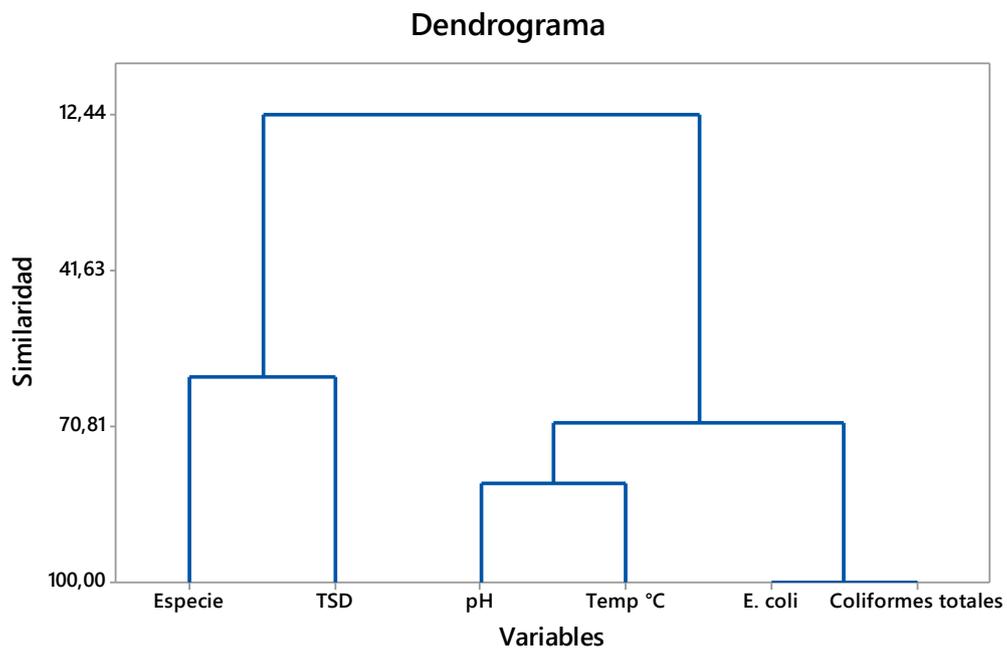
Se realizó la prueba estadística de Spearman Rho para evidenciar la relación entre los parámetros físico químicos y la remoción de *E. coli* y coliformes totales, donde podemos apreciar en la **Tabla 7** una correlación directa entre la concentración de *E. coli* y el pH ( $r_s=0,847$ ;  $p=0.000$ ) y la temperatura ( $r_s=0,944$ ;  $p=0.000$ ) lo que indica que a mayor pH y temperatura mayor concentración de bacterias.

**Tabla 8** Análisis de correlación de Spearman entre los parámetros del bioensayo

	pH	TSD	Temp °C
<i>E. coli</i>			
TSD	-0,282		
	0,181		
Temp °C	0,778	-0,480	
	0,000	0,018	
<i>E. coli</i>	<b>0,847</b>	-0,455	<b>0,944</b>
	0,000	0,025	0,000
Coliformes total	0,228	-0,454	0,271
0,375			
	0,283	0,026	0,200
0,071			

Contenido de Celdas: Spearman rho

P-Valor

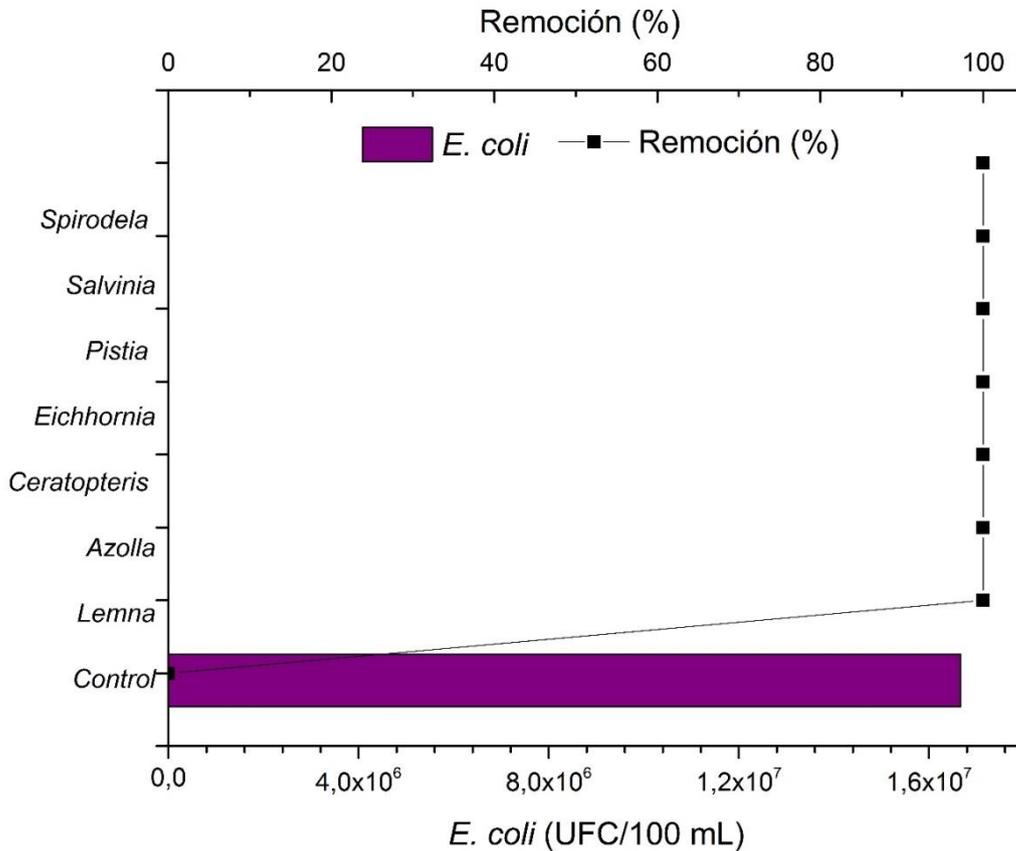


**Figura 15** Dendrograma de correlación entre los parámetros del bioensayo

Al igual que el test de Spearman rho se realizó un dendrograma **Figura 15** donde se demuestra al igual que Spearman que hay una estrecha relación tanto de coliformes con *E. coli* y una relación cercana del pH y la temperatura.

#### 4.5. Ensayos de fitorremediación en aguas negras

Las plantas que mostraron una buena tasa de eliminación tanto de coliformes como de *E. coli* se sometieron a un ensayo con aguas negras para determinar la tasa de remoción teniendo que *S. intermedia*, *S. auriculata*, *P. stratiotes*, *E. crassipes*, *C. thalictroides*, *A. caroliniana*, *L. minor* lograron un 99.97% de tasa de remoción de *E.coli* en contraste con el control que inició con un contaje de  $12 \times 10^1/100$  mL UFC *E.coli* y después de 7 días se elevó hasta  $1.67 \times 10^7/100$  mL UFC (**Figura 17**).

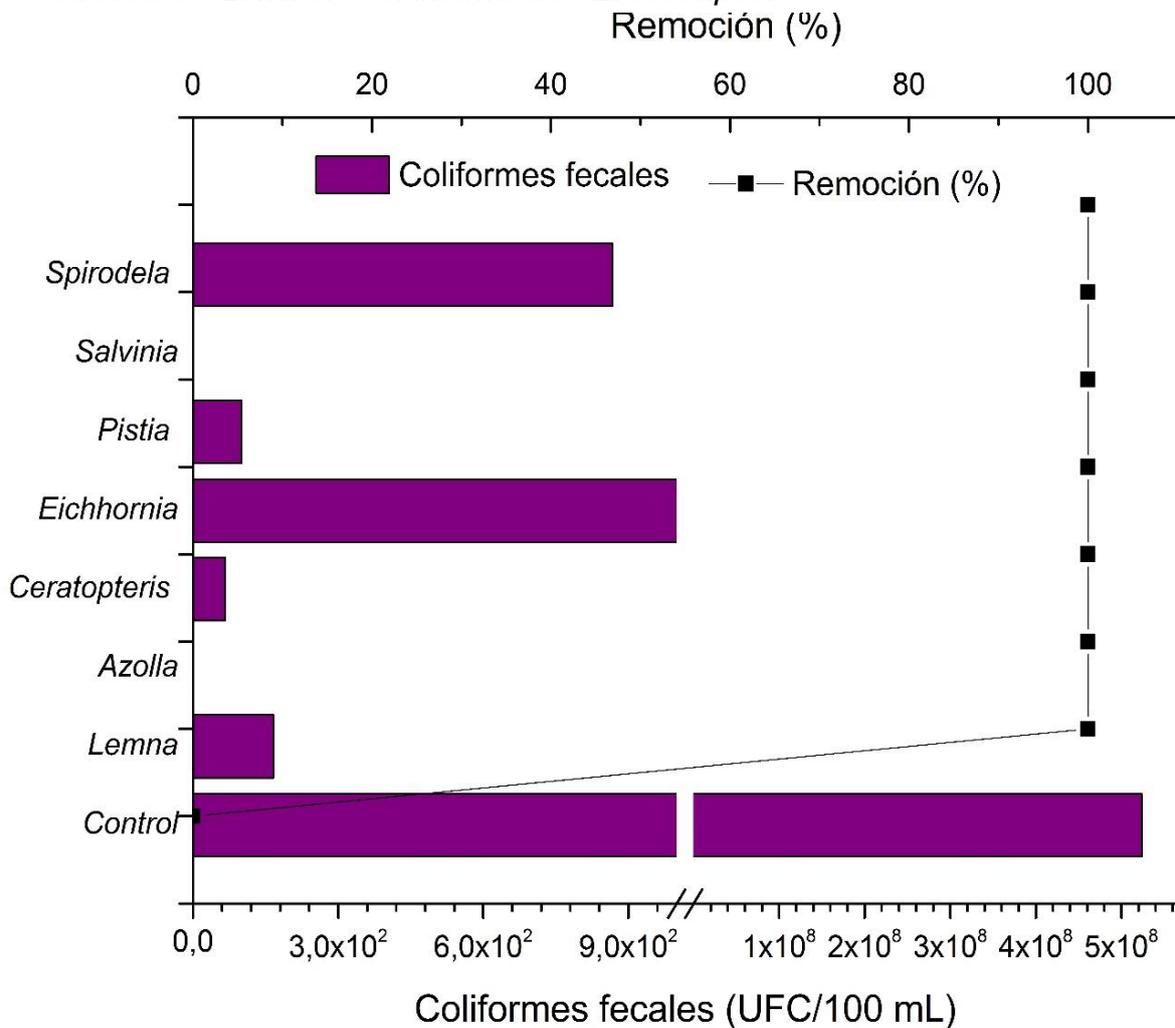


**Figura 16** Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de *E. coli* en las aguas negras. ■ Indica el porcentaje de eficiencia de cada planta en la eliminación de *E. coli*.

Por otro lado, las plantas que mostraron una buena tasa de eliminación de coliformes totales con 100% de remoción fueron los helechos: *S. auriculata* y *A. caroliniana* en comparación al control que empezó con una población bacteriana base de  $42 \times 10^2/100$  mL UFC de coliformes fecales llegando hasta  $5.24 \times 10^8/100$  mL UFC.

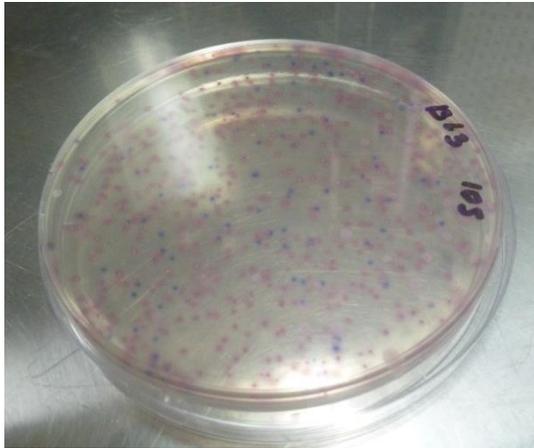
Los resultados que alcanzaron *S. auriculata* y *A. caroliniana* no fueron superados por las demás especies aunque se acercaron al 100% de eficiencia aún quedaron remanentes detectables en las placas de cultivo como se aprecia en la **Figura 20 y 21**.

El orden de remoción fue: *S. auriculata* = *A. caroliniana* > *C. thalictroides* > *P. stratiotes* > *L. minor* > *S. intermedia* > *E. crassipes*.



**Figura 17** Efecto del bioensayo con diferentes especies de plantas sobre la concentración de Coliformes totales en las aguas negras. ■ Indica el porcentaje de eficiencia de cada planta en la eliminación de Coliformes totales

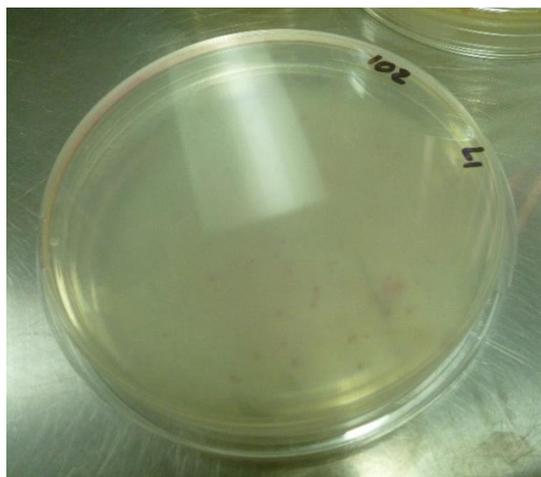
Crecimiento de colonias bacterianas (*E. coli* – Coliformes fecales) respecto al origen del agua en el ensayo.



**Figura 19** Placa con crecimiento bacteriano cultivo de *control*



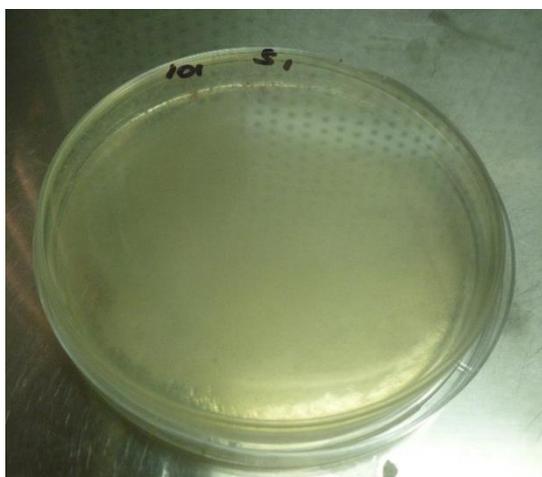
**Figura 18** Recipiente de control



**Figura 23** Placa con poco crecimiento bacteriano cultivo de *E. crassipes*



**Figura 22** Recipiente con *E. crassipes*



**Figura 20** Nulo crecimiento bacteriano cultivo de *S. auriculata*



**Figura 21** Recipiente con *S. auriculata*

#### 4.6. Efecto del tratamiento sobre parámetros físico-químicos

Se realizaron pruebas estadísticas como la de normalidad para poder aplicarles otras pruebas paramétricas pero no se obtuvieron curvas de normalidad para el caso, a su vez también se aplicaron pruebas no paramétrica no se detectaron diferencias estadísticamente significativos para con los parámetros de pH, sólidos disueltos, y temperatura por lo que se procedió a graficar su evolución durante el ensayo.

**Tabla 9** Evolución del pH durante el ensayo con aguas negras

pH	DIA 1	DIA 7
<i>Spirodela sp.</i>	7,30	8,47
<i>Salvinia sp.</i>	8,11	8,44
<i>Pistia sp.</i>	8,11	8,27
<i>Eichhornia crassipes</i>	8,11	8,26
<i>Ceratopteris thalictroides</i>	8,11	8,14
<i>Azolla sp.</i>	7,30	8,47
<i>Lemna minor</i>	8,11	8,37
<i>Control</i>	8,11	7,43

**Figura 24** Evolución del pH durante los 7 días del ensayo con aguas negras

Al cuarto día de los ensayos de fitorremediación se produce un pico en el total de sólidos suspendidos **Tabla 9** al igual que también los hubo en el pH **Tabla 8** en este día se produjeron picos de pH (*S. intermedia*, *A. caroliniana*, *L. minor*, *P. stratiotes*, *E. crassipes*) así como también se acidificó el medio de (*S. intermedia*, *S. auriculata*, *C. thalictroides*) pero al final del ensayo se normalizaron los parámetros y los niveles de pH quedaron ligeramente más alcalinos que al principio.

**Tabla 10** Sólidos disueltos totales durante el ensayo con aguas negras

<b>TSD/ppm</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 7</b>
<i>Spirodela sp.</i>	410,00	453,00
<i>Salvinia sp.</i>	427,00	457,00
<i>Pistia sp.</i>	427,00	418,00
<i>Eichhornia crassipes</i>	427,00	490,00
<i>Ceratopteris thalictroides</i>	427,00	429,33
<i>Azolla sp.</i>	410,00	453,00
<i>Lemna minor</i>	427,00	424,00
<i>Control</i>	427,00	647,00

Al igual que el pH se obtuvieron un picos de sólidos disueltos estos tienden a descender su concentración en el medio a excepción de *E. crassipes* la cual observamos su desarrollo en la **Tabla 9**.

**Tabla 11** Temperatura durante el ensayo con aguas negras

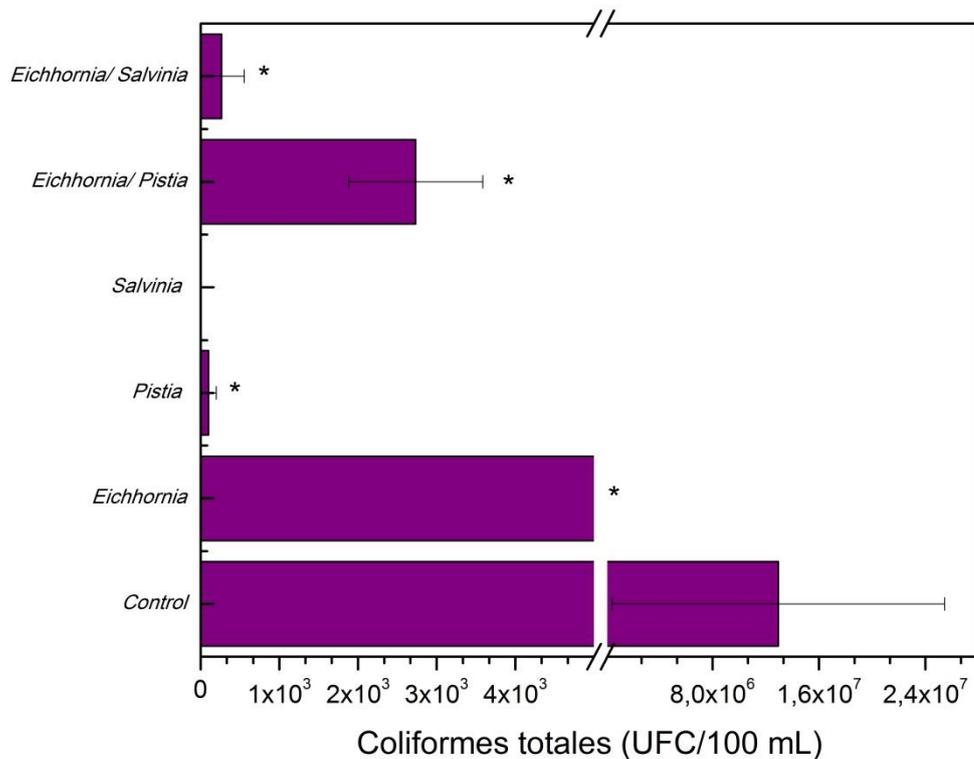
<b>°T</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 7</b>
<i>Spirodela sp.</i>	25,00	24,00
<i>Salvinia sp.</i>	26,00	22,00
<i>Pistia sp.</i>	26,00	24,67
<i>Eichhornia crassipes</i>	26,00	22,67
<i>Ceratopteris thalictroides</i>	26,00	22,67
<i>Azolla sp.</i>	25,00	24,00
<i>Lemna minor</i>	26,00	23,00
<i>Control</i>	26,00	23,00

En tanto en la **Tabla 10** no obtuvo variaciones significativas en la temperatura.

#### 4.7. Eficiencia de las plantas con menor potencial con otras de mayor potencial.

Después de realizado los ensayos con aguas negras se descubrió que *E. crassipes* es la especie con menor potencial de fitorremediación de coliformes fecales y *E. coli* por lo que se realizó un ensayo con las dos macrófitas de mayor potencial de fitorremediación *P. stratiotes* y *S. auriculata*.

No se grafica los resultados del conteo de *E. coli* ya que fueron de 0 en ambas asociaciones *E. crassipes* - *P. stratiotes* y *E. crassipes* - *S. auriculata*



**Figura 25** Efecto del bioensayo en la asociación de *E. crassipes* con *P. stratiotes* y *S. auriculata* sobre la concentración de Coliformes totales. Los resultados se muestran como medias±desviación estándar. \* Indica que existen diferencias significativas en comparación con el control según Anova de una vía y Kruskal Wallis ( $p < 0,050$ ).

De las 2 asociaciones ensayadas (*E. crassipes* - *P. stratiotes* y *E. crassipes* - *S. auriculata*) la más efectiva para la remoción de coliformes fecales fue la combinación *E. crassipes* - *S. auriculata* que demostró una remoción del 100% de *E. coli* y redujo significativamente los niveles de coliformes totales  $2.67 \times 10^2 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$  en comparación al control  $1.29 \times 10^7 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$ .

La asociación *E. crassipes* - *P. stratiotes* no fue tan efectiva aunque eliminó a la *E. coli* no redujo tanto los niveles de coliformes totales  $2.73 \times 10^3 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$  en comparación a la asociación con *S. auriculata*  $2.67 \times 10^2 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$  y al remanente bacteriano del control  $1.29 \times 10^7 \text{ UFC}/100 \text{ mL}$ .

Por otro lado, no se obtuvo normalidad para aplicar análisis paramétricos, y en las pruebas no paramétricas no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas, en los parámetros de pH (**Tabla 11**), TSD (**Tabla 12**) y temperatura **Tabla 13** por lo que los datos se los agregó en tablas para poder apreciarlos.

**Tabla 12** pH del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras

pH	DIA 1	DIA 7
<i>Eichhornia/ Pistia</i>	8,11	7,95
<i>Eichhornia/ Salvinia</i>	8,11	8,20
<i>Pistia sp.</i>	8,11	8,27
<i>Eichhornia crassipes</i>	8,11	8,26

**Tabla 13** Sólidos disueltos totales del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras

TSD	DIA 1	DIA 7
<i>Eichhornia/ Pistia</i>	427,00	483,67
<i>Eichhornia/ Salvinia</i>	427,00	491,67
<i>Pistia sp.</i>	427,00	418,00
<i>Eichhornia crassipes</i>	427,00	490,00

**Tabla 14** Temperatura del inicio y final del ensayo de sinergia de las plantas en aguas negras

°T	DIA 1	DIA 7
<i>Eichhornia/ Pistia</i>	26,00	23,00
<i>Eichhornia/ Salvinia</i>	26,00	22,67
<i>Pistia sp.</i>	26,00	24,67
<i>Eichhornia crassipes</i>	26,00	22,67

## 5. DISCUSIÓN

Se seleccionaron plantas con potencial para eliminar coliformes fecales y se verificó su capacidad para eliminar *E. coli* ATCC 25922. De las plantas estudiadas las más eficientes fueron: *C. thalictroides*, *E. crassipes*, *P. stratiotes*, *S. auriculata* y *S. intermedia* quienes eliminaron un 100% a la *E. coli* en comparación con el trabajo de (Neralla & Weaver, 2000) donde utilizaron la especie *Typha latifolia* y encontraron una eficiencia del 42,75%.

En cuanto a las coliformes totales, la única especie que no eliminó en un 100% la población fue *E. crassipes*. Además en esta especie se observó la proliferación de otras bacterias. Según Rojas, (2005) existen bacterias asociadas a *E. crassipes* tales como *E. coli*, *Pantoea sp*, *Shigella sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* y *Chromobacterium violaceum*. Este autor también demostró que *E. crassipes* presenta un mayor número de UFC/100 mL y especies de bacterias asociadas que *P. stratiotes* y *A. caroliniana* (Rojas, 2005).

Por otro lado, podemos ver una comparación de eficiencia en la **Tabla 8** entre las especies estudiadas y plantas descritas por otros autores; donde se observa que solo dos plantas *S. auriculata* y *A. caroliniana* en nuestro ensayo alcanzaron una eficiencia del 100% en la eliminación de coliformes fecales en comparación con *P. stratiotes* que alcanzó un 64.41% seguida por *Phragmites australis* con 61.12% (Mantovi et al., 2003). Las plantas de nuestros ensayos con menores niveles de eficiencia fueron *S. intermedia* 10.29% - *E. crassipes* 14.59% - *C. thalictroides* 32.03% - *L. minor* 24.91% al igual a otros estudios como el de *Typha latifolia*, *Typha domingensis*, *Scirpus acutus*, *Phragmites communis* 30.74% (Dahab & Surampalli, 2001) y *Scirpus sp.* 30.36% (Nokes, Gerba, & Karpiscak, 2003).

En el estudio de (Davison, Headley, & Edmonds, 2001) encontraron menores niveles de eficiencia, aunque probaron con distintos tiempos de retención, estos no llegaron a ser comparables a nuestros niveles obtenidos, en el ensayo con un THR (Tiempo hidráulico de retención) de 7 Días *Phragmites australis* fue de 16.92% de eficiencia en eliminación de coliformes totales.

Los resultados de los ensayos de sinergia mostraron que la unión de *E. crassipes* - *P. stratiotes* fue la más eficiente ya que eliminaron la *E. coli* y redujeron significativamente los niveles de coliformes fecales en tanto en el consorcio *E. crassipes* - *S. auriculata* solo hubo reducción de los niveles de UFC de *E. coli* y de coliformes fecales más no fueron eliminados. Al igual que nosotros Nokes et al., (2003) obtuvieron varios niveles de eficiencia en sinergia teniendo *Scirpus sp. / Typha sp.* 58.93% *Scirpus sp.* 43.86% y *Scirpus sp. / Typha sp.* 31.37%.

**Tabla 15** Comparación de la eficiencia de la remoción de bacterias por las plantas en estudio frente a otras especies descritas

LUGAR	PLANTAS	TR (D)	Log 10 /100 mL/UFC				Eficiencia %	Referencia
			Efluente	Afluente	Reducción			
<b><i>Escherichia coli</i></b>								
ECU	<i>Spirodela intermedia</i> W. D. J. Koch	7	3,6	0	3,6	100	León, R.	
ECU	<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
ECU	<i>Pistia stratiotes</i> L.	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
ECU	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
ECU	<i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) Brongn.	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
ECU	<i>Azolla caroliniana</i> Willd	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
ECU	<i>Lemna minor</i> L	7	3,07	0	3,07	100	León, R.	
UK	<i>Typha latifolia</i>	3	8	0	3,42	42,75	(Neralla & Weaver, 2000)	
<b>Coliformes totales</b>								
ECU	<i>Spirodela intermedia</i> W. D. J. Koch	7	4,47	4,93	0,46	10,29	León, R.	
ECU	<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.	7	5,62	0	5,62	100,00	León, R.	
ECU	<i>Pistia stratiotes</i> L.	7	5,62	2	3,62	64,41	León, R.	
ECU	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	7	5,62	4,8	0,82	14,59	León, R.	
ECU	<i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) Brongn.	7	5,62	3,82	1,8	32,03	León, R.	
ECU	<i>Azolla caroliniana</i> Willd	7	5,62	0	5,62	100,00	León, R.	
ECU	<i>Lemna minor</i> L	7	5,62	4,22	1,4	24,91	León, R.	
Italia	<i>Phragmites australis</i>	10	6,04	3,48	2,56	42,38	(Mantovi et al., 2003)	
EUA	<i>Scirpus sp.</i>	5	5,6	3,9	1,7	30,36	(Nokes et al., 2003)	
EUA	<i>Scirpus sp. / Typha sp.</i>	5	5,7	3,2	2,5	43,86	(Nokes et al., 2003)	
EUA	<i>Scirpus sp.</i>	5	5,1	3,5	1,6	31,37	(Nokes et al., 2003)	
EUA	<i>Scirpus sp. / Typha sp.</i>	5	5,6	2,3	3,3	58,93	(Nokes et al., 2003)	

Egipto	<i>Phragmites australis</i>	7	8,95	3,48	5,47	61,12	(Abdel-Shafy & El-Khateeb, 2013)
EUA	<i>Typha latifolia</i> , <i>Typha domingensis</i> , <i>Scirpus acutus</i> , <i>Phragmites communis</i>	6,5	6,18	4,28	1,9	30,74	(Dahab & Surampalli, 2001)
AUS	<i>Phragmites australis</i>	9,1	5,68	2,98	2,7	47,54	(Davison et al., 2001)
AUS	<i>Phragmites australis</i>	7,1	5,2	4,32	0,88	16,92	(Davison et al., 2001)
AUS	<i>Phragmites australis</i>	4,5	5,32	2,62	2,7	50,75	(Davison et al., 2001)
AUS	<i>Phragmites australis</i>	5,7	6,15	4,75	1,4	22,76	(Davison et al., 2001)

**TR(D):** Tiempo de retención en días

### 5.1. Posibles mecanismos de eliminación

Trabajos como el de Wu, Carvalho, Müller, Manoj, & Dong (2016) nos refiere los mecanismos de eliminación por los cuales son eliminadas las bacterias pudiendo ser estos por factores físicos, químicos y biológicos de forma independiente o por combinación de los mismos, dentro de los mecanismos y factores que podrían haber influido en la remoción de bacterias tenemos:

- Muerte natural de las bacterias.
- pH.
- Temperatura.
- Sedimentación.
- Adsorción por raíces.
- Generación de exudados bactericidas.

En cuanto a la muerte natural de las bacterias (coliformes) según Geldreich, (1990) las heces al abandonar el cuerpo del huésped y entrar al sistema de aguas negras, un 30% de las *E. coli* mueren y otras variedades de coliformes incrementan su población, por lo que con el uso de las plantas descritas previamente estas eliminan las variedades de *E. coli* que representa el 70% sobreviviente, a la tasa natural de mortalidad al igual que también la muerte natural contribuiría a reducir los niveles de la carga bacteriana inicial ya que la exposición a agentes estresantes como la falta de nutrientes y parámetros físico-químicos afectan a las bacterias (Wu et al., 2016).

Otros de los factores que formaría un papel importante en la eliminación de bacterias sería la variación del pH; las variaciones que se registraron del pH fueron propias del medio y según Solic & Krstuloviic (1992) el pH óptimo para la *E. coli* es de 6 – 7 y a valores superiores provocan un declive en su población.

En el experimento el pH en los controles sin las plantas se redujo de 8.20 a 7.40, por el contrario, en los tratamientos con las plantas el pH aumentó hasta 8.45 lo que promovió la muerte de las bacterias.

Las especies que aumentaron el pH a 8.45 fueron *A. caroliniana*, y *S. auriculata* lo que explicaría su eficacia en la remoción de bacterias. Por otro lado Mayo (2004) apoya la teoría de que a pH alcalinos mueren coliformes fecales.

También hubo una reducción de la temperatura de 2 – 3 °C lo que también pudo haber influido en la muerte de las bacterias; ya que la temperatura óptima para el crecimiento de las coliformes es de 37 – 40 °C por lo que la reducción a 24 °C puede haber influido en su eliminación (Mayo, 2004)

Tenemos la sedimentación como otro mecanismo de eliminación de bacterias, las plantas (macrófitas) podrían llegar a incidir en el incremento en la tasa de precipitación de sólidos suspendidos en aguas negras, las macrófitas con el crecimiento del cuerpo radicular ralentizan el flujo hidráulico lo que provoca la precipitación de los sólidos suspendidos.

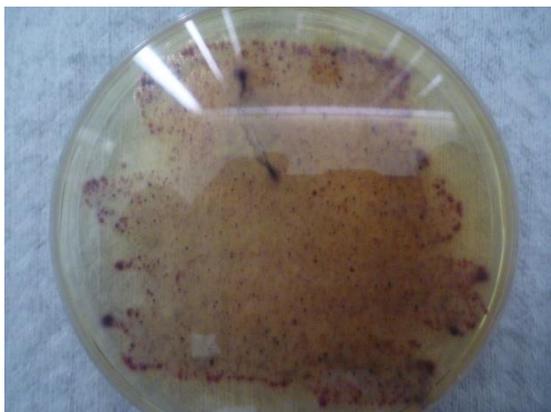
En el ensayo de Zimmels et al. (2006) y en el nuestro se observó un aumento de los niveles de TSD al cuarto día, resultados que coinciden con los de Zimmels et al. (2006) quien demostró que en un agua tratada con *E. crassipes* hubo un incremento de TSD en los días del 1 – 4 alcanzando su pico máximo al cuarto día y después de eso empezó a decrecer, lo cual se ve reflejado en nuestro ensayo teniendo como valor inicial a tratar con *E. crassipes* de 427 ppm TSD en el día 1 llegando a un pico de 471 ppm al cuarto día y decreciendo aún más para el séptimo día 415 ppm lo que concuerda con el ensayo de Zimmels et al. (2006) pero también significa que tuvo una efectividad del 2% en la eliminación de TSD.

También al cumplimiento de este postulado podemos decir que los sólidos disueltos totales, mostraron una tendencia a precipitarse en el fondo de los recipientes. Ya que en todos los ensayos se reflejó la relación del descenso de TSD con la población bacteriana, control con 647ppm y con una cantidad de coliformes totales de  $524 \times 10^8$ UFC/100 mL y en contraposición *P. stratiotes* 418 ppm y con un remanente de coliformes totales de  $1 \times 10^2$ UFC/100 mL.

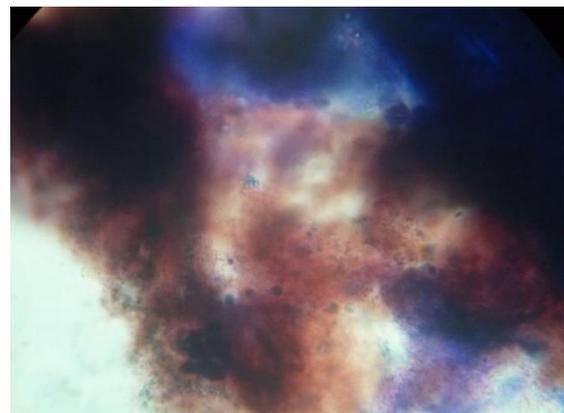
El mecanismo de adsorción podría haber contribuido ya que un gran número de coliformes se adhiere al cuerpo radicular de las macrófitas contribuyendo así a la eliminación de los coliformes y otros patógenos pero se alcanzaría un punto de saturación por lo que este factor solo sería efectivo en estadios tempranos de un proceso de fitorremediación (Solano, Soriano, & Ciria, 2004). Por lo que *E. crassipes* posee un gran rizoma donde las bacterias pueden ser adsorbidas y quedar adheridas a la misma hasta alcanzar un punto de saturación el mismo que al ser alcanzado hará de la planta fútil para eliminar patógenos ya que estos al estar adheridos al rizoma formarían un clúster o película de bacterias.

Para verificar esta hipótesis se realizaron cortes de raíz con tinciones y se observó al microscopio óptico **Figura 35** donde se apreció la presencia de bacterias con forma de bacilo en el rizoma y para confirmar que los bacilos eran coliformes se realizó un frotis de la raíz en una placa de agar selectivo evidenciándose la presencia de coliformes totales y *E. coli* **Figura 36**.

Esto justifica que en todos los ensayos de *E. crassipes* hubo presencia de coliformes totales ya que se encuentran asociadas de forma natural a las raíces de esta planta.



**Figura 26** Frotis del rizoma de *E. crassipes*.



**Figura 27** Biofilm polisacárido con bacterias con forma bacilar

Durante el desarrollo de la planta (macrófita) también se incrementa la superficie interradicular contribuyendo así a la adsorción y formación de biopelículas por parte de bacterias planctónicas, pero también este cuerpo radicular puede generar exudados con propiedades bactericidas que afectarían tanto a bacterias neutras como a las bacterias patógenas (Wu et al., 2016).

Los exudados bactericidas generados por las raíces aparte de ser tóxicos para las bacterias pueden también alterar el ambiente físico químico de la rizosfera haciendo que esta sea inhabitable para futuras colonizaciones de bacterias patógenas (Akça et al., 2012).

En nuestro caso la realización de los ensayos de sinergia no fue eficiente ya que los niveles de remoción de las plantas de forma independiente fueron mejores que en asociación. Es probable que esto se deba a la presencia de una asociación de bacterias coliformes adheridas en el rizoma de *E. crassipes*.

Finalmente, para concluir en la **Tabla 10** se muestra el Inventario de plantas recomendadas para fitorremediación de coliformes totales y *E. coli* en aguas negras.

**Tabla 10.** Inventario de plantas recomendadas para fitorremediación de coliformes totales y *E. coli* en aguas negras

Especie	Foto	Capacidad de remoción total (100%)	
		<i>E. coli</i>	Coliformes totales
<i>Azolla caroliniana</i> Willd.		+	+
<i>Salvinia auriculata</i> Aubl.		+	+
<i>Lemna minor</i> L.		+	-
<i>Pistia stratiotes</i> L.		+	-

*Ceratopteris  
thalictroides* (L.)  
Brongn.



+

-

*Spirodela  
intermedia* W. D. J.  
Koch



+

-

*Eichhornia  
crassipes* (Mart.)  
Solms



+

-

## 6. CONCLUSIONES

Las plantas seleccionadas en campo fueron las apropiadas para desarrollar los ensayos debido a que estas fueron fácilmente adaptables a un medio controlado y durante su aclimatación se evidenció un bajo o nulo estrés en las mismas, por lo que reúnen características útiles en lo que aclimatación se refiere.

Se determinó en los ensayos de laboratorio que las macrófitas seleccionadas para medir su nivel de eficiencia en la eliminación de *E. coli* ATCC 25922 lograron eliminar por completo a la bacteria en aguas inoculadas con el agente en mención.

Se realizó otro ensayo para medir la eficiencia en eliminación de Coliformes totales y *E. coli* en aguas negras con lo que se determinó que todas las plantas eran capaces de eliminar a la *E. coli* que habita en aguas negras, pero en la eliminación de los coliformes fecales se obtuvieron varios niveles de eficacia siendo que *S. auriculata* = *A. caroliniana* lograron el 100% de remoción de las coliformes y el resto niveles menores de eficiencia.

Al probar la sinergia en la eliminación de coliformes fecales, con *E. crassipes* en conjunto con *P. stratiotes* y *S. auriculata* se encontró que la mejor sinergia estuvo en la combinación de *E. crassipes* y *S. auriculata*.

Se encontró que bacterias coliformes viven en colonias asociadas de forma natural con *E. crassipes* lo que inviabiliza su uso en fitorremediación de aguas negras.

Por lo que el inventario de plantas con la capacidad de tratar aguas negras estaría conformado por: *Spirodela intermedia* W. D. J. Koch, *Salvinia auriculata* Aubl., *Pistia stratiotes* L., *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn., *Azolla caroliniana* Willd, *Lemna minor* L.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Shafy, H., & El-Khateeb, M. (2013). Integration of septic tank and constructed wetland for the treatment of wastewater in Egypt. *Desalination and Water Treatment*, 51(16–18), 3539–3546. <http://doi.org/10.1080/19443994.2012.749585>
- Academia Nacional de Ciencias. (2007). El agua potable segura es esencial. Retrieved October 20, 2016, from <https://www.koshland-science-museum.org>
- Akça, L., Tunçsiper, B., & Ayaz, S. (2012). Coliform bacteria removal from septic wastewater in a pilot-scale combined constructed wetland system. *Environmental Engineering and Management Journal*, 11(10), 1873–1879.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <http://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- APHA/AWWA/WEF. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods*.
- Arias, S., Betancur, F., Gómez, G., Salazar, J., & Hernández, M. (2010). Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas. *Informador Técnico (Colombia)*, 74, 12–22.
- Australian Government, N. C. H. and M. R. (2003). *Review of Coliforms As Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Water* (Vol. 1864961651). Retrieved from [http://www.nhmrc.gov.au/\\_files\\_nhmrc/publications/attachments/eh32.pdf?q=publications/synopses/\\_files/eh32.pdf](http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh32.pdf?q=publications/synopses/_files/eh32.pdf)
- Bhavnani, D., Bayas, R., Lopez, V., Zhang, L., Trueba, G., Foxman, B., ... Eisenberg, J. (2016). Distribution of enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli across space and time in northwestern Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 276–284. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0337>

- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4, 1–12. <http://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bollinger, R., Everett, M., Palestrant, D., Love, S., Lin, S., & Parker, W. (2003). Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*, 109(4), 580–587. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01700.x>
- Bres, P., Crespo, D., Rizzo, P., & La Rossa, R. (2012). Lemna minor y Eichhornia crassipes para eliminar el níquel. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 153–157.
- Britania. (2010). *Indol Reactivo*. Britania. Retrieved from [http://www.britanialab.com/productos/180\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/180_hoja_tecnica_es.pdf)
- Castrillo, M., Pernia, B., De Sousa, A., & Reyes, R. (2012). Utilization of Different Aspects Associated with Cadmium Tolerance in Plants to Compare Sensitive and Bioindicator Species. In *Phytotechnologies* (p. 429).
- Dahab, M., & Surampalli, R. (2001). Subsurface-flow constructed wetlands treatment in the plains: Five years of experience. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 375–380.
- Davison, L., Headley, T., & Edmonds, M. (2001). On-site domestic wastewater treatment by reed bed in the moist subtropics. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 353–360.
- Díaz, F. J., O'Geen, A. T., & Dahlgren, R. A. (2010). Efficacy of constructed wetlands for removal of bacterial contamination from agricultural return flows. *Agricultural Water Management*, 97(11), 1813–1821. <http://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.06.015>
- Ecuador, A. (2012). El Agua en el Ecuador. Retrieved from <http://agua-ecuador.blogspot.com/2012/04/la-contaminacion-del-agua-en-ecuador.html>

- El Universo. (2009). Ecuador enfrenta desafíos por contaminación de ríos. *El Universo*. Retrieved from <http://www.eluniverso.com/2009/03/18/1/1430/3927AAEE806F4DF68C94A6C26704856D.html>
- El Universo. (2013). Elevados niveles de hidrocarburos y coliformes en aguas. *Versión Digital*. Pacayacu. Retrieved from <http://www.eluniverso.com/noticias/2013/05/25/nota/955126/sucumbios-elevados-niveles-hidrocarburos-coliformes-agua>
- Enciclopedia, D. (2016). Contaminación artificial. Retrieved October 20, 2016, from <http://www.encyclopediadetareas.net/2016/08/que-es-la-contaminacion-artificial-del.html>
- Fernández, A., Tejedor, C., & Chordi, A. (1992). Effect of different factors on the die-off of fecal bacteria in a stabilization pond purification plant. *Water Research*, 26(8), 1093–1098. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90145-T](http://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90145-T)
- Forest Service, U. S. D. of A. (2016). U.S. FOREST SERVICE. Retrieved November 12, 2016, from <http://www.fs.fed.us/>
- García, M., Soto, F., González, J. M., & Bécares, E. (2008). A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems. *Ecological Engineering*, 32(3), 238–243. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.012>
- Geldreich, E. E. (1990). Microbiological Quality of Source Waters for Water Supply. *Environmental Protection Agency*.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte Der Medicin*, 2, 185–189.
- Kasarjian, J., Iida, M., & Ryu, J. (2003). New restriction enzymes discovered from *Escherichia coli* clinical strains using a plasmid transformation method. *Nucleic Acids Research*, 31(5), 1–10. <http://doi.org/10.1093/nar/gng022>

- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). Intradermal Rabies Vaccination: The Evolution and Future of Pre- and Post-exposure Prophylaxis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358(January), 3–32. <http://doi.org/10.1007/82>
- Lenntech. (2016). Enfermedades transmitidas por el agua. Retrieved February 16, 2016, from <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/deseases/enfermedades-transmitidas-por-el-agua.htm>
- Levy, K., Nelson, K. L., Hubbard, A., & Eisenberg, J. N. S. (2012). Rethinking indicators of microbial drinking water quality for health studies in tropical developing countries: Case study in northern coastal Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 499–507. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0263>
- Mantovi, P., Marmioli, M., Maestri, E., Tagliavini, S., Piccinini, S., & Marmioli, N. (2003). Application of a horizontal subsurface flow constructed wetland on treatment of dairy parlor wastewater. *Bioresource Technology*, 88(2), 85–94. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00291-2](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00291-2)
- Mayo, A. W. (2004). Kinetics of bacterial mortality in granular bed wetlands. *Physics and Chemistry of the Earth*, 29(15–18), 1259–1264. <http://doi.org/10.1016/j.pce.2004.09.030>
- Montoya Villafaë, H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. (Segunda). Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Neralla, S., & Weaver, R. . (2000). Phytoremediation of domestic wastewater for reducing populations of Escherichia Coli and MS-2 coliphage. *Environmental Technology*, 21(6), 691–698. <http://doi.org/10.1080/09593330.2000.9618954>
- Nokes, R. L., Gerba, C. P., & Karpiscak, M. M. (2003). Microbial Water Quality Improvement by Small Scale On-Site Subsurface Wetland Treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(9), 1849–1855. <http://doi.org/10.1081/ESE-120022883>

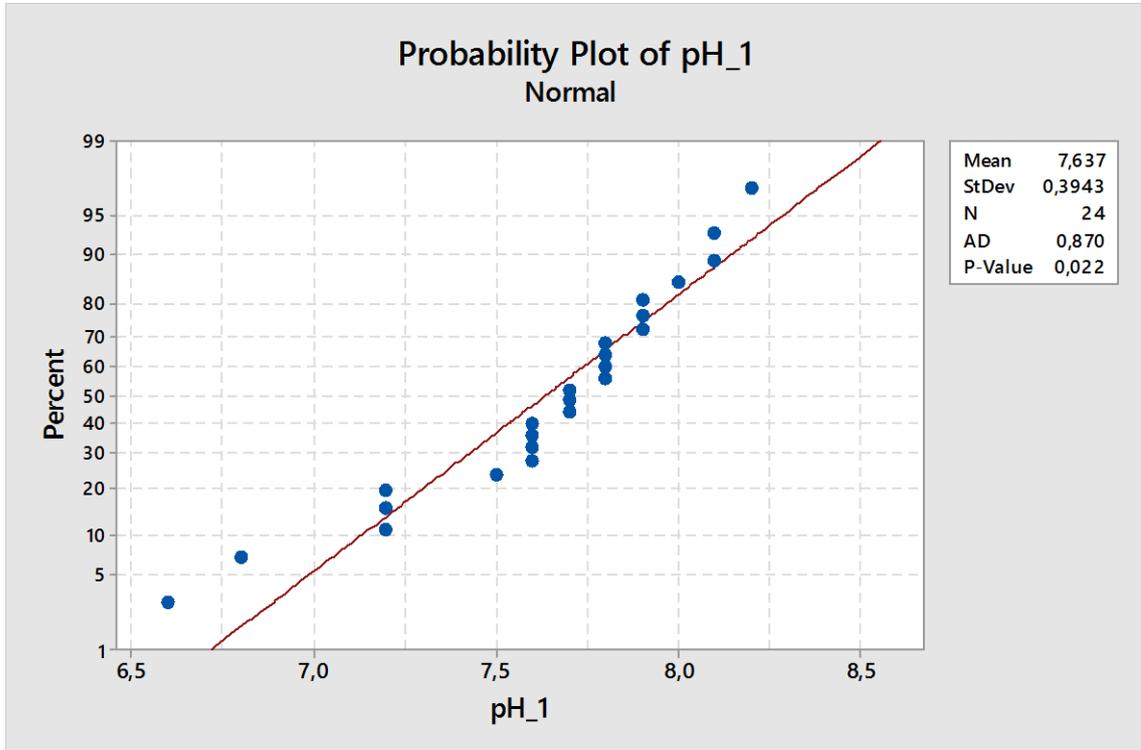
- Oquendo, R., & Boada, E. (2016). Una alternativa para el saneamiento y conservación de recursos hídricos . *Universidad Tecnica Del Norte*.
- Paulson, L. (2014). Qué es la Fitorremediación. Retrieved February 16, 2016, from <https://www.rwlwater.com/que-es-la-fitorremediacion/?lang=es>
- Pearson, H., Mara, D., Mills, S., & Smallman, D. (1987). Physico-chemical parameters influencing faecal bacterial survival in waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, 19(12), 145–152.
- Puente, D. (2015). La mayor contaminación en ríos y quebradas está en 8 sitios del sur. *El Comercio*. Retrieved from <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito-contaminacion-rios-aguas-residuales.html>
- Rao, G., Eisenberg, J. N. S., Kleinbaum, D. G., Cevallos, W., Trueba, G., & Levy, K. (2015). Spatial variability of Escherichia coli in rivers of northern coastal Ecuador. *Water (Switzerland)*, 7(2), 818–832. <http://doi.org/10.3390/w7020818>
- Rojas, J. (2005). *Diversidad bacteriana en el perifiton de raices de Eichhornia sp, Pistia sp y Azolla sp*. Universidad Earth.
- Sakurai, K., & CEPIS. (1983). Análisis de residuos municipales. In *Aspectos básicos del servicio de aseo* (p. 60).
- Shoaie, S., Karlsson, F., Mardinoglu, A., Nookaew, I., Bordel, S., & Nielsen, J. (2013). Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Scientific Reports*, 3, 2532. <http://doi.org/10.1038/srep02532>
- Solano, M. L., Soriano, P., & Ciria, M. P. (2004). Constructed Wetlands as a Sustainable Solution for Wastewater Treatment in Small Villages. *Biosystems Engineering*, 87(1), 109–118. <http://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2003.10.005>

- Solic, M., & Krstuloviic, N. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 24(8), 411–416. [http://doi.org/10.1016/0025-326X\(92\)90503-X](http://doi.org/10.1016/0025-326X(92)90503-X)
- The Environment Agency. (2002). *The Microbiology of Drinking Water (2002) - Part 1 - Water Quality and Public Health Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*.
- Tratagua Dalag S.A. (2010). *Tratamiento de aguas residuales fitorremediación*. Universidad Politecnica de Chimborazo.
- UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR. (2009). *Proyecto Biomonitorio de la calidad del agua para determinar la naturaleza y grado de la contaminación por la agricultura y actividades afines en los principales rios en la cuenca del río Guayas*. Guayaquil.
- Valderrama, L., Campos, C., Velandia, S., & Zapata, N. (1987). Evaluacion del efecto del tratamiento con plantas acuaticas *E. crassipes*, *Lemna sp.* y *L. Laevigatum* en la remocion de indicadores de contaminación fecal en aguas residuales domesticas. *Seminario Internacional Sobre Métodos Naturales Para El Tratamiento de Aguas Residuales*, 193–201.
- Virgin, H. W. (2014). The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*, 157(1), 142–150. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032>
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Manoj, V. R., & Dong, R. (2016). Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Science of the Total Environment*, 541, 8–22. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Zimmels, Y., Kirzhner, F., & Malkovskaja, A. (2006). Application of *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes* for treatment of urban sewage in Israel. *Journal of Environmental Management*, 81(4), 420–428. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.11.014>

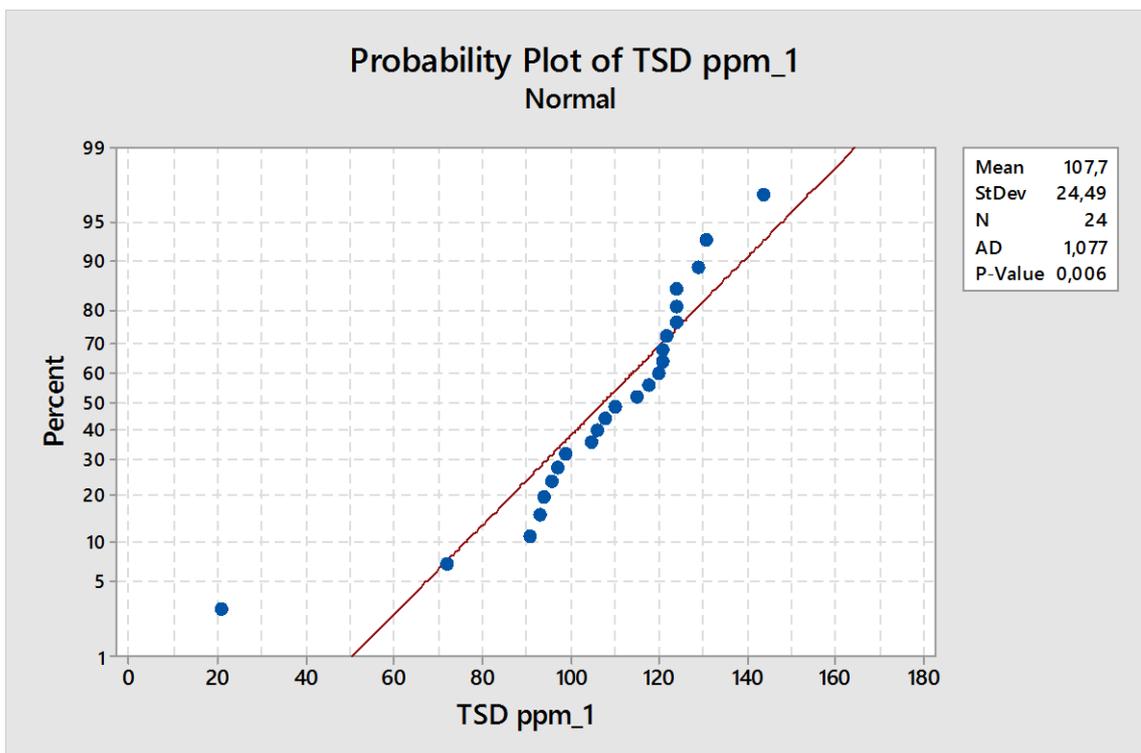
## **8. ANEXOS**

## 8.1. Pruebas estadísticas y test de normalidad de Anderson - Dailing.

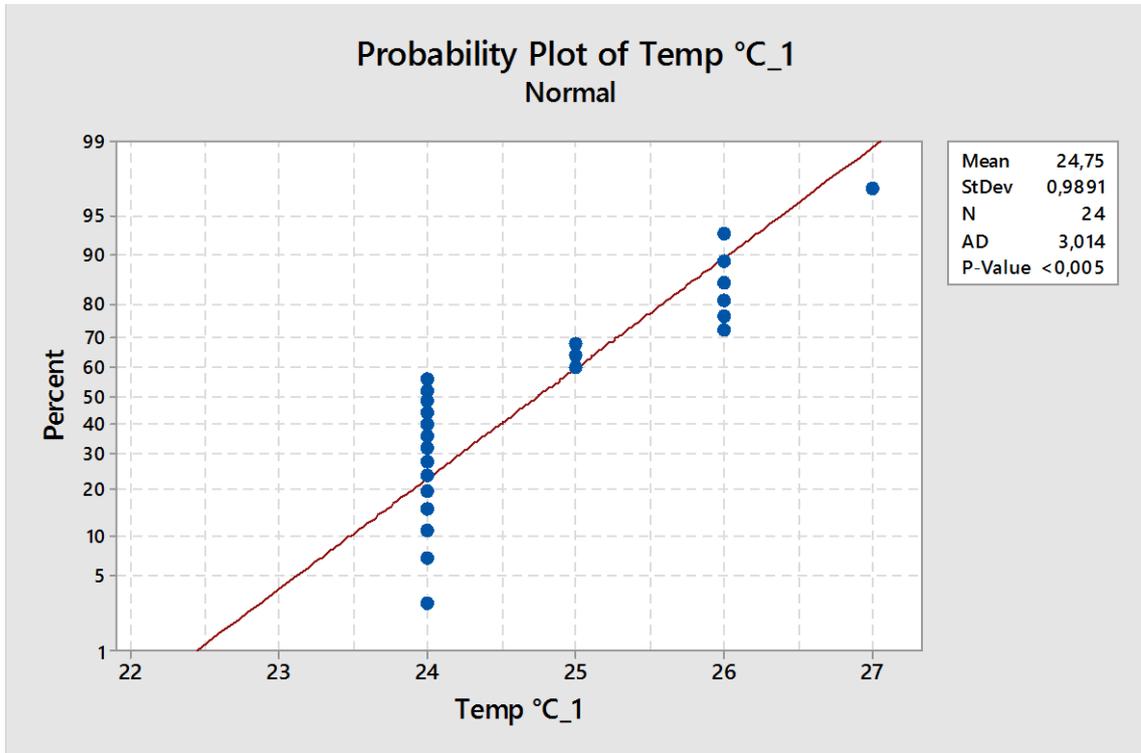
Prueba de Normalidad para pH



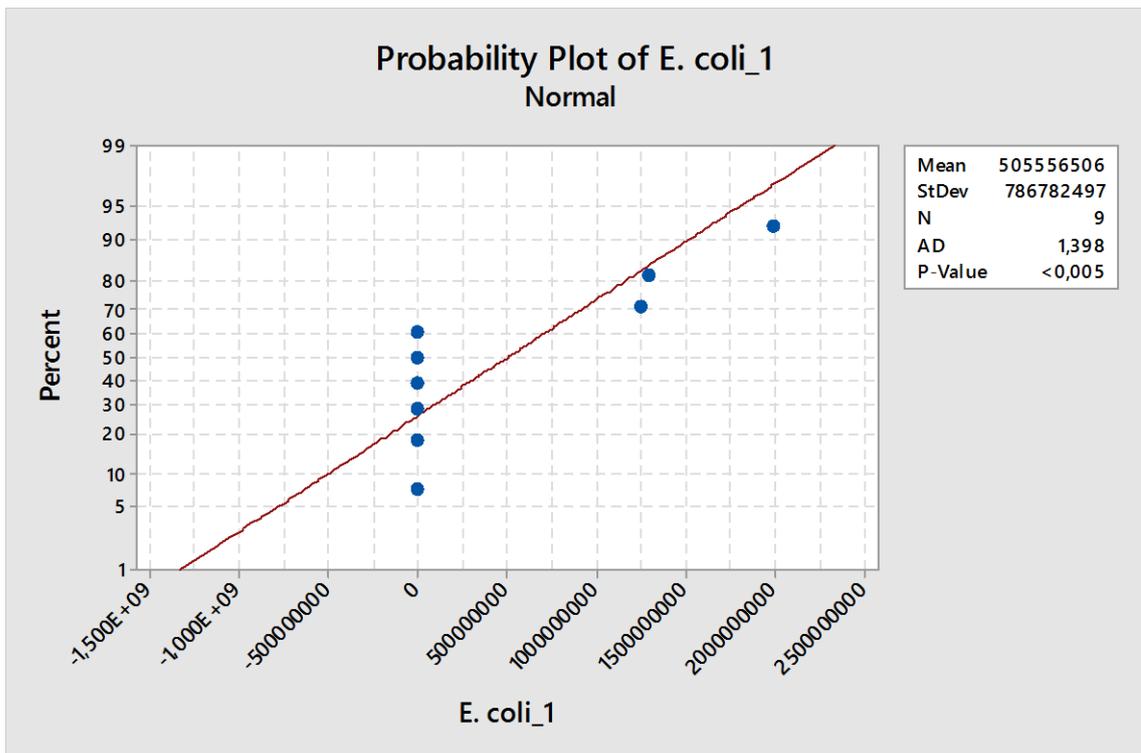
Prueba de Normalidad para TSD



Prueba de Normalidad para temperatura

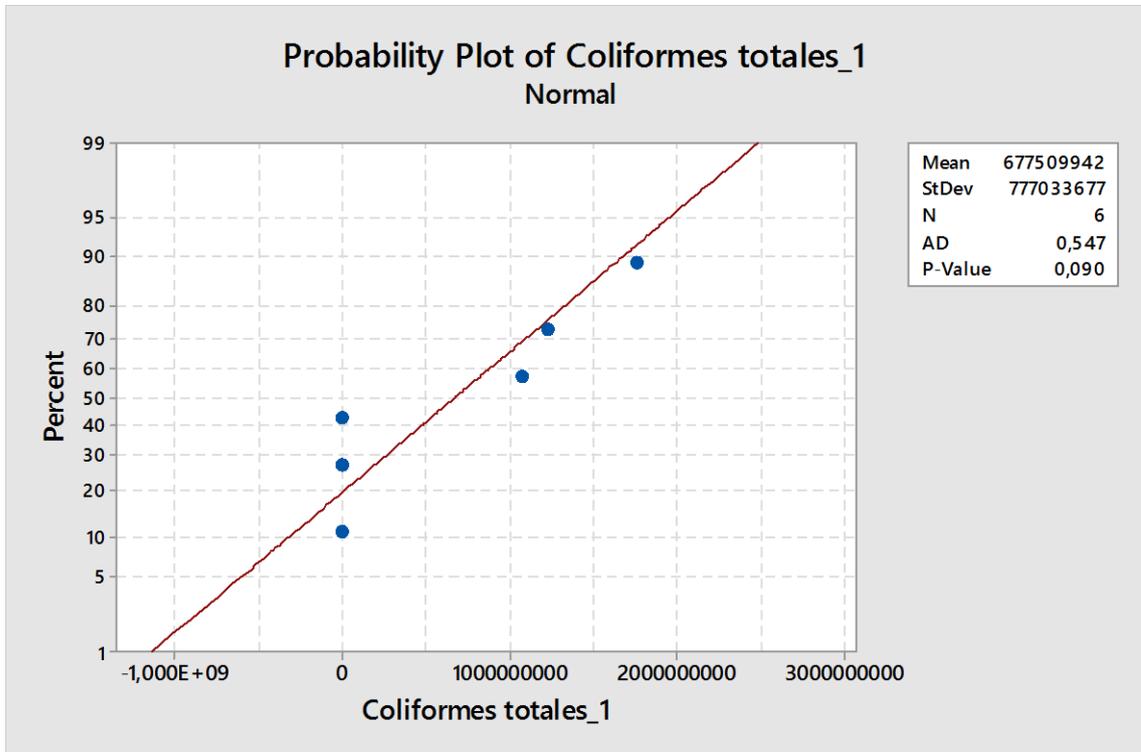


Prueba de Normalidad para la concentración de *E. coli* en el ensayo 1

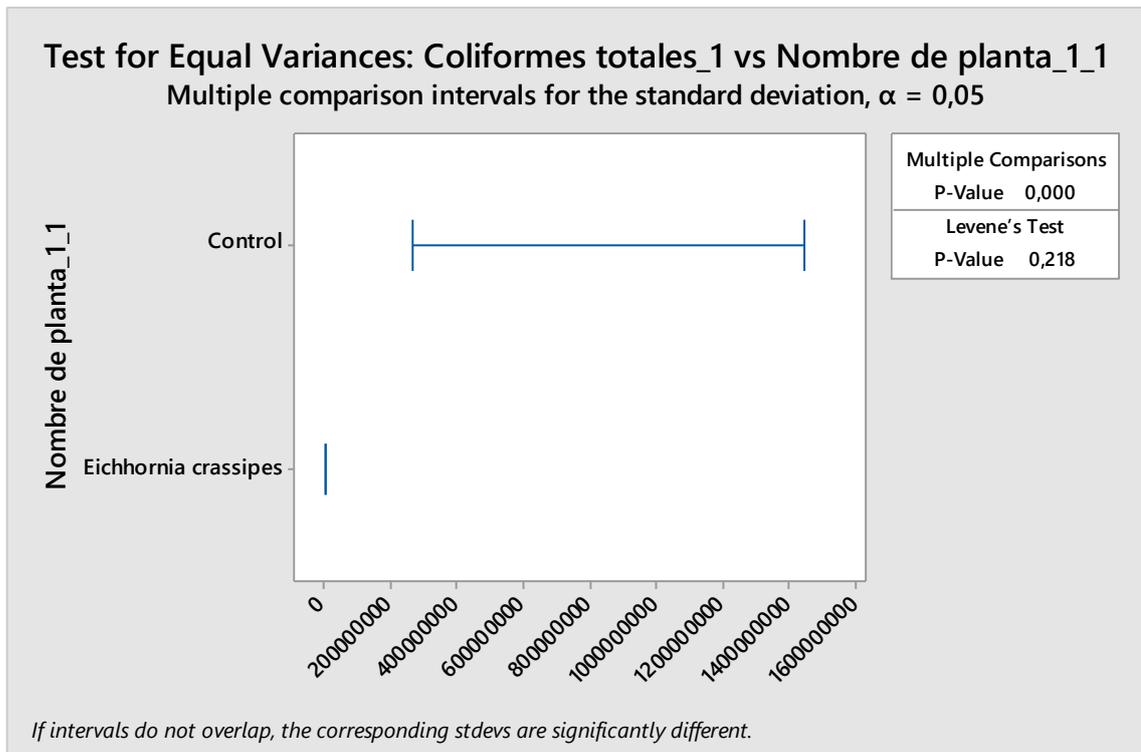


Prueba de Normalidad para la concentración de coliformes totales en el ensayo

1



Test de igualdad de varianzas de Levene



## 8.2. Pruebas no paramétricas (Pruebas de comparación)

### Kruskal-Wallis Test: pH versus Nombre de planta

Kruskal-Wallis Test on pH

Nombre de planta	N	Median	Ave Rank	Z
Azolla sp.	3	7,900	20,7	2,14
BLANCO	3	8,100	22,0	2,49
Ceratopteris thalictroides	3	7,700	13,2	0,17
Eichhornia crassipes	3	6,800	6,2	-1,66
Lenna minor	3	7,800	16,7	1,09
Pistia sp.	3	7,600	8,5	-1,05
Salvinia sp.	3	7,600	8,8	-0,96
Spirodella sp.	3	7,200	4,0	-2,23
Overall	24		12,5	

$\chi^2 = 18,99$  DF = 7 P = 0,008

### Kruskal-Wallis Test: TSD ppm\_1 versus Nombre de planta

Kruskal-Wallis Test on TSD ppm\_1

Nombre de planta	N	Median	Ave Rank	Z
Azolla sp.	3	96,00	5,3	-1,88
BLANCO	3	106,00	10,7	-0,48
Ceratopteris thalictroides	3	131,00	20,3	2,05
Eichhornia crassipes	3	72,00	2,3	-2,66
Lenna minor	3	99,00	8,0	-1,18
Pistia sp.	3	124,00	18,3	1,53
Salvinia sp.	3	121,00	17,7	1,35
Spirodella sp.	3	122,00	17,3	1,27
Overall	24		12,5	

H = 19,43 DF = 7 P = 0,007

### Kruskal-Wallis Test: E. coli\_1 versus Nombre de planta\_1

Kruskal-Wallis Test on E. coli\_1

Nombre de planta_1	N	Median	Ave Rank	Z
Azolla sp.	3	1800	5,0	0,00
Control	3	13000000000	8,0	2,32
Lenna minor	3	1050	2,0	-2,32
Overall	9		5,0	

H = 7,20 DF = 2 P = 0,027

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

#### Factor Information

Factor	Levels	Values
Nombre de planta_1_1	2	Control; Eichhornia crassipes

#### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nombre de planta_1_1	1	2,75396E+18	2,75396E+18	41,58	0,003
Error	4	2,64950E+17	6,62375E+16		
Total	5	3,01891E+18			

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
257366470	91,22%	89,03%	80,25%

#### Means

Nombre de planta_1_1	N	Mean	StDev	95% CI
Control	3	1355000000	363971153	( 942446353; 1767553647)
Eichhornia crassipes	3	19883	10800	(-412533763; 412573530)

Pooled StDev = 257366470

## Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nombre de planta_1_1	N	Mean	Grouping
----------------------	---	------	----------

Control	3	1355000000	A
Eichhornia crassipes	3	19883	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Tukey Simultaneous 95% CIs

### One-way ANOVA: Coliformes totales\_1 versus Nombre de planta\_1\_1

Method

Null hypothesis All means are equal  
 Alternative hypothesis At least one mean is different  
 Significance level  $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Nombre de planta_1_1	2	Control; Eichhornia crassipes

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nombre de planta_1_1	1	2,75396E+18	2,75396E+18	41,58	0,003
Error	4	2,64950E+17	6,62375E+16		
Total	5	3,01891E+18			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
257366470	91,22%	89,03%	80,25%

Means

Nombre de planta_1_1	N	Mean	StDev	95% CI
Control	3	1355000000	363971153	( 942446353; 1767553647)
Eichhornia crassipes	3	19883	10800	(-412533763; 412573530)

Pooled StDev = 257366470

## Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nombre de planta_1_1	N	Mean	Grouping
Control	3	1355000000	A
Eichhornia crassipes	3	19883	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL vs. C2

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL

C2	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	10100000,0	14,0	2,60
Eichhornia crassipes	3	6800,0	11,0	1,30
Eichhornia/ Pistia	3	2700,0	8,0	0,00
Eichhornia/ Salvinia	3	100,0	4,0	-1,73
Pistia sp.	3	100,0	3,0	-2,17
General	15		8,0	

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL vs. C2

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL

C2	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	10100000,0	14,0	2,60
Eichhornia crassipes	3	6800,0	11,0	1,30
Eichhornia/ Pistia	3	2700,0	8,0	0,00
Eichhornia/ Salvinia	3	100,0	4,0	-1,73
Pistia sp.	3	100,0	3,0	-2,17
General	15		8,0	

H = 12,90 GL = 4 P = 0,012

## ANOVA unidireccional: CT UFC/100mL vs. C2

Método

Hipótesis nula                    Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna                Por lo menos una media es diferente  
Nivel de significancia     $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor   Niveles   Valores

C2                                    5    Control. Eichhornia crassipes. Eichhornia/ Pistia.  
Eichhornia/ Salvinia.  
   Pistia sp.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C2	4	4,01693E+14	1,00423E+14	3,22	0,061
Error	10	3,11734E+14	3,11734E+13		
Total	14	7,13427E+14			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5583311	56,30%	38,83%	1,69%

Medias

C2	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	12940000	12484663	( 5757536. 20122464)
Eichhornia crassipes	3	7933	3635	( -7174531. 7190397)
Eichhornia/ Pistia	3	2733	850	( -7179731. 7185197)
Eichhornia/ Salvinia	3	267	289	( -7182197. 7182731)

Pistia sp. 3 100,0 100,0 (-7182363,9. 7182563,9)

Desv.Est. agrupada = 5583311

## Gráfica de intervalos de CT UFC/100mL vs. C2

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL\_1 vs. C7

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL\_1

C7	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	10100000,0	5,0	1,96
Eichhornia/ Salvinia	3	100,0	2,0	-1,96
General	6		3,5	

H = 3,86 GL = 1 P = 0,050

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL\_1 vs. C7

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL\_1

C7	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	1,01000E+07	5,0	1,96
Eichhornia/ Pistia	3	0,000000000	2,0	-1,96
General	6		3,5	

H = 3,86 GL = 1 P = 0,050

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL\_1 vs. C7

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL\_1

C7	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	10100000,0	5,0	1,96
Pistia sp.	3	100,0	2,0	-1,96
General	6		3,5	

H = 3,86 GL = 1 P = 0,050

## Prueba de Kruskal-Wallis: CT UFC/100mL\_1 vs. C7

Prueba de Kruskal-Wallis en CT UFC/100mL\_1

C7	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Control	3	10100000	5,0	1,96
Eichhornia crassipes	3	6800	2,0	-1,96
General	6		3,5	

H = 3,86 GL = 1 P = 0,050

### 8.3. Certificados: *Escherichia coli* ATCC 25922, Chromocult, Peptona



Product Sheet

#### *Escherichia coli* (ATCC®) 25922-MINI-PACK™

Please read this FIRST

Storage Temp.  
**-70°C or colder,**  
store upright.  
Storage at -20°C  
is acceptable for  
up to 1 year.

Biosafety Level  
**1**

#### Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

#### Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922-MINI-PACK™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

#### Description

**Designation:** FDA strain Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]

**Deposited Name:** *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

**Antigenic Properties:** Serotype O6, Biotype 1

**Product Description:** ATCC® 25922-MINI-PACK™ consists of 6 ready-to-use vials of ATCC® 25922™ frozen in 200 µL of glycerol stock, eliminating the need to rehydrate and culture the strain prior to use. Each vial is provided with a 2-D barcode for easy storage and tracking, as well as peel-off labels for fast and reliable recordkeeping.

#### Propagation

##### Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

##### Growth Conditions

**Temperature:** 37°C

**Atmosphere:** Aerobic

##### Propagation Procedure

Frozen mini-cryovials packed in dry ice should either be thawed immediately for use or stored at or below -70°C until the expiration date printed on the label. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year.

1. Thaw the bacterial strain upright using gentle agitation in a 25°C to 30°C water bath. Thawing will be rapid; approximately 2-3 minutes or until all ice crystals have melted.
2. Immediately after thawing, wipe down the mini-cryovial with 70% ethanol and aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #18 broth or directly inoculate a #18 plate and/or #18 agar slant.
3. Discard the empty vial. Do not refreeze any unused portion as it will result in a loss of viability.
4. Incubate at 37°C for 24 hours.

#### Notes

ATCC® 25922™ is a recommended reference strain for antibiotic susceptibility testing. It has been found that passage in broth often results in a change in MIC levels. Therefore, it is best to keep it on agar and to make stocks for storage immediately. Repeated passage is discouraged.

Colonies on #18 agar are entire, glistening, circular, smooth, translucent, and low convex.

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 25922D-5™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

#### References

References and other information relating to this product are available online at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

#### Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

#### ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

#### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet,



Product Sheet

***Escherichia coli* (ATCC®)  
25922-MINI-PACK™**

Please read this FIRST

The graphic is a black rectangle with white text and icons. At the top left is a thermometer icon. To its right, the text reads: "Storage Temp. -70°C or colder, store upright. Storage at -20°C is acceptable for up to 1 year." Below this is a horizontal dotted line. At the bottom left is a biohazard symbol. To its right, the text reads: "Biosafety Level 1".

**Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

**Citation of Strain**

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922-MINI-PACK™)

ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© ATCC 2016. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/17]

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.368.2700  
Fax: 703.368.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 2 of 2



## SAFETY DATA SHEET

Follow established laboratory procedures when handling material.

### SECTION 8 - EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

**Use Personal Protective Equipment:** Including Eye Protection, Chemical Resistant Gloves, and appropriate clothing to prevent skin exposure. In addition, a Respiratory protection program that complies with OSHA 29 CFR 1910.134 and ANSI Z88.2 requirements or European Standard EN 149 must be followed whenever workplace conditions warrant respirator use.

**Engineering Controls:** The use and storage of this material requires user to maintain and make available appropriate eyewash and safety shower facilities. Use appropriate ventilation method to keep airborne concentrations a low as possible.

**Exposure Limits:** No exposure limits for this material have been established by ACGIH, NIOSH, or OSHA.

### SECTION 9 - PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Data Not Available

### SECTION 10 - STABILITY AND REACTIVITY

Hazardous polymerization will not occur.

### SECTION 11 - TOXICOLOGICAL INFORMATION

#### Route of Exposure

**Eye Contact:** Data not available.  
**Skin Contact:** Data not available.  
**Skin Absorption:** Data not available.  
**Inhalation:** Data not available.  
**Ingestion:** Data not available.  
**Parenteral Exposure:** Data not available.

#### Sensitization

**Skin:** Data not available  
**Respiratory:** Data not available

**Target Organ(s) or System(s):** Data not available

#### Signs and Symptoms of Exposure

**Skin and Mucous Membranes:** Data not available  
**Respiratory:** Data not available  
**Gastrointestinal:** Data not available



## SAFETY DATA SHEET

<b>Ingestion:</b>	If person is unconscious seek emergency medical attention; never give anything by mouth to an unconscious person. If the person is conscious wash mouth out with water and call a physician then administer three cups of water. Do not induce vomiting unless directed to do so by a physician.
<b>Inhalation:</b>	If person is unconscious seek emergency medical attention, if person is conscious remove to fresh air and call a physician.
<b>Dermal exposure:</b>	Immediately wash skin with water followed by washing with soap and water. Remove all contaminated clothing.
<b>Eye exposures:</b>	Flush eyes with water for at least 15 minutes with eyelids separated and call a physician.

### SECTION 5 - FIRE FIGHTING MEASURES

<b>Flammability:</b>	Data not available
<b>Suitable Extinguishing Media:</b>	Water spray, carbon dioxide, dry chemical powder, Halon (where regulations permit), or appropriate foam.
<b>Firefighting Protective Equipment:</b>	Wear self-contained breathing apparatus and protective clothing to prevent inhalation, ingestion, skin and eye contact.
<b>Specific Hazard(s):</b>	Responders should take into consideration the biohazard risk associated with responding to a fire in the area where the material may be stored or handled.

### SECTION 6 - ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

<b>Procedure(s) of Personal Precaution(s):</b>	At a minimum use PPE listed in Section 8. Wear laboratory coat, gloves and eye protection. Avoid all contact. Methods for Cleaning Up
<b>Patient/Victim:</b>	Wash with soap and water. Work clothes should be laundered separately. Launder contaminated clothing before re-use. Do not take clothing home.
<b>Equipment/Environment:</b>	Allow aerosols to settle; wearing protective clothing, gently cover spill with paper towel and apply 1% sodium hypochlorite, starting at perimeter and working towards the center; allow sufficient contact time before cleanup (30 min).

**Note:** The use of additional PPE may be necessary for cleaning solutions.

### SECTION 7 - HANDLING AND STORAGE

Handle and store according to instructions on product information sheet and label.  
Special Requirements:



THE ESSENTIALS OF LIFE SCIENCE RESEARCH  
GLOBALLY DELIVERED™

## SAFETY DATA SHEET

### SECTION 1 - SUBSTANCE IDENTITY AND COMPANY INFORMATION

**Product Name:** Various Microbial Cultures at Biosafety Level 1 or 2 or 3  
**ATCC Catalog #:** Various

**COMPANY INFORMATION:** AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION  
PO BOX 1549  
MANASSAS, VA 20108

**FOR INFORMATION CALL:** 800-638-6597 or 703-365-2700  
**AFTER-HOURS CONTACT:** 703-365-2710  
**CHEMTREC EMERGENCY:** 800-424-9300 or 703-527-3887

### SECTION 2 - COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Either freeze dried, frozen or growing cells shipped in liquid cell culture medium (a mixture of components that may include, but is not limited to: inorganic salts, vitamins, amino acids, carbohydrates and other nutrients dissolved in water). Frozen Cultures may also contain a 5%-10% solution of Dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant.

### SECTION 3 - HAZARD IDENTIFICATION

**HMIS Rating:** N/A  
**NFPA Rating:** N/A

This substance is not hazardous as defined by OSHA 29CFR 1910.1200 however this product should be handled according to good lab practices, with proper personal protective equipment, proper engineering controls and within the parameters of the purchaser's safety program.

#### Health Hazards

ATCC recommends that all ATCC microbial cultures be handled by qualified microbiologists using appropriate safety procedures and precautions. Detailed discussions of laboratory safety procedures are provided in **Laboratory Safety: Principles and Practice** (Fleming et al) and in the U.S. Government Publication, **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**. This publication is available in its entirety in the Center for Disease Control Office of Health and Safety's web site at <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/index.htm>.

Information on the classification of human etiologic agents on the basis of hazard can be found as Appendix B in the NIH **Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules** at <http://grants.nih.gov/grants/policy/recombinentdnaguidelines.htm>.

### SECTION 4 - FIRST AID MEASURES

**Report to your Safety Office and Seek Medical Attention as Soon as Possible**

American Type Culture Collection (ATCC®)  
P.O. Box 1549  
Manassas, VA 20110 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

(800) 638-6597 or 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
Doc ID: 8409  
Effective Date: 08/13/2012  
Revision: 4



---

## SAFETY DATA SHEET

<b>Toxicity Data:</b>	Data not available
<b>Effects of Long Term or Repeated Exposure:</b>	Data not available
<b>Chronic Exposure–Teratogen:</b>	Data not available
<b>Chronic Exposure–Mutagen:</b>	Data not available
<b>Chronic Exposure–Reproductive Hazard:</b>	Data not available

---

**SECTION 12 - ECOLOGICAL INFORMATION**

---

No ecological information available.

---

**SECTION 13 - DISPOSAL CONSIDERATIONS**

---

Decontaminate all wastes before disposal (steam sterilization, chemical disinfection, and/or incineration).

Dispose of in accordance with applicable regulations.

---

**SECTION 14 - TRANSPORT INFORMATION**

---

Contact ATCC for transport information.

---

**SECTION 15 - REGULATORY INFORMATION**

---

Contact ATCC for regulatory information.

---

**SECTION 16 - OTHER INFORMATION**

---

DATE REVISED: JUNE 1, 2016

THE INFORMATION PRESENTED IN THIS DOCUMENT IS BELIEVED TO BE CORRECT BASED UPON DATA AVAILABLE TO ATCC. USERS SHOULD MAKE AN INDEPENDENT DECISION REGARDING THE ACCURACY OF THIS INFORMATION BASED ON THEIR NEEDS AND DATA AVAILABLE TO THEM. ALL SUBSTANCES AND MIXTURES MAY PRESENT UNKNOWN HAZARDS AND ALL NECESSARY SAFETY PRECAUTIONS SHOULD BE TAKEN. ATCC ASSUMES NO LIABILITY RESULTING FROM USING OR COMING IN CONTACT WITH THIS SUBSTANCE.



# Certificate of Analysis

1.07228.0500 Buffered Peptone Water acc. ISO 6579, ISO 21528, ISO 22964, FDA-BAM and EP  
 Batch VM714828

	Spec. Values	Batch Values
Appearance (clearness)	clear	clear
Appearance (colour)	yellowish	yellowish
pH-value (25 °C)	6.8 - 7.2	7.1

	Spec. Values	Batch Values
Growth promotion test in accordance with the current version of DIN EN ISO 11133 and the harmonised method of EP, USP and JP.		
Inoculum on reference medium (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	≤ 100	86
Inoculum on reference medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	≤ 100	78
Inoculum on reference medium (Salmonella typhimurium ATCC 14028 (WDCM 00031))	≤ 100	64
Inoculum on reference medium (Salmonella enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030))	≤ 100	98
Inoculum on reference medium (Salmonella Abony NCTC 8017)	≤ 100	57
Growth (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	good to very good	very good
Growth (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	good to very good	very good
Growth (Salmonella typhimurium ATCC 14028 (WDCM 00031))	good to very good	very good
Growth (Salmonella enteritidis ATCC 13076 (WDCM 00030))	good to very good	very good
Growth (Salmonella Abony NCTC 8017)	good to very good	very good

Incubation:  
 8 ± 2 hours at 37 ± 1 °C  
 Labony 18 - 24 hours at 30 - 35 °C

Date of release (DD.MM.YYYY) 06.11.2015  
 Expiry date (DD.MM.YYYY) 14.10.2020

Stefanie Fischer  
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



# Certificate of Analysis

1.09293.0100 KOVACS' indole reagent for microbiology  
Batch HX58078593

	Spec. Values	Batch Values
Indole formation (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	+	+
Indole formation (Proteus vulgaris ATCC 8427)	+	+
Indole formation (Enterobacter aerogenes ATCC 13048)	-	-

Tested in DEV-Tryptophan broth art. no. 1.10694 (after incubation 24 hrs. 35 °C aerobic)

Date of release (DD.MM.YYYY) 10.02.2016  
Expiry date (DD.MM.YYYY) 31.12.2018

Stefanie Fischer  
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically, and is valid without a signature

Date of control: **08-APR-2015**

Lot number: **P000314**

Expiry date: **FEB-2018**

**PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES:**

pH at room temperature	7,2 +/- 0,2
after pouring and cooling at room temperature:	
medium colour	colourless
medium aspect	homogeneous

**MICROBIOLOGICAL PROPERTIES:**

Sterility after boiling:  
No inoculum

absence of colonies

Incubation for 24 h at 37°C:  
Antibacterial effect, by isolation method:  
*S.saprophyticus* AR3883

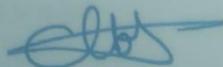
no growth

Diameter, colour and aspect of isolated colonies :

<i>E. coli</i> AR3741	2-3 mm, blue
<i>Citrobacter</i> AR3378	1,5-2 mm, mauve

This lot number satisfies QC test indicated as above.  
Our QC should not be substituted for the user's own quality control.  
For the preparation of media, please refer to the IFU.

Signature and stamp:



C. BINET  
Quality Manager

Quality Control Department

**CHROMagar**  
4, Place du 18 Juin 1940  
75006 PARIS - FRANCE



# Certificate of Analysis

1.10426.0500 Coliform Agar acc. to ISO 9308-1 Chromocult®  
 Batch VM724526

	Spec. Values	Batch Values
Appearance (clearness)	slightly turbid to turbid	slightly turbid
Appearance (colour)	yellowish to yellowish-brown	yellowish
pH-value (25 °C)	6.6 - 7.0	6.9
Growth promotion test in accordance with the current version of DIN EN ISO 11133.		
	Spec. Values	Batch Values
Inoculum on reference medium (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))		129
Inoculum on reference medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))		196
Inoculum on reference medium (Enterobacter aerogenes ATCC 13048)		171
Inoculum on reference medium (Citrobacter freundii ATCC 43864 (WDCM 00006))		102
Colony count (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))		142
Colony count (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))		218
Colony count (Enterobacter aerogenes ATCC 13048)		195
Colony count (Citrobacter freundii ATCC 43864 (WDCM 00006))		106
Recovery on test medium (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	≥ 70 %	110 %
Recovery on test medium (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	≥ 70 %	111 %
Recovery on test medium (Enterobacter aerogenes ATCC 13048)	≥ 70 %	114 %
Recovery on test medium (Citrobacter freundii ATCC 43864 (WDCM 00006))	≥ 70 %	104 %
Growth (Enterococcus faecalis ATCC 19433 (WDCM 00009))	partial inhibition	
Growth (Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 (WDCM 00024))	no limit	
Colonies (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	dark-blue to violet	
Colonies (Escherichia coli ATCC 8739 (WDCM 00012))	dark-blue to violet	
Colonies (Enterobacter aerogenes ATCC 13048 (WDCM 00175))	pink to red	
Colonies (Citrobacter freundii ATCC 43864 (WDCM 00006))	pink to red	
Colonies (Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 (WDCM 00024))	colourless	

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0  
 EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany  
 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

# Certificate of Analysis

---

1.10426.0500 Coliform Agar acc. to ISO 9308-1 Chromocult®  
Batch VM724526

---

Incubation: 21 ± 3 hours at 36 ± 2 °C

A recovery rate of 70 % is equivalent to a productivity value of 0.7.  
The indicated colony counts result from the sum of a triple determination.  
Reference media: Tryptic Soy Agar

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.04.2016  
Expiry date (DD.MM.YYYY) 02.03.2021

Stefanie Fischer  
Responsible laboratory manager quality control

---

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



# CERTIFICATION

## AOAC<sup>®</sup> Performance Tested<sup>SM</sup>

Certificate No.

**020902**

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit known as:

### Chromocult<sup>®</sup> Coliform Agar

<sup>M</sup>  
manufactured by

**Merck KGaA**

**Frankfurter Str. 250**

**64293 Darmstadt**

**Germany**

This method has been evaluated in the AOAC<sup>®</sup> Performance Tested Methods<sup>SM</sup> Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC<sup>®</sup> Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Performance Tested<sup>SM</sup> certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (January 17, 2016 – December 31, 2016). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

*Deborah McKenzie*

Deborah McKenzie, Senior Director  
Signature for AOAC Research Institute

January 17, 2016

Date

2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089  
Internet e-mail: [aoacri@aoac.org](mailto:aoacri@aoac.org) \* World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

<b>METHOD AUTHORS</b> Rolf Ossmer	<b>SUBMITTING COMPANY</b> Merck KGaA Analytics & Reagents Frankfurter Strasse 250 64271 Darmstadt Germany
<b>KIT NAME(S)</b> Chromocult® Coliform Agar	<b>CATALOG NUMBERS</b> 1104260500
<b>INDEPENDENT LABORATORY</b> Retch laboratories Analytical Laboratory P. O. Box 64101 St. Paul, MN 55164-0101 <b>USA</b>	<b>AOAC EXPERTS AND PEER REVIEWERS</b> Wallace Andrews <sup>1</sup> , Richard Wilson <sup>2</sup> , Joseph Odumeru <sup>3</sup> <sup>1</sup> Retired US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, MD, USA <sup>2</sup> Consultant, Bigfork, Montana, USA <sup>3</sup> Health Canada, Ontario, Canada
<b>APPLICABILITY OF METHOD</b> Target organism – <i>E. coli</i> and other coliforms Matrices – Frankfurters, cooked chicken, nonfat dried milk Performance claims - Chromocult® Coliform Agar enabled the detection and enumeration of <i>E. coli</i> and coliforms within 24 hours at contamination levels from low (10 cfu/g) to high (10 <sup>3</sup> cfu/g), from the selected foods: Frankfurters, Cooked Chicken and Non-fat Dried Milk. Chromocult® Coliform Agar showed equal sensitivity (occurrence of false-negatives) and specificity (occurrence of false-positives) with the AOAC MPN method 966.24 for the detection and enumeration of <i>E. coli</i> and coliforms.	<b>REFERENCE METHOD</b> <i>Official Methods of Analysis</i> (1995) 16 <sup>th</sup> Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 966.24 (20)
<b>PRINCIPLE OF THE METHOD</b> Chromocult® Coliform Agar is a selective and differential culture medium for the detection, differentiation and enumeration of <i>E. coli</i> and coliforms.  Firstly, the interaction of selected peptones, pyruvate, sorbitol and phosphate buffer guarantees rapid colony growth, even for sub-lethally injured coliforms. The growth of gram-positive bacteria as well as some gram-negative bacteria is largely inhibited by the content of Tergitol® 7 which has no negative effect on the growth of the coliform bacteria.  Secondly, Merck has developed a new combination of two chromogenic substrates which allows the simultaneous detection of total coliforms and <i>E. coli</i> .  <b>DISCUSSION OF THE VALIDATION STUDY</b> Chromocult® Coliform Agar enables the detection and enumeration of <i>E. coli</i> and coliforms within 24 hours at contamination levels from low (10 cfu/g) to high (10 <sup>3</sup> cfu/g), from the selected foods: Frankfurters, Cooked Chicken and Non-fat Dried Milk. Chromocult® Coliform Agar shows equal sensitivity (occurrence of false-negatives) and specificity (occurrence of false-positives) with the AOAC MPN method 966.24 for the detection and enumeration of <i>E. coli</i> and coliforms.	<b>REFERENCES CITED</b> 1. Ossmer, Rolf., Evaluation of the Chromocult® Coliform Agar, AOAC® <i>Performance Tested</i> <sup>SM</sup> certification number 020902. 2. AOAC Research Institute Validation Outline for Chromocult® Coliform Agar, Approved – February 2009. 3. Standard methods for the examination of water and wastewater (1995) 19th Ed., American Public Health Association, Washington, D.C., USA 4. Byamukama, D., Mach, R.L., Kansime, F., Manafi, M., & Farnleitner, A.H. (2005) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> <b>71</b> , 65-71 5. Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I., & Alonso, J.L. (2000) <i>J. Appl. Microbiol.</i> <b>88</b> , 280-285 6. Gonzalez, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D., & de Sousa, G.B. (2003) <i>Food Microbiology</i> <b>20</b> , 601- 604 7. International Organization for Standardization (2001) <i>General rules for microbiological examinations</i> , ISO 7218:1996/Amendment 1:2001, Geneva, Switzerland 8. International Organization for Standardization (1999) <i>General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions</i> , ISO 6887-1:1999, Geneva, Switzerland 9. International Organization for Standardization (2006) <i>Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques</i> , ISO 5667-1:2006, Geneva, Switzerland 10. International Organization for Standardization (2005) <i>General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture</i> , ISO 8199:2005, Geneva, Switzerland 11. Kilian, M. & Bülow, P. (1976) <i>Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B</i> <b>84</b> , 245-251 12. Ogden, I.D., Brown, G.C., Gallacher, S., Garthwaite, P.H., Gennari, M., Gonzalez, M.P., Jorgensen, L.B., Lunestad, B.T., MacRae, M., Nunes, M.C., Petersen, A.C., Rosnes, J.T., & Vliegenthart, J. (1998) <i>International Journal of Food Microbiology</i> <b>40</b> , 57- 64 13. Ossmer, R. (1996) Simultaneous Detection of Total Coliforms and <i>E. coli</i> with Chromocult® Coliform Agar. Health-Related Water Microbiology Symposium, Mallorca, Spain 14. Ossmer, R., Schmidt, W., & Mende, U. (1999) Chromocult® Coliform Agar – Influence of Membrane Filter Quality on Performance. – XVII Congreso de la Sociedad, Granada, Spain 15. New Zealand Dairy Industry (1998) <i>Microbiological Methods Manual, Section 48: Product Test Methods – Enteric Indicator Organisms</i> , NZTM 2; 48.5.1-48.5.10 16. Suwansonthichai, S., & Rengpipat, S. (2003) <i>International Journal of Food Microbiology</i> <b>81</b> , 113 – 121 17. Turner, K.M., Restaino, L., & Frampton, E.W. (2000) <i>J. of Food Prot.</i> <b>63</b> , 539-541 18. U.S. Environmental Protection Agency (2002) Federal Register/Vol. 67, No.209, 29. October 2002, Rules and Regulations 19. U.S. Food and Drug Administration (2003) <i>Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 1: Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate</i> , <a href="http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html">http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html</a> , accessed June 23, 2008 20. <i>Official Methods of Analysis</i> (1995) 16 <sup>th</sup> Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 966.24

**Table 8. Inclusivity study: growth and colony color of coliform and *E. coli* strains incubated on Chromocult® Coliform Agar at 35°C for 24 h**

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL β-D-galactosidase	X-Glucuronide β-D-glucuronidase	Colony color <sup>a</sup>
1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922	30-100	+	+	+	dark blue to violet
2. <i>Escherichia coli</i>	DSMZ	502	30-100	+	+	+	dark blue to violet
3. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	8739	30-100	+	+	+	dark blue to violet
4. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35218	30-100	+	+	+	dark blue to violet
5. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11105	30-100	+	+	+	dark blue to violet
6. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11229	30-100	+	+	+	dark blue to violet
7. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	10536	30-100	+	+	+	dark blue to violet
8. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	51739	30-100	+	+	+	dark blue to violet
9. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	49161	30-100	+	+	+	dark blue to violet
10. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35421	30-100	+	+	+	dark blue to violet
11. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35270	30-100	+	+	+	dark blue to violet
12. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	33582	30-100	+	+	+	dark blue to violet
13. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11775	30-100	+	+	+	dark blue to violet
14. <i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC	35470	30-100	+	+	-	salmon-red
15. <i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC	35469	30-100	+	+	-	salmon-red
16. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33650	30-100	+	+	-	salmon-red
17. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33651	30-100	+	+	-	salmon-red
18. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33652	30-100	+	+	-	salmon-red
19. <i>Escherichia intermedia</i>	ATCC	21073	30-100	+	+	-	salmon-red
20. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	13048	30-100	+	+	-	salmon-red
21. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	15038	30-100	+	+	-	salmon-red
22. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	35028	30-100	+	+	-	salmon-red
23. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	35029	30-100	+	+	-	salmon-red
24. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	29940	30-100	+	+	-	salmon-red
25. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	51342	30-100	+	+	-	salmon-red
26. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	13047	30-100	+	+	-	salmon-red

<sup>a</sup> Typical appearance of *E. coli* (Gal +, Gluc +): dark blue to violet

Typical appearance of coliforms (Gal +, Gluc -): salmon-red

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL β-D-galactosidase	x-Glucuronide β-D-glucuronidase	Colony color <sup>a</sup>
27. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	29006	30-100	+	+	-	salmon-red
28. <i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC	9394	30-100	+	+	-	salmon-red
29. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	29941	30-100	+	+	-	salmon-red
30. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	35030	30-100	+	+	-	salmon-red
31. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	35549	30-100	+	+	-	salmon-red
32. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	51329	30-100	+	+	-	salmon-red
33. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	12868	30-100	+	+	-	salmon-red
34. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	29004	30-100	+	+	-	salmon-red
35. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	29544	30-100	+	+	-	salmon-red
36. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	43165	30-100	+	+	-	salmon-red
37. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	49334	30-100	+	+	-	salmon-red
38. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	13182	30-100	+	+	-	salmon-red
39. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	8724	30-100	+	+	-	salmon-red
40. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	33531	30-100	+	+	-	salmon-red
41. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	13883	30-100	+	+	-	salmon-red
42. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	10031	30-100	+	+	-	salmon-red
43. <i>Citrobacter braakii</i>	ATCC	6750	30-100	+	+	-	salmon-red
44. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	8454	30-100	+	+	-	salmon-red
45. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	8090	30-100	+	+	-	salmon-red
46. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	43864	30-100	+	+	-	salmon-red
47. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	6879	30-100	+	+	-	salmon-red
48. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	11811	30-100	+	+	-	salmon-red
49. <i>Citrobacter koseri</i>	ATCC	27028	30-100	+	+	-	salmon-red
50. <i>Citrobacter koseri</i>	ATCC	27156	30-100	+	+	-	salmon-red
51. <i>Citrobacter</i> ssp.	ATCC	51642	30-100	+	+	-	salmon-red
52. <i>Citrobacter</i> ssp.	ATCC	51378	30-100	+	+	-	salmon-red
53. <i>Citrobacter youngae</i>	ATCC	29221	30-100	+	+	-	salmon-red

Typical appearance of *E. coli* (Gal +, Gluc +): dark blue to violet

Typical appearance of coliforms (Gal +, Gluc -): salmon-red

**Table 9. Exclusivity study: growth and colony color of non-coliform strains incubated on Chromocult® Coliform Agar at 35°C for 24 h**

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL β-D-galactosidase	x-Glucuronide β-D-glucuronidase	Colony color
1. Acinetobacter baumannii	ATCC	19606	100-300	+	-	-	colorless
2. Aeromonas hydrophila	ATCC	7966	100-300	+	-	-	colorless
3. Alcaligenes faecalis	ATCC	19209	100-300	+	-	-	colorless
4. Bacillus cereus	ATCC	11778	100-300	-	-	-	
5. Bacillus pumilus	ATCC	27142	100-300	-	-	-	
6. Bacillus subtilis	ATCC	6051	100-300	-	-	-	
7. Campylobacter jejuni	ATCC	29428	100-300	-	-	-	
8. Clostridium perfringens	ATCC	13124	100-300	-	-	-	
9. Edwardsiella tarda	ATCC	15947	100-300	+	-	-	colorless
10. Hafnia alvei	ATCC	29926	100-300	+	-	-	colorless
11. Lactobacillus acidophilus	ATCC	4356	100-300	-	-	-	
12. Microbacterium lacticum	DSMZ	20427	100-300	-	-	-	
13. Micrococcus luteus	ATCC	10240	100-300	-	-	-	
14. Morganella morganii	ATCC	25830	100-300	+	-	-	colorless
15. Morganella morganii	ATCC	8019	100-300	+	-	-	colorless
16. Proteus mirabilis	ATCC	14153	100-300	+	-	-	colorless
17. Proteus mirabilis	ATCC	14273	100-300	+	-	-	colorless
18. Proteus mirabilis	ATCC	29906	100-300	+	-	-	colorless
19. Proteus vulgaris	ATCC	13315	100-300	+	-	-	colorless
20. Proteus vulgaris	ATCC	8427	100-300	+	-	-	colorless
21. Providencia rustigiannii	ATCC	13159	100-300	+	-	-	colorless
22. Pseudomonas aeruginosa	ATCC	27853	100-300	+	-	-	colorless
23. Pseudomonas aeruginosa	ATCC	9027	100-300	+	-	-	colorless
24. Pseudomonas alcaligenes	ATCC	14909	100-300	+	-	-	colorless
25. Pseudomonas fluorescens	ATCC	13525	100-300	-	-	-	
26. Pseudomonas putida	ATCC	12633	100-300	+	-	-	colorless
27. Pseudomonas stutzeri	ATCC	17832	100-300	+	-	-	colorless

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL β-D-galactosidase	x-Glucuronide β-D-glucuronidase	Colony color
28. Salmonella Anatum	ATCC	9270	100-300	+	-	+	turquoise
29. Salmonella Choleraesuis	NCTC	6017	100-300	+	-	-	colorless
30. Salmonella Choleraesuis	ATCC	12011	100-300	+	-	-	colorless
31. Salmonella Enteritidis	ATCC	13076	100-300	+	-	-	colorless
32. Salmonella Typhimurium	ATCC	13113	100-300	+	-	-	colorless
33. Serratia plymuthica	ATCC	7462	100-300	-	-	-	
34. Shigella boydii	ATCC	8702	100-300	+	-	+	turquoise
35. Shigella flexneri	ATCC	12022	100-300	+	-	-	colorless
36. Shigella flexneri	ATCC	12025	100-300	+	-	-	colorless
37. Shigella flexneri	ATCC	12023	100-300	+	-	+	turquoise
38. Shigella sonnei	ATCC	29930	100-300	+	-	-	colorless
39. Shigella sonnei	ATCC	11060	100-300	+	-	-	colorless
40. Staphylococcus aureus	ATCC	6538p	100-300	-	-	-	
41. Staphylococcus saprophyticus	ATCC	15305	100-300	-	-	-	
42. Streptococcus pyogenes	ATCC	12344	100-300	-	-	-	
43. Yersinia intermedia	ATCC	29909	100-300	+	-	-	colorless
44. Yersinia enterocolitica	ATCC	23715	100-300	+	-	-	colorless

**Table 14. Method comparison study (internal and independent food testing): summary of results for total coliforms**

Total Coliforms								
Food		Level	Mean log <sub>10</sub> Chromocult	S <sub>r</sub> Chromocult	RSD, % Chromocult	Mean log <sub>10</sub> Reference	S <sub>r</sub> Reference	RSD, % Reference
Frankfurter	Internal	Control	na <sup>a</sup>	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.00005		Low	1.41	0.21	14.84	1.18	0.19	16.12
<i>p</i> = 0.01		Medium	2.98	0.47	15.79	2.54	0.55	21.62
<i>p</i> = 0.97		High	3.82	0.4	10.47	3.74	0.24	6.42
Chicken	Internal	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.001		Low	2.15	0.06	2.80	1.18	0.25	21.26
<i>p</i> = 0.03		Medium	2.98	0.1	3.35	2.76	0.26	9.43
<i>p</i> = 0.001		High	3.63	0.06	1.65	2.54	0.36	14.19
NFDM	Internal	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.23		Low	1.72	0.07	4.08	1.58	0.37	23.38
<i>p</i> = 0.004		Medium	2.65	0.1	3.77	1.96	0.2	10.21
<i>p</i> = 0.001		High	3.49	0.03	0.86	2.7	0.27	10
NFDM	Independ.	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.3		Low	1.6	0.32	19.97	1.84	0.3	16.35
<i>p</i> = 0.06		Medium	2.38	0.04	1.68	3.57	0.8	22.42
<i>p</i> = 0.06		High	3.94	0.34	8.63	3.85	0.48	12.45

<sup>a</sup> Not applicable

**Table 15. Method comparison study (internal and independent food testing): summary of results for *E. coli***

<i>E. coli</i>								
Food		Level	Mean log <sub>10</sub> Chromocult	S <sub>r</sub> Chromocult	RSD, % Chromocult	Mean log <sub>10</sub> Reference	S <sub>r</sub> Reference	RSD, % Reference
Frankfurter	Internal	Control	na <sup>a</sup>	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.13		Low	0.9	0	0	1.15	0.17	14.72
<i>p</i> = 0.21		Medium	2.74	0.61	22.24	2.54	0.55	21.62
<i>p</i> = 0.17		High	3.49	0.41	11.74	4.05	0.62	15.3
Chicken	Internal	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.11		Low	1.90	0.05	2.63	1.36	0.41	30.11
<i>p</i> = 0.81		Medium	2.55	0.19	7.45	2.97	0.57	19.19
<i>p</i> = 0.79		High	3.56	0.08	2.25	3.58	0.31	8.67
NFDM	Internal	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.05		Low	1.2	0.22	18.27	0.72	0.19	26.41
<i>p</i> = 0.08		Medium	1.99	0.12	6.03	1.72	0.15	8.7
<i>p</i> = 0.15		High	2.88	0.05	1.74	2.66	0.53	19.9
NFDM	Independ.	Control	na	na	na	na	na	na
<i>p</i> = 0.002		Low	1.48	0.27	18.28	0.74	0.2	27.07
<i>p</i> = 0.43		Medium	2.14	0.12	5.61	2.08	0	0
<i>p</i> = 0.8		High	3.54	0.3	8.48	3.45	0.13	3.76

<sup>a</sup> Not applicable

Merck Chromocult® Coliform Agar AOAC® Certification Number 020902

<b>ORIGINAL CERTIFICATION DATE</b> February 27, 2009	<b>CERTIFICATION RENEWAL RECORD</b> Renewed Annually through December 2016
<b>METHOD MODIFICATION RECORD</b> None	<b>SUMMARY OF MODIFICATION</b>
Under this AOAC® <i>Performance Tested</i> <sup>SM</sup> License Number, 020902 this method is distributed by:	Under this AOAC® <i>Performance Tested</i> <sup>SM</sup> License Number, 020902 this method is distributed as:

#### 8.4. Registro Fotográfico



**Figura 1:** Demarcación con GPS



**Figura 2:** Colecta de especies vegetales



**Figura 3:** Colecta de especies vegetales



**Figura 4:** Colecta de especies vegetales



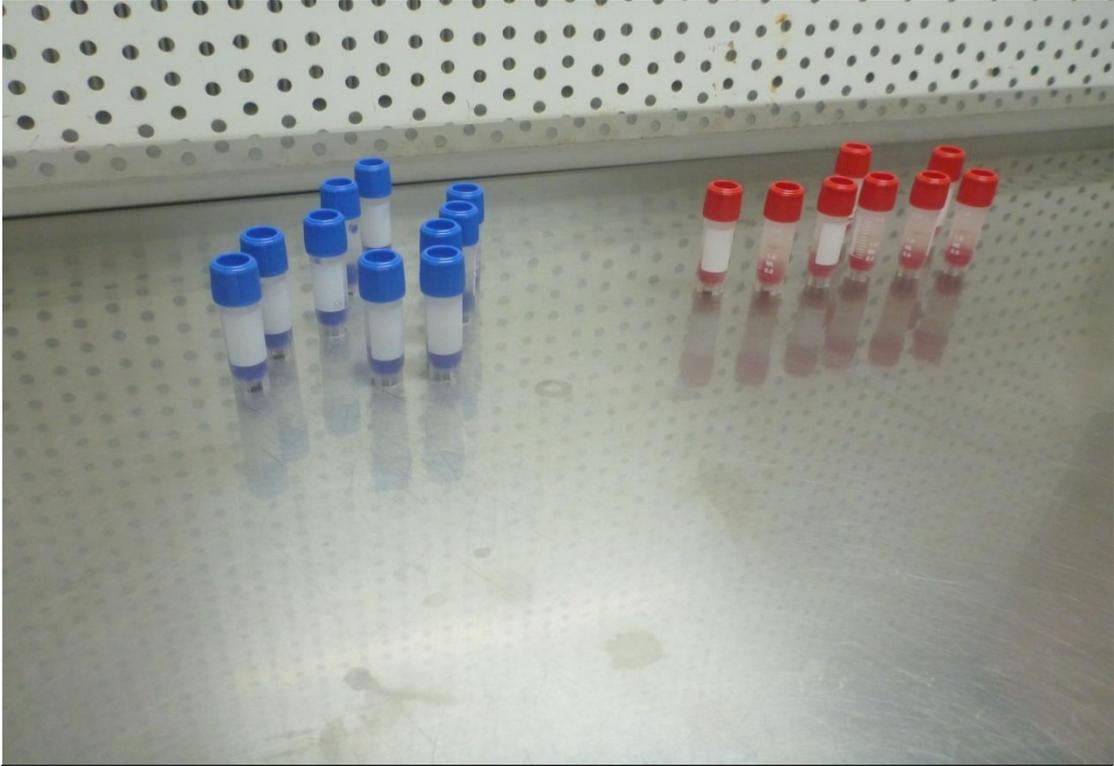
**Figura 5:** *Escherichia coli*  
ATCC25922



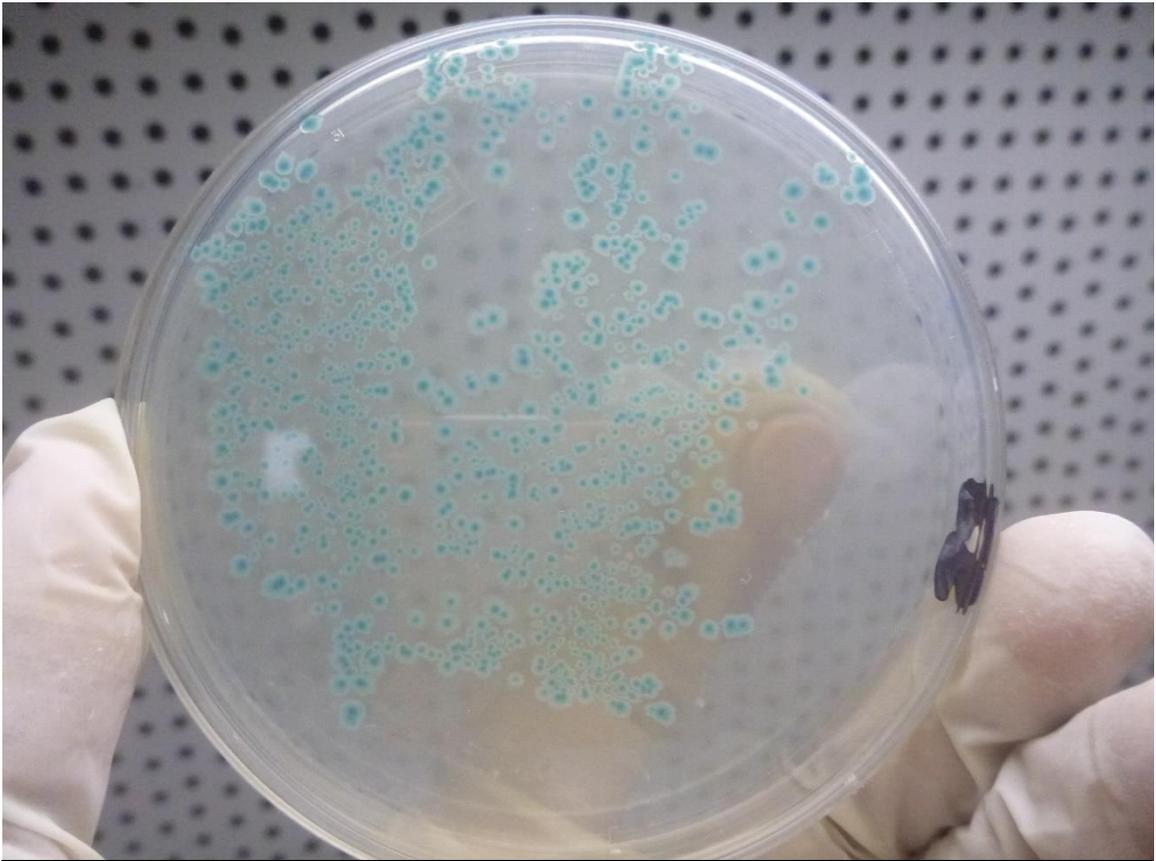
**Figura 6:** Asa de *Escherichia coli*  
ATCC25922



**Figura 7:** Hidratación de la *Escherichia coli* ATCC25922



**Figura 8:** Preservación en CryoBanks de *E. coli* ATCC25922



**Figura 9:** Cultivo de *E. coli* ATCC25922



**Figura 10:** Siembra para contaje



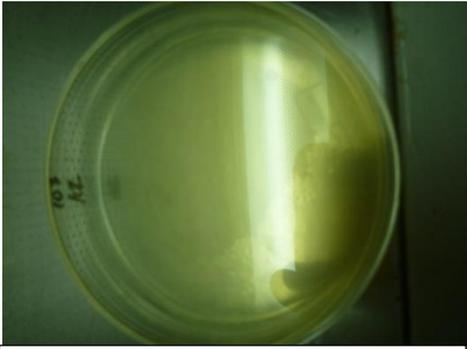
**Figura 11:** Ensayo con *S. auriculata* e inoculo



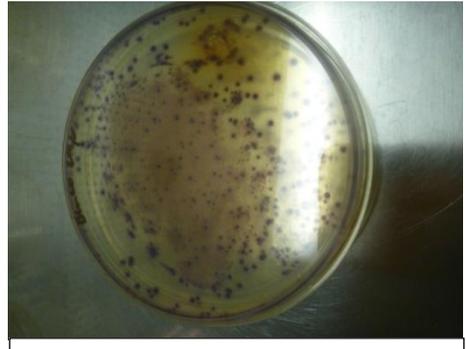
**Figura 12:** Ensayo con inoculo



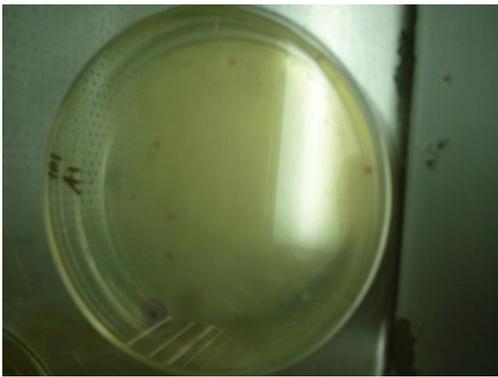
**Figura 13:** Ensayo con *L. minor* e inoculo



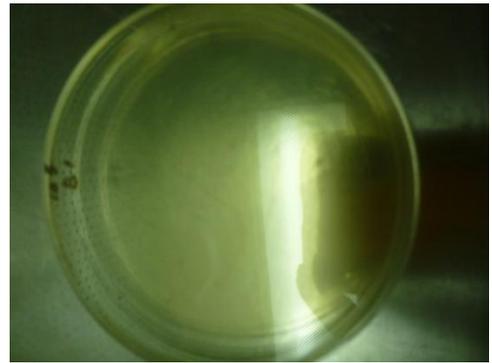
**Figura 14** Placa de *Azolla* inoculo



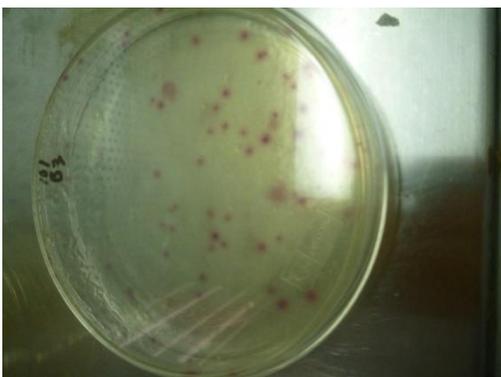
**Figura 15** Placa Control inoculo



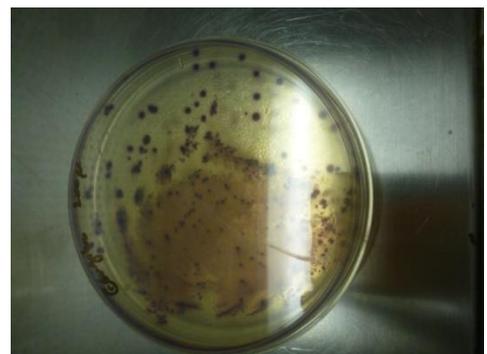
**Figura 16** Placa de *Azolla* inoculo



**Figura 17** Placa de *Azolla* inoculo



**Figura 18** Placa Control inoculo



**Figura 19** Placa Control inoculo



**Figura 20** Inicio del ensayo de macrófitas con aguas negras.



**Figura 21** Final del ensayo de macrófitas con aguas negras.



**Figura 22** Dilución de muestras del ensayo en agua de peptona



**Figura 23** Siembra de las diluciones de las muestras del ensayo.



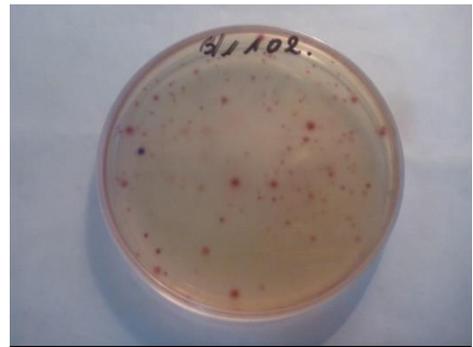
**Figura 24** Destrucción de placas de cultivo



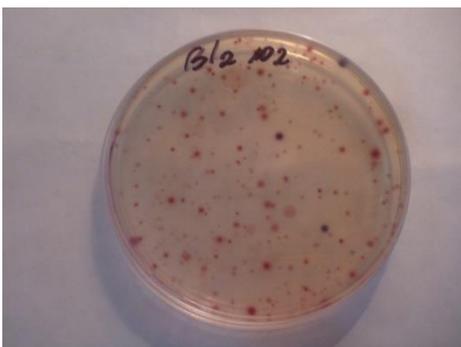
**Figura 25** Placas de cultivo en autoclave (ensayo inoculo)



**Figura 26** Placas de cultivo en autoclave (ensayo aguas negras)



**Figura 27** Placa de cultivo control (ensayo aguas negras)



**Figura 28** Placa de cultivo control (ensayo aguas negras)



**Figura 29** Placa de cultivo control (ensayo aguas negras)

