

CONTROL DE CARACOLES EN SISTEMAS PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ *
ANA MARÍA MUÑOZ COLUNGA **

*** Investigador, Instituto de Ingeniería, UNAM**

**** Becaria, Instituto de Ingeniería, UNAM**

RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Objetivos y alcances</i>	2
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales</i>	5
2.2 <i>Generalidades sobre las familias Lymnaeidae y Physidae</i>	6
2.3 <i>Medidas de control</i>	8
3. DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE BIODISCOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODO	15
4.1 <i>Estudios en caracoles</i>	15
4.2 <i>Experimentos en el respirómetro</i>	24
5. RESULTADOS	29
5.1 <i>Estudios con caracoles</i>	29
5.2 <i>Experimentos de respirometría</i>	40
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	55
Apéndice A Procedimiento para el análisis Probit y de máxima verosimilitud	59
Apéndice B Estimación del área del biodisco que ocupan los caracoles	61

ABSTRACT

In biological systems using biofilms (trickling filters and RBCs) for the treatment of wastewater, the presence of selective and non-selective predators is commonly observed. Some of them are big enough to predate on the biofilm causing damages over the microbiological communities reducing the overall efficiency of the processes.

This study deals with the identification and control methods of the snails present in the RBC system of the wastewater treatment plant of the National University of Mexico at the main campus. The organisms were identified to belong to the families *Lymnaeidae* and *Physidae*. It was determined that the snails destroy every day 6.4 percent of the biofilm in the third stage of the RBC. The biofilm grows constantly; otherwise the snails would consume it completely in 15 days. Bioassays were performed to determine the resistance of the snails to two specific toxic substances: **Bayluscid**, provided by Bayer, and **Piquerol**, an extract from several native plants. No matter these two substances are considered a toxic specific for snails, they cause inhibition on other organisms present in the biofilms. The results indicate that Bayluscid is more toxic than Piquerol when using the same concentration and experimental duration. Their effects diminish after 8 hours, which is related to the uptake by tissues and through microbial degradation.

Through respirometric analysis it could be observed that, no matter both substances are biodegradable, they cause inhibitory effects on the bacterial systems. These effects are not considered toxic for the biofilm if used according to the time and the mean lethal concentrations required for the destruction of the snails.

RESUMEN

En sistemas biológicos para tratamiento de aguas residuales que trabajan bajo el principio de biopelículas (filtros biológicos y biodiscos), comúnmente se presentan organismos que depredan selectivamente sobre otros organismos de la biopelícula o de manera no selectiva, sobre toda la biopelícula. Estos últimos causan daños sobre los sistemas microbianos haciendo que la eficiencia global del proceso disminuya.

Este trabajo trata sobre la identificación y forma de control de los caracoles presentes en el biodisco que se encuentra en la planta para tratamiento de aguas residuales de la UNAM en Ciudad Universitaria. Los organismos se identificaron como pertenecientes a las familias *Lymnaeidae* y *Physidae*. Se calculó que diariamente los caracoles destruyen el 6.4 por ciento de la biopelícula de la tercera etapa del biodisco. Si la biopelícula no se encontrara en continuo crecimiento, los caracoles la podrían destruir en 15 días. Se hicieron bioensayos para determinar su resistencia ante dos sustancias tóxicas específicas: Bayluscid de Bayer y Piquerol, sustancia extraída de plantas nativas de México. Aunque dichas sustancias están consideradas molusquicidas, también son inhibidoras del metabolismo de otros organismos presentes en las biopelículas. Los resultados indican que Bayluscid es más tóxico que Piquerol al requerirse menores concentraciones para alcanzar la mortandad media. Sus efectos disminuyen después de 8 horas, lo cual se relaciona con la incorporación de los tóxicos a los tejidos y por degradación bacteriana.

En determinaciones respirométricas se pudo observar que, aunque los dos molusquicidas son biodegradables, causan efectos inhibitorios sobre los sistemas bacterianos. Estos efectos no se identificaron como nocivos a las concentraciones letales medias en el tiempo requerido para eliminar los caracoles.

1. INTRODUCCIÓN

En México, el acelerado y continuo crecimiento de la población y el desarrollo de la planta productiva, provocan el aumento continuo de la demanda de agua. La población muestra una fuerte tendencia a concentrarse en las grandes ciudades, las cuales concentran también la mayor parte de las actividades industriales y las que disponen de una mayor cobertura en los servicios de agua potable. En consecuencia, los usos de agua doméstica e industrial constituyen las fuentes principales de generación de aguas residuales. Gran parte del volumen de aguas residuales no recibe ningún tratamiento previo a su descarga en cuerpos naturales de agua (ríos, lagos, canales, etc) o antes de que sean utilizadas en la agricultura. El resultado ha sido un creciente deterioro de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, los cuales constituyen las principales fuentes de abastecimiento de agua potable de la población.

A través del tratamiento de las aguas residuales y reusando el agua en la industria, agricultura y riego de áreas verdes, es posible reducir los efectos de la contaminación y mejorar el aprovechamiento de los recursos hídricos.

Los procesos biológicos forman parte esencial del tratamiento secundario de aguas residuales. Algunos de ellos son *Biodiscos*, filtros biológicos (o también llamados percoladores) y reactores de biopelícula sumergida, los cuales basan su funcionamiento en la formación de una película de microorganismos adherida a un material inerte que degrada la materia orgánica contaminante. El ambiente creado en estos sistemas es favorable para la propagación de caracoles dulceacuícolas (Higgins, 1948; Ingram *et al*, 1958; Iwai *et al*, 1989; Learner, 1975; Lohmeyer, 1955; 1957). Estos autores, con base en observaciones visuales, coinciden en señalar que los caracoles ocasionan problemas de operación y disminuyen la eficiencia de depuración del agua residual debido a la depredación sobre la

biopelícula. Ingram *et al* (1958) se basan en datos de colectas y en determinaciones fisicoquímicas realizadas en un filtro rociador. Iwai *et al* (1989) observan una notable disminución en la eficiencia del tratamiento de un sistema de película sumergida, la cual atribuyen a la presencia de *Physa anatina*.

La presencia de diversas especies de caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales que utilizan películas biológicas pueden ocasionar problemas que justifiquen su control. Dicho control debe ser efectivo en un corto plazo para evitar la reinfestación del sistema, además de no interferir en la eficiencia del tratamiento.

1.1 Objetivos y alcances

Los principales objetivos planteados en este trabajo son:

- a) Identificar taxonómicamente los caracoles que se encuentran en el Biodisco de la Planta para Tratamiento de Aguas Residuales, de Ciudad Universitaria, y estimar el posible daño ocasionado por ellos.
- b) Conocer el tamaño, distribución por edades, localización y dispersión de la población de caracoles en el Biodisco.
- c) Determinar la sensibilidad de los caracoles a agentes tóxicos por medio de bioensayos.
- d) Conocer las condiciones y características del medio que propicia el desarrollo de los caracoles.
- e) Proponer un método para el control de caracoles que se encuentran en sistemas de película biológica para tratamiento de aguas residuales sin afectar el proceso de tratamiento.

Con base en la revisión bibliográfica sobre control de caracoles y por su disponibilidad, se propone la utilización de dos molusquicidas como agentes para el control: *Bayluscid EC250* y *Piquerol A*. Para establecer niveles de concentración letal

media (LC50) a distintas horas de exposición de ambos compuestos sobre la población de caracoles se realizarán bioensayos en el laboratorio.

El trabajo se restringirá a la utilización de los organismos contenidos en el sistema para tratamiento de aguas residuales, denominado Biodisco que se encuentra en la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria. Se determinará el daño de los caracoles en dicho sistema mediante un análisis parcial de su población basándose en la depredación sobre la biopelícula.

El posible daño que los molusquicidas puedan causar sobre la biopelícula, se determinará mediante experimentación en un respirómetro Warburg modificado. Se comparará el consumo de oxígeno de la biopelícula en presencia y ausencia de los molusquicidas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales

En los reactores de película biológica, el agua residual por tratar, entra en contacto con una población microbiana que se desarrolla en forma de película adherida a la superficie de un medio sólido de soporte. Existen dos tipos de sistemas: estacionario o de medio fijo y sistemas de medio en movimiento. Los biofiltros o filtros rociadores y los reactores de biopelícula sumergida son ejemplo del primer grupo; en ellos, el agua residual se mueve entre el medio de soporte. Los biodiscos son ejemplo del segundo tipo donde el medio se encuentra en movimiento.

En los sistemas antes mencionados, se ha observado la presencia de caracoles principalmente de las familias *Lymnaeidae* y *Physidae*. Los trabajos que se pueden encontrar en la literatura especializada son muy escasos, aunque se sabe que la invasión de estos animales es muy común (Learner, 1975; Pointier, 1990).

Los primeros trabajos conocidos en los que se menciona la presencia de caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales, son de observaciones en filtros rociadores en los cuales se identificaron las siguientes especies: *Agriolmix agrestis*, *Galba glabra*, *Galba palustria* y *Radix peregra* en Inglaterra (Lloyd, 1940, en Learner, 1975). *Lymnaea humulis*, *Physa anatina*, *Physa integra*, *Physa halei* y *Physa cubensis* fueron observados en Estados Unidos de Norteamérica (Higgins, 1948 e Ingram *et al*, 1958).

Lohmeyer (1955 y 1957) observó gran cantidad de caracoles en el filtro rociador de la Universidad de Florida, EUA y menciona que estos animales inducen corrosión en las bombas de recirculación del sistema. También advirtió que en el agua de recirculación hay

un elevado número de conchas de caracol, las cuales afectan el correcto funcionamiento del brazo rociador haciendo que su movimiento sea más lento de lo esperado. Se llega a la misma conclusión en el trabajo de Ingram *et al* (1958). Estos investigadores hicieron colectas de caracoles durante un año en la salida de agua de un filtro rociador en Ohio, EUA. Reunieron media y hasta una tonelada de conchas por día durante una primavera; esta gran cantidad de conchas bloqueaba tuberías y otros conductos de agua. Realizaron, como parte de sus trabajos, durante dos semanas del mes de mayo, la separación de caracoles de la superficie del biofiltro, al término de las cuales pudieron observar que las concentraciones contaminantes en el efluente de la planta disminuyeron notablemente: la DBO de 131 a 59 mg/l, el nitrógeno amoniacal de 17.9 a 13.0 mg/l y el nitrógeno total de 24.8 a 24.4 mg/l, respectivamente. Concluyeron que los caracoles, al alimentarse de la biopelícula, la dañan, provocando una disminución en la eficiencia de eliminación de contaminantes.

En el trabajo de Iwai *et al* (1989) realizado en un sistema de biopelícula sumergida en Japón, de junio de 1986 a septiembre de 1987, se observó una notable disminución en la eficiencia del tratamiento atribuida a la presencia de *Physa anatina*. Dicha especie invadió la planta de aguas residuales poco antes de junio de 1987 y, posteriormente, se observó un aumento en los valores de DBO, DQO, fosfato total, sólidos suspendidos en el efluente.

Winkler (1986) y Metcalf & Eddy (1985) consideran que los caracoles son útiles porque al alimentarse de la biopelícula evitan la acumulación de lama sobre el material de empaque y ayudan a mantener la población microbiana en fase de crecimiento exponencial constante.

2.2 Generalidades sobre las familias Lymnaeidae y Physidae

Todos los caracoles de agua dulce presentan una concha calcárea que cubre las partes blandas del animal, dando protección a las mismas. La concha tiene forma cónica o fusiforme; sus colores van de claros a oscuros siempre opacos y suelen presentar bandas en la superficie. El tamaño de los adultos varía de 5 a 15 mm. En los *limneidos* el sentido de los giros de la concha es a la derecha y en los *physidos* a la izquierda (Burch y Cruz, 1987).

En estos organismos, la branquia ha desaparecido y la cavidad del manto ha derivado en un pulmón. El techo de dicha cavidad se ha vascularizado y los bordes de la misma se han unido al dorso del animal, salvo por una pequeña abertura denominada neumostoma que se abre o se cierra de acuerdo con el ciclo ventilatorio, el cual se lleva a cabo mediante la formación de una bóveda del techo y aplanamiento del piso de la cavidad del manto (Barnes, 1985).

Las familias *Lymnaeidae* y *Physidae* se encuentran ampliamente distribuidas en lagos, ríos, charcas y canales y se ubican desde las márgenes rocosas hasta profundidades aproximadas de tres metros. Cuando se encuentran en aguas someras suben a la superficie para respirar abriendo el neumostoma y cerrándolo cuando se sumergen; la inmersión puede durar de quince minutos a una hora. Algunas especies pueden permanecer sumergidas todo su ciclo de vida llenando de agua la cavidad del manto (Calaw, 1978).

Los caracoles son principalmente herbívoros y su alimentación está determinada por lo que esté a su alcance y puedan ingerir. Análisis estomacales han revelado la presencia de algas verdeazules, diatomeas, pequeños crustáceos, larvas de dípteros, protozoarios, copépodos, ostrácodos, rotíferos, nematodos y plantas verdes (Calaw, 1978).

Son hermafroditas simultáneos con una gónada denominada ovotestis productora de óvulos y espermatozoides; la cópula comprende un individuo que actúa como macho y otro como hembra. Las etapas larvales transcurren dentro del huevo. La madurez reproductora se alcanza en dos o tres meses. A partir del estadio de huevo transcurren aproximadamente 30 días para que los caracoles jóvenes alcancen longitudes de 3 a 4 mm, 60 días para longitudes de 4 a 8 mm (caracoles adultos), etapa en la cual mantienen una actividad predominantemente reproductora, y 90 días para llegar de 8 a 13 mm (caracoles viejos) (Burch y Cruz, 1987; Calaw, 1978).

Los miembros del género *Physa* producen en promedio de 200 a 300 huevos por mes durante el periodo de mayor actividad reproductora, la cual puede llevarse a cabo entre marzo y agosto o de diciembre a agosto, durando de 6 a 9 meses, llegando entonces a producir más de 1000 huevos por individuo. Los periodos de mayor y menor crecimiento de la población se dan durante abril y junio y de noviembre a febrero, respectivamente. En organismos viejos que miden 8 o más milímetros se observan los niveles más altos de

mortalidad entre junio y agosto. Viven a temperaturas que oscilan entre 11 y 40°C (Calaw, 1978; Malek, 1977).

2.3 Medidas de control

Numerosos caracoles acuáticos, entre los que se encuentran *Lymnaeidae* y *Physidae*, son huéspedes intermediarios de tremátodos, parásitos que afectan al hombre y animales domésticos causando enfermedades como esquistosomiasis y fasciolosis, las cuales dañan el hígado y los pulmones. Las infecciones ocurren en mayor medida en poblaciones de Asia, África y Sudamérica (Feachman y Garelick, 1983).

Las principales investigaciones sobre control de caracoles se han derivado de su relación con las enfermedades mencionadas y se busca su control para impedir la transmisión de enfermedades.

2.3.1 Control ecológico

Este tipo de control se basa en alterar el lugar en el que se ha establecido la población. Dicha alteración se hace secando el hábitat dos o tres veces por año y dejando las zonas donde normalmente habitan libres de fango y vegetación. Sin embargo, algunos caracoles son capaces de resistir la sequía repoblando el hábitat en periodos muy cortos después de que el agua retorna (Malek, 1977).

2.3.2 Control biológico

El control biológico consiste en utilizar un depredador selectivo para tratar de aniquilar poblaciones que se consideran como plaga o reducirlas a una densidad muy baja. La naturaleza de las relaciones entre depredador y presa limita en gran medida el éxito de los controladores biológicos; los mejores efectos se consiguen con depredadores específicos o con parásitos naturales de la plaga. Frecuentemente es necesario criar a los parásitos anticipadamente para superar los periodos de disminución de las poblaciones controladoras.

Aragua y Thomas (1983) sugieren tres estrategias principales que debe adoptar un depredador de caracoles dulceacuícolas: a) el depredador debe consumir obligadamente

más presas en la medida que estas aumenten; b) si la presa tiende a agruparse en sitios específicos, el depredador debe responder situándose en la vecindad de estos; c) la tasa reproductora del depredador debe ser mayor que la de la presa, lo cual permitirá mantener controlada la población de presas.

Margalef (1983) menciona a las sanguijuelas (*hirudíneos*) como depredadores de *fisidos* (ambas especies presentes en sistemas para tratamiento de aguas residuales de película biológica). Las aguas ligeramente alcalinas y ricas en materia orgánica favorecen el desarrollo de las sanguijuelas. Sin embargo, pese a tener un ambiente favorable y comida en abundancia, estas no logran disminuir las poblaciones de caracoles. Probablemente su actividad depredadora no sobrepasa la capacidad de reproducción de los caracoles o es posible que entre ambas poblaciones se establezca un equilibrio. También es posible que, ante la abundancia de alimento, las sanguijuelas prefieran otro alimento antes que los caracoles.

Han sido estudiados otros agentes de control, como los caracoles *Marisa cornuarietis*, *Pomacea* spp y *Heliosoma duryi*, los cuales se alimentan de huevos y juveniles de caracoles dulceacuícolas. El consumo de masas de huevos puede ser accidental y no específico debido a que son depositados sobre sustratos que forman parte de la dieta de los probables caracoles controladores. Ferguson (1977), en Aragua y Thomas (1983), ha observado que cuando el consumo es intencional las especies exhiben una conducta depredadora impredecible, regulada por factores medioambientales, de edad y estado fisiológico de los individuos depredadores.

Los probables agentes controladores de caracoles dulceacuícolas no muestran una intensa actividad depredadora ni una capacidad reproductora suficientemente alta para ser considerados como una solución al problema de la infestación. La efectividad de los depredadores está fuertemente asociada con su densidad que generalmente no sobrepasa a la de los caracoles que se desea controlar, lo cual impide que el control biológico tenga éxito.

2.3.3 Control químico

Los estudios en este sentido se iniciaron a principios de siglo en Japón, siendo este método el más empleado y el que ha dado mejores resultados (Malek, 1977). La World Health

Organization (1965) aprobó la comercialización de más de 22 molusquicidas sintéticos entre los que se encuentra Bayluscid EC250 como uno de los más tóxicos tanto para caracoles adultos como para sus huevecillos. La sustancia activa de Bayluscid es una sal de etanolamina con composición química $C_{15}H_{15}Cl_2N_3O_5$ producida por Bayer en Alemania (Bayluscid, 1970). La investigación realizada por Feachman y Garelick (1983) comprobó que no hay evidencia de que los caracoles puedan desarrollar resistencia al compuesto después de una prolongada aplicación.

Debido a su fácil degradación biológica y a consideraciones económicas y ecológicas, el uso de molusquicidas de origen vegetal se ha incrementado favorablemente en los últimos años. En la actualidad existen aproximadamente más de 50 tóxicos que han sido aislados de plantas, incluyendo saponinas, flavonoides y terpenoides. A este último grupo pertenece Piquerol A, el cual es un molusquicida aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae). Esta planta es de amplia distribución y endémica en el valle de México y se desarrolla en los meses de agosto a diciembre. La efectividad de Piquerol A ha sido probada en 8 especies de caracoles dulceacuícolas, siendo una de ellas *Physa cubensis* (Cruz et al, 1989).

3. DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE BIODISCOS

La planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria inició su operación en abril de 1982. Consta de dispositivos para tratamiento preliminar (rejillas y desarenador), tratamiento secundario (lodos activados, filtro rociador y biodiscos), tratamiento terciario (filtros de arena) y desinfección con cloro gas. La planta fue diseñada para tratar 40 l/s de agua residual, los cuales se distribuyen del modo siguiente: 20 l/s son tratados mediante el sistema de lodos activados, 10 l/s corresponden al filtro rociador y 10 l/s al biodisco (González, 1982).

El biodisco instalado en la planta de CU fue construido por la compañía Autotrol Corporation, de Estados Unidos de Norteamérica. De acuerdo con las especificaciones de diseño del fabricante el sistema puede tratar 7.5 l/s de aguas residuales que contengan contaminantes orgánicos expresados como Demanda Bioquímica de Oxígeno de 150 mg/l y 200 mg/l de Sólidos Suspendedos Totales con una eficiencia de remoción del 90 % (Autotrol, 1978).

Los discos que forman al biodisco son placas corrugadas de polietileno, los cuales están soportados en su centro sobre una flecha de acero inoxidable de 40.5 cm de lado (sección cuadrada) y tienen un diámetro de 3.6 m. El biodisco está dividido en tres etapas. La primera tiene un área expuesta al desarrollo de biopelícula de 4,589 m² y las dos restantes de 2,080 m² cada una. El sistema está montado sobre un tanque de concreto con un volumen útil de 49.9 m³. Los discos (el material plástico) se encuentran sumergidos en el agua contenida en el tanque de concreto en un 40 por ciento de su superficie (fig 3.1). Con el fin de disminuir la influencia de los cambios de temperatura, lluvia, granizo o nieve sobre la biopelícula y para prevenir el crecimiento de algas en la superficie de los discos, se encuentran protegidos por una cubierta de fibra de vidrio con ocho ventanillas laterales

y puertas en los extremos, las cuales permiten la observación, ventilación y acceso al sistema.

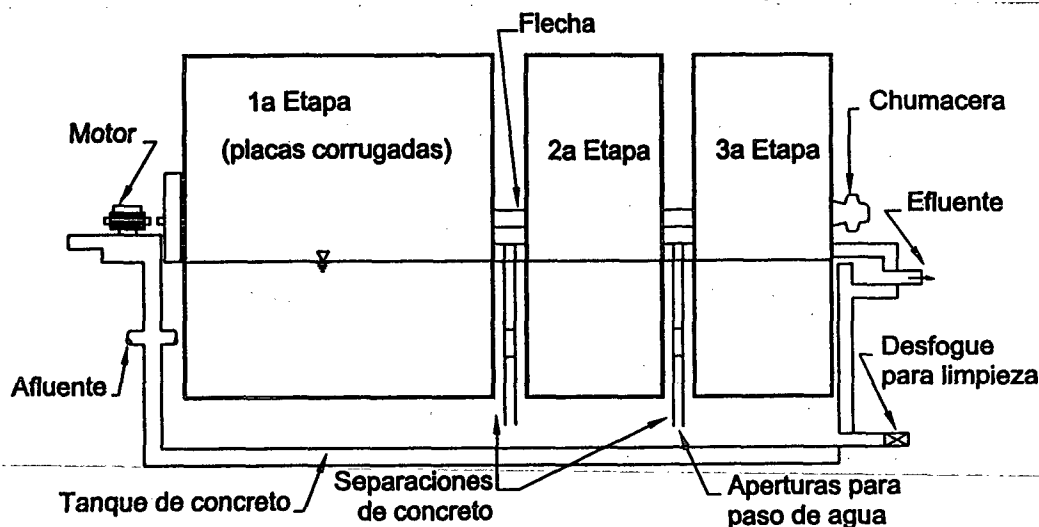


Fig 3.1 Diagrama esquemático de la unidad de biodiscos de la planta para tratamiento de agua residual de CU

El biodisco gira a 1.6 RPM, impulsado por un motorreductor de 5 HP (3.75 kW). Cuando el proceso inicia su operación (procedimiento de arranque), los microorganismos transportados en el agua residual se adhieren a la superficie del material plástico, crecen y se desarrollan hasta cubrirlo por completo. Al girar el biodisco, los microorganismos que se encuentran adheridos sobre la superficie del material plástico entran en contacto, de forma alternada, con la materia orgánica contenida en el agua de desecho, que es utilizada como fuente de nutrientes y con el oxígeno atmosférico que les permite respirar y efectuar la degradación aerobia de las sustancias orgánicas contaminantes (fig 3.2).

De la biopelícula se desprenden microorganismos en forma de flóculos o partes de dicha biopelícula debido a las fuerzas cortantes originadas por la rotación de los discos al pasar estos por el agua y debido a los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en las capas inferiores de la biopelícula. Las partículas desprendidas salen del tanque con el agua tratada para ser separadas en el sedimentador secundario. Esto evita que la biopelícula alcance espesores excesivos y limitando la penetración de nutrientes y de oxígeno hacia las células de las capas más profundas.

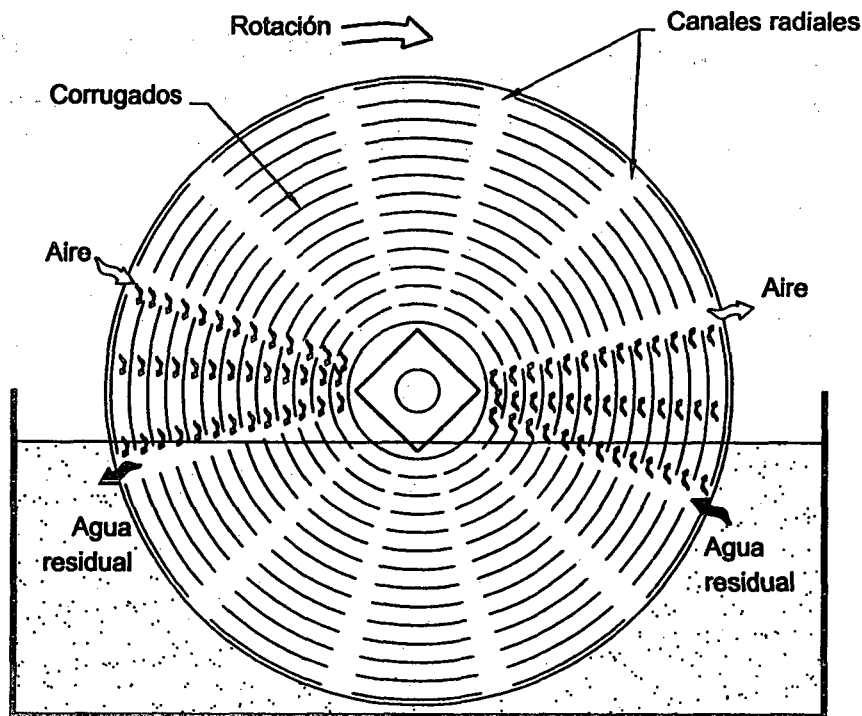


Fig 3.2 Corte transversal de un biodisco

El agua residual pasa por rejillas y desarenador antes de entrar al biodisco para evitar que entren partículas de gran tamaño o de alta densidad. El caudal que entra al biodisco se regula por medio de una compuerta colocada después de un vertedor Parshall. Por gravedad, el agua fluye para entrar al biodisco en la primera etapa pasando después a las otras dos. El giro del biodisco hace que el líquido dentro del tanque esté siempre bien mezclado y evita que las partículas desprendidas de la biopelícula se depositen en el fondo del tanque.

La división del biodisco en etapas permite el desarrollo de poblaciones microbianas especializadas en la degradación de los sustratos presentes en el tanque correspondiente. Sus tasas de crecimiento son más altas en las primeras etapas disminuyendo en cada una de las subsecuentes, lo cual origina películas de mayor espesor en la primera etapa. Esto implica que la biopelícula en las primeras etapas se renueva más rápidamente que en las últimas.

En cada etapa, el grado de desarrollo depende de la concentración de materia orgánica presente en el agua; como consecuencia, se tiene que en las primeras etapas predominan bacterias heterótrofas que se reproducen rápidamente. En la última, la

concentración de materia orgánica es menor que en las anteriores y esto permite la proliferación de grandes cantidades de bacterias nitrificantes dentro de la delgada matriz gelatinosa formada por bacterias heterótrofas.

4. MATERIAL Y MÉTODO

En este capítulo se hace una descripción de la metodología utilizada en los ensayos biológicos y en los estudios de inhibición del metabolismo microbológico por presencia de inhibidores.

Otros aspectos que se tratan son la ubicación taxonómica de los caracoles, la determinación del tamaño de la población y el volumen de biopelícula que consumen al alimentarse.

4.1 Estudios en caracoles

4.1.1 Ubicación taxonómica

Los caracoles utilizados provinieron del sistema de biodiscos de la planta para tratamiento de aguas residuales de CU. Su ubicación a nivel de género y familia se efectuó mediante algunas de las características más distintivas de la morfología externa, de acuerdo con las claves taxonómicas propuestas por Burch y Cruz (1987).

4.1.2 Bioensayos

Todas las series de ensayo se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1965, 1983, 1988) y por el método estándar (APHA *et al*, 1985)

4.1.2.1 Aclimatación

Los caracoles se seleccionaron y distribuyeron acorde con su tamaño en tres categorías: pequeños, de 0.01 a 4.0 mm, medianos de 4.1 a 8.0 mm y grandes de 8.1 a 13.0 mm. Los segundos fueron utilizados para la experimentación, siempre y cuando no se observaran daños en la caparazón.

Se colocaron lotes de 50 ejemplares en tres acuarios de 9 litros. Uno de los acuarios contenía agua sin cloro; otro, residual y otro, destilada, manteniéndolos con aeración a temperatura ambiente durante 24 horas. Para que los lotes de caracoles pudieran ser utilizados se requiere que la mortalidad sea inferior al 10 por ciento (APHA *et al*, 1985). La menor mortandad se obtuvo en el acuario con agua destilada; por este motivo, durante toda la experimentación posterior, se utilizó agua destilada para seleccionar los ejemplares de trabajo.

4.1.2.2 Condiciones experimentales

Grupos de 5 caracoles se introdujeron en frascos de vidrio de 300 ml que contenían 250 ml de agua con diversas concentraciones de Bayluscid EC250 o de Piquerol A. Los recipientes se mantuvieron sin tapar, sin adición de alimento para los caracoles, sin aeración, con luz diurna normal y a temperatura ambiente del laboratorio. Se prepararon frascos de control con las mismas condiciones, solamente sin adición de inhibidores.

~~Los caracoles exhiben una conducta de protección tendiendo a deslizarse hacia afuera de la solución de prueba, por lo que fue necesario cubrir los frascos con una gasa justo por encima de la línea de agua.~~

4.1.2.3 Bioensayos preliminares

El objetivo de estos ensayos fue determinar un intervalo de concentraciones con el cual se tuvieran respuestas que fluctuaran de 0 a 100 por ciento de mortalidad en un lapso máximo de 24 horas. Las dosis experimentadas con Bayluscid fueron de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/l; con Piquerol de 5, 10, 25 y 50 mg/l (Cruz *et al*, 1989; Malek, 1977; Webbe, 1985; WHO, 1965 y 1983). Como resultado se observó una gran sensibilidad de los caracoles a Bayluscid, muriendo en su totalidad a la primera, segunda y cuarta hora de

exposición a las concentraciones de 4.0, 2.0 y 1.0 mg/l, respectivamente. A la concentración de 0.5 mg/l sobrevivieron más de 10 horas. Los caracoles expuestos a Piquerol murieron a intervalos regulares antes de 24 horas.

4.1.2.4 Bioensayos definitivos

Con base en los resultados de la experimentación anterior, las concentraciones utilizadas para Bayluscid fueron de 0.01, 0.05, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 1.0 mg/l; con Piquerol se utilizaron las mismas que en los bioensayos de preliminares: 5, 10, 25 y 50 mg/l. Para cada concentración se utilizaron dos frascos de prueba con una réplica y dos frascos de control.

Las observaciones se hicieron cada dos horas después de la exposición, hasta la décima hora. Posteriormente y excepto en aquellos recipientes donde la mortalidad total se presentó antes de 10 horas, se hicieron cada 24 horas hasta el tercer día en que se dio por terminado el experimento.

La determinación de muerte se hizo al observar ausencia total de contracciones musculares bajo el microscopio estereoscópico. Los organismos vivos se regresaron al frasco de prueba y los caracoles aparentemente muertos se enjuagaron con agua corriente para eliminar trazas del molusquicida y se colocaron en otro recipiente que contenía el mismo volumen de agua para observar su posible recuperación y asegurar que el criterio de muerte propuesto fue adecuado. En los casos donde los caracoles se recuperaron fue necesario repetir la serie de ensayo.

4.1.3 Determinación de la concentración letal media (LC50)

La estimación de mortalidad en el 50 por ciento de la población (LC50) para cada tiempo de exposición se obtuvo por medio del análisis *log-probit* descrito por Finney (1971, 1978). Según Mendoza (1988), esta es la referencia clave más importante sobre el tema de métodos estadísticos para el tratamiento de ensayos biológicos. A continuación se describe de forma breve el procedimiento.

El bioensayo presenta solo dos resultados posibles: que los caracoles mueran o no. Esta es una respuesta irreversible conocida como *respuesta cuantal*, cuyo valor es designado en toxicología como *tolerancia* e implica una variación semejante e independiente entre individuos, de modo que la probabilidad de que un caracol muera es proporcional a las muertes que ocurrirán en el conjunto de los individuos que reciben la misma dosis. La asignación a cualquiera de las dosis de molusquicidas es aleatoria, dado que un bloque formado por n individuos (cinco caracoles) tiene la misma probabilidad de recibir cualquiera de las n dosis (siete en los ensayos con Bayluscid, cinco en los de Piquerol).

La medición directa de la tolerancia es impráctica debido a que se requiere observar a los caracoles continuamente para conocer el tiempo en que mueren. Una estimación eficiente es la determinación de la concentración letal media (LC50). Esta dosis se caracteriza por la cantidad de estímulo que produce la muerte en el 50 por ciento de los individuos expuestos.

La prueba típica para estimar la dosis letal media es aquella en la cual grupos semejantes e independientes de organismos se exponen a diferentes concentraciones de un compuesto durante un tiempo determinado.

El hecho de que uno de los cinco caracoles expuestos a una cierta concentración pueda o no morir origina una cierta distribución de tolerancias que puede presentar un comportamiento sesgado (menor tolerancia a concentraciones mayores). Para lograr que dicha tolerancia tome la forma de una curva de distribución de frecuencia normal, se transforman los valores de las concentraciones a logaritmos con base 10. Esto sirve para poder representar gráficamente el porcentaje de mortalidad (sin sesgos) con respecto al logaritmo de la concentración. De acuerdo con las concentraciones utilizadas (ver inciso 4.1.2.4), se sabe que la mortalidad de la población expuesta a los molusquicidas es baja en la región cercana al 0 y al 100 por ciento y es alta en la región intermedia; en consecuencia, la distribución de tolerancias toma la forma de una curva sigmoide como se muestra en la fig 4.1.

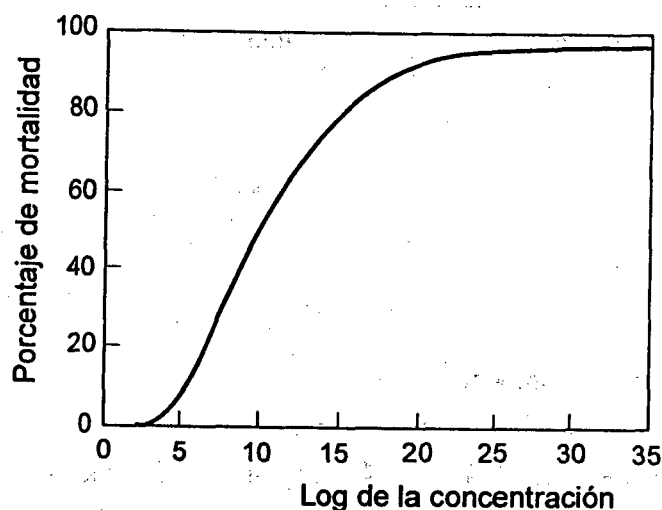


Fig 4.1 Curva de distribución acumulativa de la tolerancia

Para transformar la curva sigmoide en una línea recta, el porcentaje de mortalidad se convierte a unidades *probit*. Al 50 por ciento de la mortalidad le corresponden 5 unidades *probit* (fig 4.2). La probabilidad de respuesta toma valores entre 0 y 1 (ocurre o no ocurre) con una distribución normal con media de cero y varianza de uno.

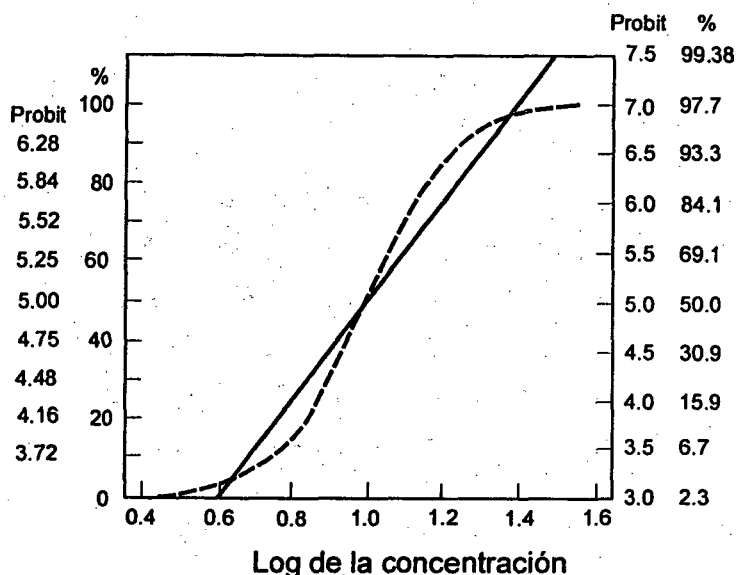


Fig 4.2 Curva sigmoide de transformación a línea recta cuando las ordenadas son medidas en la escala lineal de probits en lugar de porcentajes

La unidad *probit* asigna un valor a la probabilidad de respuesta (Y) a una dosis (x) y se define como la Desviación Normal Equivalente incrementada en 5 unidades por la relación:

$$z = (x_i - \mu) / \tilde{\sigma} + 5 \quad (4.1)$$

donde

- z desviación normal equivalente
- x_i valor i-ésimo observado de mortalidad
- μ promedio de mortalidad de los organismos de prueba
- σ̃ desviación estándar

entonces

$$\text{Unidad } probit = z + 5$$

La relación entre el *probit* y la proporción esperada de respuesta (Y) a una dosis (x) está dada por la ecuación lineal

$$Y = 5 \frac{1}{\tilde{\sigma}} (x - \mu) \quad (4.2)$$

A partir de la ec 4.2 se obtiene la ec de la línea recta $Y = \tilde{\sigma} + \beta \cdot x$: la cual sirve para estimar μ como σ̃ (ordenada al origen) y 1/σ̃ como β (pendiente). Con base en criterios estadísticos de frecuencia, la ecuación anterior y un modelo denominado de máxima verosimilitud, fueron utilizados para determinar la concentración letal media para cada tiempo de exposición, la cual corresponde a x. El modelo de máxima verosimilitud es usado para verificar la correlación entre la mortalidad de caracoles en el mismo grupo y de este modo la dispersión de mortalidad alrededor de la línea de regresión (línea *probit*).

Para los análisis log-*probit* y de máxima verosimilitud se utilizó un programa de computadora y antes de correrlo con estos bioensayos se comparó con los datos y resultados de un experimento citado en Finney (1971), coincidiendo con los mismos.

4.1.4 Determinación del tamaño y distribución de edad de los caracoles

Como se indica en el cap 3, el biodisco en el cual se encontraban los caracoles objeto de este estudio, consta de tres etapas: la primera tiene un área de $4,589 \text{ m}^2$ y las dos restantes de $2,080 \text{ m}^2$ cada una. La mayoría de los caracoles se ubicaban en la tercera etapa. Tal disposición permite utilizar la técnica de muestreo por cuadrantes para estimar el tamaño de la población al utilizar los caracoles que se encuentran en la última placa de dicha etapa bajo las siguientes consideraciones: a) se puede determinar con precisión la población en cada cuadrante; b) conocerse con exactitud el área de cada cuadrante y c) los cuadrantes son representativos del área total.

El procedimiento consistió en contar los individuos en la mitad de la última placa, la cual se compone de 12 secciones de 1.93 m^2 cada una (ver apéndice B). Posteriormente, los caracoles se distribuyeron de acuerdo con su tamaño y se determinaron algunas características inherentes a los individuos (peso, longitud de la concha, etc). Para este tipo de muestreos Andrewartha (1973), propone estimar el tamaño de la población mediante la expresión

$$N [X \pm \tilde{\sigma}_x \cdot t(n-1, 0.05)] \quad (4.3)$$

donde

N	número total de cuadrantes del área de muestreo
X	media de la población
$\tilde{\sigma}_x$	error estándar
$t(n-1, 0.05)$	valor tomado de la tabla de distribución "t" con 5 grados de libertad y 95 % de confianza

4.1.5 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles

La distribución espacial de los caracoles se obtuvo mediante el cociente entre la varianza ($\tilde{\sigma}^2$) y la media (X). La varianza es una propiedad general de las distribuciones que estima el valor de las distancias entre cada punto y la media. Así, el cociente $\tilde{\sigma}^2/X$ se ha de aproximar a la unidad para una distribución al azar. Sin embargo, se considera que la simple media es una estimación de la varianza, por lo que ha de aplicarse una prueba de

significancia o de error estándar ($\tilde{\sigma}_x$) que considere la dispersión de una serie de medias con respecto a la media $\bar{X}$.

$$\tilde{\sigma}_x = \tilde{\sigma} / (n - 1) \quad (4.4)$$

donde

$\tilde{\sigma}_x$ error estándar
 $\tilde{\sigma}$ desviación estándar de la población
 n tamaño de la muestra

para una distribución al azar

$$1 - [t(n - 1, 0.05)(\tilde{\sigma}_x)] < \tilde{\sigma}^2 / X < 1 + [t(n - 1, 0.05)(\tilde{\sigma}_x)] \quad (4.5)$$

Considerando la facilidad de ocupación del espacio por los individuos en términos de espacio continuo, se comprende que el tipo de distribución estadística al que se aproximan los caracoles puede variar si se amplía la dimensión de los cuadrantes. Uno de los procedimientos para verificar el tipo de distribución es el índice (I_m) propuesto por Morisita (Franco, 1985).

$$I_m = [n \tilde{\sigma} z_i (z_i - 1)] / [N(N - 1)] \quad (4.6)$$

donde

n número de cuadrantes
 $\tilde{\sigma}$ desviación estándar de la población
 z_i número de individuos del cuadrante i
 N número total de individuos en todos los cuadrantes

La decisión se toma de acuerdo con los siguientes criterios:

Si $I_m = 1$, entonces se presenta una distribución al azar;

Si $I_m < 1$, entonces se presenta una distribución uniforme.

4.1.6 Determinación de la densidad y biomasa de la población de caracoles

La densidad de la población se puede obtener mediante la relación

$$\text{densidad} = \text{media de la población} / \text{área del cuadrante} \quad (4.7)$$

La biomasa de los caracoles se estima a partir de su peso individual (medido como peso húmedo) de los organismos que salen con el agua tratada del biodisco. El agua transporta organismos vivos que se desprenden de la superficie del biodisco, organismos muertos y conchas vacías. Es necesario tomar en cuenta el peso de las conchas vacías (Southwood, 1978), debido a que son testimonio de los animales muertos, que en algún momento dado depredaron sobre la biopelícula, y del tamaño que alcanzaron. Para esto se utiliza la ec 4.8

$$B = D \cdot (\sum w / n) \quad (4.8)$$

donde

B biomasa expresada en peso por unidad de área (g/m^2)

D densidad de la población (número de individuos/ m^2)

$\sum w$ suma del peso de cada uno de los organismos que forman parte de la muestra

n número de organismos de la muestra.

4.1.7 Generación de la película biológica para realizar experimentos

Con objeto de tener una biopelícula representativa de la del biodisco, que pudiera ser utilizada como alimento de caracoles y para las pruebas de inhibición en el respirómetro Warburg, se permitió el desarrollo de películas biológicas sobre discos de vidrio esmerilado de 10 cm de diámetro y 3 mm de espesor que fueron fijados al material plástico del biodisco. Después de cuatro días se pudo observar a simple vista, la formación de una biopelícula sobre los discos de vidrio. Con objeto de que la biopelícula generada en los discos de vidrio fuera representativa de la del biodisco, se permitió que la película de los discos se aclimatara durante varias semanas antes de poder ser usada.

La biopelícula generada de esta forma fue utilizada para cuantificar la capacidad de depredación de los caracoles y para estudios de inhibición por tóxicos en el respirómetro.

4.1.8 Utilización de la biopelícula por los caracoles

Para conocer la rapidez de consumo de los caracoles de biopelícula, se colocaron discos de vidrio cubiertos de biopelícula y cantidades conocidas de caracoles en acuarios de 9 litros cada uno. Se suministró oxígeno por medio de pequeñas piedras porosas difusoras y se cuantificó el tiempo que los caracoles requirieron para acabar con la biopelícula. Las condiciones detalladas de la experimentación y los resultados se presentan en la tabla 5.4

4.2 Experimentos en el respirómetro

En esta parte del trabajo se hace un breve análisis de la relación que hay entre el consumo de sustrato y de oxígeno por microorganismos aerobios. De esta forma, se pueden realizar determinaciones cinéticas que permitan conocer los efectos de los molusquicidas sobre la película biológica. Es importante hacer notar que los molusquicidas son tóxicos y que es necesario conocer sus efectos inhibidores sobre la biopelícula y la capacidad de esta para degradarlos.

4.2.1 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno

Las células aerobias obtienen la mayor parte de su energía a través de la respiración, esto es, gracias a una transferencia de protones y electrones, desde las moléculas orgánicas combustibles hasta el oxígeno molecular. Durante el metabolismo aerobio de los organismos que forman la película biológica, el consumo de sustrato se relaciona directamente con el consumo de oxígeno. Durante la degradación aerobia de un sustrato se puede observar la disminución de la concentración del sustrato consumido ($S_0 - S_f$) y el aumento del consumo bioquímico de oxígeno ($CBO_0 - CBO_f$) respecto al tiempo (fig 4.3).

El valor máximo de CBO_f y el mínimo de S_f indican que el sustrato ha sido completamente degradado.

El consumo total de oxígeno durante la degradación de un sustrato es la suma de la respiración endógena y la respiración exógena. La respiración endógena representa el consumo de oxígeno cuando la célula no tiene disponible sustratos exógenos y está consumiendo sustancias almacenadas previamente (por ejemplo, glucógeno y/o polihidroxibutirato). La respiración exógena o también denominada *de sustrato* se lleva a

cabo cuando la célula utiliza como alimento un sustrato exógeno. La respiración endógena puede determinarse en un medio libre de sustratos y la respiración de sustrato se obtiene de la diferencia entre los valores de respiración total o combinada y los de respiración endógena.

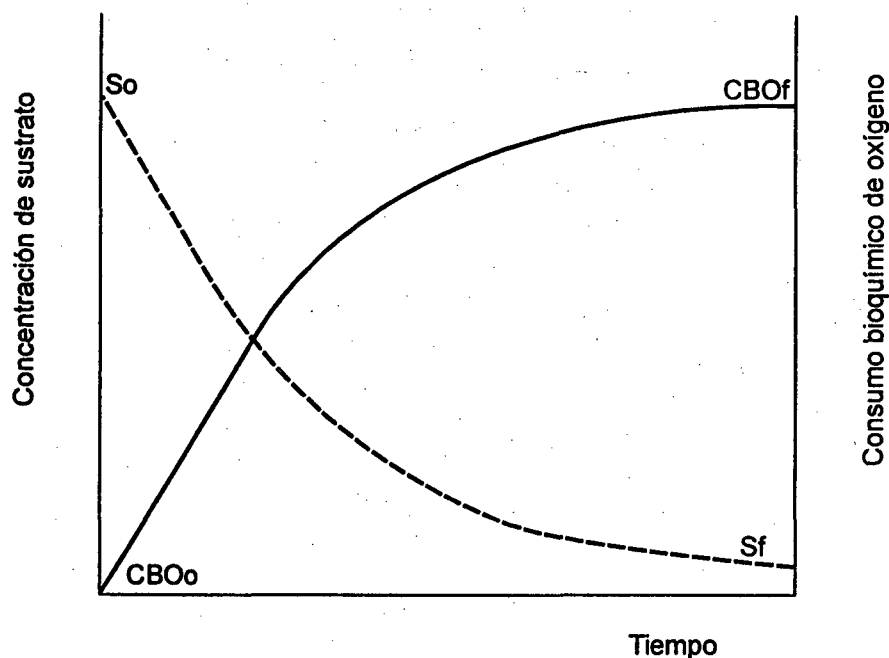


Fig 4.3. Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno

4.2.2 Efecto de los molusquicidas sobre la biopelícula

El efecto de los molusquicidas sobre la biopelícula puede manifestarse, a) cuando los microorganismos mueren por intoxicación (no hay consumo de oxígeno); b) cuando su metabolismo sea inhibido por la presencia de los tóxicos (valores de consumo de oxígeno menores a los que se obtienen por respiración endógena) y c) cuando los organismos de la biopelícula, a pesar de estar bajo condiciones de inhibición, puedan degradar los compuestos tóxicos usados contra los caracoles (valores de consumo de oxígeno mayores a los de respiración endógena).

Con base en los resultados de los bioensayos, las concentraciones de molusquicida se ajustaron por dilución en una solución de fosfatos amortiguadora y en agua residual cruda para la exposición a las biopelículas en el respirómetro. Como complemento energético se utilizó glucosa (300 mg/l) en la solución amortiguadora y en el agua residual (con Piquerol A no se hizo el ensayo con agua residual). Con glucosa y agua residual el consumo de oxígeno puede aumentar debido a que las células se encuentran en un medio

rico en alimento. En un medio sin sustrato (solución amortiguadora de fosfatos con molusquicida) el consumo de oxígeno puede disminuir con respecto a las soluciones con glucosa y con respecto a la respiración endógena.

4.2.3 Medición del consumo de oxígeno de los organismos de la biopelícula

En un sistema cerrado a temperatura y volumen constantes, la reacción que consume oxígeno hace que disminuya la presión manométrica dentro del sistema. El consumo de oxígeno es directamente proporcional al consumo de sustrato y a su vez proporcional a los cambios de presión. El respirómetro Warburg sirve para medir de forma confiable y eficiente cambios muy pequeños en la presión de un gas en un sistema cerrado. La fig 4.4 muestra el diagrama del respirómetro utilizado.

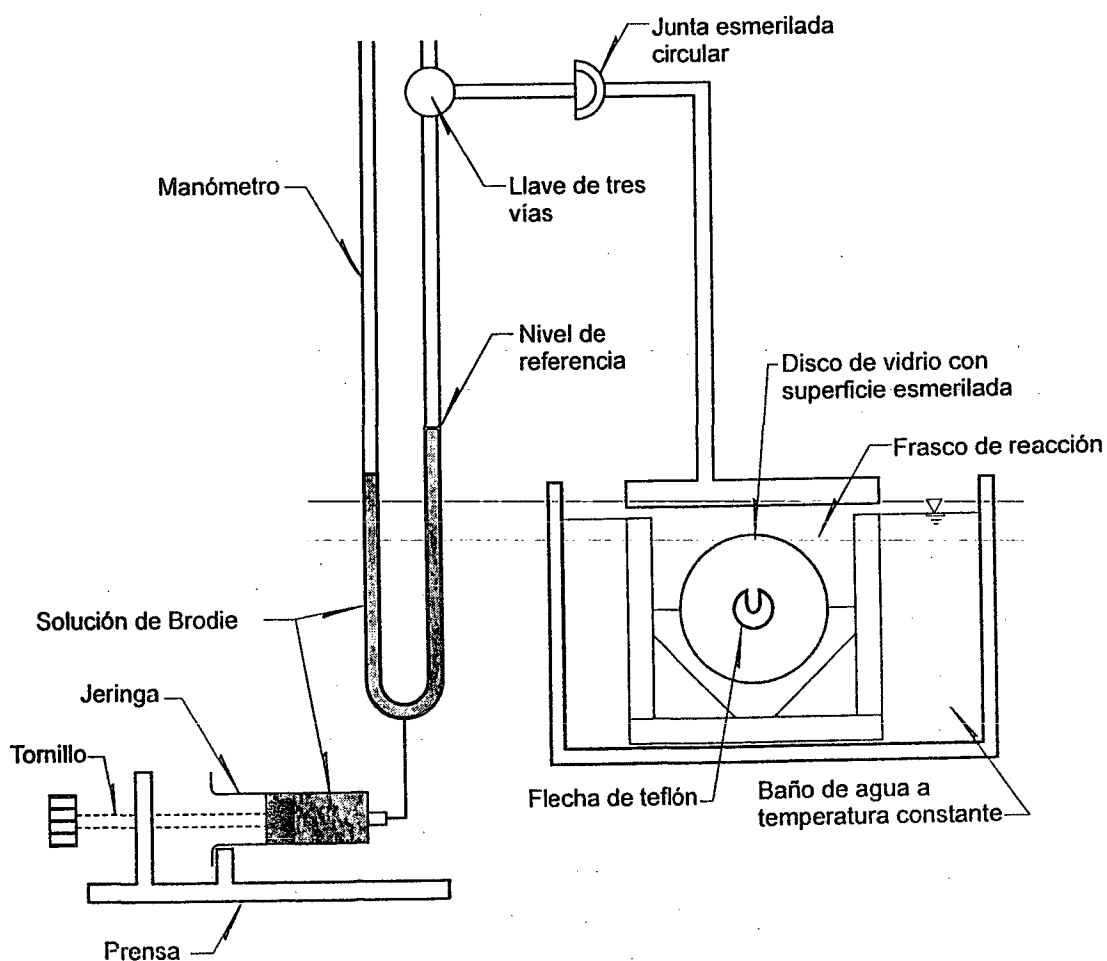


Fig 4.4 Diagrama esquemático del respirómetro Warburg

4.2.4 Descripción y funcionamiento del respirómetro Warburg

El respirómetro consta de dos partes principales: manómetro y frasco de reacción. En este último, se encuentra una flecha de teflón que tiene incorporada una barra magnética a la cual se monta un disco cubierto de biopelícula (ver inciso 4.1.5). La flecha con el disco gira al accionar un sistema de poleas externo provisto de magnetos que giran a velocidad controlada. En la parte superior del frasco se encuentra un depósito sobre el que se colocan tres o cuatro lentejas de KOH para absorber el CO_2 liberado durante la oxidación biológica. El aparato utilizado cuenta con seis juegos de frascos de reacción con manómetro (fig 4.5).

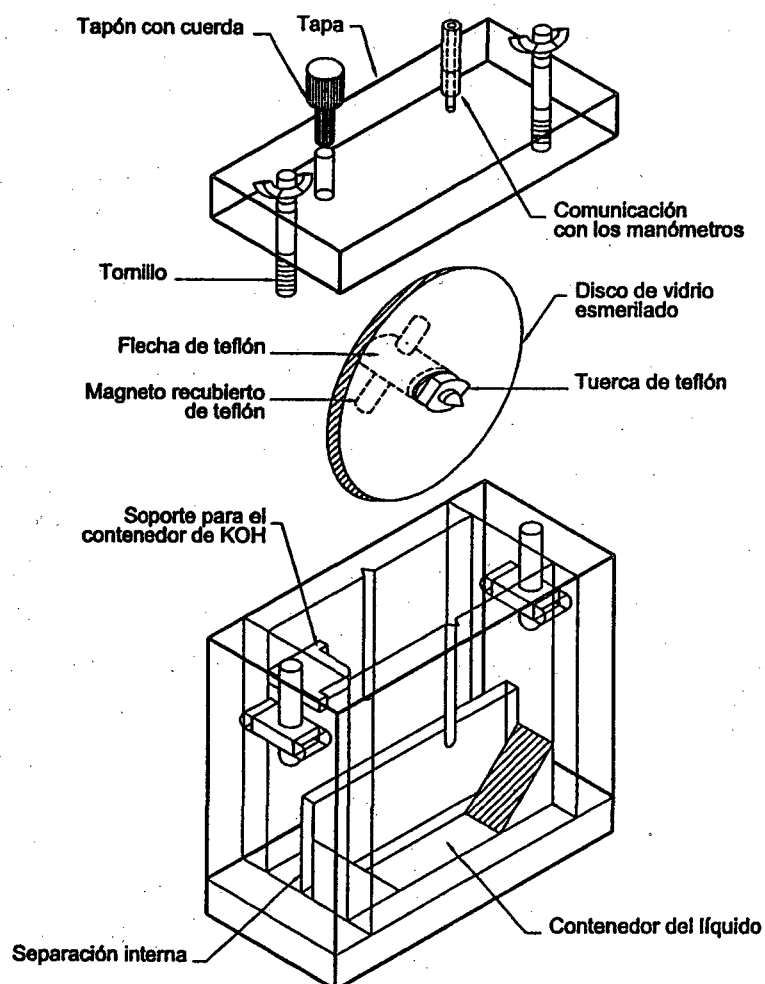


Fig 4.5 Diagrama de los frascos de reacción

Para evitar que los cambios de temperatura afecten las mediciones, los frascos de reacción se sumergen en un baño de agua para mantener la temperatura constante (20-22 °C), la cual se regula mediante un termostato.

Los cambios de presión se corrigen mediante un termobárometro, que consiste en un frasco igual a los otros al que se le adicionan 65 ml de agua destilada.

Se coloca la solución con molusquicida, con cuatro concentraciones diferentes, en cuatro de los frascos de reacción; en un quinto recipiente se adiciona solución amortiguadora de fosfatos sin molusquicida y sin glucosa (respiración endógena), al sexto frasco se le adiciona solamente agua destilada para ser utilizado como termobarómetro y poder ajustar los cambios de presión atmosférica durante el tiempo de experimentación. El volumen de 65 ml de las soluciones cubre el 40 por ciento de la superficie de los discos.

Las tapas de los frascos tienen dos perforaciones: una de ellas conecta el frasco de reacción con el manómetro y la otra sirve para introducir la solución de prueba. En la parte inferior del manómetro se encuentra una jeringa sujeta a una pequeña prensa de tornillo que se utiliza como depósito de una solución de Brodie (presión de vapor de 10,000 mm columna de agua). Los niveles de dicha solución se ajustan al nivel de referencia moviendo el émbolo de la jeringa en uno u otro sentido.

Durante el tiempo de la experimentación, se van anotando los valores de la diferencia de presiones con respecto a lecturas realizadas en intervalos de tiempo conocidos (generalmente cada 5 minutos). Posteriormente, se realizan los cálculos que permitan conocer y graficar los valores de oxígeno consumido con respecto al tiempo.

5. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de los bioensayos con caracoles y de la experimentación con el respirómetro.

5.1 Estudios con caracoles

5.1.1 Ubicación taxonómica

La clasificación taxonómica que corresponde a los caracoles que se encuentran en el biodisco de la planta para tratamiento de aguas residuales de CU, se basa en las claves propuestas por Burch y Cruz (1987) y en los trabajos de Burch (1982) y Camplitt (1970).

El género se reconoció a través de una serie de características de la morfología externa: la concha tiene forma cónica, color café oscuro, con bandas sobre su superficie, carece de opérculo y de ornamentaciones, la espira de la concha se presenta levantada, espira y concha se enrollan hacia la izquierda; la cabeza tiene un par de tentáculos y ojos cerca de la base de estos.

Phyllum: *Mollusca*

Clase: *Gastropoda*

Subclase: *Pulmonata*

Superorden: *Basomathophora*

Orden: *Lymnophila*

Superfamilia: *Ancyloidea*

Familia: *Physidae*

Subfamilia: *Physinae*

Género: *Physa*

En las figs-5.1 y 5.2 se presentan algunos de los rasgos más distintivos de la concha y de la organización de *Physa*.

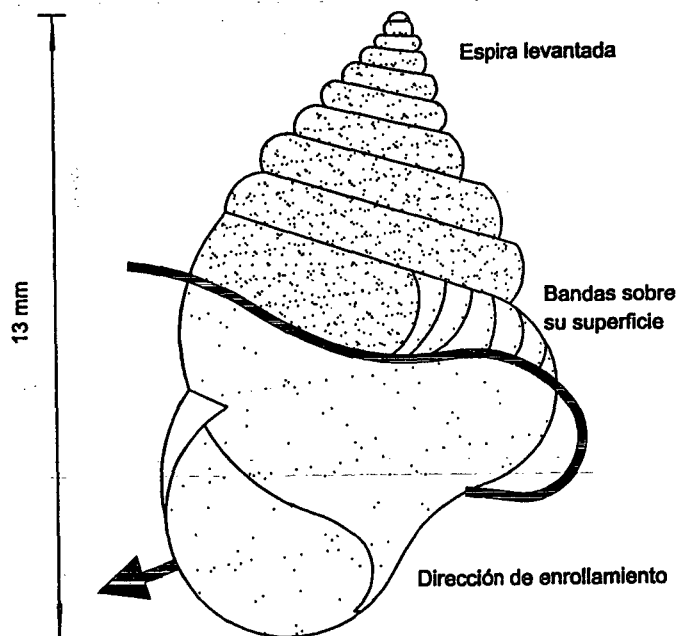


Fig 5.1 Morfología característica de la concha de *Physa* sp (tomado de Burch y Cruz, 1987)

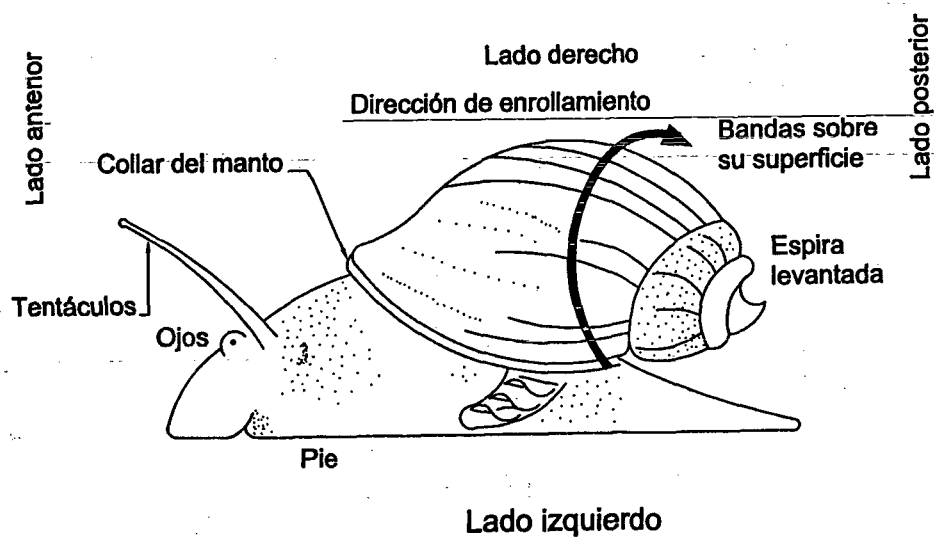


Fig 5.2 Organización morfofuncional de *Physa* sp (tomado de Burch y Cruz, 1987)

5.1.2 Determinación de la concentración letal media (LC50)

Los resultados de los bioensayos se resumen en las tablas 5.1 y 5.2, en las cuales se presentan los valores de las LC50 a distintas horas de exposición, la ordenada al origen ($\bar{O}$), la pendiente (β) y la varianza de la misma $\bar{O}^2(\beta)$.

Según Finney (1971, 1978), $\bar{O}$ representa el *probit* promedio de los puntos que conforman la recta y corresponde a la proporción esperada de mortalidad (en *probits*) donde, a un valor de 50 por ciento, le son asignadas 5.0 unidades *probit*. En las tablas se observa que la mortalidad aumenta con el tiempo de exposición y que es mayor para Bayluscid que para Piquerol. Se concluye que Bayluscid tiene un impacto más drástico que Piquerol sobre la población *Physa*.

Tabla 5.1 Resultados del ensayo con Bayluscid EC250

Tiempo de exposición, en horas	$\bar{O}$	β	$\bar{O}^2(\beta)$	LC50, en mg/l
4	4.896	0.866	0.104	3.43
6	5.622	0.987	0.076	0.33
8	6.429	1.003	0.068	0.057
10	6.465	0.634	0.181	0.0077
24	7.226	0.837	0.410	0.0026

Tabla 5.2 Resultados del ensayo con Piquerol A

Tiempo de exposición, en horas	$\bar{O}$	β	$\bar{O}^2(\beta)$	LC50, en mg/l
4	0.908	2.04	2.649	90.60
6	1.657	2.15	0.649	39.86
8	2.385	2.29	0.066	13.86
10	3.275	2.39	0.038	7.37
24	4.059	1.73	0.875	3.41

Los valores positivos y diferentes de cero de la pendiente β indican una tasa de mortalidad positiva, la cual aumenta con respecto a la relación logarítmica de la concentración-tiempo. Esto se observó hasta las 8 y 10 horas para Bayluscid y Piquerol, respectivamente. Después, el valor de β decrece, lo cual significa que la efectividad de los molusquicidas está limitada respecto al tiempo e indica el límite de tolerancia fisiológico máximo de la población ya que el efecto de los tóxicos empieza a decrecer y se vuelve independiente de la concentración. Estos valores pueden también indicar que los caracoles tienen la capacidad para aclimatarse a la presencia del tóxico y/o que su metabolismo puede asimilar y degradar parte de él.

El valor de cada pendiente indica la homogeneidad de respuesta de los organismos durante el bioensayo. En las tablas 5.1 y 5.2 se observa que a mayores pendientes corresponden valores más pequeños de varianza de la pendiente ($\hat{\sigma}^2(\beta)$). La varianza es una medida de la dispersión del conjunto de resultados del bioensayo alrededor de la línea de regresión (línea *probit*) y sus bajos valores demuestran que la población de caracoles estudiada fue muy homogénea en su respuesta.

La varianza de la pendiente muestra que los caracoles presentan gran susceptibilidad a los tóxicos, principalmente de las 4 a las 8 horas con Bayluscid y de 6 a 10 horas con Piquerol. Durante este periodo se observan las varianzas más bajas durante toda la experimentación.

De acuerdo con los resultados de las LC50, Bayluscid es un producto más tóxico que Piquerol al requerir concentraciones inferiores. Ambos compuestos se adecuan a los requerimientos de la WHO (1965, 1983, 1988), la cual establece un máximo de concentración de 100 mg/l para provocar mortalidad superior al 90 % en un tiempo no mayor de 24 horas. La decisión de utilizar uno u otro dependerá de la disponibilidad del compuesto y de su precio.

5.1.3 Determinación del tamaño de la población y distribución de edades

La distribución espacial de *Physa* se incrementa notablemente en la última de las tres etapas del biodisco. Tomando en cuenta que hay una correlación entre la forma de la concha, locomoción y forma de vida, se puede pensar que los factores que limitan la colonización de los caracoles en las etapas iniciales se debe a que el pie de los caracoles

de agua dulce funciona como un órgano adhesivo y tiene forma de suela plana; está adaptado para la locomoción en diversos medios, principalmente arena y fondos lodosos. La base del pie presenta una glándula pedal, la cual secreta una mucosidad que le permite la adherencia al medio sobre el cual se mueve. Las biopelículas que se desarrollan en la primera y segunda etapas del biodisco están formadas por microorganismos que se encuentran en estado de crecimiento rápido: las biopelículas se regeneran rápidamente (su desprendimiento es continuo) y se denominan *jóvenes* al tener tiempos de regeneración inferiores a tres días. Esto hace que las capas superiores de microorganismos tengan poca resistencia mecánica y no soporten fácilmente el peso de los caracoles. La biopelícula de la tercera etapa está formada por microorganismos acostumbrados a la carencia de alimento, lo cual hace que la adherencia entre ellos sea buena y presenta suficiente resistencia para soportar los caracoles que sobre ella se mueven. Como consecuencia, los caracoles encuentran condiciones adecuadas para su desarrollo en la última etapa del biodisco al ser la biopelícula más delgada en esta etapa que en las primeras. En muy pequeño número, también se pudieron observar individuos en la primera etapa del biodisco.

Con base en conteos se concluyó que el número de individuos que se encuentran fuera de la tercera etapa es despreciable para el conteo total. De estas observaciones se eligió un método de muestreo por cuadrantes para estimar el tamaño de la población.

A partir de los datos que se obtuvieron en los muestreos en la última placa de la tercera etapa del biodisco, se calcularon algunos parámetros estadísticos, los cuales son necesarios para conocer el tamaño de la población:

Media ($\bar{X}$)	= 533
Varianza ($\bar{O}^2$)	= 751
Desviación estándar ($\bar{O}$)	= 27.41
Error estándar ($\bar{O}_x$)	= 0.63

El tamaño de la población con respecto al área total de muestreo y su intervalo de confianza se calcularon sustituyendo los valores en la ec 4.3.

$$\text{Tamaño de la población de caracoles en la tercera etapa del biodisco de CU} = 12[533 \pm (0.63)(2.6)] = 6376 - 641$$

La distribución por edades constituye una característica importante de la población ya que indica su condición. Como regla general, una población en expansión rápida comprenderá una gran proporción de individuos jóvenes; una población estable abarcará una distribución más uniforme de edades y una población decadente contendrá una gran proporción de individuos viejos. Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, las poblaciones tienden hacia una distribución homogénea de edades.

La distribución por edades de la población de caracoles se muestra en la tabla 5.3. El 41.2 por ciento corresponde a organismos pequeños que miden entre 0.01 y 4.0 mm; el 38.3 por ciento son caracoles medianos cuyo tamaño va de 4.1 a 8.0 mm; los organismos grandes miden entre 8.1 y 13.0 mm y comprenden el 20.5 por ciento de la población. Los organismos pequeños y los medianos predominan sobre los más grandes.

De acuerdo con Lotka (1956), citado por Odum (1984), si la estabilidad de la población se rompe a causa de cambios temporales en el medio (en este caso la adición de un compuesto no habitual al sistema), la distribución de las edades tenderá a modificarse hasta alcanzar otra distribución de equilibrio.

Tabla 5.3 Características de *Physa sp* en el biodisco de CU

Característica	pequeños	medianos	grandes
Longitud de la concha, en mm	0.01-4.0	4.1-8.0	8.1-13.0
Peso por individuo, en g	0.0127	0.109	0.201
Días posteriores a la puesta (edad)*	0-30	30-50	50-80
Número de individuos**	318	1224	654
Porcentaje, en número	41.2	38.3	20.5

* Adaptado de Camplitt (1970)

** En la última placa del biodisco

5.1.4 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles

Los individuos de una población pueden estar distribuidos de tres formas: a) al azar, b) uniformemente y c) amontonados (Franco, 1985). La distribución al azar tiene lugar donde las condiciones son iguales en todo el medio. La distribución uniforme se presenta donde la competencia entre individuos es activa o donde existe un antagonismo que provoca un espaciamiento regular. El amontonamiento refleja una interacción positiva

entre los individuos de la población. Se han sugerido diferentes métodos que pueden utilizarse para analizar el tipo de dispersión de una población (Franco, 1985). Uno de ellos es la razón de varianza media (ver inciso 4.1.5).

La distribución de varianza media se calcula por medio de la ec 4.5

$$1 - [2.6(0.63)] < 751/533 < 1 + [2.6(0.63)] = -0.61 < 1.4 < 2.6$$

Los resultados demuestran que la población se distribuye al azar en el biodisco. Para comprobarlo se sustituyeron valores en la ec 4.6

$$I_m = \frac{6(1.702.964)}{3196(3195)} = 1.0$$

Como $I_m = 1.0$, se concluye que la distribución es al azar (Franco, 1985). Esto indica que los caracoles se encuentran en un hábitat que ofrece condiciones adecuadas para su desarrollo donde todo el espacio tiene la misma probabilidad de ser ocupado y que la presencia de un individuo en un cierto punto no afecta la ubicación de otro. La población no presenta tendencia a agruparse ni a rechazarse y no hay competencia entre ellos ni por recursos ni por espacio.

5.1.5 Determinación de la densidad y biomasa de la población de caracoles

La densidad de la población se expresa como número de individuos por unidad de superficie o volumen. Usando la ec 4.7 se tiene que la densidad (D) de la población de caracoles es

$$D = \frac{533}{1.93m^2} = 276 \text{ caracoles}/m^2 \text{ en la última placa del biodisco}$$

Cada individuo de la población se puede caracterizar por una biomasa y con ella contribuye a la biomasa total del sistema. Dos propiedades del individuo se refieren a cómo realiza tal contribución: a) está presente durante un tiempo hasta que sobreviene la muerte; b) mientras vive, su biomasa no permanece constante, sino que tiende a aumentar (Southwood, 1978). Ambas características de los individuos fueron tomadas en cuenta (ver inciso 4.1.6) y se calcularon mediante la ec 4.8

$$-(276 \text{ caracoles/m}^2) \cdot (354.43 \text{ g} / 3196 \text{ caracoles}) = 30.60 \text{ g/m}^2$$

Esto indica que nueve caracoles pesan 1.0 g como masa húmeda, ya tomando en cuenta la distribución de tamaños. Se determinó que se desprenden de la biopelícula del biodisco y son arrastrados por el agua diariamente, 709 g de caracoles. Este valor se calcula multiplicando la densidad de individuos (30.60 g/m^2) por el área superficial de la última placa del biodisco (23.16 m^2).

Con base en estos valores se puede pensar que la masa de caracoles que pasan, arrastrados por el agua, del biodisco al sedimentador secundario es muy baja para que pueda obstruir las tuberías de la planta (tubos de 30 cm de diámetro). Ingram *et al* (1958) informan que las tuberías de la planta en la que trabajaron se taparon al fluir por ellas hasta media tonelada diaria de conchas de caracoles.

Desde el punto de vista trófico, y por simplicidad, el biodisco puede dividirse en solo dos niveles: organismos productores (los que forman la biopelícula) y organismos consumidores (los caracoles). El nivel trófico, el tamaño de los organismos, su densidad y su metabolismo están correlacionados. Generalmente, los animales grandes ocupan niveles tróficos superiores como consumidores y los muy pequeños como productores. Cuanto más bajo es el nivel trófico más alta es la densidad de la población. Mil millones de bacterias (Margalef, 1983) o nueve caracoles pesan un gramo. El metabolismo por gramo de biomasa de los microorganismos pequeños es inmensamente mayor que la rapidez metabólica de organismos mayores (Margalef, 1974). En este caso, aunque pase más energía a través del nivel trófico productor que a través del consumidor (caracoles), el metabolismo y la renovación rápida de los microorganismos generan una producción mayor, con una biomasa permanentemente más pequeña. Consecuentemente, la rapidez metabólica por gramo de biomasa será superior en los microorganismos que en los caracoles.

Desde el punto de vista de flujo de materia y energía puede considerarse que las condiciones en que se han desarrollado los microorganismos y los caracoles dentro del biodisco han conducido a un equilibrio trófico entre ellos, debido a que las condiciones ambientales y el suministro de alimento (contaminantes en las aguas residuales) no sufren cambios drásticos con respecto al tiempo.

5.1.6 Determinación del consumo de biopelícula por los caracoles

Según se describe en el inciso 4.1.8, se realizaron experimentos en el laboratorio para determinar la tasa de consumo de la biopelícula por caracoles de tamaño mediano. La tabla 5.4 presenta los resultados de los experimentos.

Tabla 5.4 Estimación de la tasa de consumo de la biopelícula

Número de caracoles	Núm de discos	Área superficial de los discos, en cm^2	Espesor de la biopelícula, en cm	Volumen de biopelícula consumida, en cm^2	Consumo volumétrico por individuo, en cm^3	Tiempo de consumo, en horas	Consumo individual por unidad de tiempo ($\text{cm}^3/\text{caracol hora}$)
10	1	154.3	0.026	4.01	0.401	45	0.0089
10	2	154.3	0.013	4.01	0.401	22	0.0182
10	2	154.3	0.015	4.63	0.463	20	0.02315
10	1	154.3	0.01	1.54	0.154	10	0.0154
14	1	154.3	0.012	1.85	0.132	24	0.0055
31	2	154.3	0.0095	2.93	0.095	24	0.00394
31	2	154.3	0.0135	4.16	0.134	48	0.00295
60	3	154.3	0.02	9.26	0.154	48	0.00313
70	2	154.3	0.0185	5.71	0.0815	16	0.0051

De la última columna de la tabla 5.4 se obtiene el valor promedio del consumo de biopelícula que es de $8.995 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$ por caracol, por hora o $2.158 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$ por caracol por día. Considerando que la población se encuentra homogéneamente distribuida en la tercera etapa del biodisco, se tiene que la cantidad total de caracoles es de 276 caracoles/ m^2 por 2,080 m^2 de área superficial expuesta al crecimiento de biopelícula; en la tercera etapa es igual a 374,080 caracoles.

Si cada caracol consume $2.158 \times 10^{-8} \text{ m}^3$ de biopelícula por día, entonces la población completa consume $1.205 \times 10^{-2} \text{ m}^3$ de biopelícula por día (en la tercera etapa del biodisco).

Considerando que el espesor promedio de la biopelícula es de 9.1×10^{-5} m, entonces el volumen de la biopelícula en la tercera etapa es de 0.187 m^3 . De donde

$$0.187 \text{ m}^3 / 1.205 \times 10^{-2} \text{ m}^3/\text{d} = 15 \text{ días}$$

Esto significa que los caracoles podrían destruir toda la biopelícula de la tercera etapa en 15 días si esta no estuviera en crecimiento continuo. El consumo diario de los caracoles es del 6.4 por ciento de toda la biopelícula.

5.1.7 Efecto de los caracoles sobre la remoción de contaminantes del biodisco

Como se menciona en el cap 3, la configuración por etapas del biodisco favorece la remoción secuencial de sustratos y conduce al desarrollo, principalmente en la última etapa, de bacterias nitrificantes (*Nitrobacter* y *Nitrosomonas*). Oga *et al* (1991) señalan que la biomasa característica de la última etapa presenta baja adherencia al material plástico, baja densidad y lento crecimiento. Según Ramírez (1988) los microorganismos de la última etapa se duplican aproximadamente cada 15 a 20 días. Entonces se puede considerar que el consumo del 6.4 por ciento de biopelícula de la tercera etapa afecta la eficiencia del proceso (nitrificación deficiente).

Para determinar si la presencia de caracoles afecta el proceso de remoción de contaminantes se hizo una comparación de las concentraciones de materia orgánica (medida como $\text{DBO}_{\text{total}}$) y de nitrógeno amoniacal de mayo a julio de 1983 (6 meses después de la puesta en marcha del sistema cuando no nitrificaba) con el mismo periodo en 1990. Para ello se utilizó una evaluación del funcionamiento del biodisco que hizo Norouzian (1983) y el trabajo de Ochoa (1983). El caudal promedio de agua residual que el biodisco ha tratado desde su instalación en 1981 es de 10 l/s ($864 \text{ m}^3/\text{d}$). Los datos de 1990 fueron extraídos de la bitácora de operación de la planta para tratamiento de aguas residuales de CU (tabla 5.5).

En la tabla 5.5 puede observarse que los valores promedio de la DBO en 1983 eran superiores a los medidos en 1990. En 1983, la remoción de la DBO fue del 70 por ciento, mientras que en 1990 fue del 80 por ciento. Esto se explica ya que, con los años, al crecer la Ciudad Universitaria, la concentración de material orgánico disminuyó por dilución, haciendo que la carga de material orgánico en el biodisco disminuyera al mantenerse un

caudal constante de 10 l/s (864 m³/d). Esto tuvo como consecuencia una mejor remoción de material orgánico: el valor promedio de DBO en 1990 fue de 19 mg/l.

Tabla 5.5 Comparación de la DBO y Nitrógeno Amoniacal en 1983 y en 1990

Medición en	DBO _{total} en mg/l				Nitrógeno amoniacal, en mg/l			
	1983		1990		1983		1990	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
marzo	162	33	51	8				
	114	50	84	11				
	105	60	66	14				
	102	30	54	7				
abril	60	22	42	7				
	150	45	84	9				
	140	35	114	21				
	160	55	72	15				
	125	40	54	9				
	150	55	114	9				
	134	20	117	9				
	120	45	45	7				
	100	30	129	11				
mayo	120	20	54	8	14.0	3.3	8.6	5.4
	105	85	138	36	13.4	3.3	5.5	3.5
	120	45	50	11				
	220	80	99	14	11.5	9.2	8.3	6.9
	110	25	66	9				
	160	45	78	8	15.2	2.6	12.3	10.1
	125	42	102	11	15.3	6.5	9.7	6.8
	165	75	54	14	10.7	2.8	10.9	8.8
junio	120	30	108	23	8.9	1.3	9.9	8.8
julio	135	30	99	47	9.9	6.9	7.1	4.8
	185	25	195	46	7.3	2.6	9.1	8.1
	165	30	189	45	16.4	4.6	8.6	6.6
	120	16	150	40	14.5	2.5	7.8	6.2
	165	42	150	40	12.9	2.4	8.4	6.4
	75	27	120	40	12.4	1.1	6.1	4.3
	110	30	1	34	10.3	1.6	4.3	3.9
Valor promedio	132	40	95	19	12.3	3.6	8.3	6.5

Teóricamente, la reducción de la carga orgánica en el biodisco debe de traer, consecuentemente, una mejora en las condiciones para el crecimiento de bacterias nitrificantes. Si esto fuera completamente cierto, la concentración efluente de nitrógeno amoniacal debiera ser inferior en 1990 que en 1983.

La remoción de nitrógeno amoniacal en 1983 fue del 81 y, en 1990, del 33 por ciento. El hecho es que, en vez de observarse una reducción en la concentración de nitrógeno amoniacal en 1990 con respecto a 1983, se tiene un aumento, a pesar de que la concentración afluente se redujo.

La única explicación para este fenómeno es la participación de los caracoles en el deterioro de la biopelícula, afectando principalmente las bacterias nitrificantes, la cuales tienen la tasa de reproducción más baja de las bacterias presentes en la biopelícula.

5.2 Experimentos de respirometría

A continuación se presentan los resultados de los experimentos de inhibición de Bayluscid y Piquerol sobre la biopelícula, realizados en el respirómetro.

5.2.1 Efectos del Bayluscid sobre la biopelícula

Se realizaron tres series de corridas en el respirómetro mezclando Bayluscid con una solución amortiguadora de fosfatos (el sustrato lo constituyó únicamente Bayluscid), en combinación con una solución de 300 mg/l de glucosa y con agua residual cruda de CU. Cada corrida se llevó a cabo adicionando Bayluscid (además de las sustancias antes mencionadas) en cuatro frascos, cada uno con concentraciones de 0.33, 0.057, 0.0077 y 0.0026 mg/l, las cuales corresponden a las 6, 8, 10 y 24 horas de exposición, respectivamente, del compuesto actuando sobre los caracoles (concentración letal media, LC50).

La fig 5.3 muestra el consumo bioquímico de oxígeno con respecto al tiempo cuando la biopelícula se pone en contacto con Bayluscid diluido en una solución amortiguadora de fosfatos. Se puede observar que Bayluscid es degradado por los microorganismos con una rapidez superior a la tasa de consumo de oxígeno de la respiración endógena. Esto indica que Bayluscid es utilizado como sustrato por los microorganismos que forman la película biológica. Las pendientes de las curvas aumentan al disminuir la concentración del Bayluscid, lo cual indica que tiene efectos inhibidores

sobre los microorganismos de la biopelícula y que los efectos inhibidores aumentan con su concentración.

La fig 5.4 muestra los valores de las curvas de la fig 5.3 después de restarles la respiración endógena (curvas reducidas). Dichas curvas muestran los valores de la respiración en presencia del Bayluscid como único sustrato. Dicha figura muestra que el Bayluscid es utilizado más rápidamente a bajas concentraciones. Asimismo, se observa que, a pesar de que las concentraciones de Bayluscid son bajas, las curvas no alcanzan una asíntota en algún valor de CBO, señalando que la reacción de degradación fue concluida, lo que indica que los organismos requieren oxígeno en grandes cantidades para mantener su metabolismo en presencia del Bayluscid.

En las figs 5.5 y 5.6 se nota que todas las curvas de respiración de glucosa con Bayluscid tienen valores superiores a la respiración endógena, y que la curva de glucosa sola alcanza un valor final antes que las otras tres. Al principio, la reacción de consumo de oxígeno se lleva a cabo rápidamente, lo cual se manifiesta en la pendiente inicial de las curvas, para después disminuir lentamente. El hecho de que las pendientes de las curvas con Bayluscid sean superiores a la respiración endógena indican que este compuesto es utilizado, junto con la glucosa, como fuente de alimento por los microorganismos y que los efectos inhibitorios del Bayluscid aumentan con su concentración.

En las figs 5.5 y 5.6 se observa que las pendientes de las curvas disminuyen al aumentar la concentración del Bayluscid. La curva con la concentración más alta del Bayluscid es la más cercana a la curva de respiración de glucosa, la cual alcanza la asíntota a los 150 minutos, tiempo en el cual los microorganismos de la biopelícula consumen toda la glucosa. Las otras curvas no alcanzaron una asíntota en el tiempo de estudio.

Al igual que en las figs 5.3 y 5.4, las pendientes de las curvas en las figs 5.5 y 5.6 son mayores que la respiración endógena y no alcanzan un valor estable en el tiempo de estudio, a pesar de las bajas concentraciones utilizadas del Bayluscid. Esto indica que, durante el tiempo de experimentación, los microorganismos de la biopelícula no consumieron completamente el sustrato disponible.

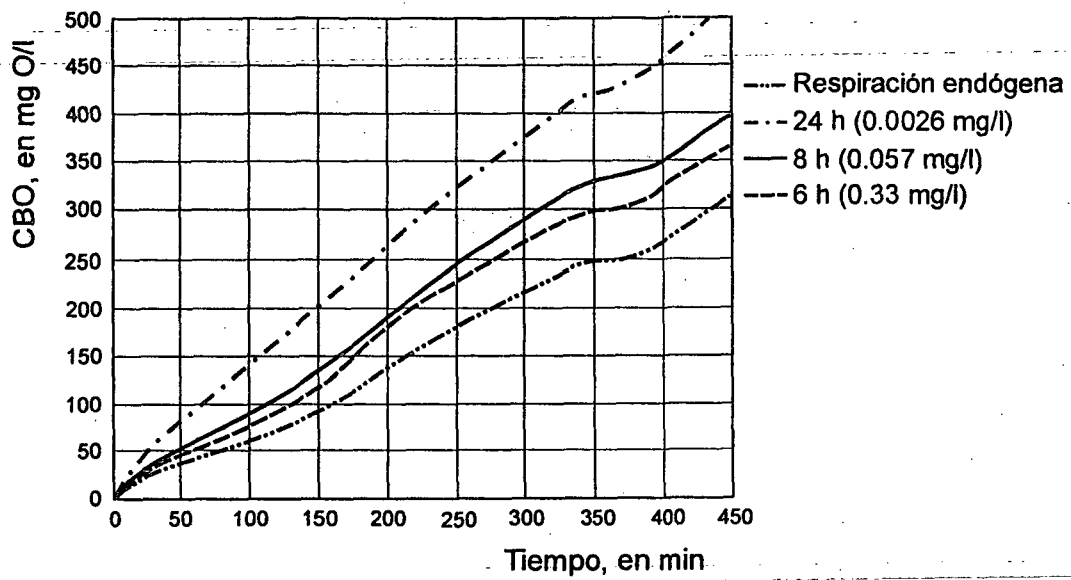


Fig 5.3 Efecto del Bayluscid diluido en una solución amortiguadora de fosfatos, sobre la respiración microbiana

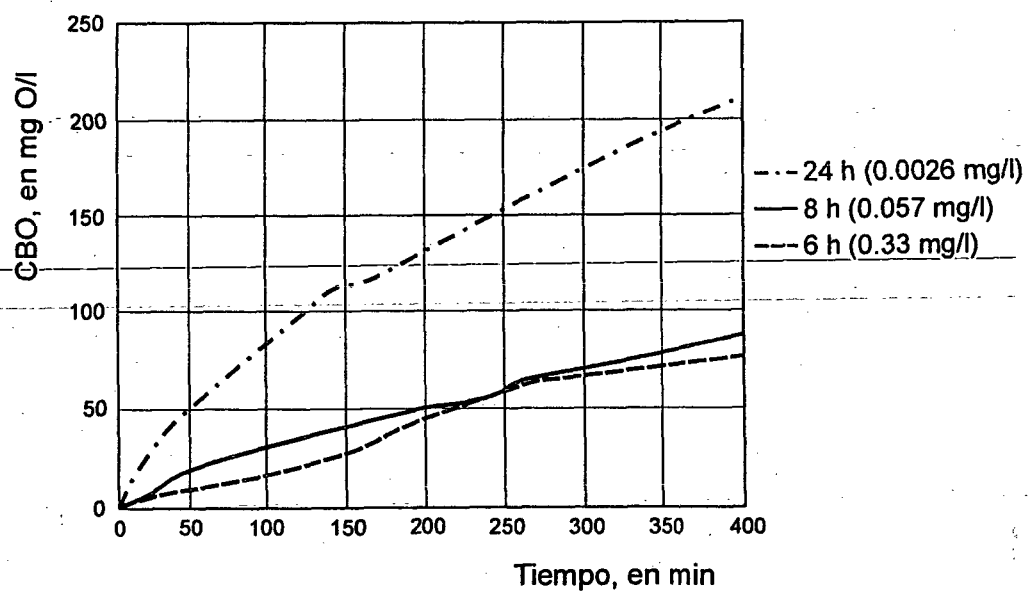


Fig 5.4 Respiración exógena del Bayluscid en ausencia de otra fuente de carbono

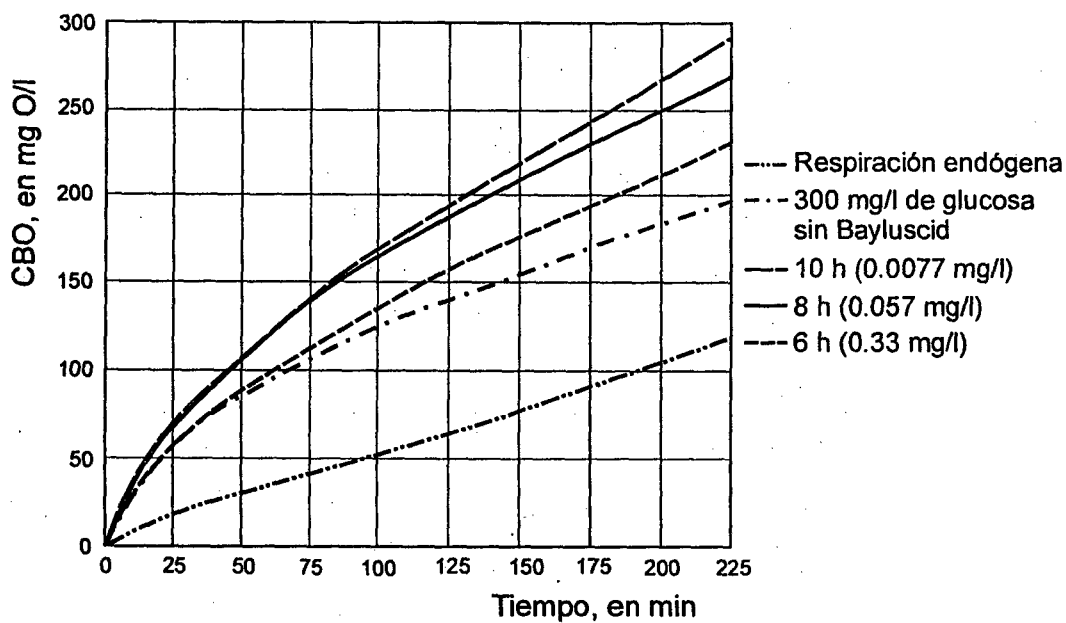


Fig 5.5 Curvas de respiración simultánea del Bayluscid y glucosa

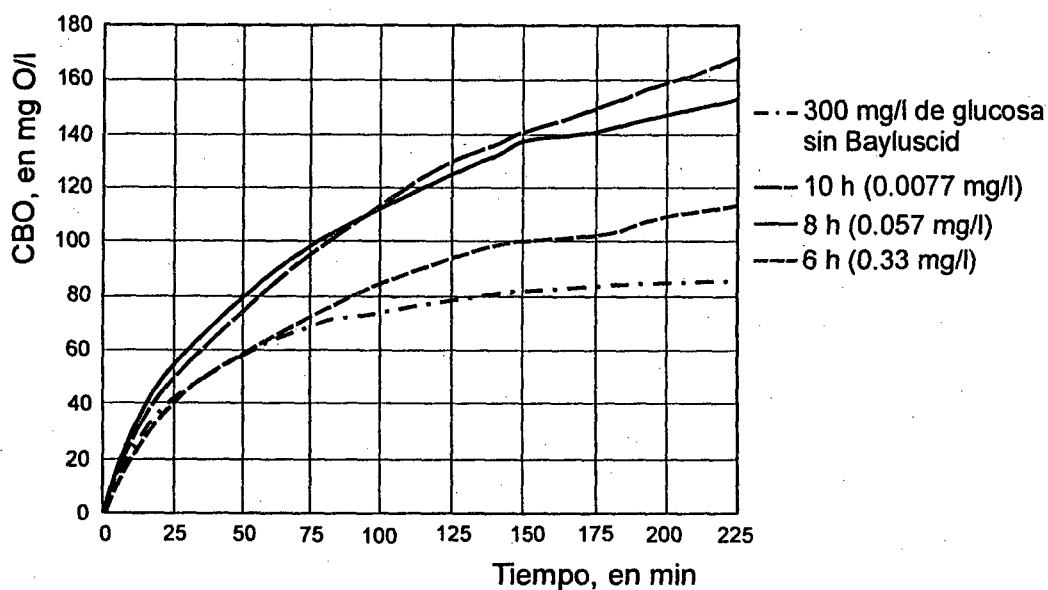


Fig 5.6 Respiración neta del Bayluscid en combinación con glucosa

Las figs 5.7 y 5.8 muestran las curvas de respiración combinada y de respiración de sustrato (curvas reducidas), respectivamente. En la fig 5.7 se observa que el consumo de oxígeno para degradar el material orgánico contenido en el agua residual es cercano a la respiración endógena y que solamente la mezcla de agua residual con la concentración menor del Bayluscid presenta valores de consumo de oxígeno superiores a la respiración endógena. El consumo de oxígeno de la mezcla de agua residual con las concentraciones del Bayluscid de 0.057 y 0.33 mg/l son inferiores a la respiración endógena. Esto se observa en la fig 5.7 al presentarse pendientes de consumo de oxígeno *negativas*. Esto indica que los efectos inhibidores del Bayluscid no solo afectan los sistemas enzimáticos que permiten el consumo de sustrato, sino que, a mayores concentraciones, también afecta negativamente las funciones metabólicas básicas de la célula al inhibir la respiración endógena.

De igual forma que en los casos anteriores, se concluye que el Bayluscid es inhibidor del metabolismo de los microorganismos que forman la biopelícula y que su efecto aumenta con la concentración. En el caso de la mezcla de aguas residuales con Bayluscid, el efecto inhibidor es mayor que cuando no hay otra fuente de carbono (figs 5.3 y 5.4) o cuando hay glucosa presente (figs 5.5 y 5.6) y es el único de los tres casos estudiados donde el efecto inhibidor reduce el consumo de oxígeno por abajo de la respiración endógena. Es posible que la combinación del Bayluscid con agua residual genere un efecto potenciador del tóxico sobre los microorganismos.

Volskay y Leslie (1990) mencionan que algunas sustancias químicas pueden influir en la velocidad de degradación de sustratos cuando hay organismos capaces de degradar a ambos. Painter (1983) ha demostrado que los organismos presentes en las aguas residuales domésticas son capaces de degradar diversos compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos cuando se encuentran en un ambiente adecuado. En este mismo sentido, el estudio de Etges (1969) en Andrews *et al* (1986) demuestra que las bacterias *Pseudomonas* y *Aerobacter* degradan Niclosamida (5,2-dicloro-4-nitrosalicilanilida) al utilizarla como fuente de nitrógeno. Algunos hongos y levaduras presentes también mostraron la capacidad de reducir la concentración original de Niclosamida a la que fueron expuestos en presencia de glucosa como fuente de carbono.

Durante los bioensayos se observó que los efectos tóxicos del Bayluscid sobre los caracoles se atenúan después de 10 horas. Esto puede deberse a dos factores: a la

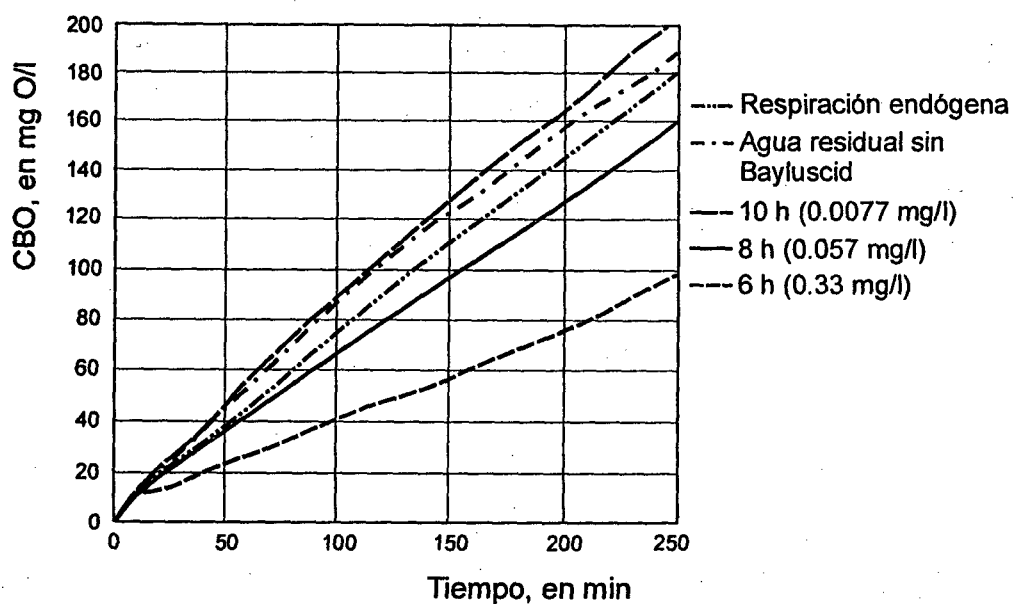


Fig 5.7 Respiración del Bayluscid en combinación con agua residual cruda

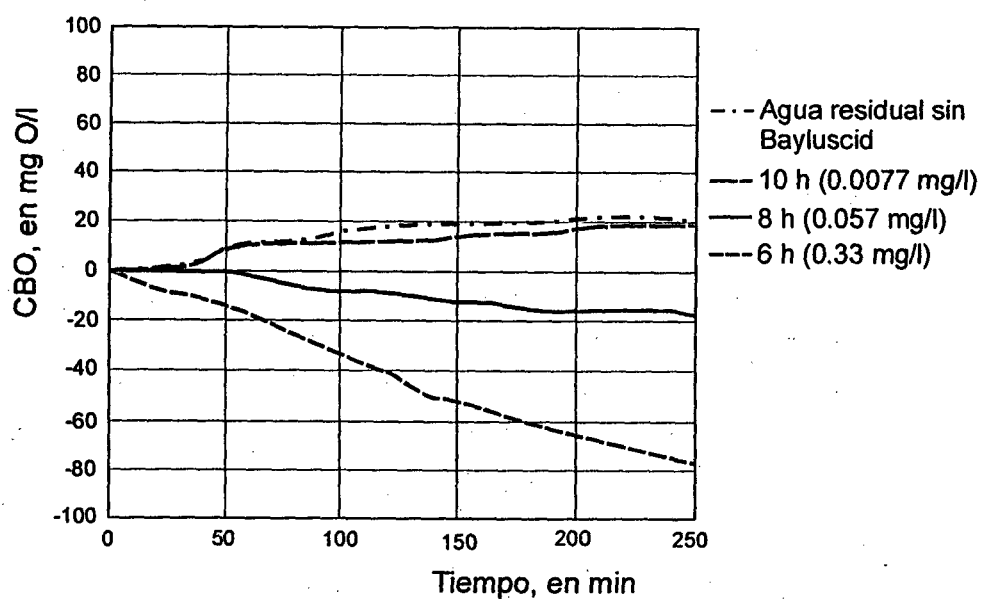


Fig 5.8 Respiración neta del Bayluscid en combinación con agua residual

degradación biológica del Bayluscid o a la incorporación y acumulación del compuesto (sin ser metabolizado) en los tejidos de los organismos que entran en contacto con él. Esto indica una reducción de los efectos tóxicos conforme transcurre el tiempo. Según Volskay y Leslie (1990), al transcurrir el tiempo de exposición, aumenta la probabilidad de que los organismos sintetizen enzimas para la degradación de los compuestos originalmente extraños o que sus sistemas se adapten a él.

5.2.2 Efectos del Piquerol sobre la biopelícula

De forma similar que con el Bayluscid, se realizaron experimentos con el Piquerol para conocer sus efectos inhibidores sobre los microorganismos de la película biológica. Se hicieron dos experimentos en el respirómetro adicionando soluciones con diferentes concentraciones del Piquerol; una solución amortiguadora de fosfatos y una solución de 300 mg/l de glucosa. Las concentraciones del Piquerol que se utilizaron fueron: 39.9, 13.9, 7.4 y 3.4 mg/l, las cuales corresponden a las 6, 8, 10 y 24 horas (LC50) del tóxico actuando sobre los caracoles.

La fig 5.9 muestra las curvas de respiración de la biopelícula con Piquerol como única fuente de carbono. Solamente la curva de 39.9 mg/l presenta valores de consumo de oxígeno inferiores a los de la respiración endógena, lo cual señala que a esta concentración los microorganismos están siendo inhibidos sin cubrir sus requerimientos mínimos (respiración endógena) de energía.

La fig 5.10 muestra las curvas reducidas de consumo de oxígeno. El hecho de que los valores de respiración con las concentraciones de 3.4, 7.4 y 13.9 mg/l sean mayores que la respiración endógena indica que el Piquerol está siendo degradado como fuente de carbono por los microorganismos y que tiene efectos similares a los del Bayluscid sobre la biopelícula. Las curvas de respiración tienden a disminuir sus pendientes conforme transcurre el tiempo sin alcanzar valores similares a los de la respiración endógena. En esta misma figura se observa que los efectos inhibitorios del Piquerol aumentan al aumentar la concentración del tóxico.

Comparando las concentraciones de Piquerol con las de Bayluscid se concluye que el Piquerol es un tóxico menos activo que el Bayluscid, ya que se requieren concentraciones inferiores para lograr efectos similares sobre la actividad de la biopelícula.

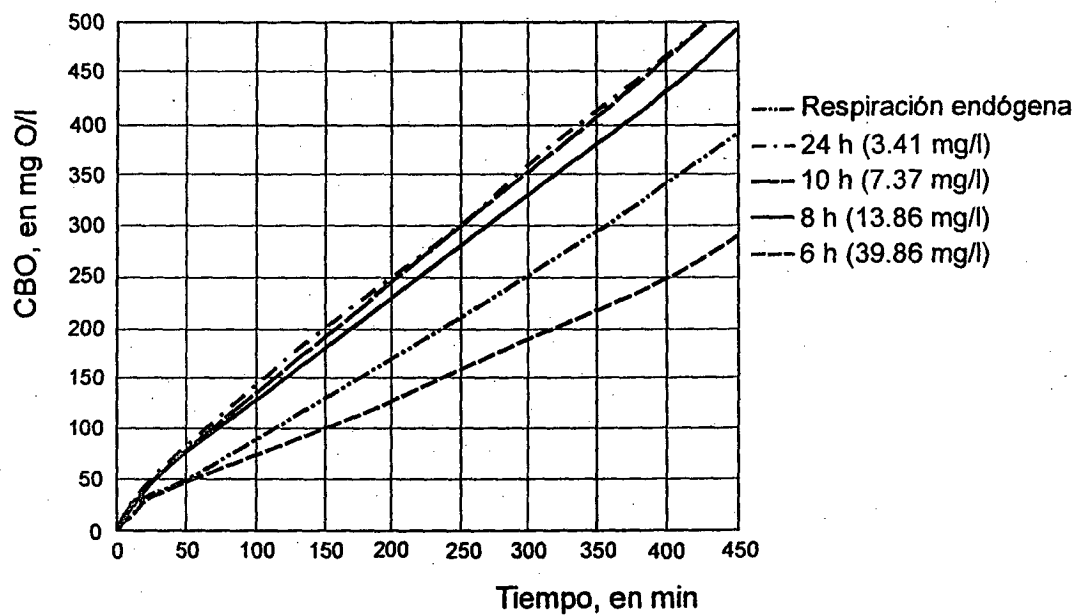


Fig 5.9 Respiración total del *Piquerol* en una solución amortiguadora de fosfatos

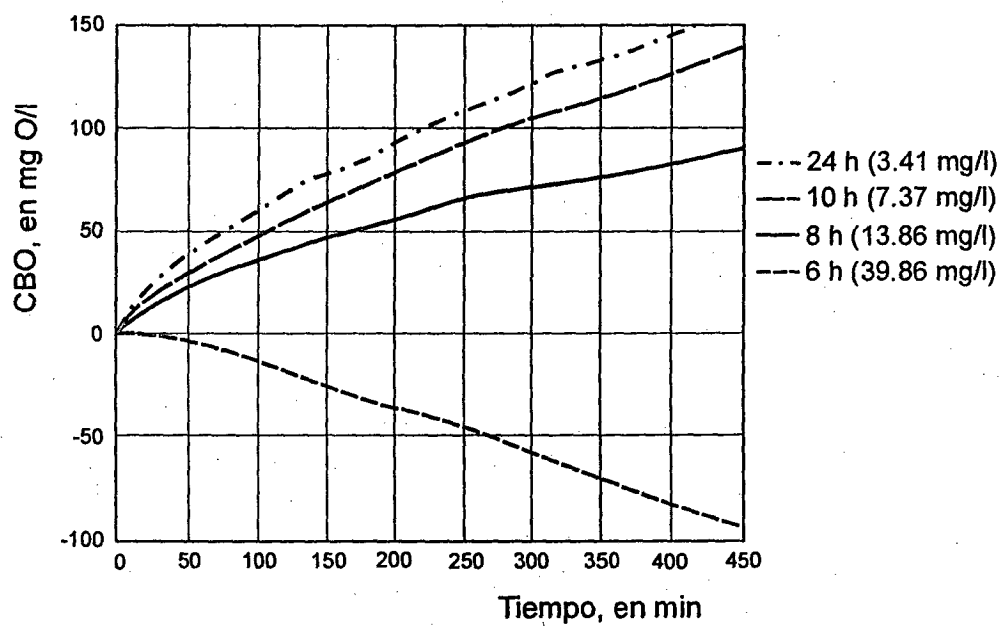


Fig 5.10 Respiración neta del *Piquerol*

Las figs 5.11 y 5.12 muestran las curvas de respiración combinada de glucosa en presencia del Piquerol. Se puede observar que, a pesar de que la mayor concentración del Piquerol presenta la mayor inhibición, todas las curvas presentan valores superiores a los de la respiración endógena. El comportamiento del Piquerol en presencia de glucosa es similar al del Bayluscid. Al aumentar la concentración del Piquerol, aumentan los efectos inhibitorios sobre la biopelícula.

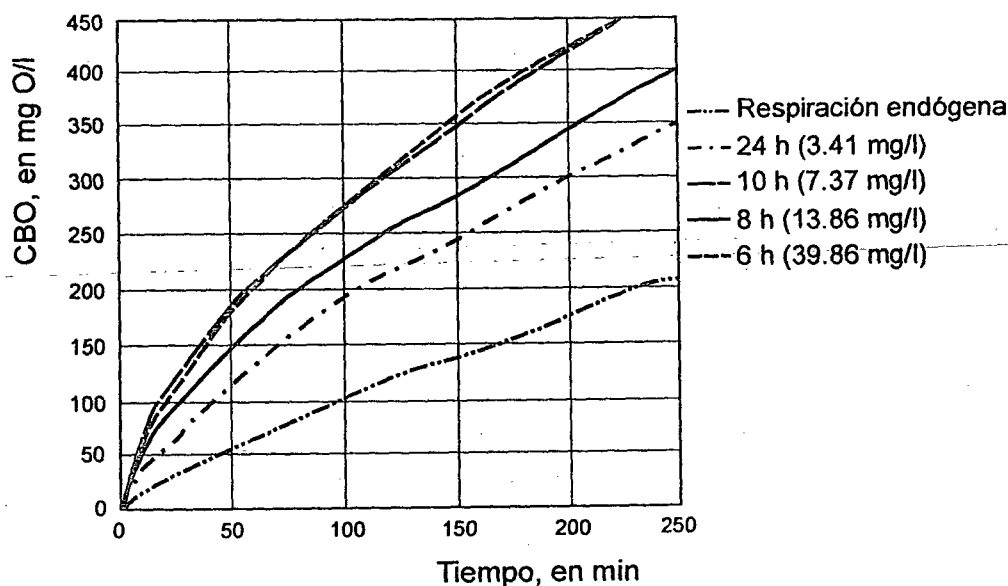


Fig 5.11 Respiración combinada del Piquerol con glucosa

En la fig 5.12 se observa que el comportamiento de las curvas con las concentraciones más bajas del Piquerol es similar entre ellas, aunque los valores de respiración de la menor concentración son ligeramente superiores.

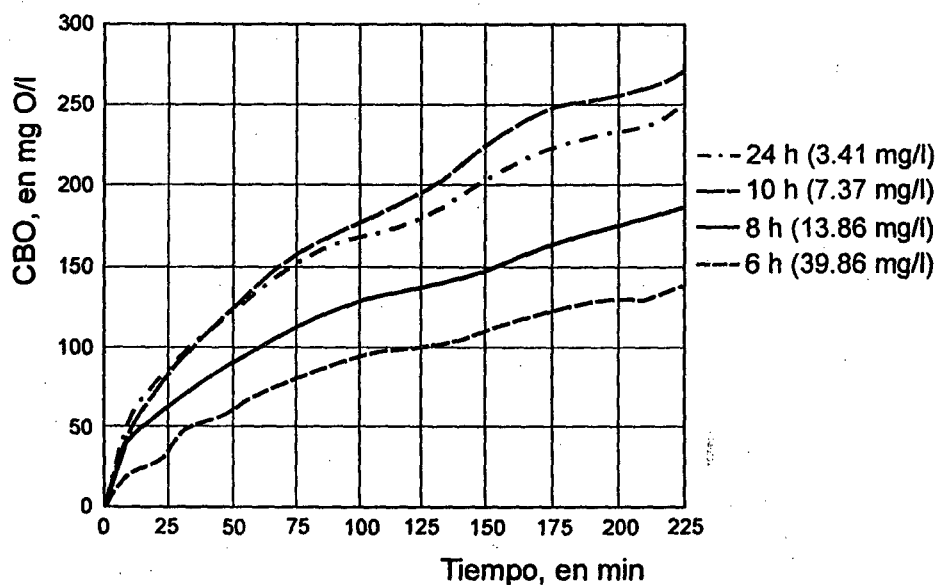


Fig 5.12 Respiración neta del Piquerol en combinación con glucosa

5.2.3 Comentarios generales

Bajo condiciones experimentales similares y utilizando concentraciones equivalentes (en horas), ambos molusquicidas actúan sobre la biopelícula de forma similar. La cantidad de oxígeno consumida por los microorganismos de la biopelícula es mayor con las menores concentraciones de molusquicidas en ausencia de otra fuente de carbono (comparar figs 5.4 y 5.10). Las curvas de respiración combinada de los tóxicos con glucosa tienen todos valores superiores a los de la respiración endógena y presentan un comportamiento similar con los dos tóxicos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A continuación, se presentan las conclusiones más relevantes de este estudio y se hacen recomendaciones sobre la utilización de molusquicidas.

1. En los sistemas para tratamiento de aguas residuales que utilizan película biológica, como el biodisco, existen condiciones adecuadas para la propagación de caracoles dulceacuícolas, generalmente de las familias *Lymnaeidae* y *Physidae*. Su número tiende a aumentar en las partes donde la biopelícula es más delgada.
2. El Bayluscid es más tóxico que el Piquerol en caracoles ya que se requieren concentraciones menores para lograr efectos letales similares.
3. Al entrar en contacto con los caracoles, la toxicidad de los molusquicidas disminuye después de 8 horas para el Bayluscid y de 10 horas para el Piquerol. La causa no pudo ser detectada y se proponen dos alternativas: degradación del compuesto y adsorción del mismo en tejidos sin sufrir cambios bioquímicos.
4. Los caracoles que sobreviven 24 horas de exposición a las concentraciones más bajas de los tóxicos permanecen en un estado de perturbación identificado como efecto subletal.
5. Tanto el Bayluscid como el Piquerol son biodegradables por los microorganismos que forman la biopelícula. Debido a que las curvas de consumo de oxígeno del Piquerol tienen valores superiores (para concentraciones equivalentes en horas de exposición) a los del Bayluscid, se concluye que el Piquerol es más fácilmente degradado que el Bayluscid para los mismos tiempos de exposición.

6. La magnitud de los efectos inhibidores de los molusquicidas estudiados sobre las biopelículas, a las concentraciones recomendadas, es proporcional a su concentración y no se detecta un efecto severo sobre el metabolismo de los microorganismos que forman la biopelícula.
7. De los resultados de los bioensayos y de respirometría se concluye que para controlar la población de caracoles se pueden utilizar ambos molusquicidas porque actúan eficientemente. Su efecto es inmediato y su toxicidad decrece 24 horas después de aplicado el producto.

Recomendaciones sobre la aplicación de los molusquicidas

Debido a que durante los experimentos de respirometría se observó que la presencia de aguas residuales potencia el efecto tóxico de los molusquicidas sobre la biopelícula, se recomienda que, antes de la aplicación de los molusquicidas, se suspenda la alimentación de aguas residuales para permitir que los microorganismos degraden completamente el material orgánico presente en el agua que se queda en el tanque. En el caso de biodiscos se recomienda aplicar la cantidad necesaria directamente en el tanque de la etapa infestada, sin suspender el giro del aparato, para alcanzar la concentración seleccionada. La alimentación de aguas residuales se podrá reanudar al concluirse el tiempo de exposición deseado.

El tratamiento deberá efectuarse de acuerdo con la especie o género de que se trate. Debido a que se desconoce el efecto que causan los molusquicidas sobre los huevecillos, es conveniente hacer una segunda aplicación después de que transcurra el tiempo estimado de nacimiento de los caracoles que se encontraban en estado de larva al realizar la primera aplicación. Se recomienda hacer aplicaciones periódicas en intervalos de tiempo inferiores al que requieren los caracoles para llegar a su edad de reproducción. También se sugieren aplicaciones periódicas ya que los caracoles son transportados por el agua residual permitiendo la colonización periódica del sistema.

Deberá constatarse que la población decrece haciendo una estimación aproximada del tamaño de la misma inmediatamente antes y después de aplicado el producto y posterior a tres meses, tiempo estimado para que una población se recupere.

Es importante efectuar determinaciones analíticas del agua a la entrada y salida del sistema antes y después de la aplicación de los molusquicidas para asegurar que se obtienen resultados benéficos con la aplicación. Puede darse el caso de que la cantidad de caracoles presentes no representen un problema operacional del sistema de tratamiento o que los molusquicidas dañen las biopelículas.

BIBLIOGRAFÍA

Andrewartha, H C (1973), *Introducción al estudio de las poblaciones animales*, Alhambra, España

Andrews, P, Thyssen, J y Lorket, D (1986), "The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide", en *The toxicology of molluscicides*, Webbe G (ed), Pergamon Press, Inglaterra

APHA, AWWA y WPCF (1985), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 16ª ed American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation, Washington, EUA

Aragua, C L y Thomas, J D (1983), "The predatory behavior of *Marisa cornuarietis* on eggs and neonates of *Biomphalaria glabrata*, the snails host of *Schistosoma mansoni*", *Malacología*, 24 (1-2): 198-210, EUA

Autotrol Corporation (1978), *Design manual wastewater treatment systems*, Autotrol Corporation, Milwaukee, EUA

Barnes, R D (1985), *Zoología de los invertebrados*, Ed Interamericana, México

Bayluscid (1970), "Bayer 73 preparado para el control de caracoles acuáticos", informe técnico, Rep Fed de Alemania

Burch, J B (1984), "Freshwater snails (*mollusca: gastropoda*) of North America", Environmental Protection Agency, EUA

Burch, B J y Cruz, R A (1987), "Clave genérica para la identificación de gastrópodos de agua dulce en México", *Instituto de Biología*, UNAM, México

Calaw, P (1978), "The evolution of life-cycle strategies in fresh-water, Gastropodes", *Malacología* 17 (2): 351-364, EUA

Camplitt, P V (1970), "Comparative ecology of the snails *Physa gyrina* and *Physa integra* (Bassommatophora: Physidae)", *Malacología* 10 (1): 131-151, EUA

Cruz, R A, Chavarrin, C, Arias, C M, Taboada, J y Jiménez, M (1989), "Actividad molusquicida del Piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados", *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (1): 35-40, Brasil

Feachman, R B y Garelick, D (1983), "Schistosoma and Schistosomiasis", en *Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management*, John Wiley and Sons: 443-455, EUA

Finney, D J (1971), *Probit analysis*, Cambrigde University, Inglaterra

Finney, D J (1978), *Statistical method in biological assay*, 3a ed, Charles Griffin, Inglaterra

Franco, J L (1985), *Manual de ecología*, Trillas, México

González Martínez, S, (1982), "Planta para tratamiento de aguas de desecho de la Ciudad Universitaria descripción del estado actual", informe interno (proy 2326), Instituto de Ingeniería, UNAM, México

Higgins, T E (1948), "Sewage Works", 19: 143, Inglaterra

Ingram, M N, Bridge, C W y Hagerty, L T (1958), "Snails associated with sewage treatment installations", *Sewage and Industrial Wastes*, 30 (6): 821-825, EUA

- Iwai, S, Oshino, Y y Tsukada, T (1989), "Design and operation of small wastewater treatment plants by the microbial film process", en *Small wastewater treatment plants*, Odegaard H (ed) Tapir Publishers: 151-157, Noruega
- Learner, M A (1975), "Crustacea and Mollusca", en *Ecological aspects of used-water treatment*, Curds, C R y Hawkes, H A (ed), vol 1, Academic Press: 393-398, Inglaterra
- Lohmeyer, G T (1955), Snails in the trickling filter, *Sewage and Industrial Wastes*, 27 (3): 337-338, EUA
- Lohmeyer, G T (1957), "Trickling filters and operation tips", *Sewage and Industrial Wastes*, 29 (1): 89-98, EUA
- Malek, E A (1977), *Medical and economic malacology*, Hafner, EUA
- Margalef, R (1974), *Ecología*, Omega, Barcelona
- Margalef, R (1983), *Limnología*, Omega, Barcelona
- Mendoza, R M (1988), "Interferencia Bayesiana sobre cocientes lineales en un modelo de regresión lineal múltiple", tesis de doctorado, Fac de Ciencias, UNAM, México
- Metcalf & Eddy (1985), *Ingeniería sanitaria: tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales*, Labor, México
- Norouzian, M (1983), "A performance evaluation and kinetics determination of an RBC system operating at the CU wastewater treatment plant", informe interno (proy 3306), *Instituto de Ingeniería*, UNAM, México
- Ochoa, A R (1983), "Evaluación del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria", tesis de maestría, DEPFI, UNAM, México
- Odum, P E (1984), *Ecología*, Interamericana, México

Oga, T, Suthersan, S y Ganczarczyk, J (1991), "Some properties of aerobic biofilm", *Enviromental Technology*, 12: 431-440, EUA

Painter, H A (1983), "Metabolism and physiology of aerobic bacteria and fungi", en *Ecological aspects of used-water treatment*, Curds, C R y Hawkes, H A (ed), vol 2 Academic Press: 11-75, Inglaterra

Pointier (1990), Comunicación personal

Ramírez, C (1988), "Nitrificación y destrucción de la alcalinidad en una unidad de biodiscos estructuralmente modificada y su efecto sobre el crecimiento de algas en el efluente", tesis de maestría, DEPFI, UNAM, México

Southwood, T R (1978), *Ecological methods*, Chapman and Hall, Inglaterra

Volskay, T V y Leslie, G (1990), "Respiration inhibition kinetic analysis", *Water Research*, 24 (7): 863-874, Inglaterra

Webbe, A C (1985), "Laboratory and field testing of Bayluscide (Bayer 73)", Rep Fed de Alemania

Winkler, M (1986), *Tratamiento biológico de aguas de desecho*, Limusa, México

World Health Organization (1965), "Molluscicidae screening and evaluation", *Bull Wld Hlth*, 33: 567-581, Suiza

World Health Organization (1983), "Report of the scientific working group on plant molluscicidae & guidelines for evaluation of plant molluscicidae", TDR/SCH-SWG (4)/83.3, Suiza

World Health Organization (1988), "Data Sheet on Pesticides", 63, *Niclosamide*, WHO/UBC/OS/ 88.63, Suiza

APÉNDICE A PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS PROBIT Y DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El siguiente es un ejemplo del procedimiento que se llevó a cabo para obtener las LC50 a distintos tiempos de exposición. Los datos que se presentan corresponden a uno de los experimentos con Bayluscid EC250 a las 8 horas de exposición.

Dosis	Log de las dosis	Número de caracoles de prueba	Número de caracoles muertos	Porcentaje de caracoles muertos	Probit empírico	Probit esperado				
(mg/l)	x	n	r	p(100r/n)		$Y=a+b(x)$	nw	y	nwx	nwy
1.0	0	10	9	90	6.28	6.1	4.07	6.02	0.00	24.50
0.60	-0.22	10	8	80	5.84	5.9	4.7	5.68	-1.05	26.69
0.50	-0.30	10	8	80	5.84	5.8	5.0	5.78	-1.50	28.90
0.40	-0.40	10	8	80	5.84	5.7	5.3	5.78	-2.12	30.63
0.10	-1.0	10	5	50	5.00	5.1	6.3	5.00	-6.30	31.43
0.05	-1.3	10	4	40	4.75	4.9	6.3	4.75	-8.19	29.92
0.01	-2.0	10	3	30	4.48	4.2	5.0	4.50	-10.0	22.50
TOTAL							36.67		-29.14	94.59

El probit empírico se obtiene de una tabla con valores de transformación de porcentajes a unidades probit.

El probit esperado se obtiene de un análisis de regresión de los datos de porcentaje de mortalidad (columna p) y logaritmo de la concentración (columna x), con lo cual se obtienen valores para a = ordenada al origen y para b = pendiente. En la ecuación de la recta $Y = a + b(x)$ el probit esperado es = $6.11 + 0.92(0)$; (-0.22) ; (-0.30) y (-2.0) .

El valor de nw se obtiene de una tabla que asigna un coeficiente de porcentaje natural de respuesta para cada valor de Y o probit esperado. El valor de y se obtiene de tablas que relacionan los probits esperados y el porcentaje de respuesta.

Se tiene entonces que

$$\Sigma nw = S_{nw} = 36.67$$

$$\Sigma nwx = S_{nwx} = -29.14$$

$$\Sigma nwy = S_{nwy} = 94.59$$

$$x = S_{nwx}/S_{nw} = -29.14 / 36.67 = -0.7947$$

$$y = S_{nwy}/S_{nw} = 94.59/36.67 = 2.5806$$

$$S_{nwx_a}^2 = S_{nwx2}/S_{nw} = (-29.14)^2/36.67 = 23.1626$$

$$Snwx_b = nwx(x) + = (0 \cdot 0) + (-1.034 \cdot -0.22) + (-1.50 \cdot -0.30) \dots + (-10 \cdot -2.0) = 38.472$$

$$Snwxy_a = y(nwx) + = (6.02 \cdot 0) + (5.68 \cdot -1.034) \dots + (4.50 \cdot -10) = -142.33$$

$$Snwxy_b^2 = Snwx(Snwx^2)/Snw = -29.14(194.59)/36.67 = -154.655$$

$$Snwy_a = nwy(y) + = (24.501 \cdot 6.02) + (26.69 \cdot 5.68) + \dots (22.50 \cdot 4.50) = 1043.50$$

$$Snwy_b^2 = Snwy^2/Snw = (194.59)^2/36.67 = 1032.62$$

$$Snwx^2 = Snwx_a^2 - Snwx_b = 38.4724 - 23.1626 = 15.3098 = S_{xx}$$

$$Snwxy = Snwxy_a - Snwxy_b = -142.136 - 154.655 = 12.5193 = S_{xy}$$

$$Snwy^2 = Snwy_a - Snwy_b^2 = 1043.50 - 1032.62 = 10.873 = S_{yy}$$

De las ecuaciones propuestas por Finney (1971 y 1978)

$$b_0 \beta = S_{xy}/S_{xx} = 12.519/15.309 = 0.8177$$

$$a_0 Y = y - bx = Y = 5.3066 - (0.8177)(-0.7947) = 4.6567$$

$$Y = \tilde{O} + \beta x = 4.6567 + 0.8177x$$

$$X^2 = S_{yy} - S_{xy}^2/S_{xx} = 10.873 - (12.5193)^2/15.3098 = 0.636$$

Consultando la tabla de X^2 , para una $X^2_{0.05}$ y 5 grados de libertad = 11.1 mayor que 0.639.

Por tanto, la relación lineal probit es un resultado satisfactorio del experimento. Puede continuarse y se obtiene la varianza y la LC50 del modo siguiente

$$\tilde{O}(\beta) = 1/Snw(x - x)^2 = 0.6386$$

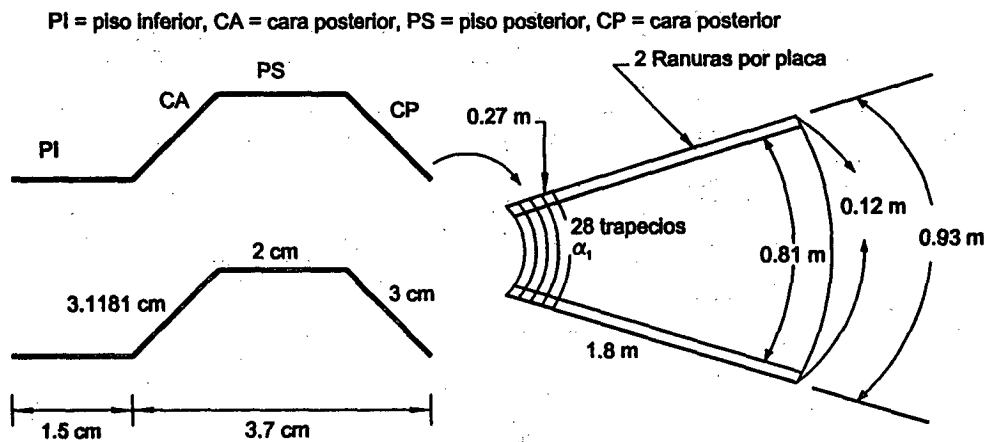
Para obtener LC50

$$m = x + (5 - y/b) = -0.7947 + (5 - 5.306/0.817) = -1.169 \text{ antilog} = 0.067 \text{ mg/l, la cual es la concentración letal media para 8 horas de exposición.}$$

APÉNDICE B ESTIMACIÓN DEL ÁREA DEL BIODISCO QUE OCUPAN LOS CARACOLES

Cada disco del biodisco está formado por 24 placas cuyas corrugaciones tienen forma de trapecio, cada una de las cuales tiene las siguientes medidas:

PI = piso inferior, CA = cara posterior, PS = piso posterior, CP = cara posterior.



$$\alpha t = 12\alpha_1 = 309.36972^\circ$$

$$\text{piso inferior} = \text{piso superior} = \pi \cdot \alpha \cdot t^\circ / 180^\circ (r_1^2 - r_2^2)$$

$$\text{Cara anterior} = \text{cara posterior} = 0.031181 \alpha^\circ t \cdot \pi / (r_1 + r_2) 360^\circ$$

$$\alpha_1 = 0.81(180^\circ) / (1.8) = 25.783^\circ$$

Área de ranuras (2 ranuras por placa, 6 cm de base triangular, 12 placas)

$$0.06\text{m} \cdot 2 \cdot 1.60/2 (\text{radio de ranura}) \cdot 12 = 1.152 \text{ m}$$

(1.60 se obtiene de $1.80 \cdot 0.20 \text{ m}$).

23.1648 m² superficie total de la última placa del biodisco

$$23.1648 \text{ m}^2 / 12 \text{ placas de muestreo} = 1.9304 \text{ m}^2 \text{ cada cuadrante de muestreo}$$