



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA CAPACIDAD
DEPREDADORA DE *Paramecium multimicronucleatum*
Y *Rotaria rotatoria* SOBRE POBLACIONES DE
ENTEROBACTERIAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

CLAUDIA ANTARES SILVA REYES

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

México, D. F.

Junio, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; al CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Esta tesis contó con el apoyo para la compra de reactivos y materiales, otorgado en parte por los proyectos DGAPA/PAPIME claves: EN-213104 "Desarrollo, montaje y validación de prácticas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología ambiental"; PE 205706 "Desarrollo de prácticas avanzadas para la enseñanza de la microbiología ambiental" y del proyecto DGAPA/PAPIIT clave: IN215006-3 "Determinación de la capacidad desinfectante de aguas residuales domésticas usando agregados minerales naturales y artificiales conteniendo plata", así como de la FQ- UNAM a través del PAIP 6190-14 (VMLP), durante los años 2005, 2006 y 2007.

A los miembros de mi Comité Tutorial conformado por el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello como director de la tesis por guiarme y apoyarme con paciencia y comprensión, la Dra. Nandini Sarma y La Dra. María Antonieta Aladro Lubel, que me ayudaron con sus valiosos conocimientos para la realización de esta tesis.

RECONOCIMIENTOS

A las personas del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, lugar donde se realizó la presente tesis, que contribuyeron con su apoyo para el desarrollo de este trabajo, especialmente a las maestras Guadalupe Tsuzuki y Patricia Castro por sus valiosos consejos.

DEDICATORIA

Dedicada con todo mi cariño a mis hijas Brenda Itzel y Amalinalli y a mi esposo Héctor Ramírez porque son mi principal motivo para superarme.

A mis padres María de Jesús Reyes y Agustín Silva por su apoyo incondicional para que estudiara y saliera adelante, especialmente a mi madre.

A mis hermanos Agustín y Adán que aún estando lejos siempre cuento con ellos., a Ángela y Renato que siempre cuento con su apoyo.

ÍNDICE	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	3
1.1 Introducción	3
1.2 Hipótesis	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Estrategia de trabajo	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Problemática de la desinfección del agua	7
2.2. Desinfección del agua	9
2.3. Métodos de desinfección	9
2.3.1. Agentes químicos	9
2.3.2. Agentes físicos	10
2.3.3. Medios mecánicos	10
2.3.4. Agentes biológicos	11
2.3.5. Depredación y respuesta funcional	12
2.4. Microorganismos que se eliminan con la desinfección	13
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Experimentación preliminar	16
3.1.1. Estandarización del inóculo	16
3.1.2. Aislamiento y cultivo de <i>Paramecium multimicronucleatum</i> y <i>Rotaria rotatoria</i>	18
3.2. Experimentación	18

3.2.1. Determinación de las dimensiones de <i>Paramecium multimicronucleatum</i> y <i>Rotaria rotatoria</i>	18
3.2.2. Evaluación de las tasas de consumo de <i>Paramecium multimicronucleatum</i> y <i>Rotaria rotatoria</i>	19
3.2.3. Evaluación del índice de selectividad	21
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Determinación del tamaño, volumen y peso de <i>Paramecium multimicronucleatum</i> y <i>Rotaria rotatoria</i>	23
4.2. Tasas de consumo	25
4.3. Índice de selectividad	37
4.4. Análisis estadístico	39
5.- CONCLUSIONES	41
ANEXOS	42
ANEXO A : Generalidades de las enterobacterias	43
ANEXO B : Generalidades de <i>Paramecium</i>	46
ANEXO C : Generalidades de <i>Rotaria rotatoria</i>	51
LITERATURA CITADA	57

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Página

TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de eliminación de bacterias patógenas de los diferentes procesos físicos	11
Tabla 2. Incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias en México	15
Tabla 3. Medición de las dimensiones promedio de <i>P.multimicronucleatum</i> y <i>R. rotatoria</i>	25
Tabla 4. Tasas de consumo promedio obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> , con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones, (desviaciones estándar promedio de 4 réplicas).	26
Tabla 5. Tasas de consumo de <i>R. rotatoria</i> , con tres especies de enterobacterias a cinco diferentes concentraciones (Desviaciones estándar promedio de 4 réplicas)	27
Tabla 6. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^3 bac/mL.	29
Tabla 7. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^5 bac/mL.	30
Tabla 8. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^7 bac/mL.	31
Tabla 9. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^8 bac/mL.	32
Tabla 10. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^9 bac/mL.	33
Tabla 11. Consumo de presas de un cultivo mixto para el cálculo de los índices de selectividad (promedio de 4 réplicas).	37
Tabla 12. Índices de selectividad de <i>P. multimicronucleatum</i> y <i>R. rotatoria</i> con respecto a tres tipos de presas (<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> y <i>S. sonnei</i>).	38
Tabla 13. Pruebas estadísticas para las tasas de consumo, con dos depredadores y tres diferentes tipos de presas.	40
Tabla 14. Análisis de varianza	40

FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de las actividades llevadas a cabo en la experimentación	6
Figura 2. Mecanismo de formación del cloroformo	8
Figura 3. Los tres tipos de respuesta funcional	13
Figura 4. Esquema general de la estandarización de los inóculos de las especies de enterobacterias seleccionadas.	17
Figura 5. Esquema general para la obtención de la tasa de consumo	20
Figura 6. Esquema general para la obtención del índice de selectividad	21
Figura 7. Gráfica de las tasas de consumo promedio obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> , con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones.	26
Figura 8. Gráfica de las tasas de consumo promedio obtenidas de <i>R. rotatoria</i> , con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones.	27
Figura 9. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real y <i>R. rotatoria</i> masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^3 bac/mL.	29
Figura 10. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real y <i>R. rotatoria</i> masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^5 bac/mL.	30
Figura 11. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real y <i>R. rotatoria</i> masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^7 bac/mL.	31
Figura 12. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real y <i>R. rotatoria</i> masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^8 bac/mL.	32
Figura 13. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de <i>P. multimicronucleatum</i> vs. <i>R. rotatoria</i> masa real y <i>R. rotatoria</i> masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^9 bac/mL.	33
Figura 14. Curvas de respuesta funcional tipo I de <i>P. multimicronucleatum</i> con <i>E. coli</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhi</i>	35
Figura 15. Curvas de respuesta funcional tipo I de <i>R. rotatoria</i> con <i>E. coli</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhi</i>	36
Figura 16. Índices de selectividad de <i>P. multimicronucleatum</i> y <i>R. rotatoria</i>	39

Figura 17. Microfotografía y esquema del <i>Paramecium multimicronucleatum</i> , utilizando contraste de fases. Se muestra la posición fija de las vacuolas contráctiles en diástole, y la formación de la vacuola alimenticia	49
Figura 18. Microfotografías de <i>P. multimicronucleatum</i> 40× en contraste de fases.	50
Figura 19. Microfotografías de <i>P. multimicronucleatum</i> a 40×, donde se observa la presencia de varios micronúcleos a un costado del macronúcleo, con una tinción de Carbonato de plata	50
Figura 20. Microfotografía de <i>P. multimicronucleatum</i> a 40×. Donde se observa el citostoma y el macronúcleo (tinción de carbonato de plata).	50
Figura 21. Microfotografía de <i>P. multimicronucleatum</i> a 40×. Se observa el macronúcleo (tinción de hematoxilina de Harris).	50
Figura 22. Esquema del rotífero <i>R. rotatoria</i> . Se muestra la estructura sistémica	55
Figura 23. Microfotografía de <i>R. rotatoria</i> 10× campo claro donde se puede observar claramente la corona, el mástax y el estómago.	55
Figura 24. Microfotografía de <i>R. rotatoria</i> 40× campo claro. Se observa claramente los espolones y los dedos con los que se fija a la materia orgánica.	56

RESUMEN

La cloración es el método de desinfección de aguas residuales domésticas más utilizado en todo el mundo, no obstante forma compuestos indeseables, que pueden ser cancerígenos y mutagénicos para los seres humanos. Otras alternativas son la utilización de los rayos UV y el ozono que presentan una alta eficiencia de desinfección pero un alto costo de implementación. Una posible alternativa para la eliminación de bacterias patógenas del agua, es el uso de agentes biológicos como el ciliado *Paramecium multimicronucleatum* y del rotífero *Rotaria rotatoria*, los cuales son depredadores naturales de bacterias tanto en ambientes naturales como en sistemas de tratamiento de aguas residuales. La exitosa aplicación de estas especies redundaría en un menor costo, fácil aplicación y un menor impacto negativo hacia el ambiente y la salud pública.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y comparar en función de su volumen corporal, la tasa de consumo y el índice de selectividad sobre poblaciones de enterobacterias entre *R. rotatoria* y *P. multimicronucleatum*.

En este sentido primero se llevó a cabo el aislamiento y el cultivo de los microorganismos en medios adecuados para su conservación y multiplicación, estos fueron aislados de la planta de tratamiento a base de lodos activados, de ciudad universitaria. El cultivo stock de cada microorganismo se mantuvo en infusión de lechuga a 28°C en recipientes de 100 mL, se realizaron transferencias a un nuevo medio de cultivo cada tercer día en el caso de *P. multimicronucleatum* y cada 7 días para *R. rotatoria* debido a la diferencia en el tiempo de generación.

Después se midió la longitud y anchura para obtener el volumen y el peso tanto de *R. rotatoria* como de *P. multimicronucleatum*; con estos datos se calculó el peso equivalente por especie, permitiendo así evaluar y comparar sus tasas de consumo cuando son alimentados, por separado con *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei* a 5 diferentes concentraciones iniciales de cada bacteria (1.00×10^3 , 1.00×10^5 , 1.00×10^7 , 1.00×10^8 y 1.00×10^9 bac/mL). A partir del procesamiento de los datos obtenidos se procedió a determinar el índice de selectividad alimentaria de *R. rotatoria* y *P. multimicronucleatum*.

Los resultados mostraron que *R. rotatoria* tiene un volumen corporal 30% superior al de *P. multimicronucleatum*. En todas las combinaciones realizadas, las tasas de consumo fueron siempre mayores para *R. rotatoria* que para *P. multimicronucleatum*. La más alta fue la de *E. coli*, con 5.13×10^7 bac/mL alcanzada cuando la concentración inicial fue de 1.00×10^9 bac/mL. Las mayores diferencias en las tasas de consumo, con base en los pesos equivalentes, se observaron con *S. typhi* siendo de hasta 13.9 y 28.4 veces mayores en el caso de las concentraciones, de 1.00×10^5 y 1.00×10^7 bac/mL, respectivamente. Lo anterior implica que *R. rotatoria* es más eficiente en la desinfección biológica de las aguas residuales. De acuerdo a los índices de selectividad, se concluye que *P. multimicronucleatum*, tiene predilección en el consumo de *E. coli* y *S. sonnei*, evitando el consumo de *S. typhi*; mientras que *R. rotatoria* no tiene preferencia por ninguna de las tres especies de enterobacterias estudiadas.

ABSTRACT

The chlorination is the method of disinfection domestic wastewater most widely used throughout the world, however undesirable form compounds, which can be mutagenic and carcinogenic to humans. Other alternatives are using UV and ozone exhibiting high efficiency disinfection but a high cost of implementation. One possible alternative for eliminating pathogenic bacteria from the water, is the use of biological agents such as ciliado *Paramecium multimicronucleatum* and rotifer *Rotaria rotatoria*, which are natural predators of bacteria in natural environments and systems in wastewater treatment. The successful implementation of these species would be in a lower cost, easy to apply and less negative impact to the environment and public health.

The purpose of this study was to evaluate and compare in terms of body volume, the consumption rate and the rate of selectivity on populations Enterobacteriaceae between *R. rotatoria* and *P. multimicronucleatum*.

Here are first carried out the isolation and cultivation of microorganisms in appropriate ways to preserve and multiply, these were isolated from the treatment plant-based activated sludge, university town. The growing stock of each microorganism remained infusion of lettuce at 28 ° C in 100 mL containers were transferred to a new culture medium every third day in the case of *P. multimicronucleatum* and every 7 days for *R. rotatoria* due to the difference in generation time.

Then was measured the length and width to get the volume and weight of both *R. rotatoria* as *P. multimicronucleatum*; with these data was calculated by weight equivalent species, thus allowing assess and compare their rates of consumption when they are fed, separately with *E. coli*, *Salmonella typhi* and *Shigella sonnei* to 5 different initial concentrations of each bacterium (1.00×10^3 , 1.00×10^5 , 1.00×10^7 , 1.00×10^8 and 1.00×10^9 bac/mL). After processing the data was obtained to determine the rate of food selectivity *R. rotatoria* and *P. multimicronucleatum*.

The results showed that *R. rotatoria* body has a volume 30% higher than *P. multimicronucleatum*. In all combinations made, consumption rates were always higher for *R. rotatoria* it to *P. multimicronucleatum*. The highest was the *E. coli*, with 5.13×10^7 bac/mL achieved when the initial concentration was 1.00×10^9 bac/mL. The largest differences in consumption rates, based on the equivalent weights were observed with *S. typhi* being up 13.9 and 28.4 times higher in the case of mergers, 1.00×10^5 and 1.00×10^7 bac/mL, respectively. This implies that *R. rotatoria* is more efficient in biological disinfection of wastewater. According to the indices of selectivity, we conclude that *P. multimicronucleatum*, has a predilection consumption *E. coli* and *S. sonnei*, avoiding consumption of *S. typhi*, while *R. rotatoria* has no preference for any of the three species studied Enterobacteriaceae

1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

1.1 Introducción

Uno de los grandes problemas que enfrenta el país es el incremento de la contaminación de los cuerpos de agua naturales, a través de la descarga de aguas residuales domésticas sin tratamiento. Estas son portadoras de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Shigella* que producen graves infecciones intestinales, poniendo en peligro la salud y la vida del ser humano (Bitton, 1994). Los agentes etiológicos de éstas se encuentran en las materias fecales y la orina de los seres humanos infectados (Pelczar, 1977) y, cuando son eliminadas, pueden llegar a algún cuerpo acuático receptor, limitando así su uso como fuente para diferentes actividades.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales como el de lodos activados, filtros percoladores y lagunas de oxidación, logran remover cerca del 90 al 99% de dichos microorganismos (Collado, 1992; Schiller, 1996; IMTA, 1997; Stevik *et al.*, 2004). No obstante el alto porcentaje de remoción logrado, no cumplen con los límites máximos permisibles establecidos en la normatividad nacional mexicana vigente para su descarga y/o reúso que es de 1,000 NMP/100 mL (NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996). Es por ello que los efluentes de aguas residuales tratadas requieren de un paso adicional de desinfección. La cloración es en la actualidad el método de desinfección más efectivo y económicamente factible (Metcalf & Eddy, 1996). Sin embargo, el cloro, por ser una molécula muy reactiva, reacciona con la materia orgánica que se encuentra en las aguas residuales formando compuestos indeseables, tales como los trihalometanos y haloácidos que son agentes cancerígenos y mutagénicos potenciales al acumularse en los seres humanos (Kampioti, 2002).

Otras alternativas para la desinfección de las aguas residuales es la utilización de los rayos UV y ozono los cuales presentan una alta eficiencia de desinfección no obstante su gran desventaja es su alto costo de implementación y la falta de efecto desinfectante remanente (Acher *et al.*, 1997; Lazarova *et al.*, 1998 y Xu *et al.*, 2002). Una alternativa más es la utilización de la plata, que desde tiempos muy antiguos, ha sido una opción empleada para el lavado de ropa, fibras y desinfección del agua, y al igual que el cloro, presenta efecto desinfectante remanente. En la actualidad, la plata o sus compuestos son empleados para la potabilización del agua para consumo humano (Davies y Etris, 1997), sin embargo, su uso en aguas residuales es aún incipiente, aparentemente debido a lo prohibitivo que resultaría su costo de implementación.

En este sentido sigue siendo deseable encontrar métodos de desinfección que sean menos costosos de fácil uso y cuyo impacto negativo hacia el ambiente y la salud pública sea nulo. Una posible alternativa sería la utilización de agentes biológicos como es el caso del ciliado libre nadador *Paramecium multimicronucleatum* y el rotífero *Rotaria rotatoria*, los cuales representan un eslabón muy importante dentro de la cadena o trama alimentaria presente a lo largo del proceso de biodegradación de la materia orgánica existente, tanto en cuerpos de agua natural, como sometida a tratamientos biológicos (Pauli *et al.*, 2001; González, 1999; Matz y Jürgens, 2001). Estos microorganismos son los responsables de disminuir, de manera considerable, la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundaría en la disminución del grado de turbiedad,

debido al efecto depredador (Tellez y Bautista, 1991; Hahn y Höfle, 2001; Mendoza, 2004). Particularmente, los rotíferos tienen una gran capacidad para filtrar grandes cantidades de materia orgánica y bacterias (Sarma *et al.*, 2003) y se ha comprobado que son capaces de ingerir quistes de protozoarios parásitos como *Giardia* y *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2000; Stott *et al.*, 2001; Trout *et al.*, 2002). Por otro lado, los protozoarios ciliados son responsables de la purificación de una considerable proporción de las aguas residuales. Resultados experimentales, a nivel de laboratorio, empleando agua residual doméstica tratada en presencia y en ausencia de ciliados, evidenciaron que cuando los ciliados están presentes existe mayor remoción de contaminantes. Los porcentajes de remoción logrados son superiores en 40% para el material orgánico disuelto (medido como demanda química de oxígeno), 50% en contenido de nitrógeno orgánico y de 70%, tanto en sólidos suspendidos como en bacterias (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

Las aguas residuales domésticas contienen gran cantidad de energía proveniente de toda la materia que ahí se concentra, la cual no puede ser aprovechada mediante métodos convencionales de tratamiento (Sarma y Sarma, 2002). Esta energía podría ser aprovechada por algunos microorganismos como los protozoarios ciliados y los rotíferos (Mazari *et al.*, 2000a). Estos microorganismos forman parte de los microorganismos que se encuentran normalmente en los lodos activados de las plantas depuradoras de aguas residuales (Ríus *et al.*, 1996).

Ríus *et al.*, 1996 estudiaron la importancia de los rotíferos en los procesos de lodos activados, encontrando que la población estaba compuesta principalmente por los géneros *Lacane* y *Rotaria* y que el aumento de estas poblaciones, implica una disminución en la diversidad de las poblaciones de protozoos ciliados.

Se han realizado estudios en donde se estima la fracción activa de protozoarios que consumen bacterias, así como la estimación *in situ* y en laboratorio de la tasa de ingestión de los protistas representantes, mediante el marcado de enterobacterias y *Vibrio cholerae* por fluorescencia (FLB) en sistemas acuáticos naturales (González *et al.*, 1992; González, 1999; Matz y Jürgens, 2001; Martínez *et al.*, 2004; Jiang y Krumins, 2006). Esto no ha sido realizado aun en un sistema artificial de la planta de tratamiento de aguas residuales.

Debido a la propiedad que tiene el *P. multimicronucleatum* y el rotífero *R. rotatoria* como consumidores de bacterias, se ha considerado la posibilidad de utilizarlos para la eliminación de enterobacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. de aguas residuales pretratadas biológicamente, en lugar de la utilización de agentes químicos los cuales como ya se mencionó anteriormente, presentan algunas desventajas.

Es por esto que resulta importante realizar una comparación de la capacidad depredadora de estos microorganismos sobre diferentes especies de enterobacterias, para ello se puede evaluar la tasa de consumo, y estimar si ésta varía con respecto al volumen o biomasa de cada uno de los dos microorganismos consumidores de bacterias; Así mismo determinar si presentan selectividad en cuanto al consumo o eliminación de alguna de las especies de enterobacterias suministradas.

En consecuencia el presente trabajo de tesis, plantea evaluar de manera comparativa, la capacidad depredadora y selectiva de dos microorganismos, como posible alternativa para la eliminación biológica de enterobacterias presentes en aguas residuales domésticas.

1.2. Hipótesis

Debido a su mayor volumen corporal, *Rotaria rotatoria* tiene mayor capacidad depredadora sobre poblaciones de enterobacterias que *Paramecium multimicronucleatum*, así como una menor selectividad en el consumo de enterobacterias.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar y comparar las tasas de consumo y el índice de selectividad por el sustrato, de *Rotaria rotatoria* y *Paramecium multimicronucleatum*, al suministrarles tres diferentes especies de enterobacterias.

Objetivos particulares

- Evaluar y comparar las tasas de consumo de *Rotaria rotatoria* y *Paramecium multimicronucleatum* cuando se les suministran, por separado, diferentes concentraciones de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*.
- Establecer si *Rotaria rotatoria* y *Paramecium multimicronucleatum* presentan o no selectividad con respecto a la depredación específica de alguna de las especies de enterobacterias suministradas.

La estrategia de trabajo se indica en la Fig. 1.

1.4. Estrategia de trabajo

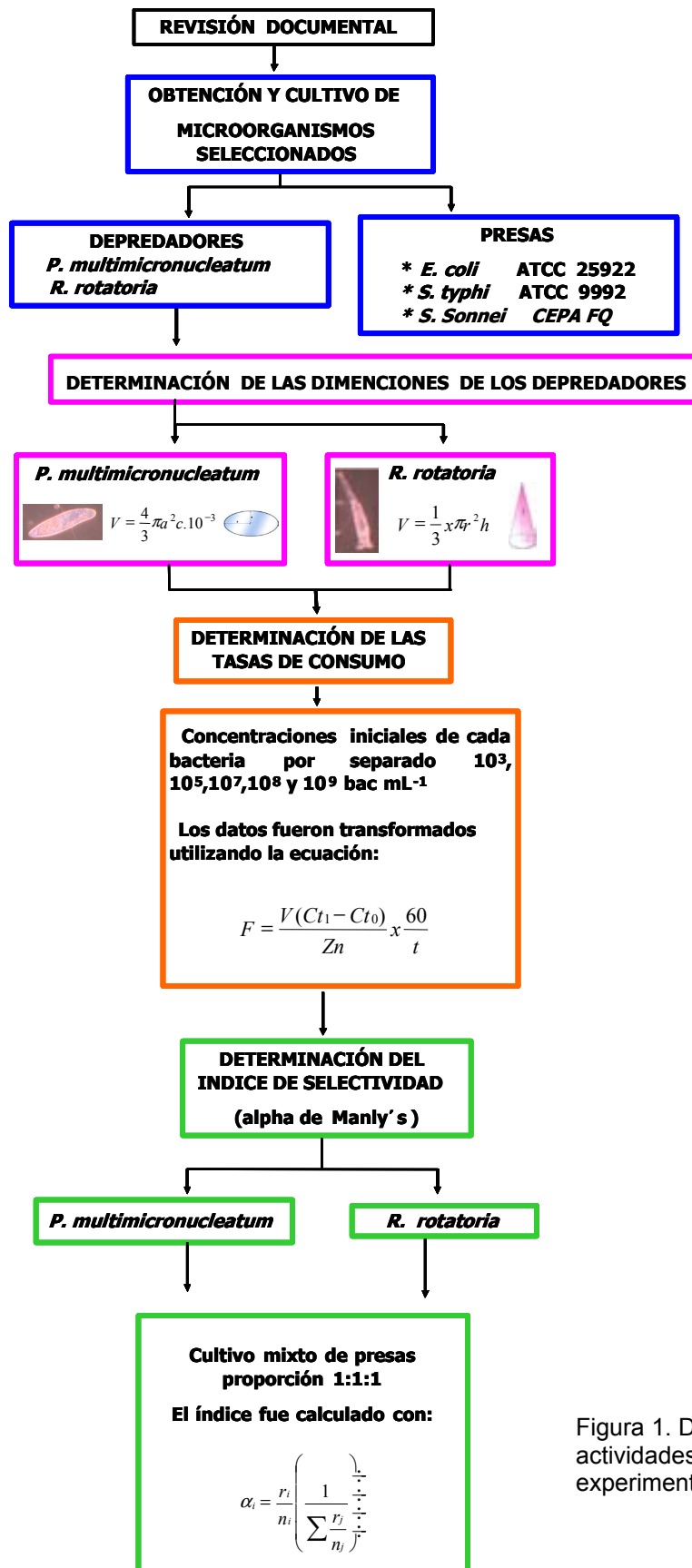


Figura 1. Diagrama de flujo de las actividades llevadas a cabo en la experimentación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Problemática de la desinfección del agua

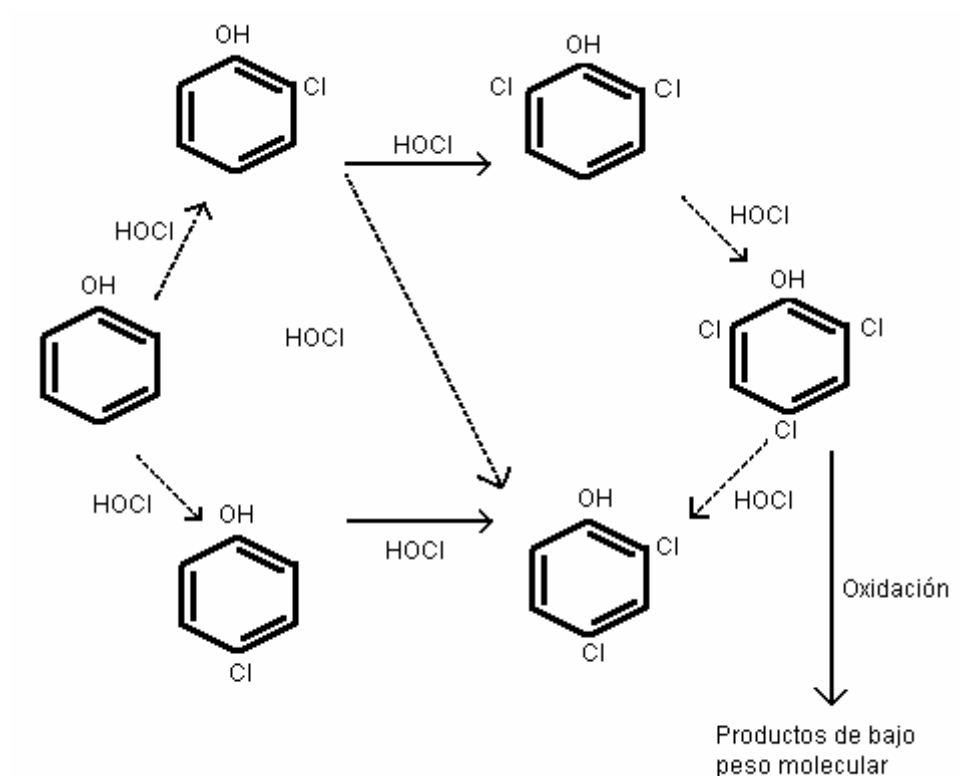
El cloro ha sido el principal desinfectante de los abastecimientos de agua desde hace prácticamente un siglo, se considera el método más efectivo y económicamente factible, su empleo nunca fue discutido y los beneficios derivados de su empleo han sido evidentes, evitando y eliminando las grandes epidemias y brotes de enfermedades hídricas, hasta que en 1974, algunos investigadores como Rook en Holanda y Bellar en Estados Unidos, pusieron en evidencia que el cloro por ser una molécula muy reactiva sufre un número de reacciones químicas con la materia orgánica del agua residual, que deben ser consideradas, ya que éstas tienen entre sus productos compuestos organoclorados indeseables llamados subproductos de cloración (SPC). Los SPC más comunes son los trihalometanos (THMs), los ácidos haloacéticos (HAAs), los haloacetoneitrilos (HANs), la cloropicrina (CHP), las cetonas halogenadas (HKs) y el hidrato de cloro (CH) (Kampioti y Stephanou, 2002; Zhang y Minear, 2002).

La cloración puede ser extensiva, es decir, puede encontrarse la serie de fenoles clorados hasta pentaclorofenol. La actividad de cada anillo depende del tipo de compuesto de origen, cabe anotar el fuerte olor que presentan estos compuestos. Es posible que con una cloración intensiva y a concentraciones más elevadas se produzcan compuestos orgánicos clorados de menor peso molecular como los trihalometanos (Metcalf y Eddy, 1991). También se encuentra la ruptura del anillo aromático en la formación de cloroformo, como se muestra en la Figura 2 (Sechoing *et al.*, 1984).

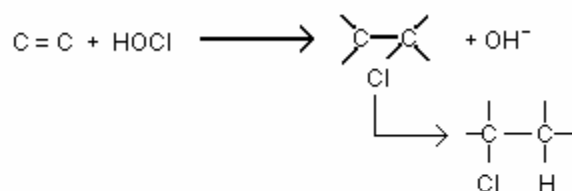
Según. Norwood *et al.*, 1987, éstos no son los únicos mecanismos en la formación de compuestos organoclorados, ya que a menudo se encuentran compuestos que no resultarían de estos mecanismos. Norwood *et al.*; 1987, sugieren que aún falta mucha investigación para poder reconocer todos los procesos dentro de un sistema tan complejo como pueden ser las aguas naturales y residuales. De igual modo, aún cuando se han identificado compuestos derivados de la cloración, hay muchos otros que aún no han podido ser determinados.

El cloroformo que es el THM más importante al acumularse en los seres vivos es un agente cancerígeno y mutagénico potencial para los seres humanos. La mayoría de la actividad mutagénica en el agua para beber clorada ha sido asociada con HANs y especialmente con HAAs (Kampioti y Stephanou, 2002; Aysegul, 2003),

Se han realizado numerosos estudios toxicológicos en donde los resultados muestran que varios de los SPC como bromodiclorometano, bromoformo, cloroformo, ácido dicloroacético y bromato son cancerígenos en animales de laboratorio y compuestos como dibromoclorometano y algunos ácidos haloacéticos, tienen efectos adversos en el sistema reproductivo, en el desarrollo y riesgo de sufrir cáncer en el colon, vejiga y páncreas (USEPA, 1998; King *et al.*, 2000; Villanueva *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2003; Saghir y Schultz, 2005).



Adición a enlaces dobles



Formación de trihalometanos. Se tipifica el mecanismo de la siguiente manera:

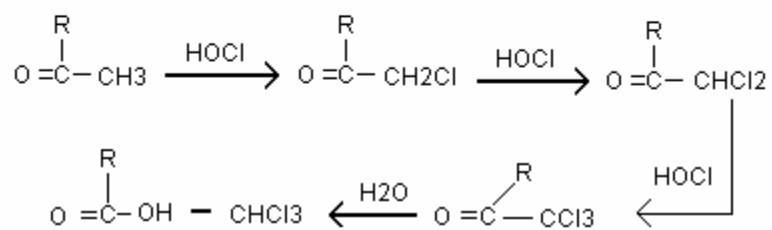


Figura 2. Mecanismo de formación del cloroformo

La evidencia experimental sugiere que la exposición, también ocurre a través de la inhalación y absorción por la piel, durante el baño y la natación en albercas (Villanueva *et al.*, 2007).

Un estudio de los niveles de THMs y HAAs del agua de la zona sur de la ciudad de México, reveló que se encuentran por debajo de los límites permisibles que establece la norma oficial mexicana, pero se observa que al existir materia orgánica aún en baja concentración (de 0.08 a 4.82 mg/L) y reaccionar ésta con el cloro residual se incrementa la formación de compuestos clorados. Los datos del cloro residual obtenidos indican que no existe un control adecuado del proceso de cloración, pues en ocasiones se encontraba por debajo del límite indicado, llevándose a cabo una desinfección insuficiente con el riesgo de crecimiento bacteriano, y en otras ocasiones las concentraciones del cloro residual libre se encontraban por encima del límite permisible (hasta 50 veces más), con los consecuentes riesgos para la salud (Mazari *et al.*, 2000b).

2.2. Desinfección del agua

La desinfección consiste en la inducción de la pérdida estructural selectiva hacia los microorganismos que causan enfermedades. No todos los microorganismos pierden su estructura celular durante el proceso, punto en el que radica la principal diferencia entre la desinfección y la esterilización, proceso que conduce a la destrucción de la totalidad de los microorganismos. En el campo de las aguas residuales, los que ocasionan efectos nocivos en los seres humanos son las bacterias, los virus y los quistes amibianos. Las enfermedades bacterianas típicas transmitidas por el agua son: tífus, cólera, paratífus y la disentería bacilar, mientras que las enfermedades causadas por los virus incluyen, entre otras, la poliomielitis y la hepatitis infecciosa y en el caso de amebas, amibiasis.

Durante el último siglo, el proceso de desinfección ha ganado gran importancia en el tratamiento del agua, lo anterior debido a que ha sido la solución al gran problema de los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por el agua (Droste, 1997).

2.3. Métodos de desinfección

Tradicionalmente, los métodos para la desinfección del agua; se clasifican en químicos, físicos y mecánicos.

2.3.1. Agentes químicos.

Los agentes químicos utilizados para la desinfección de aguas residuales incluyen:

- a) El cloro y sus compuestos;
- b) el bromo;
- c) el yodo;
- d) el ozono;
- e) los metales pesados y compuestos afines;

Los métodos químicos son los más utilizados para la desinfección del agua, entre los que podemos encontrar a los halógenos como el cloro el bromo y el yodo. Todos son desinfectantes muy estables y conservan un efecto remanente, pero el más utilizado es el método de la cloración ya sea con el uso de gas cloro o con compuestos de cloro (hipocloritos) por su capacidad para eliminar microorganismos patógenos y mantener una concentración remanente en el sistema de distribución, así como también su amplia disponibilidad y su costo moderado en la mayoría de las regiones del mundo.

El ozono, actualmente es el más serio competidor del cloro por su eficiencia como desinfectante. En la actualidad, la única opción viable, en lugar de la cloración para la desinfección de los suministros de agua comunales, es la ozonización, la cual se utiliza cada vez más en los sistemas europeos de abastecimiento. Sin embargo, el uso del ozono generalmente no se recomienda para los países en desarrollo, debido a los altos costos de instalación mantenimiento y operación, (Schulz y Okun, 1998). El ozono, además de ser un buen desinfectante, es desodorante y decolorante. Es poco soluble en el agua y es muy volátil. Se mantiene en el agua, sólo algunos minutos; en su aplicación, se pierde aproximadamente cerca de 10% de su producción, al volatilizarse por lo que no deja una concentración residual que permita valorar su presencia después del tratamiento (Bitton, 1994; Droste, 1997).

2.3.2. Agentes físicos

Los desinfectantes físicos que se pueden emplear son la luz y el calor. El agua caliente a la temperatura de ebullición, por ejemplo, destruye las principales bacterias causantes de enfermedades y no formadoras de esporas. El calor se suele emplear con frecuencia en las industrias lácticas y de bebidas, pero su aplicación al agua residual no es factible debido al alto costo que supondría. Sin embargo, la pasteurización del fango es una práctica habitual en toda Europa.

La luz solar también es un buen desinfectante, especialmente la radiación ultravioleta. En la esterilización de pequeñas cantidades de agua, el empleo de lámparas especiales ha resultado exitoso. La eficacia de este proceso depende de la penetración de los rayos en el agua. La geometría de contacto entre la fuente emisora de luz ultravioleta y el agua es de gran importancia debido a que la materia en suspensión, las moléculas orgánicas disueltas y la propia agua, además de los microorganismos, absorberán la radiación. Por lo tanto, la aplicación de la radiación ultravioleta como mecanismo de desinfección no resulta sencilla en sistemas acuosos, especialmente por la presencia de materia particulada.

2.3.3. Medios mecánicos.

Las bacterias también se pueden eliminar, durante el tratamiento del agua residual, empleando medios mecánicos, como son:

La sedimentación natural, es el proceso por el cual se realiza la decantación de materias en suspensión, La decantación natural del material fino, entre ellos, limo y arcillas, ayuda a la remoción de las bacterias, decantando más rápidamente los esporulados y los huevos de helmintos, dependiendo su eficiencia del tiempo de retención en el reservorio (Cáceres, 1990).

La sedimentación con ayuda de coagulantes, en el cual se agregan algunas sustancias al agua, para ayudar a la sedimentación de partículas coloidales, o finamente desmenuzadas que se encuentran en suspensión (Franceschi *et al.*, 2002). Debido a que los microorganismos son partículas coloidales; estos se encuentran sometidos a los mismos procesos de remoción de los demás coloides, por eso este proceso elimina con apreciable grado de eficiencia, la mayoría de las bacterias, protozoos y virus que se encuentran en el agua.

La filtración también es un proceso por el cual el agua pasa a través de sustancias porosas capaces de retener materias en suspensión. Puede remover microorganismos patógenos que se ocultan en partículas de materia orgánica que no pueden ser eliminados eficientemente por desinfectantes químicos. El mecanismo de remoción es una combinación de filtración física, reacciones químicas y transformaciones biológicas. En la tabla 1 se muestra la eficiencia que tiene cada uno de los diferentes procesos físicos para la eliminación de bacterias patógenas (Ausland *et al.*, 2002).

Tabla 1. Porcentaje de eliminación de bacterias patógenas de los diferentes procesos físicos

PROCESOS	ELIMINACION EN %
Tamices de malla gruesa	0 –5
Tamices de malla fina	10-20
Desarenadores	10-25
Sedimentación primaria	25-75
Sedimentación química	40-80
Filtros percoladores	90-95
Lodos activados	90-98
Cloración de agua residual tratada	98-99

2.3.4 Agentes biológicos

Otra alternativa para la eliminación de bacterias patógenas de las aguas residuales, podría ser la utilización de microorganismos depredadores como agentes biológicos. Estas bacterias podrían utilizarse como fuente de alimento para estos microorganismos entre los que podemos encontrar, a los rotíferos y ciliados. Estos microorganismos representan un eslabón muy importante dentro de la cadena o trama alimentaria presente a lo largo del proceso de biodegradación de la materia orgánica existente tanto en cuerpos de agua natural como aquellos sometidos a tratamientos biológicos en plantas de tratamiento (Tellez y Bautista, 1991; Hahn y Höfle, 2001; Mendoza, 2004). Estos microorganismos son los responsables de disminuir de manera considerable la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundaría en la disminución del grado de turbiedad, debido al efecto depredador y de aglomeración que éstos ejercen sobre las bacterias (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

De manera particular, los protozoarios ciliados son responsables de una considerable proporción de la purificación de aguas residuales. Resultados experimentales a nivel de laboratorio, empleando agua residual doméstica, tratada en presencia y en ausencia de ciliados, evidenciaron que cuando los ciliados están presentes existe mayor remoción de contaminantes. Los porcentajes de remoción logrados son superiores en 40% para el material orgánico disuelto (medido como demanda química de oxígeno), 50% en contenido de nitrógeno orgánico y de 70%, tanto en sólidos suspendidos como en bacterias (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

Las aguas negras contienen además de materia orgánica, diversos microorganismos que mantienen la actividad biológica, entre esta gama de microorganismos encontramos a los rotíferos, los cuales son capaces de tolerar gran variedad de condiciones ecológicas y de ayudar a depurar el agua al alimentarse de detritos y microorganismos entre ellos bacterias.

También se sabe que los rotíferos utilizan directamente materia orgánica y materia orgánica disuelta en forma de partículas y a través del consumo de bacterias (Mendoza, 2004). La materia orgánica que se concentra en las aguas residuales, no puede ser aprovechada mediante los métodos convencionales de tratamiento; para ello se puede utilizar a diversos microorganismos, entre ellos a los rotíferos que por su alta tasa de metabolismo pueden utilizar la energía de dichas aguas (Mazari *et al.*, 2000a).

La capacidad de tolerar condiciones de DBO alta y materia orgánica residual varía entre las especies de ciliados y rotíferos, por lo que se han realizado diversos estudios para establecer si el agua proveniente de sistemas de tratamiento de agua residual, como los lodos activados son apropiados para el crecimiento de algunas especies de rotíferos y poder utilizarlos en la depuración de dichas aguas (Aguilera, 2002).

2.3.5 Depredación y Respuesta Funcional

La depredación no es solamente una transferencia de energía entre los seres vivos, sino que constituye una interacción directa y compleja entre dos o más especies, la que come y la que es comida. La abundancia de depredadores puede en ocasiones depender de la abundancia de sus presas. Cada una de las dos especies puede influir sobre el crecimiento poblacional de la otra y favorecer el establecimiento de nuevas adaptaciones (Smith y Smith, 2004).

El número de presas que un depredador consume es una función de la densidad de la presa y es conocida como respuesta funcional (Holling, 1966). La respuesta funcional es la relación entre la densidad de la presa y el número de presas ingeridas por un depredador, por unidad de tiempo (Scheiner y Gurevitch, 2001).

En general los organismos muestran uno de los tres tipos de respuesta funcional (Fig. 3), estas curvas de respuesta parecen corresponder a tres diferentes estrategias de forrajeo: La curva de tipo I es característica de animales que consumen su alimento a una tasa proporcional a la tasa con que la encuentran, o sea que aumenta linealmente hasta un máximo que se mantiene constante con el aumento de la densidad de presas (organismos filtradores); las curvas de tipo II son características de muchos microorganismos que toman

cierta cantidad de tiempo para ingerir y capturar su comida (organismos invertebrados); la respuesta funcional tipo III, es indicativa de organismos que muestran un comportamiento de aprendizaje, en el que bajo un cierto umbral de densidad, los organismos no utilizan las presas para comida con gran intensidad, sin embargo por arriba de los niveles del umbral de densidad, los organismos incrementan su tasa de consumo de presas hasta un nivel de saturación (Real, 1977; Scheiner y Gurevitch, 2001).

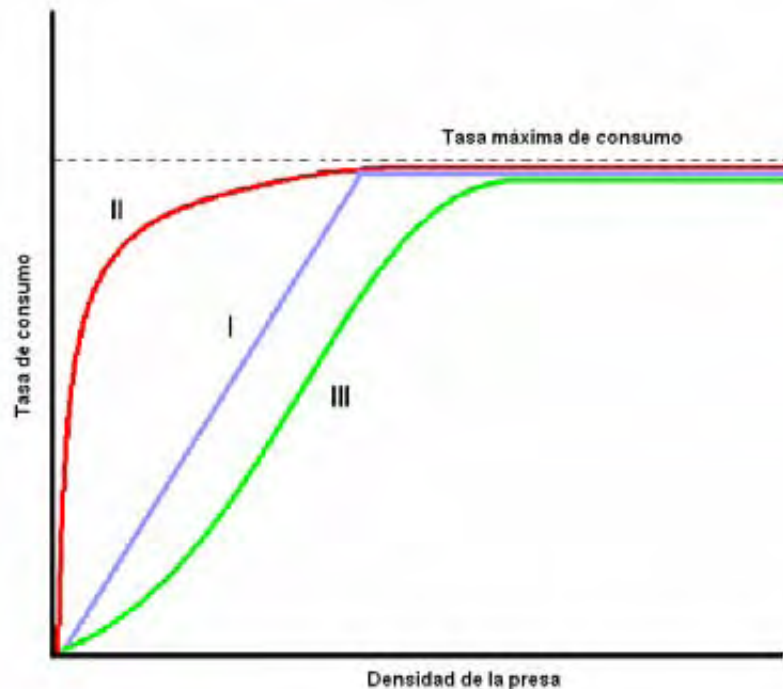


Figura 3. Los tres tipos de respuesta funcional (Holling, 1959)

2.4. Microorganismos que se eliminan con la desinfección

La transmisión de microorganismos patógenos mediante el agua para beber es un gran problema, sus efectos no sólo se presentan en países con bajas medidas de higiene sino también en países industrializados (Schoenen, 2000).

Los microorganismos que pueden estar presentes en el agua de consumo humano, debido a su contaminación son: bacterias, virus, protozoos y helmintos. Se sabe que los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua proceden de las descargas intestinales de hombres y animales, y se ha estimado que el número de bacterias coliformes en las descargas fecales llega hasta, quizás, 2.00×10^{12} organismos diarios por persona (McJunkin, 1988)

De todos los microorganismos, las bacterias son las más numerosas y las que también se encuentran con más frecuencia en el agua. Las bacterias patógenas que se han encontrado en el agua son: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolítica* y *Campylobacter pylori* (Metcalf y Eddy, 1996).

Ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli* y otras como, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* y microorganismos similares son denominados coliformes, ya que son miembros comunes de la biota intestinal (Bitton, 1994). Históricamente han sido recomendados como indicadores para la evaluación microbiológica de la calidad del agua (APHA, 1998).

Otros microorganismos patógenos que también pueden ser transmitidos por el agua son los virus. Son parásitos intracelulares, generalmente específicos respecto a las células que constituyen su albergue. Los virus que más interesan en cuanto a la transmisión de enfermedades infecciosas hídricas, son principalmente los que se multiplican en el intestino y son expelidos en gran número en las heces de los individuos infectados. Si bien la reproducción no ocurre fuera de huéspedes vivos, los virus entéricos tienen una gran capacidad para sobrevivir en el ambiente acuático y pueden permanecer vivos por días o meses.

Existen tres tipos de protozoos intestinales patógenos para el hombre, que pueden ser transmitidos por el agua: *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* y *Giardia lamblia*. Todos han sido asociados a brotes epidémicos causados por el agua potable. Los quistes de *E. histolytica* pueden sobrevivir por varios meses en el agua a 0°C; 30 minutos a 45°C y 5 minutos a 50°C. Es uno de los patógenos conocidos más resistentes al cloro. Existen amebas de vida libre pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* que son parásitos oportunistas, producen la meningoencefalitis amibiana primaria enfermedad mortal para el hombre. Éstas propiamente no se transmiten por la ingesta de agua, sino por la penetración del microorganismo a través de la nariz en agua para uso recreativo (piscinas, aguas termales, lagos etc.) (Beaver *et al*, 1992). También se han encontrado una gran variedad de huevos y larvas de helmintos en el agua potable. Los helmintos intestinales más difundidos son los *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, *Schistosoma* y *Ancylostoma*, los mismos que también pueden estar presentes en las aguas de recreación.

La contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua con aguas residuales domésticas puede ser causa de transmisión de microorganismos, así como el agua que sólo tuvo un tratamiento deficiente de desinfección (Cáceres, 1990). Existen diversos factores que influyen en la calidad del agua que consume una población. Entre éstos se encuentran: la presencia o ausencia de fuentes de abastecimiento naturales de agua; la infraestructura de redes de almacenamiento y distribución de agua; los aspectos culturales y socioeconómicos que condicionan la aceptación o rechazo a ciertas formas de abastecimiento y potabilización de agua (Sánchez *et al.*, 2000).

Las poblaciones con menor acceso a sistemas que garanticen la disponibilidad de agua potable para consumo humano son las poblaciones de mayor marginación socioeconómica en México, y en particular el estado de Chiapas, no escapa a esta situación. Según cifras del Censo de Población y Vivienda de 1990 el 20% de las viviendas en México no disponía de agua potable. En la tabla 2 se muestran la incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias en México (Sánchez *et al.*, 2000)

Tabla 2. Incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias en México.

Enfermedad	Nacional	Chiapas	Región Fronteriza
Absceso hepático amibiano	6.65	15.88	ND
Amibiasis intestinal	1, 675.99	2, 984.30	4, 974.0
Ascariasis	470.66	1, 054.62	1,719.8
Fiebre tifoidea	12.00	21.61	ND
Giardiasis	81.53	97.21	190.4
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	5, 218.91	3, 574.56	3, 223.6
Otras infecciones intestinales debidas a protozoarios	114.15	204.80	2 052.8
Oxiuriasis	133.69	259.76	421.5
Paratifoidea y otras salmonelosis	223.53	616.27	455.8
Shigelosis	47.14	175.86	713.9
Teniasis	3.18	6.87	ND

ND: no documentado

Fuente: Sánchez *et al.*, 2000

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

La capacidad depredadora de *Rotaria rotatoria* y *Paramecium multimicronucleatum* se puede evaluar mediante la cuantificación del número de bacterias sobrevivientes, empleando el método de cuenta en placa con medios selectivos (Ramírez *et al.*, 2000).

El método de cuenta en placa se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo adecuado, se multiplica y produce datos de fácil identificación, tales como la formación de colonias en placas de agar. Este método ha sido fuertemente criticado como un estimador ineficiente del número total de enterobacterias en ecosistemas acuáticos. Lo anterior debido a que las bacterias entéricas pueden ser cultivables y no cultivables, o bien, que permanezcan en estado de latencia, por lo que no pueden ser cuantificadas por este método. Estas deficiencias ponen en riesgo la salud humana (González *et al.*, 1992). En el presente estudio se utilizaron bacterias provenientes de cepas puras que son activadas previamente a su empleo, por lo que son metabólicamente activas y cultivables. Además, este método permite establecer la selectividad de alimentación del paramecio y del rotífero, al poder diferenciar con medios selectivos, el número de bacterias sobrevivientes de cada especie suministrada.

3.1. Experimentación preliminar

Para esta etapa, se obtuvieron las tres cepas de enterobacterias seleccionadas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella typhi* ATCC 9992
- *Shigella sonnei* Cepa FQ

Estas se conservaron en un cultivo stock, con agar nutritivo en tubo inclinado, a 4°C.

3.1.1. Estandarización del inóculo

Se llevó a cabo la estandarización del inóculo de cada una de las especies bacterianas. Este paso es necesario para poder establecer las concentraciones utilizadas (1.00×10^3 , 1.00×10^5 , 1.00×10^7 , 1.00×10^8 y 1.00×10^9 bac/mL) en las siguientes etapas experimentales (Fig. 4).

Para ello se procedió de la siguiente manera:

- Se prepara una infusión de lechuga, hirviendo 2 g de lechuga por cada 100 mL de agua y se filtra para eliminar la materia orgánica no disuelta.
- Se colocan 5 mL de ésta infusión en tubos de 16 x 150 y se esteriliza.
- Se prepara un cultivo stock sembrando las bacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* o *Shigella sonnei*) en tubos con agar nutritivo inclinados, incubándose por 24 hrs.
- Del cultivo de 24 hrs. se toma una asada y se hacen diluciones hasta 1.00×10^{-4} y se siembran en cajas con agar nutritivo, dispersándolas por toda la superficie. Se incuba por 48 hrs. a 37 °C.

- De estas cajas, se toma con un asa bacteriológica, las colonias de bacterias que midan 3 mm aproximadamente y se descargan en un tubo con 5 mL de infusión de lechuga estéril, el número de colonias dependerá de la concentración que se desee. Para obtener una concentración de 1.00×10^5 bac/mL se necesita 1 colonia/mL, para una concentración de 1.00×10^7 bac/mL son 3 colonias/mL y para una concentración de 1.00×10^9 bac/mL se necesitan 5 colonias/mL.
- Para obtener las concentraciones 1.00×10^3 bac/mL y 1.00×10^8 bac/mL, se realizan las diluciones a partir de las concentraciones 1.00×10^5 bac/mL y 1.00×10^9 bac/mL, respectivamente.

El procedimiento para obtener las diferentes concentraciones de bacterias se estableció mediante la experimentación de diversos ensayos hasta encontrar las condiciones y los materiales adecuados.

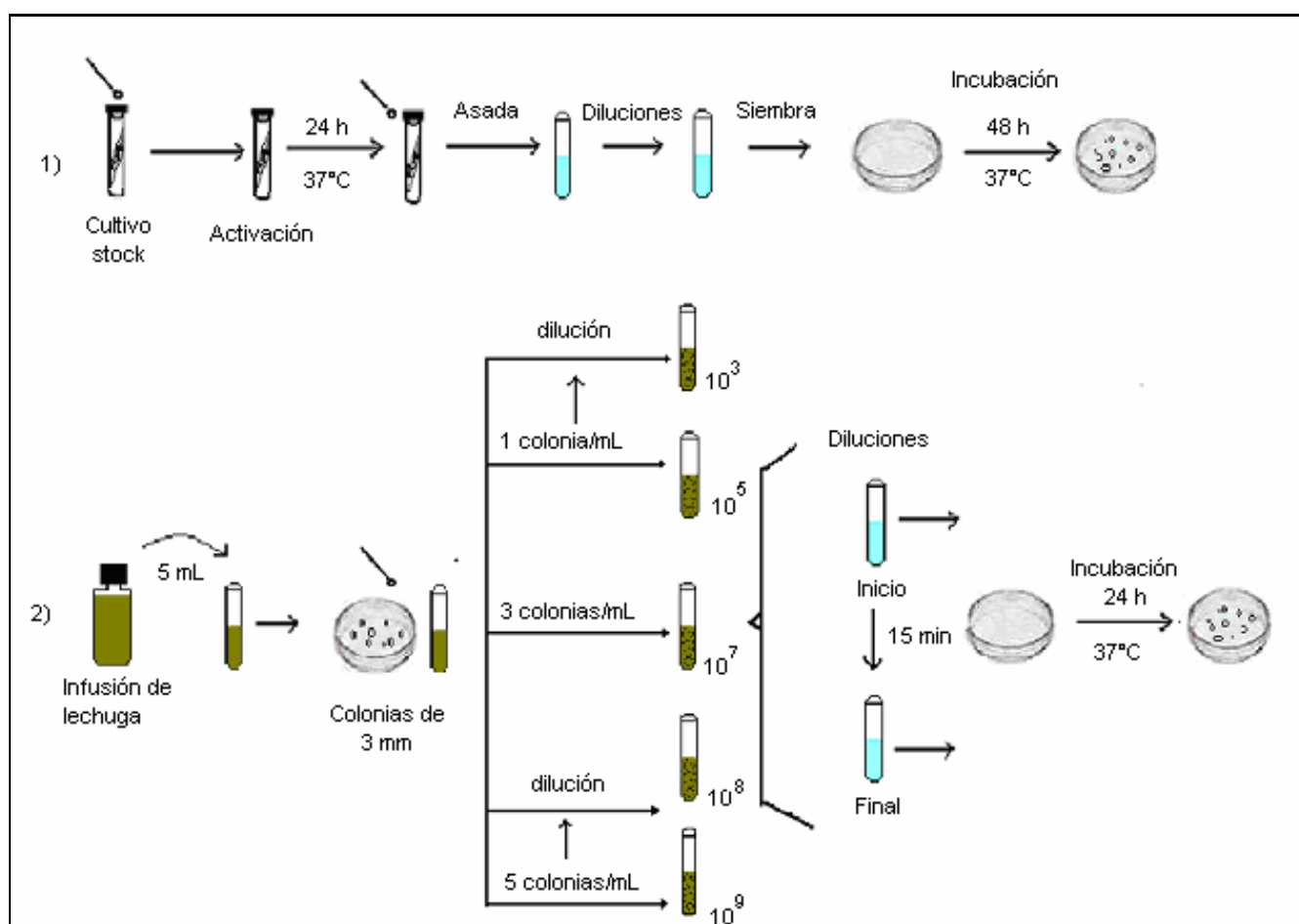


Figura 4. Esquema general de la estandarización de los inóculos de las especies de enterobacterias seleccionadas.

3.1.2. Aislamiento y cultivo de *Paramecium multimicronucleatum* y *Rotaria rotatoria*

Se llevó a cabo el aislamiento y el cultivo de los microorganismos en medios adecuados para su conservación y multiplicación como abajo se especifica.

Para obtener un cultivo Stock de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* se probaron diferentes medios tales como: infusión de cebada, infusión de cebada con un cultivo mixto de enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*), caldo nutritivo y caldo nutritivo inoculado con un cultivo mixto de enterobacterias, infusión de lechuga e infusión de lechuga con un cultivo mixto de enterobacterias.

Paramecium multimicronucleatum:

Fue aislado de un sistema de tratamiento de aguas residuales a base de lodos activados, el cual se ubica en ciudad universitaria.

El cultivo stock se mantuvo en infusión de lechuga inoculado con un cultivo mixto de enterobacterias, a 28°C en recipientes de 100 mL, se realizaron transferencias a un nuevo medio de cultivo cada tercer día.

Rotaria rotatoria:

Esta especie fue aislada del mismo sistema de tratamiento de aguas residuales.

Para el cultivo stock se utilizó también, infusión de lechuga inoculada con enterobacterias como medio de cultivo, a 28°C, pero a diferencia del *P. multimicronucleatum*, la transferencia a un nuevo medio se llevó a cabo cada 7 días.

3.2. Experimentación

3.2.1. Determinación de las dimensiones de *Paramecium multimicronucleatum* y *Rotaria rotatoria*

- Para obtener el tamaño de ambos microorganismos se midió la anchura y la longitud de 50 individuos utilizando el programa Motic (Moticam – Mod480 – 12 mm), calculando el promedio y la desviación estándar.
- Para calcular el volumen del *Paramecium multimicronucleatum* se asumió que este tiene una forma elipsoidal y se utilizó la siguiente ecuación (Curds y Cockburn, 1971):

$$V = \frac{4}{3} \pi a^2 c \cdot 1.00 \times 10^{-3}$$



Donde V = volumen, $\pi = 3.1416$, $a = \text{anchura}/2 = \text{profundidad}/2$ y $c = \text{longitud}/2$, todo en μm , y $V \cdot 1.00 \times 10^3 \mu\text{m}^3$

- El volumen de *Rotaria rotatoria* se calculó asumiendo que el rotífero tiene la forma geométrica de cono, se utilizó la ecuación correspondiente, de acuerdo con Downing y Rigler (1984).

$$V = \frac{1}{3} \times \pi r^2 h$$



Donde V = volumen, $\pi = 3.1416$, r = anchura/2, h = longitud, todo en μm , y V $1.00 \times 10^3 \mu\text{m}^3$

3.2.2. Evaluación de las tasas de consumo de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*

- En 3 tubos de ensayo estériles de 16x150 (testigo inicio, depredador + bacteria y testigo final), se colocan en cada uno 50 individuos lavados previamente en cuatro cambios de infusión de lechuga estéril para eliminar los restos de bacterias y materia orgánica.
- A cada uno de los tubos se adiciona 1 mL del inóculo con la concentración de bacterias que se este probando, preparado de acuerdo a como se indica en la estandarización del inóculo (Fig. 4).
- Se cuantifica el número de bacterias en el tubo testigo inicio, realizando las diluciones necesarias dependiendo de la concentración utilizada.
- Para los otros dos tubos (depredador + bacteria y testigo final) se deja transcurrir un tiempo de contacto de 15 min. y se cuantifica el número de bacterias que sobreviven, también realizando las diluciones necesarias.
- La cuantificación de las bacterias se realiza mediante el método de cuenta en placa utilizando el medio adecuado para el crecimiento de la bacteria de prueba, incubando las cajas bajo las condiciones que se mencionan a continuación dependiendo del medio que sea utilizado.
- Agar mFc (Medio para coliformes fecales) para *E. coli* a 44.5°C durante 48 horas.
- XLD para *S. typhi* y *S. sonnei* a 37°C durante 48 horas.
- Este procedimiento se realizará 4 veces para cada una de las bacterias de prueba y por cada uno de los microorganismos depredadores para cuestiones estadísticas (Fig. 5).

Para el cálculo de la tasa de filtración se utiliza la siguiente ecuación:

$$F = \frac{V(Ct_1 - Ct_0)}{Zn} \times \frac{60}{t}$$

F = Tasa de filtración individual $^{-1} h^{-1}$.

V = Volumen de agua en mL del contenedor de alimentación.

Ct₀ = Conteo de células mL⁻¹ en el contenedor de alimentación al inicio del experimento.

Ct₁ = Conteo de células mL⁻¹ en el contenedor de alimentación al final del experimento.

Zn = Número de individuos por contenedor (*P. multimicronucleatum* o *R. rotatoria*).

t = Tiempo de alimentación en minutos (15 min.).

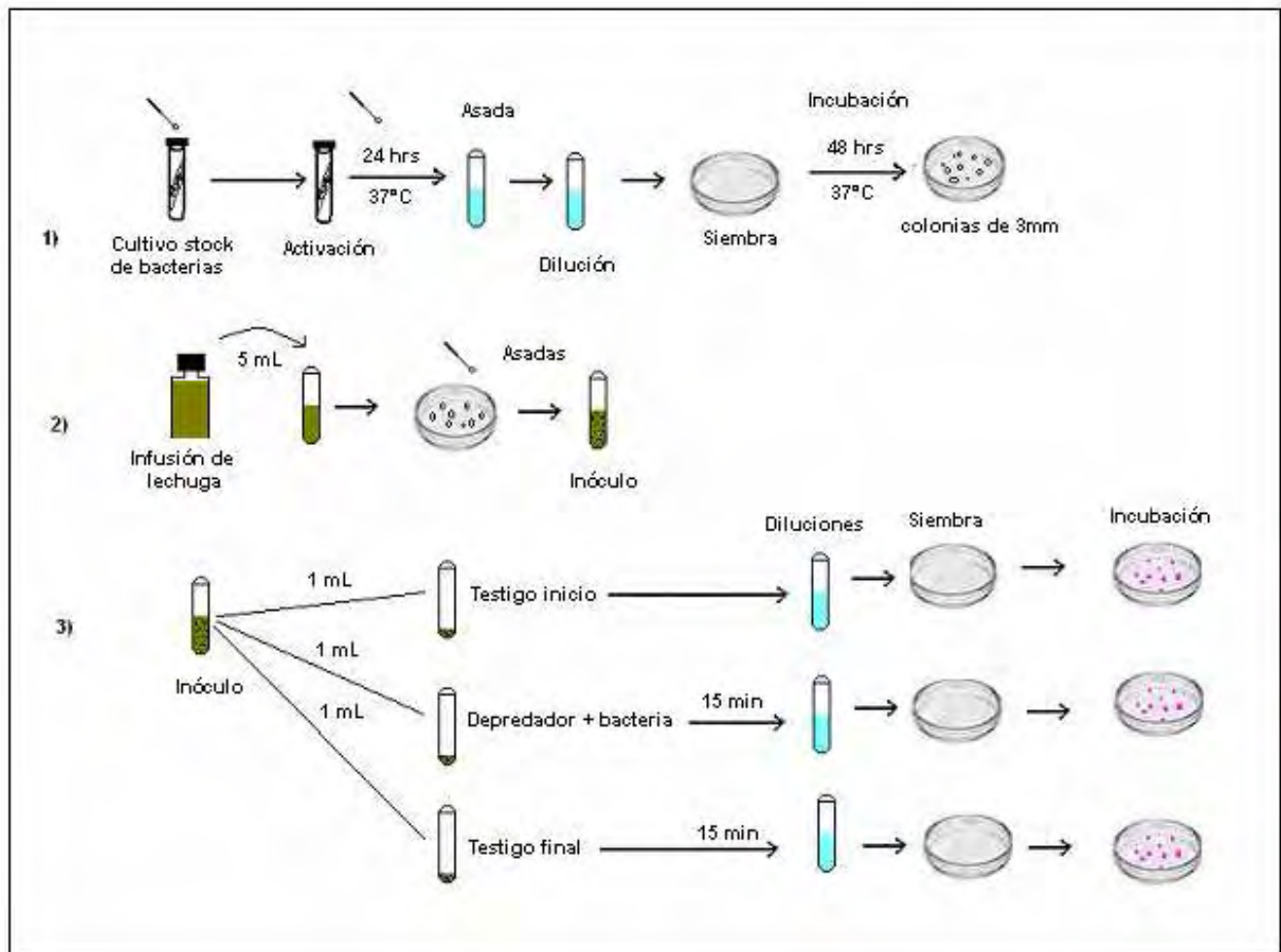


Figura 5. Esquema general para la obtención de la tasa de consumo

3.2.3. Evaluación del índice de selectividad.

- En 3 tubos estériles de 16 x 150, se colocan 50 individuos de *P. multimicronucleatum* o *R. rotatoria* (lavados previamente en cuatro cambios de infusión de lechuga estéril para eliminar los restos de bacterias y materia orgánica).
- En estos tubos, se adiciona 1 mL de una suspensión mixta con las 3 bacterias de prueba (*E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*), en una proporción de 1:1:1.

- Esta suspensión se realiza de acuerdo con el procedimiento para la estandarización del inóculo por cada una de las 3 bacterias como se indica en la Fig. 6 parte 1.
- En el primer tubo se cuantifica el número de bacterias al inicio de la prueba realizando las diluciones requeridas (testigo inicial).
- Se deja transcurrir un tiempo de contacto de 15 min. con los dos tubos restantes (depredador + bacterias y testigo final) y se hacen las diluciones correspondientes.
- La cuantificación del número de bacterias sobrevivientes de cada una de las especies de prueba, se realiza mediante el método de cuenta en placa, utilizando medios específicos diferenciales para cada una.
- De cada uno de los tubos se siembran 2 cajas con medios diferenciales para determinar las concentraciones de cada bacteria. En la primera caja se utilizo medio de cultivo mFc para *E. coli* incubándose a 44.5°C durante 48 horas y en la segunda caja medio SS para *S. typhi* y *S. sonnei* incubándose a 37°C durante 48 horas (Fig. 6).
- Este procedimiento se realiza 4 veces por cada uno de los depredadores.

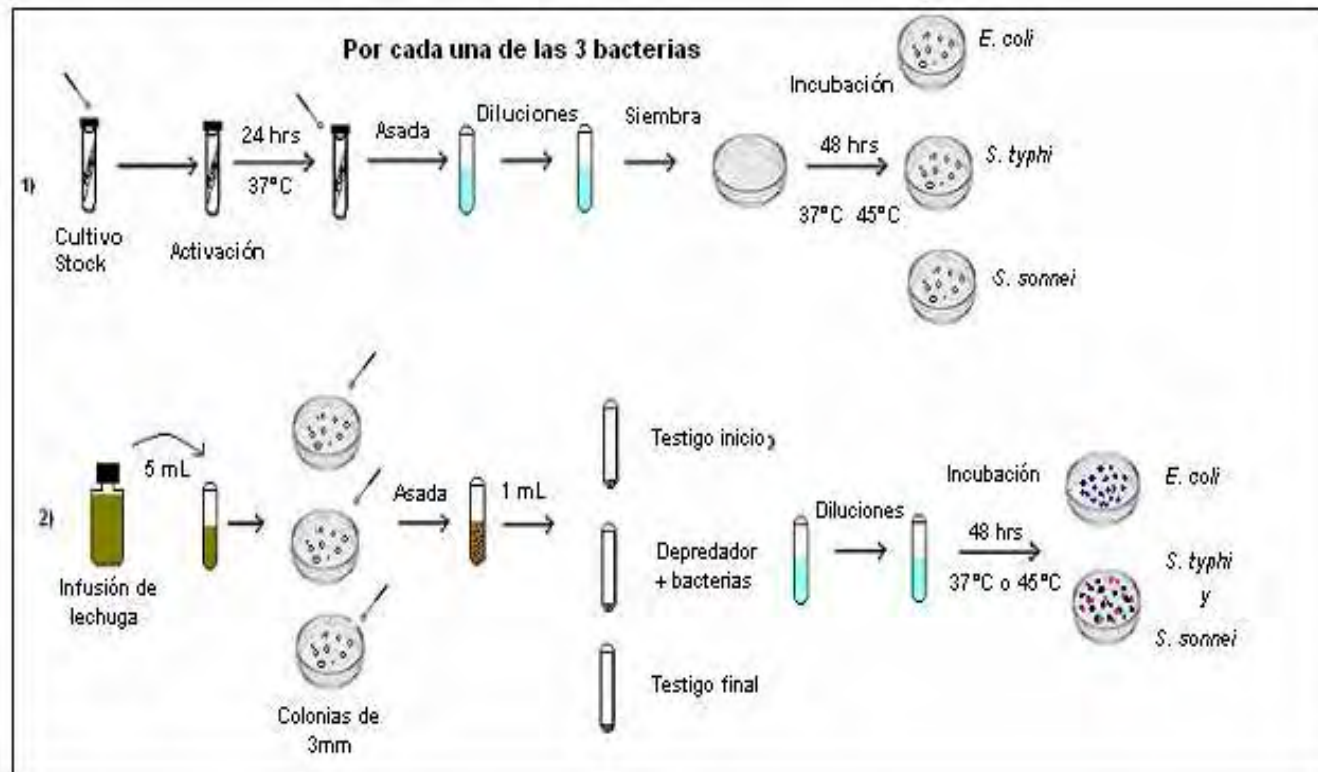


Figura 6. Esquema general para la obtención del índice de selectividad. El índice de selectividad o alfa (α) de Manly se calcula con la siguiente ecuación (Krebs, 1999):

$$\alpha_i = \frac{r_i}{n_i} \left(\frac{1}{\sum \frac{r_j}{n_j}} \right)$$

Donde:

α = Índice de selectividad

$r_{i,j}$ = Proporción de la presa tipo i o j en la dieta (consumida)

$n_{i,j}$ = Proporción de la presa tipo i o j en el ambiente

Para la interpretación de los resultados se considera si:

m = número de tipos de presa

$\alpha = \frac{1}{m}$ La alimentación es indistinta.

$\alpha > \frac{1}{m}$ La presa tipo i es preferida en la dieta

$\alpha < \frac{1}{m}$ La presa tipo i no es preferido

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del tamaño, volumen y masa de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*

De manera paralela a las pruebas preliminares, se realizó la búsqueda y aislamiento de los depredadores, un ciliado, en este caso *Paramecium multimicronucleatum* y un rotífero *Rotaria rotatoria*, ya que estos microorganismos son habitantes comunes de los cuerpos de agua naturales y las plantas de tratamiento de aguas residuales, específicamente las de lodos activados (Pauli *et al.*, 2001), donde son los responsables de disminuir de manera considerable la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundaría en la disminución del grado de turbiedad, debido al efecto depredador (Curds y Vandyke, 1966; Curds y Cockburn, 1971). Estos microorganismos se eligieron como una alternativa para la eliminación de bacterias de aguas parcialmente tratadas, ya que al formar parte de la microfauna que se encuentra normalmente en los lodos activados de las plantas depuradoras de aguas residuales (Rius *et al.*, 1996), soportan mayores concentraciones de materia orgánica (DBO₅ de 50 a 600 mg/L) (Luna-Pabello *et al.*, 1994) que los microorganismos que habitan normalmente solo en cuerpos de agua naturales.

De los diferentes medios de cultivo que se probaron para el cultivo stock de los microorganismos depredadores; el mejor crecimiento ocurrió con el de infusión de lechuga inoculada con enterobacterias. Ambos microorganismos tuvieron un crecimiento adecuado en este cultivo lo que facilitó la realización de las pruebas bajo las mismas condiciones de alimentación y temperatura, por lo que fue posible cultivarlos por un tiempo previo de tres meses para adecuarlos a este alimento y estandarizar los inóculos.

Para la identificación de *P. multimicronucleatum* se utilizaron las tinciones de hematoxilina de Harris y carbonato de plata, con las cuales se pudo revelar la infraciliatura, así como algunas estructuras citoplasmáticas, especialmente fibras cinetodesmales y el aparato nuclear, observándose claramente los múltiples micronúcleos localizados a un costado del macronúcleo, que son característicos de la especie (Fernández-Galiano, 1976). En el caso de *R. rotatoria* no se pueden utilizar este tipo de técnicas para su identificación debido a la deformación morfológica que sufre al entrar en contacto con algún agente extraño, por esta razón la identificación se llevó a cabo con la observación directa *in vivo*, y debido a su gran movilidad fue necesaria la utilización de agua hirviendo para inmovilizarlo y desplegarlo completamente, para su identificación plena (Donner, 1965).

Con los valores de las dimensiones de longitud y anchura determinadas (tabla 3); se calcularon los volúmenes de *P. multimicronucleatum* y de *R. rotatoria* utilizando las ecuaciones abajo señaladas en donde se asume que el paramecio tiene una forma similar a la elipsoidal (Curds y Cockburn, 1971) y en el caso de *R. rotatoria* la comparación se realizó con la forma geométrica de un cono utilizando la ecuación referida por Downing y Rigler (1984), de acuerdo a las dimensiones calculadas se observó que *R. rotatoria* es 30% más grande que *P. multimicronucleatum*, aunque aparentemente podrían parecer del mismo tamaño por la característica que tiene el rotífero de contraer parte de su cuerpo, por lo que se debe tener cuidado al realizar la medición de cada individuo, ya que esta debe realizarse cuando el rotífero se encuentre totalmente estirado. Para lo anterior se puede recurrir a

diversos procedimientos, tales como la narcotización con lidocaina y tabaco, o empleando agua hirviendo. Para calcular la masa de cada especie se utilizó la fórmula $m = d/v$, suponiendo que su densidad es igual a la del agua (1 g/L) y utilizando los volúmenes calculados con el fin de realizar posteriormente una comparación de las tasas de consumo con base a sus masas equivalentes.

Cálculos:



$$V = \frac{4}{3} \pi a^2 c \cdot 10^{-3}$$

***P. multimicronucleatum*:**

$$V = (1.33)(3.1416)(28\mu\text{m})^2 (125\mu\text{m}) \times 10^{-3}$$

$$V = (4.1877)(784 \mu\text{m}^2)(125\mu\text{m}) \times 10^{-3}$$

$$V = 410.394 \mu\text{m}^3$$



$$V = \frac{1}{3} \pi r^2 h$$

***R. rotatoria*:**

$$V = (0.33) (3.1416) (35\mu\text{m})^2 (422\mu\text{m}) \times 1.00 \times 10^{-3}$$

$$V = (1.047) (1225 \mu\text{m}^2) (422\mu\text{m}) \times 1.00 \times 10^{-3}$$

$$V = 541.246 \mu\text{m}^3$$

Tabla 3. Dimensiones promedio de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*

Microorganismo	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Volumen (µm ³)	Masa (mg)
<i>P. multimicronucleatum</i>	250 ± 10	56 ± 4	410.39	4.1 x 1.00 x 10 ⁻⁴
<i>R. rotatoria</i>	422 ± 15	70 ± 5	541.24	5.41 x 1.00 x 10 ⁻⁴

4.2 Tasas de consumo

En la primera etapa de la experimentación se realizaron las pruebas para obtener las tasas de consumo de *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei* por parte de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* utilizando cinco diferentes concentraciones de bacterias (1.00×10^3 , 1.00×10^5 , 1.00×10^7 , 1.00×10^8 y 1.00×10^9 bac/mL); estas bacterias se cultivaron en caldo nutritivo para poder alcanzar concentraciones elevadas de hasta 1.00×10^9 bac/mL, pero al utilizarlas en las pruebas se observó que la carga de materia orgánica del caldo nutritivo era muy alta aún en la concentración más baja de bacterias, lo que hacía que el *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* murieran en pocos segundos, esto pudo deberse a la excesiva carga de materia orgánica del medio o a metabolitos tóxicos excretados por las bacterias, lo que impedía realizar la medición de la tasa de consumo. Como alternativa se evaluó un procedimiento que implicaba el uso de un medio que permitiera tanto la adecuada sobrevivencia de las bacterias como la de los depredadores. Para ello se empleó la misma infusión de lechuga donde se cultivaban los depredadores y en donde las bacterias también sobrevivían. La prueba se hizo eliminando por completo, por filtración con membrana de 0.45 µm toda la materia orgánica suspendida presente en la infusión de lechuga y mediante esterilización por autoclave bacterias contaminantes. En la infusión resultante, se colocó una asada directa de las colonias de bacterias que se desarrollaron en medio sólido (agar nutritivo). El tamaño de dichas colonias fue de aproximadamente 3mm. La concentración de las bacterias añadidas se determinó mediante cuenta en placa, lo que permitió estimar el número aproximado de colonias por asada. Este procedimiento evitó la adición de medio de cultivo y con ello la inducción de la muerte de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*. Asimismo, se facilitó el poder obtener una determinada concentración de bacterias, a partir de la adición de múltiplos de asadas conteniendo colonias de tamaño uniforme. Las tasas de consumo se calcularon con base en el peso equivalente de los dos depredadores, tomando como referencia el microorganismo con la menor masa que en este caso es el de *P. multimicronucleatum*.

Tabla 4. Tasas de consumo promedio obtenidas de *Paramecium multimicronucleatum*, con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones, (desviaciones estándar promedio de 4 réplicas).

<i>Paramecium multimicronucleatum</i>					
Depredador	F= tasa de consumo (bac/ciliado/h)				
	Concentración inicial (bac/mL)				
Presa	1.00×10^3	1.00×10^5	1.00×10^7	1.00×10^8	1.00×10^9
<i>E. coli</i>	$6.73 \pm 0.61 \times 10^3$	$1.64 \pm 0.03 \times 10^5$	$5.07 \pm 0.06 \times 10^6$	$3.78 \pm 0.11 \times 10^7$	$4.59 \pm 0.77 \times 10^7$
<i>S. typhi</i>	$1.26 \pm 0.42 \times 10^3$	$2.71 \pm 0.45 \times 10^3$	$4.02 \pm 0.27 \times 10^5$	$9.68 \pm 0.78 \times 10^6$	$1.59 \pm 0.27 \times 10^7$
<i>S. sonnei</i>	$4.38 \pm 0.82 \times 10^3$	$1.49 \pm 0.03 \times 10^5$	$2.55 \pm 0.17 \times 10^6$	$1.14 \pm 0.02 \times 10^7$	$2.16 \pm 0.88 \times 10^7$

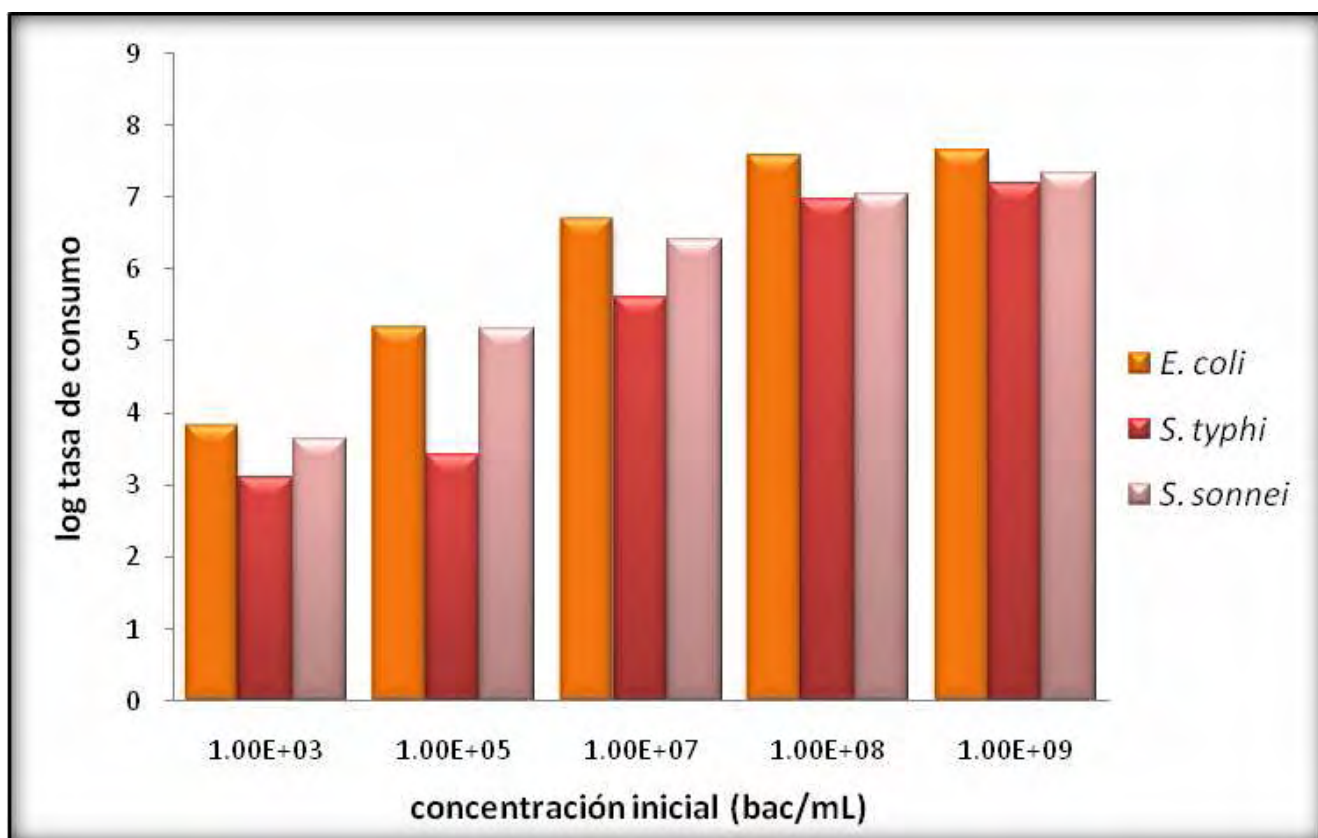


Figura 7. Gráfica de las tasas de consumo promedio obtenidas de *Paramecium multimicronucleatum*, con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones

Tabla 5. Tasas de consumo de *Rotaria rotatoria*, con tres especies de enterobacterias a cinco diferentes concentraciones (Desviaciones estándar promedio de 4 réplicas).

<i>Rotaria rotatoria</i>					
Depredador	F= tasa de consumo (bac/rotífero/h)				
	Concentración inicial (bac/mL)				
Presas	1.00×10^3	1.00×10^5	1.00×10^7	1.00×10^8	1.00×10^9
<i>E. coli</i>	$6.80 \pm 0.39 \times 10^3$	$6.16 \pm 0.06 \times 10^5$	$3.54 \pm 0.05 \times 10^7$	$4.0 \pm 0.26 \times 10^7$	$5.13 \pm 0.49 \times 10^7$
<i>S. typhi</i>	$3.52 \pm 0.17 \times 10^3$	$3.78 \pm 0.02 \times 10^5$	$1.14 \pm 0.03 \times 10^7$	$1.48 \pm 0.02 \times 10^7$	$1.70 \pm 0.05 \times 10^7$
<i>S. sonnei</i>	$5.93 \pm 0.30 \times 10^3$	$6.31 \pm 0.05 \times 10^5$	$2.00 \pm 0.03 \times 10^7$	$2.14 \pm 0.07 \times 10^7$	$2.28 \pm 0.05 \times 10^7$

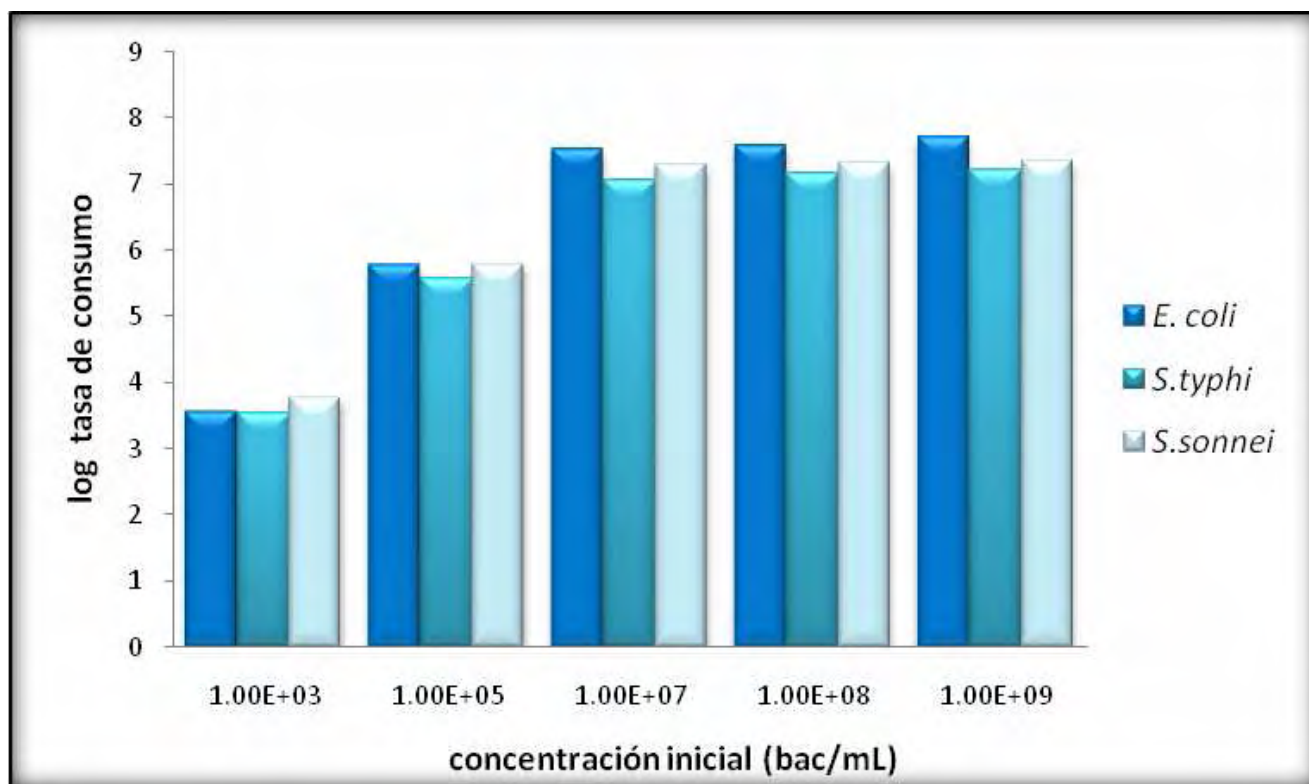


Figura 8. Gráfica de las tasas de consumo promedio obtenidas de *Rotaria rotatoria*, con tres especies de enterobacterias y cinco diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos para *P. multimicronucleatum* (Tabla 4 y Fig. 7) mostraron que las tasas de consumo más altas se presentaron con *E. coli* para todas las concentraciones utilizadas, y las más bajas para *S. typhi* con respecto al tipo de presa; en cuanto a las diferentes concentraciones de presa utilizadas, la tasa máxima de consumo se alcanzó con la concentración inicial del orden de 1.00×10^8 bac/mL, ya que no se observó un aumento significativo de las tasas de consumo, entre las concentraciones del orden de 1.00×10^8 y 1.00×10^9 bac/mL para las tres especies de bacterias ofrecidas, lo que sugiere que *P. multimicronucleatum*, bajo las condiciones experimentales empleadas, puede alcanzar una tasa máxima de consumo entre 1.00×10^9 y 1.00×10^{10} bac/mL. Es necesario realizar las pruebas de tasa de consumo con concentraciones más altas, para poder establecer la tasa de consumo máxima específica.

En el caso de *R. rotatoria* (Tabla 5 y Fig. 8), las tasas de consumo resultaron similares a las obtenidas con *P. multimicronucleatum*, mostrando los valores más altos también con la presa *E. coli* para todas las concentraciones utilizadas, y las más bajas para *S. typhi* con respecto al tipo de presa, en el caso de las concentraciones, las tasas más altas se presentaron con la concentración inicial del orden de 1.00×10^9 bac/mL. Al igual que *P. multimicronucleatum* es necesario realizar más pruebas para determinar cual es la tasa máxima de consumo, aunque no se observó un aumento significativo de las tasas, entre las concentraciones del orden de 1.00×10^7 , 1.00×10^8 y 1.00×10^9 bac/mL para las tres especies de bacterias ofrecidas, lo que indicó que *R. rotatoria*, podría tener una tasa máxima de consumo del orden de 1.00×10^8 ó 1.00×10^9 bac/mL.

Aunque estos resultados son muy similares para los dos depredadores *R. rotatoria* siempre presentó mayores tasas de consumo que *P. multimicronucleatum*, en todas las combinaciones realizadas, siendo la más alta la de *E. coli*, de 5.13×10^7 (Tabla 5).

En las siguientes tablas se muestran los resultados de las tasas de consumo obtenidas tanto con el peso real como con el peso equivalente de *R. rotatoria*, haciendo una comparación del número de veces que es mayor la tasa de consumo de *R. rotatoria* con respecto a las tasas de consumo de *P. multimicronucleatum* aun con un peso equivalente, con las tres especies de enterobacterias seleccionadas. La comparación de los valores obtenidos mostró que aun igualando los pesos de los depredadores las tasas de consumo de *R. rotatoria* son mayores que las de *P. multimicronucleatum*, observándose mayores diferencias con las concentraciones de 1.00×10^5 y 1.00×10^7 bac/mL entre las tasas de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* que fueron 3.76, 13.9 y 4.23 veces más grandes con la concentración de 1.00×10^5 bac/mL para *E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei* respectivamente y 6.8, 28.4 y 7.84 veces más grande con la concentración de 1.00×10^7 bac/mL (Tablas 7, 8 y Fig. 10, 11).

Tabla 6. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^3 bac /mL.

Concentración inicial 1.00×10^3 bac /mL					
Presa	<i>P. multimicronucleatum</i> Masa real (*0.41 μ g)	<i>R. rotatoria</i> Masa real (*0.54 μ g)	No. Tasas de consumo mayor	<i>R. rotatoria</i> Masa equivalente (*0.41 μ g)	No. Tasas de consumo mayor
<i>E. coli</i>	6.73×10^3	8.95×10^3	1.33	6.80×10^3	1.01
<i>S. typhi</i>	1.26×10^3	4.64×10^3	3.68	3.52×10^3	2.79
<i>S. sonnei</i>	4.38×10^3	7.81×10^3	1.78	5.93×10^3	1.35

Nota: * Masa por individuo. ** Se está suponiendo que la biomasa de ambas especies es igualmente eficiente, tomando como base la masa de *P. multimicronucleatum*.

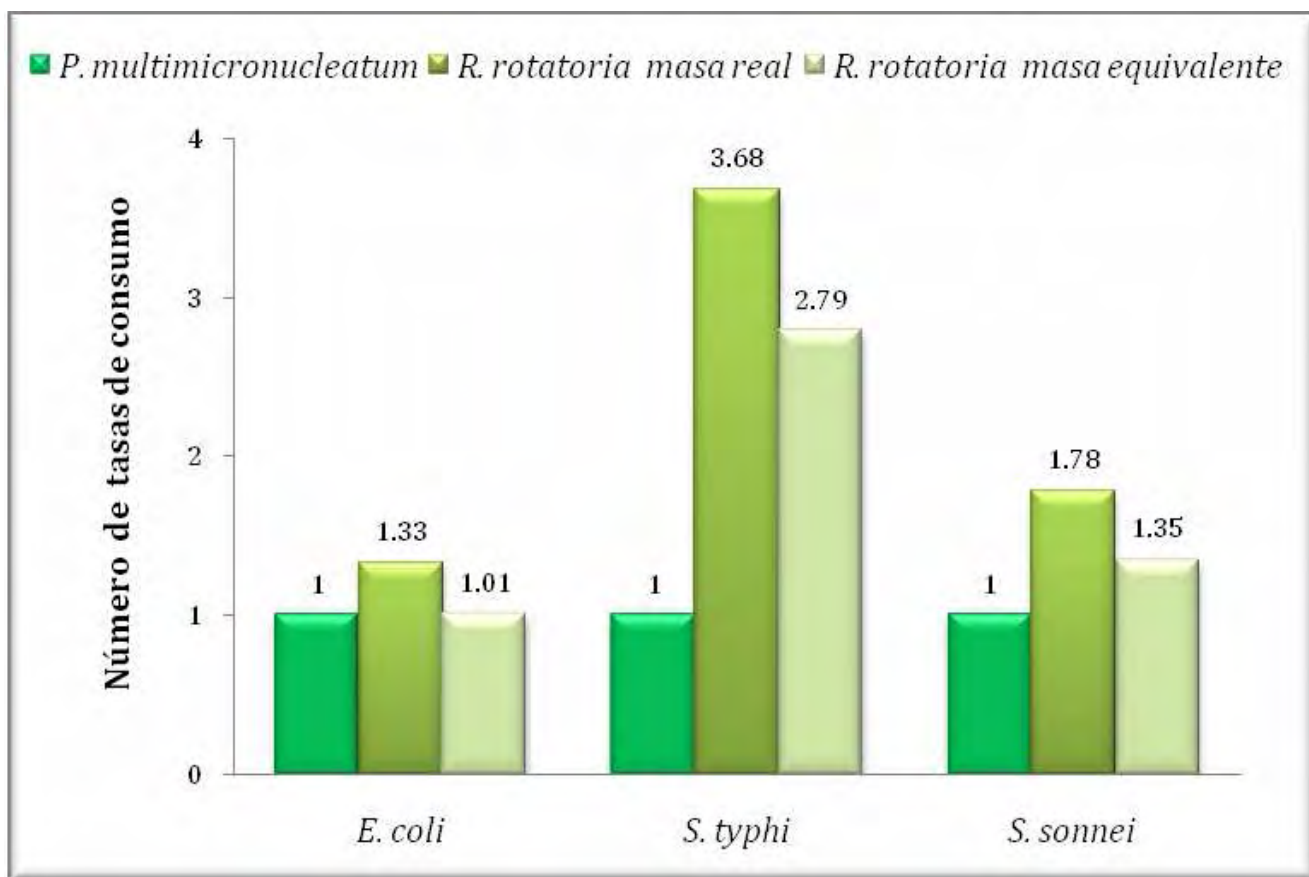


Figura 9. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real y *R. rotatoria* masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^3 bac/mL.

Tabla 7. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^5 bac/mL.

Concentración inicial 1.00×10^5 bac/mL					
Presa	<i>P. multimicronucleatum</i> Masa real (*0.41 µg)	<i>R. rotatoria</i> Masa real (*0.54 µg)	No. Tasas de consumo mayor	<i>R. rotatoria</i> Masa equivalente (*0.41 µg)	No. Tasas de consumo mayor
<i>E. coli</i>	1.64×10^5	8.11×10^5	4.95	6.16×10^5	3.76
<i>S. typhi</i>	2.71×10^3	4.98×10^5	18.4	3.78×10^5	13.9
<i>S. sonnei</i>	1.49×10^5	8.31×10^5	5.58	6.31×10^5	4.23

Nota: * Masa por individuo. ** Se está suponiendo que la biomasa de ambas especies es igualmente eficiente, tomando como base la masa de *P. multimicronucleatum*.

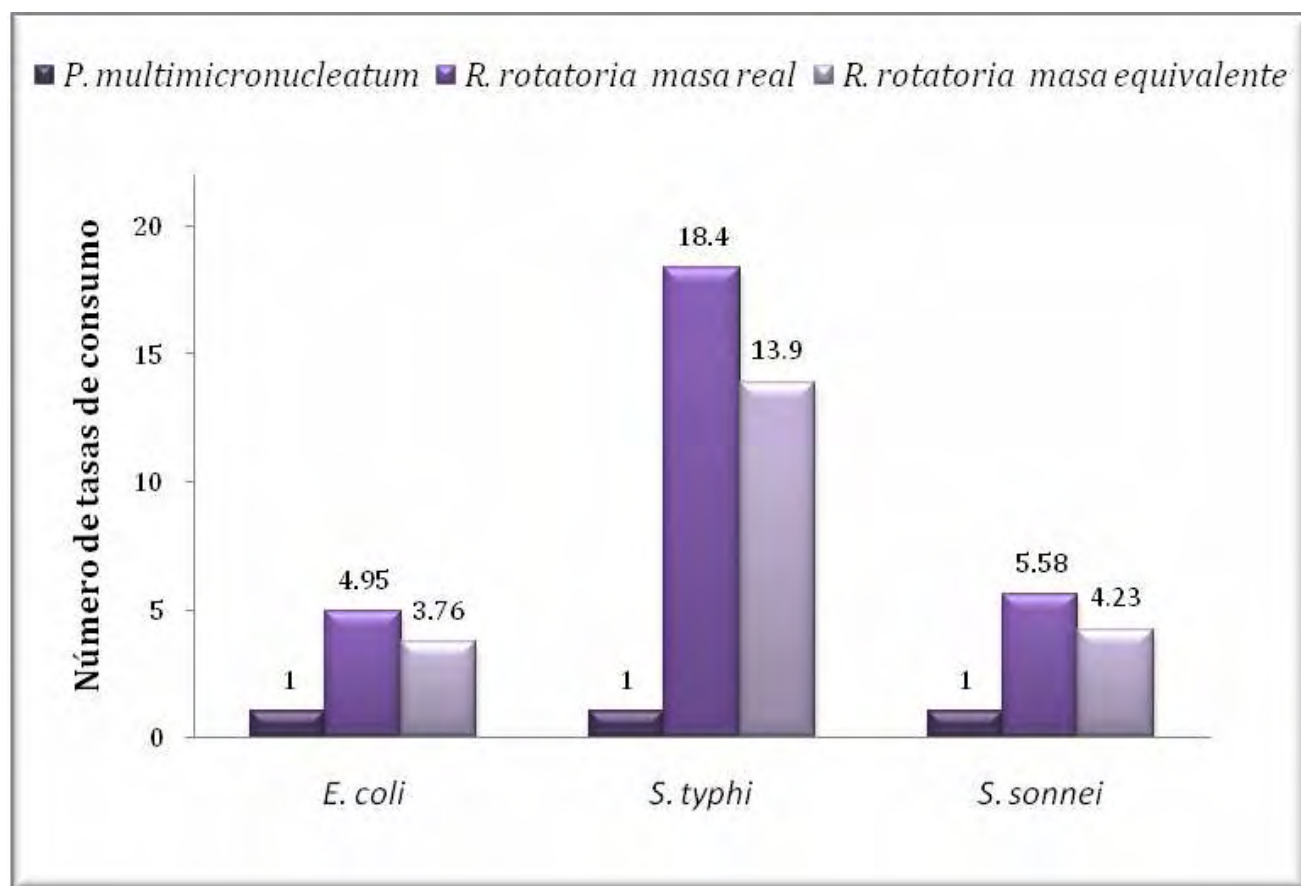


Figura 10. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real y *R. rotatoria* masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^5 bac/mL.

Tabla 8. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^7 bac/mL.

Concentración inicial 1.00×10^7 bac/mL					
Presa	<i>P. multimicronucleatum</i> Masa real (*0.41 µg)	<i>R. rotatoria</i> Masa real (*0.54 µg)	No. Tasas de consumo mayor	<i>R. rotatoria</i> Masa equivalente (*0.41 µg)	No. Tasas de consumo mayor
<i>E. coli</i>	5.07×10^6	4.66×10^7	9.19	3.54×10^7	6.98
<i>S. typhi</i>	4.02×10^5	1.50×10^7	37.3	1.14×10^7	28.4
<i>S. sonnei</i>	2.55×10^6	2.63×10^7	10.3	2.00×10^7	7.84

Nota: * Masa por individuo. ** Se está suponiendo que la biomasa de ambas especies es igualmente eficiente, tomando como base la masa de *P. multimicronucleatum*.

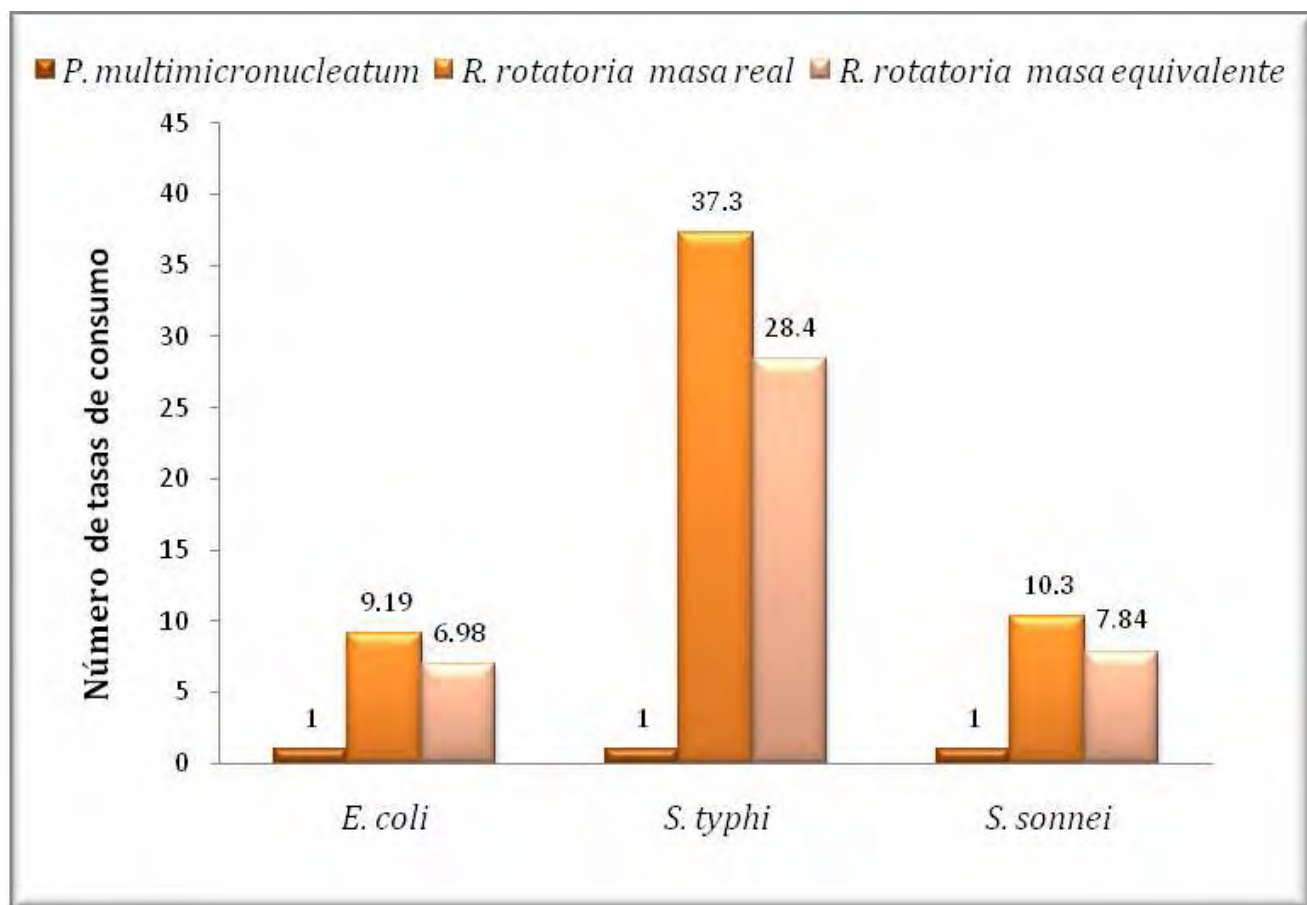


Figura 11. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real y *R. rotatoria* masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^7 bac/mL.

Tabla 9. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^8 bac/mL.

Concentración inicial 1.00×10^8 bac/mL					
Presa	<i>P. multimicronucleatum</i> Masa real (*0.41 µg)	<i>R. rotatoria</i> Masa real (*0.54 µg)	No. Tasas de consumo mayor	<i>R. rotatoria</i> Masa equivalente (*0.41 µg)	No. Tasas de consumo mayor
<i>E. coli</i>	3.78×10^7	5.27×10^7	1.39	4.00×10^7	1.06
<i>S. typhi</i>	9.68×10^6	1.95×10^7	2.01	1.48×10^7	1.53
<i>S. sonnei</i>	1.14×10^7	2.81×10^7	2.46	2.14×10^7	1.88

Nota: * Masa por individuo. ** Se está suponiendo que la biomasa de ambas especies es igualmente eficiente, tomando como base la masa de *P. multimicronucleatum*.

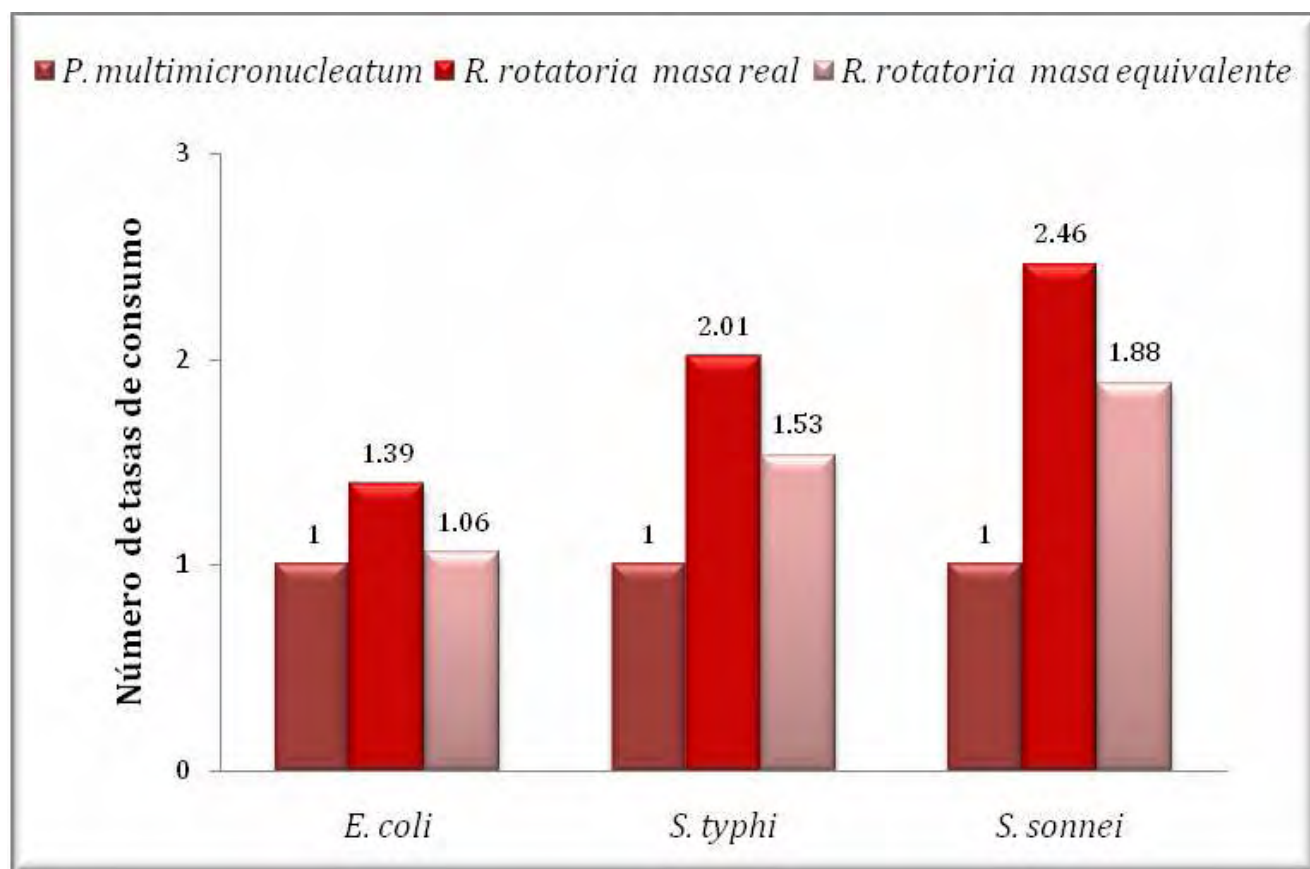


Figura 12. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real y *R. rotatoria* masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^8 bac/mL.

Tabla 10. Comparación de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real vs. masa equivalente concentración inicial 1.00×10^9 bac /mL.

Concentración inicial 1.00×10^9 bac/mL					
Presa	<i>P. multimicronucleatum</i> Masa real (*0.41 µg)	<i>R. rotatoria</i> Masa real (*0.54 µg)	No. Tasas de consumo mayor	<i>R. rotatoria</i> Masa equivalente (*0.41 µg)	No. Tasas de consumo mayor
<i>E. coli</i>	4.59×10^7	6.75×10^7	1.47	5.13×10^7	1.12
<i>S. typhi</i>	1.59×10^7	2.25×10^7	1.42	1.70×10^7	1.07
<i>S. sonnei</i>	2.16×10^7	$3.00E \times 10^7$	1.39	2.28×10^7	1.06

Nota: * Masa por individuo. ** Se está suponiendo que la biomasa de ambas especies es igualmente eficiente, tomando como base la masa de *P. multimicronucleatum*.

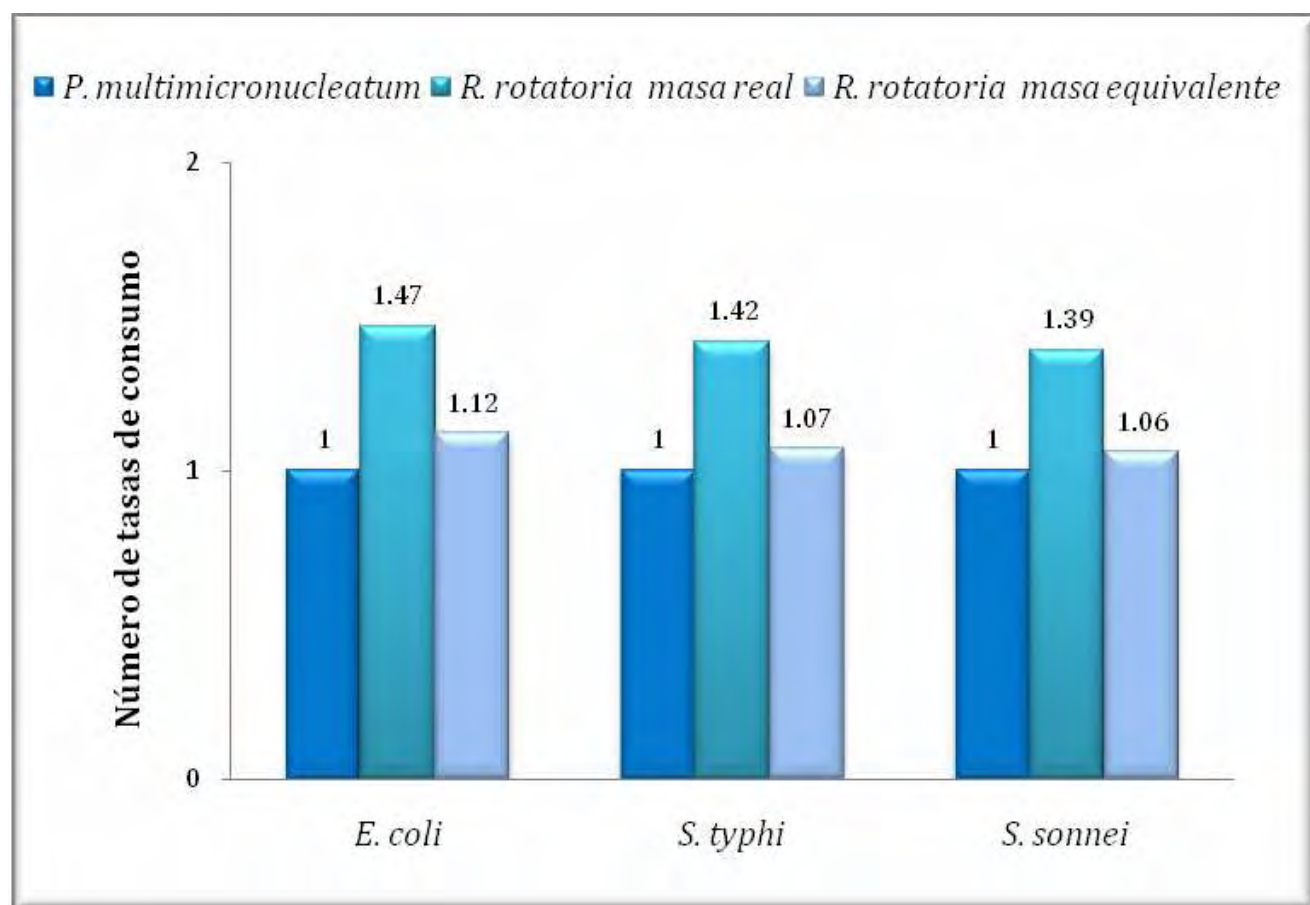


Figura 13. Gráfica de las tasas de consumo obtenidas de *P. multimicronucleatum* vs. *R. rotatoria* masa real y *R. rotatoria* masa equivalente con una concentración inicial 1.00×10^9 bac/mL.

Las mayores diferencias en las tasas de consumo de ambos depredadores se observaron con *S. typhi* siendo hasta 13.9 y 28.4 (Tablas 7, 8 y Fig.10, 11) como ya se mencionó anteriormente, lo que nos indica que *R. rotatoria* tiene una mayor capacidad de consumo en un plazo corto de tiempo, esto puede deberse a la diferencia evolutiva del *P. multimicronucleatum* con respecto a *R. rotatoria*, ya que el primero es un protista que tiene un sistema de digestión primitivo basado en la formación y fusión de diversas vacuolas digestivas (Ruppert y Barnes, 1996), el segundo es un metazoario, el cual tiene ya conformados sistemas especializados como el digestivo que lo hacen ser más eficiente, ya que son capaces de consumir partículas de mayor tamaño como los quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* (4.5-5.5 μm de diámetro) (Fayer *et al.*, 2000 ; Trout *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta los tiempos de generación de los depredadores, las tasas de consumo serían diferentes, debido a la cantidad de biomasa que se formaría de cada uno, en un plazo de tiempo más largo, ya que en este trabajo la comparación de las tasas de consumo se realizó con base en un solo individuo de cada especie con un tiempo muy corto, *R. rotatoria* tiene una mayor capacidad de consumo de bacterias patógenas, en cambio conforme el tiempo es más prolongado la capacidad de *P. multimicronucleatum* es mayor tomando en cuenta el número de individuos que se forman debido al tiempo de generación más corto de 7 a 8 horas (28°C) aproximadamente (Kippert, 1996), contra 8 a 10 días (28°C), de *R. rotatoria* (Makarewicz y Likens, 1979; Ricci, 1984), por lo que tomando en cuenta el tiempo de generación de *R. rotatoria* de 10 días, la cantidad de *P. multimicronucleatum* será de aproximadamente 58 veces mayor que la cantidad de *R. rotatoria*, por lo que su eficiencia para eliminar las bacterias patógenas será mucho mayor debido a la cantidad de biomasa formada.

También se graficaron la concentración inicial contra tasa de consumo de cada uno de los depredadores con respecto a cada presa para obtener las curvas de respuesta funcional, que es el número de presas que un depredador consume en función de la densidad de la presa (Holling, 1966). La respuesta funcional como ya se mencionó es la relación entre la densidad de la presa y el número de presas ingeridas por un depredador, por unidad de tiempo (Scheiner y Gurevitch, 2001). En general los organismos muestran uno de los tres tipos de respuesta funcional, estas curvas de respuesta parecen corresponder a tres diferentes estrategias de forrajeo: La curva de tipo I es característica de animales que consumen su alimento a una tasa proporcional a la tasa con que la encuentran, o sea que aumenta linealmente hasta un máximo que se mantiene constante con el aumento de la densidad de presas, este tipo de curvas son características de organismos filtradores; las curvas de tipo II son características de muchos microorganismos que toman cierta cantidad de tiempo para ingerir y capturar su comida (organismos invertebrados); la respuesta funcional tipo III, es indicativa de organismos que muestran un comportamiento de aprendizaje, en el que bajo un cierto umbral de densidad, los organismos no utilizan las presas para comida con gran intensidad, sin embargo por arriba de los niveles del umbral de densidad, los organismos incrementan su tasa de consumo de presas hasta un nivel de saturación (Real, 1977; Scheiner y Gurevitch, 2001). En las gráficas obtenidas de respuesta funcional de ambos depredadores, se observa que todas muestran un comportamiento de respuesta funcional tipo I, típico de los organismos filtradores como es el caso de éstos, donde la tasa de consumo de las presas se incrementa linealmente hasta alcanzar una tasa máxima de consumo, donde se mantiene constante con el aumento de la concentración de la presa (Fig. 14 y 15).

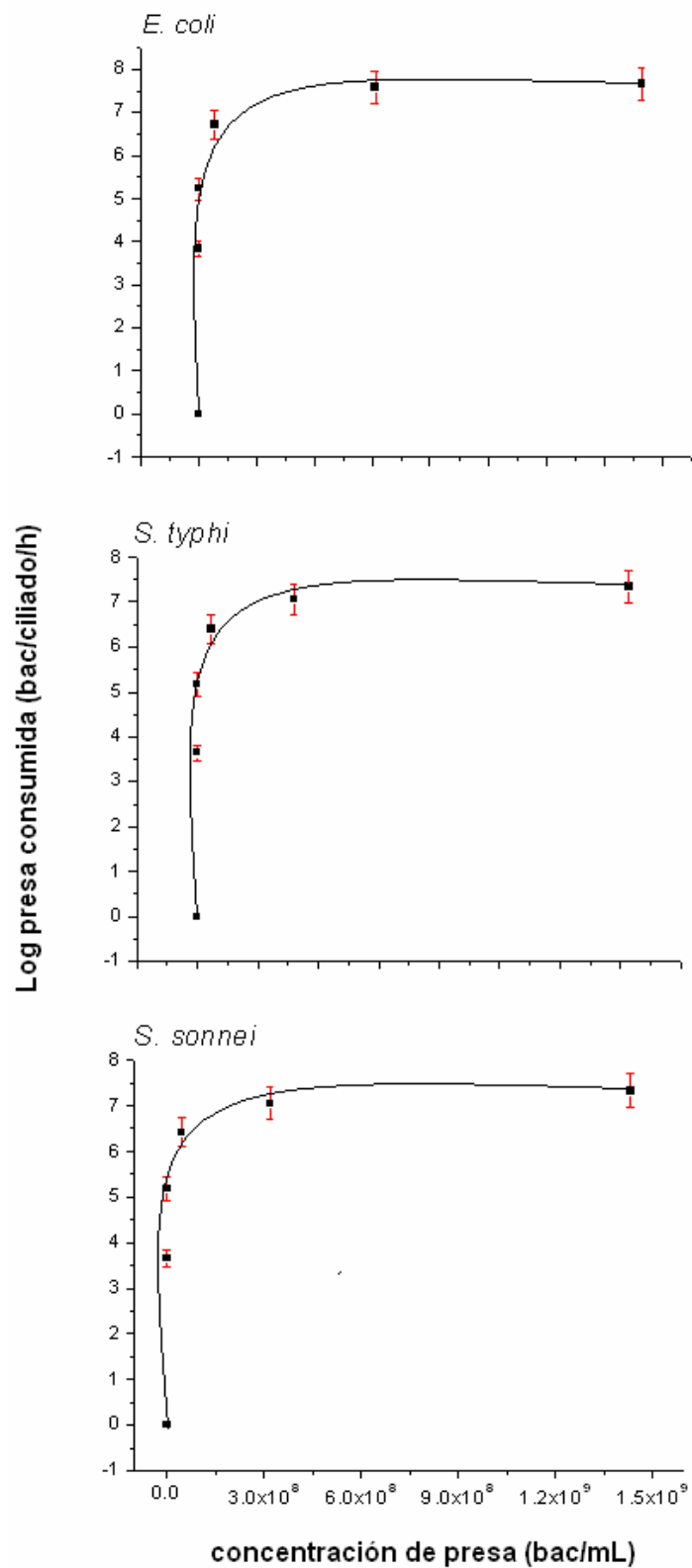


Figura 14. Curvas de respuesta funcional tipo I de *P. multimicronucleatum* con *E. coli*, *S. sonnei*, *S. typhi* (Desviación estándar promedio de 4 réplicas).

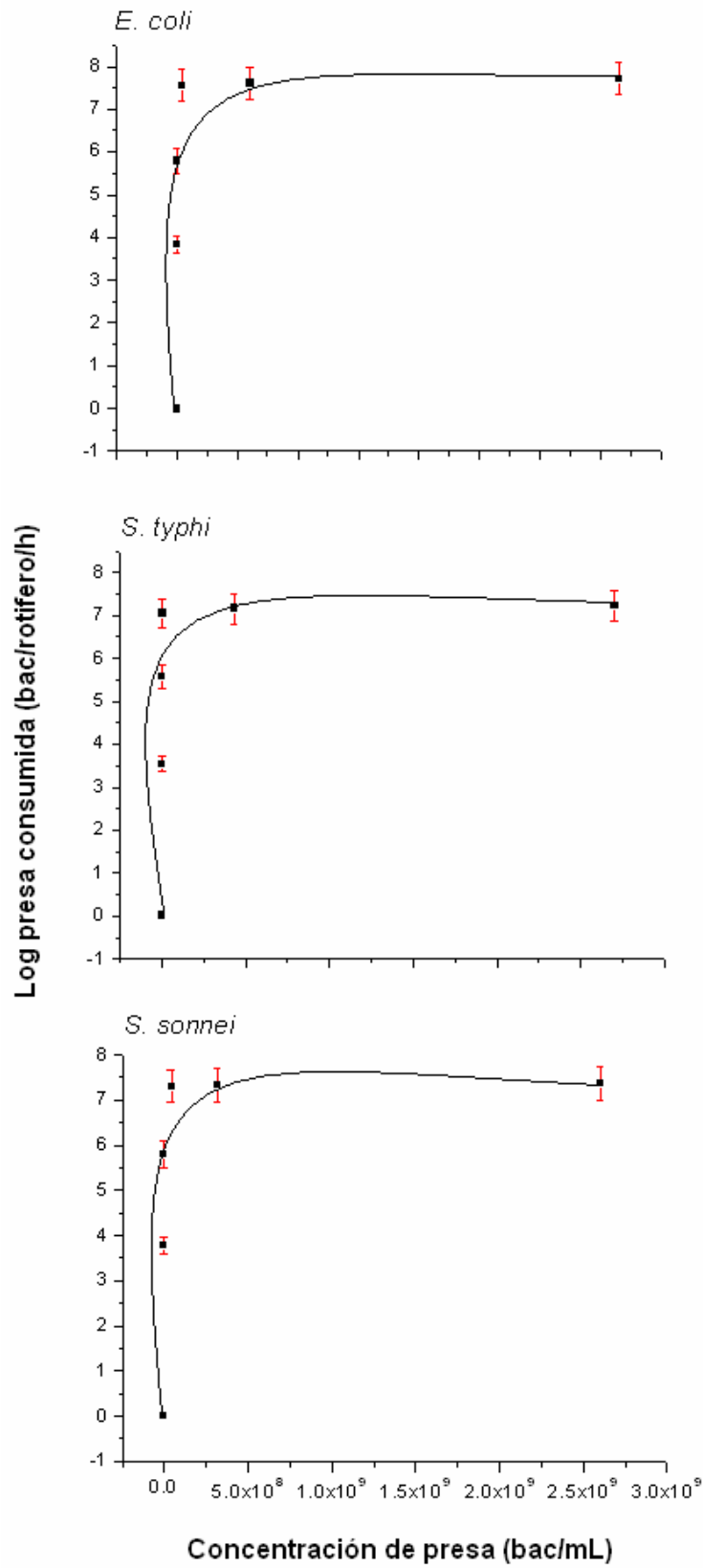


Figura 15. Curvas de respuesta funcional tipo I de *R. rotatoria* con *E. coli*, *S. sonnei*, *S. typhi* (Desviación estándar promedio de 4 réplicas)

4.3 Índice de selectividad

Como ya se mencionó las mayores diferencias se observaron con *S. typhi*, pero también se obtuvieron las tasas de consumo más bajas en todas las combinaciones, esto puede deberse a que en recientes estudios se ha descubierto que las especies de *Salmonella*, presenta al menos 70 diferentes antígenos –O de superficie, esta diversidad de antígenos permite a la bacteria tener una defensa contra ciertos tipos de depredadores en este caso los ciliados como *P. multimicronucleatum*, lo cual permite que ésta sea ignorada como alimento en cierto grado. La presión selectiva que se ejerce sobre *Salmonella*, resulta en altos niveles de diversificación antigénica, esta diversificación es reconocida con diferentes eficiencias por el ciliado, lo que permite la discriminación de la presa hasta cierto punto (Wildschutte *et al.*, 2004). Existen otros estudios donde se ha comprobado que esta bacteria también puede sobrevivir a la ingestión de los ciliados, esta asociación protozoo-bacteria, provee a la bacteria un incremento a la resistencia a la desinfección por cloración en aguas tratadas. Esta resistencia a la digestión, podría ser una evolución precursora de la patogenicidad, que hoy es un mecanismo de sobrevivencia hacia ambientes acuáticos inhóspitos (King *et al.*, 1988; Brandl *et al.*, 2005). Esto se ve reflejado de igual manera en los índices de selectividad obtenidos (Fig.9), en donde se observa que sólo en el caso de *P. multimicronucleatum*, cuando se le ofertan las tres especies de enterobacterias, tiene preferencia por *E. coli* y *S. sonnei*, evitando en su alimentación a *S. typhi*, lo que no sucede con *R. rotatoria*, indicando que no es selectiva en su alimentación con respecto a estas presas.

La obtención de los índices de selectividad, se realizó mediante los siguientes cálculos: (Krebs, 1999).

Tabla 11. Consumo de presas de un cultivo mixto para el cálculo de los índices de selectividad (promedio de 4 réplicas).

Depredadores	Presas					
	<i>E. coli</i>		<i>S. sonnei</i>		<i>S. typhi</i>	
	Ambiente	Consumida	Ambiente	Consumida	Ambiente	Consumida
<i>P. multimicronucleatum</i>	3.20 x 10 ⁵	1.56 x 10 ⁵	3.10 x 10 ⁵	1.14x 10 ⁵	3.79 x 10 ⁵	8.70 x 10 ⁴
<i>R. rotatoria</i>	3.33 x 10 ⁵	2.91 x 10 ⁵	2.66 x 10 ⁵	2.10 x 10 ⁵	3.17 x 10 ⁵	2.14 x 10 ⁵

Donde:

$$\alpha = \frac{r_i}{n_i} \left(\frac{1}{\sum \frac{r_j}{n_j}} \right)$$

α = Índice de selectividad
 $r_{i,j}$ = Proporción de la presa tipo i o j en la dieta (consumida)
 $n_{i,j}$ = Proporción de la presa tipo i o j en el ambiente

m = número de tipos de presa, en este caso se tienen diferentes tipos de presas por lo tanto:

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{3} = \mathbf{0.33.}$$

Para la interpretación de los resultados se considera si:

$\alpha = \frac{1}{m}$ La alimentación es indistinta.

$\alpha > \frac{1}{m}$ La presa tipo i es preferida en la dieta

$\alpha < \frac{1}{m}$ La presa tipo i no es preferido

Los índices de selectividad obtenidos, a partir de las diferentes proporciones consumidas de las tres bacterias utilizadas en un cultivo mixto (1:1:1), muestra que *P. multimicronucleatum* tiene preferencia en su dieta por *E. coli* y *S. sonnei*, presentando un índice de selectividad (α Manly's) $> \frac{1}{m}$, mientras que *S. typhi*, es ignorada en su dieta ya que el índice es $< \frac{1}{m}$.

En el caso de *R. rotatoria*, los índices de selectividad muestran preferencia por los tres tipos de bacterias (Tabla 12).

La gráfica obtenida para los índices de selectividad, nos muestra las diferentes proporciones en que se consumieron las distintas bacterias, para cada uno de los depredadores. La línea roja nos muestra el valor de $\frac{1}{m}$, que en este caso es de 0.33, los valores por debajo de esta indican que la presa no es preferida en la dieta, como es el caso de *P. multimicronucleatum* con *S. typhi*.

Tabla 12. Índices de selectividad de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* con respecto a tres tipos de presas (*E. coli*, *S. typhi* y *S. sonnei*).

α Manly's (Índice de selectividad)		
Depredadores Presas	<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	<i>Rotaria rotatoria</i>
<i>Escherichia. coli</i>	0.81 > 0.33 Preferida	0.59 > 0.33 Preferida
<i>Salmonella typhi</i>	0.27 < 0.33 No Preferida	0.40 > 0.33 Preferida
<i>Shigella sonnei</i>	0.51 > 0.33 Preferida	0.50 > 0.33 Preferida

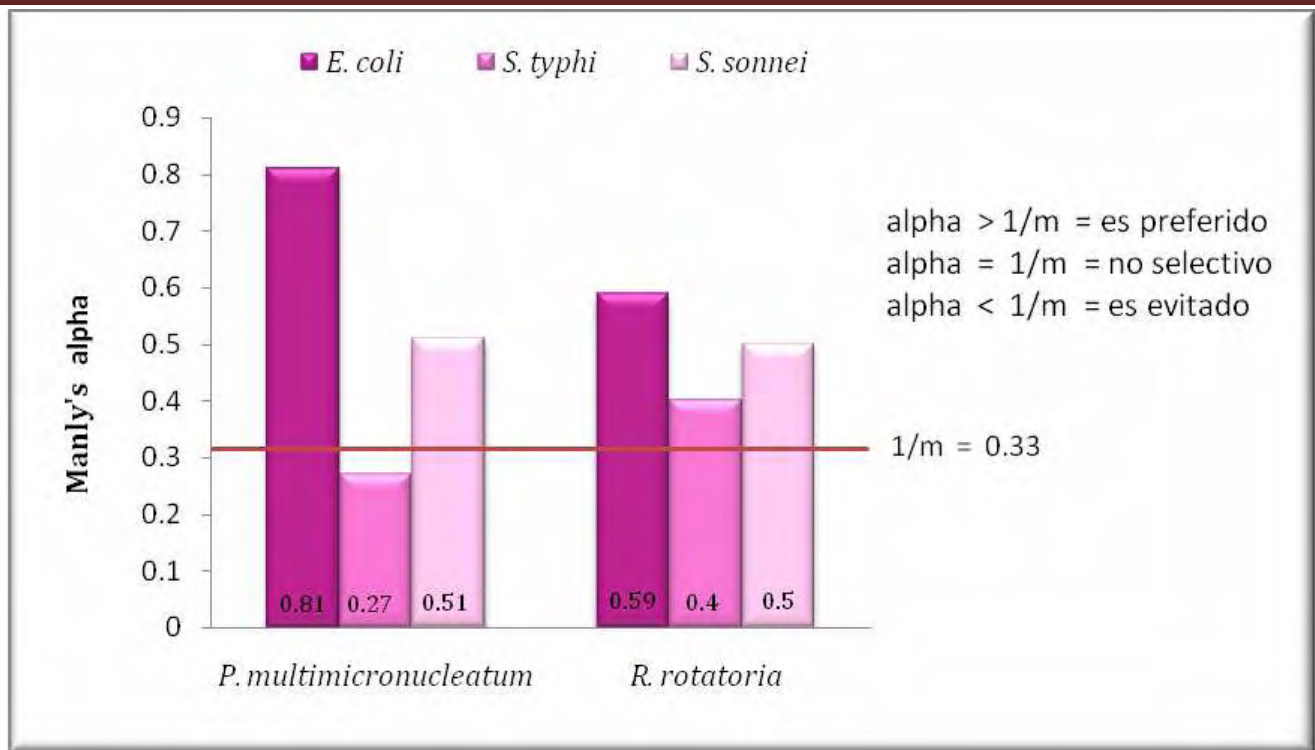


Figura 16. Índices de selectividad de *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*

4.4 Análisis Estadístico

En la Tabla 13 se presentan los resultados estadísticos obtenidos para las tasas de consumo de ambos depredadores, con cada una de las tres diferentes presas utilizadas, donde se muestran las medias, \pm el error estándar y las desviaciones estándar correspondientes.

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza, tomando como referencia las mayores tasas de consumo, las cuales se presentaron en todos los casos con una concentración del orden de 1.00×10^9 bac/mL. Los resultados indican que existen diferencias significativas entre *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria* en cuanto a las tasas de consumo de las tres especies de presas, la mayor diferencia se presentó en el caso de *S. typhi*, con un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 13. Pruebas estadísticas para las tasas de consumo, con dos depredadores y tres diferentes tipos de presas.

Depredadores	N	Medias	SD	SE
<i>E. coli</i>				
<i>P. multimicronucleatum</i>	4	5.07 x 10 ⁶	135492.92724	67746.46362
<i>R. rotatoria</i>	4	3.54 x 10 ⁷	1.04 x 10 ⁷	521815.7401
<i>S. typhi</i>				
<i>P. multimicronucleatum</i>	4	4.02x 10 ⁵	54110.99703	27055.49852
<i>R. rotatoria</i>	4	6.77 x 10 ⁶	86554.41448	43277.20724
<i>S. sonnei</i>				
<i>P. multimicronucleatum</i>	4	2.55 x 10 ⁶	358329.45734	179164.72867
<i>R. rotatoria</i>	4	2.62 x 10 ⁷	991211.38008	495605.69004

Hipótesis nula: Las medias de los datos seleccionados son iguales
 Hipótesis alternativa: Las medias de uno o más datos seleccionados son diferentes

Tabla 14. Análisis de varianza.

ANOVA

Source	D	MS	Square	F Value	P Value
Tasa máxima de consumo orden 1.00 x 10 ⁹					
<i>E. coli</i>					
Concentración	1	1.84 x 10 ¹⁵	1.84 x 10 ¹⁵	3327.32627	1.82 x 10 ⁻⁹
Error	6	3.32 x 10 ¹²	5.53 x 10 ¹¹		
<i>S. typhi</i>					
Concentración	1	18.12 x 10 ¹³	8.12 x 10 ¹³	15603.9541	1.77 x 10 ⁻¹¹
Error	6	3.12 x 10 ¹⁰	5.20 x 10 ⁹		
<i>S. sonnei</i>					
Concentración	1	1.12 x 10 ¹⁵	1.12 x 10 ¹⁵	2026.73733	8.04 x 10 ⁻⁹
Error	6	3.33 x 10 ¹²	5.55 x 10 ¹¹		

Nivel de significancia 0.05
 Las medias de las poblaciones son significativamente diferentes.

5.- CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos, para la comparación de las tasas de consumo entre *P. multimicronucleatum* y *R. rotatoria*, se puede concluir que *R. rotatoria* tiene tasas de consumo hasta 28 veces mayores que *P. multimicronucleatum* considerando la masa equivalente por individuo, bajo condiciones experimentales similares, lo que indicaría que *R. rotatoria* puede ser utilizado más eficientemente que *P. multimicronucleatum* para la desinfección biológica de aguas residuales domésticas, en un plazo corto de tiempo.

Sin embargo, al tomar en cuenta los tiempos de generación de cada microorganismos, la eficiencia de *P. multimicronucleatum* resultaría hasta 58 veces mayor que *R. rotatoria*, por la generación de un número mayor de individuos en un tiempo equivalente, que en conjunto eliminan una mayor cantidad de bacterias, con un tiempo de contacto más largo.

- De acuerdo a los índices de selectividad obtenidos, se concluye que *P. multimicronucleatum*, tiene predilección en el consumo de *E. coli* y *S. sonnei*, evitando a *S. typhi*; mientras que *R. rotatoria* no tiene preferencia por alguno de los tres tipos de presa. Los resultados sugieren que *S. typhi* puede ser tóxico para *P. multimicronucleatum*.

RECOMENDACIONES

- ❖ Es conveniente realizar más pruebas, para evaluar tasas de consumo con concentraciones iniciales más altas y poder establecer la tasa máxima específica de consumo de ambos microorganismos.
- ❖ Se recomienda también, realizar las pruebas con la biomasa generada por cada depredador, utilizando el tiempo de generación de *R. rotatoria*, para poder establecer experimentalmente la tasa de consumo a largo plazo.
- ❖ El agua residual doméstica sometida a la desinfección biológica con *R. rotatoria* y *P. multimicronucleatum*, podría ser utilizada principalmente para riego agrícola o acuicultura de peces, no obstante deberán realizarse estudios complementarios asociados con el cumplimiento de lo establecido en la NOM-003-SEMARNAT 1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.

ANEXOS

GENERALIDADES DE LAS ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias comprenden un grupo filogenético relativamente homogéneo. Caracterizadas fenotípicamente como sigue: bacilos Gram-negativos no esporulantes, anaerobias o aerobias facultativas, negativos a la oxidasa con requerimientos de nutrición relativamente simples, fermentan gran variedad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y diversos factores de virulencia (Madigan, 1997).

La familia *Enterobacteriaceae* está constituida por un gran grupo heterogéneo de bastoncillos Gram-negativos cuyo hábitat natural es el tubo intestinal del hombre. La familia incluye a los géneros: (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*; *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*). Algunos microorganismos intestinales, como *Escherichia coli* forman parte de la biota natural y producen de manera incidental enfermedad, mientras que otros como *Salmonella* y *Shigella*, son patógenas de manera regular para el hombre.

Escherichia coli

Los miembros del género de *Escherichia* son habitantes casi universales de las vías intestinales de los humanos y los animales de sangre caliente y fría (Freeman, 1989), *Escherichia* tiene un papel nutricional en las vías intestinales sintetizando vitaminas, en especial vitamina K. *Escherichia* tipo salvaje en rara ocasión muestra algún requerimiento del factor de crecimiento y es capaz de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono y energía como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc. Sólo en raras ocasiones es patógena y en general esto sucede cuando la resistencia del huésped es baja. Algunas cepas se han implicado en la diarrea de lactantes que ocurre a veces en proporciones epidémicas en las guarderías infantiles u obstétricas (Madigan, 1997), y también puede ser causante de infecciones de las vías urinarias, en personas mayores o con inmunodepresión por tratamiento quirúrgico o por exposición a radiaciones ionizantes, y de septicemias y meningitis neonatal (Freeman, 1989).

Las cepas enteropatogénicas de *Escherichia coli* se han vuelto más frecuentes con relación a las infecciones disentéricas y las fiebres generalizadas. Como se observó, estas cepas forman el antígeno K, que permite ataque y colonización del intestino delgado, y la enterotoxina responsable de los síntomas de la diarrea.

Las colonias en especial las que crecen en gelatina nutritiva, son opacas o parcialmente translúcidas, lisas y de consistencia homogénea, y presentan la forma de hoja de arce común a muchas enterobacterias. Cuando crecen en agar azul de metileno-eosina, las colonias toman un característico brillo metálico. Algunas variedades son β -hemolíticas en agar-sangre; las cepas hemolíticas aparecen con más frecuencia en los procesos patológicos que en el intestino. Estas bacterias crecen abundantemente en los medios nutritivos ordinarios y pueden cultivarse en los medios nutritivos más sencillos, es decir, los que tienen una fuente de nitrógeno inorgánico y glucosa. El crecimiento se produce a una temperatura que oscila entre 10°C y 46°C siendo el nivel óptimo de 37°C.

Fermentan rápidamente diversos azúcares como la lactosa produciendo ácido y gas. El principal ácido que se produce es el ácido láctico, así como ácido fórmico y acético en cantidades menores junto con alcohol etílico.

La mayor parte de las cepas se destruyen al exponerlas a 60°C durante 30 minutos pero pueden encontrarse ocasionalmente variedades más resistentes. Al igual que otras bacterias Gram-negativas, son más resistentes a la acción bacteriostática de los colorantes que las Gram-positivas. En consecuencia, los medios selectivos que contienen colorantes se usan comúnmente como medios de aislamiento ordinario de éstas y otras bacterias entéricas. Su capacidad para crecer en presencia de sales biliares es también marcada, y éstas suelen incorporarse a los medios selectivos.

Las cepas de *E. coli* que provocan enfermedades diarreicas se han agrupado en tres categorías según su mecanismo de patogénesis que son serológica y epidemiológicamente distintas:

- 1) enterotoxigénicas
- 2) enteropáticas
- 3) enteroinvasivas

Salmonella

Salmonella y *Escherichia* se relacionan en forma bastante estrecha; los dos géneros tienen cerca del 45 a 50% de sus secuencias de DNA en común. A diferencia de las especies del género *Escherichia*, las de *Salmonella* suelen ser patógenas ya sea en el hombre o en animales de sangre caliente. En los humanos las enfermedades más comunes causadas por *Salmonella*, son la fiebre tifoidea y la gastroenteritis. La *Salmonella* se caracteriza inmunológicamente con base en tres antígenos de superficie celular, el O, o de pared celular (somático), el antígeno H o flagelar, y el antígeno Vi (capa de polisacárido externa), que se encuentra en principio en las cepas de *Salmonella* que causan fiebre tifoidea (Madigan, 1997).

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos cuya morfología celular es muy similar a la del resto de las enterobacterias y no se pueden distinguir de ellas. Se tiñen fácilmente con los colorantes habituales y si se examinan al microscopio no aparece un ordenamiento celular aparente. Todas las especies excepto *Salmonella enteritidis* serotipos *pullorum* y *gallinarum* se mueven activamente mediante flagelos peritricos. Con microscopio óptico no se distinguen cápsulas, aunque la mayoría de las *Salmonella typhi* y en algunas otras salmonellas se encuentra un antígeno superficial, que es un polisacárido denominado Vi.

La mayoría de las especies de *Salmonella* estudiadas poseen fimbrias adhesivas, normalmente del tipo manosa-sensible. En los cultivos de estos bacilos igual que en muchas otras bacterias hay una variación de las colonias de rugosas a lisas (S-R). El cambio de liso a rugoso es manifiesto no sólo como una alteración de la morfología de la colonia sino también como una pérdida de virulencia. El cambio se refleja inmunológicamente como una pérdida de las cadenas laterales O-específicas del lipopolisacárido liso quedando el core R fundamental y el lípido A: los antígenos flagelares no se modifican con esta variación.

Las bacterias de este grupo tienen requerimientos nutrimentales sencillos, y crecen con facilidad en los medios nutrimentales habituales. Se obtiene un crecimiento adecuado en

medios sintéticos que contienen sales de amonio como fuente de nitrógeno y fuentes de carbono sencillas como la glucosa el piruvato o el lactato. La gran mayoría de las cepas no necesitan vitaminas o aminoácidos, algunas cepas de *Salmonella typhi* necesitan que se les suministre triptófano. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C pero se observa un buen crecimiento a temperatura ambiente. Son anaerobias facultativas que crecen bien en condiciones aerobias como en condiciones anaerobias.

Shigella

En general el género *Shigella* está muy relacionado con el de *Escherichia*; son tan semejantes que pueden experimentar recombinación genética unas con otras y son susceptibles para algunos de los mismos bacteriófagos. Las pruebas de homología del DNA muestran que hay cepas de *Shigella* que tienen del 70 casi el 100% de homología con *E. coli*. En contraste con *Escherichia*, *Shigella* es comúnmente patógena para el hombre, causando una grave gastroenteritis llamada disentería bacilar. La *Shigella dysenteriae* se transmite en los alimentos y a través del agua, y es capaz de invadir las células del epitelio intestinal. Una vez establecida produce una endotoxina y una neurotoxina que presentan efectos enterotóxicos (Madigan, 1997).

El género *Shigella* está integrado por bacilos Gram-negativos, no esporulados relacionados con el resto de las otras bacterias entéricas.

Algunas de ellas se parecen a las formas anaeróbicas de *Escherichia* y a los bacilos tifoideos que fermentan carbohidratos produciendo ácidos sin liberar gas; ninguno de los bacilos disentéricos es móvil de ahí que no contengan antígenos flagelados. Como grupo difieren entre sí por sus características bioquímicas e inmunológicas.

Las especies del género *Shigella* son aerobias y anaerobias facultativas y su temperatura al final del crecimiento es de 37 °C. Sus requerimientos nutritivos no son complejos ya que crecen en medios nutritivos ordinarios que contienen peptonas y extractos de carne. Fermentan glucosa sin formar gas, dando lugar a los mismos productos finales que el resto de las formas entéricas: ácido láctico junto con cantidades menores de fórmico y acético y de alcohol etílico. Al igual que otros bacilos Gram- negativos son relativamente resistentes a la acción bacteriostática de los colorantes, y estas sustancias pueden incorporarse a medios diferenciales para su aislamiento.

Según la clasificación actual se reconocen cuatro especies dentro del género *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, separadas principalmente por múltiples reacciones bioquímicas (Brook, 1990) La fermentación de manitol es uno de los caracteres más típicos. Todas las especies, excepto *Shigella dysenteriae*, fermentan en manitol. *Shigella sonnei* difiere de las otras especies fermentadoras de manitol por la lenta fermentación de la lactosa (de cuatro a siete días), Las fermentaciones son anaerobias, sin formación de gas.

GENERALIDADES DE *Paramecium*

Paramecium es uno de los géneros de protozoos ciliados más conocidos, y distribuidos en el mundo además de que se cultiva muy fácilmente en el laboratorio.

Los paramecios se encuentran generalmente en estanques, charcas, lagos, ríos de flujo lento y arroyos, se encuentran en toda el agua dulce estancada o tranquila, se conocen también especies que viven en el agua de mar y algunas se pueden encontrar en el agua residual o en el interior de algunos estanques que contienen alguna sal (Kudo, 1985).

El mayor factor que condiciona la presencia de *Paramecium* es la comida, pero otros factores también pueden influenciar como el pH, oxígeno entre otros. Se alimentan esencialmente de bacterias, pero también de materia orgánica en descomposición como desechos descompuestos de hojas y otros vegetales (Ruppert y Barnes, 1996). Prefieren ambientes con pH cerca de la neutralidad (6.5 – 7.5). Sin embargo los paramecios han mostrado habilidades para adaptación a diversos cambios de pH, temperatura, concentración de sales etc. Esta gran habilidad de adaptación explica la amplia distribución de las diferentes especies en todos los continentes.

Los paramecios tienen alrededor de 10,000-14,000 cilios en la superficie de la célula y se mueven alrededor de 1000 μm por segundo. En el paramecio la dirección del movimiento ciliar eficaz es oblicua respecto al eje longitudinal del cuerpo, esto hace que el ciliado nade en espiral al mismo tiempo que gira sobre su eje longitudinal, este movimiento puede invertirse y con ello el paramecio retrocede como una reacción de evasión ante alguna sustancia u objeto indeseable (Ruppert y Barnes, 1996).

Paramecium multimicronucleatum.

Es un organismo unicelular, alargado su longitud va de 250 μm y 56 μm de anchura (medidas obtenidas en el presente trabajo). El aspecto general es el de una suela de zapato o un puro, más o menos ancho en el centro, disminuyendo hacia las extremidades; el extremo anterior es ligeramente agudo y el posterior redondeado, con varios cilios “caudales” más largos.

Infraciliatura somática

La infraciliatura somática está compuesta por 117-122 cinetias que presentan un tamaño y una disposición diferente dependiendo de su situación topográfica. Las que corresponden a la cara ventral del organismo se inician en el lado derecho de la parte anterior a nivel de la sutura pre-oral, bordean al citostoma curvándose para terminar en la posición posterior a nivel de la sutura post-oral. Las cinetias correspondientes a la cara dorsal tienen una disposición meridiana. El espacio entre cada dos cinetias tiene una longitud de 3.5 micras.

Ventralmente, a nivel de la sutura post-oral y en posición subterminal se localiza el citoprocto. En la cara dorsal se localizan los poros de las vacuolas contráctiles, el posterior entre las cinetias dorsales 44-45 y el anterior entre las cinetias dorsales 45-46. Las cinetias tanto ventrales como dorsales terminan al centro del polo antapical del organismo. La película presenta un aspecto de celdillas rectangulares que cubren todo el organismo.

Aparato nuclear

Incluye un macronúcleo y varios micronúcleos (tres a 12 generalmente cuatro): estos últimos son pequeños y difíciles de observar “*in vivo*” pero puede ser observado mediante técnicas micrográficas. El micronúcleo es de forma esférica, se encarga del intercambio genético, da origen al macronúcleo, este último es denominado vegetativo ya que no es decisivo en la reproducción. El macronúcleo es oval o adquiere la forma de habichuela y se encuentra situado inmediatamente por delante del punto medio del cuerpo. Es esencial para el desarrollo normal de las funciones metabólicas, y además depende del mismo el control de los genes del fenotipo. Los paramecios se reproducen por fisión binaria y en intervalos se someten a dos tipos de reorganización nuclear que son la conjugación y la autogamia. Esta reorganización nuclear parece que tiene un efecto rejuvenecedor y resulta necesaria para la fisión asexual, se ha demostrado que en el *Paramecium* sólo pueden pasar por unas 350 generaciones asexuales continuas. Si no ocurriese la reorganización nuclear, la línea asexual (o clon) se muere, aparentemente debido a la disminución de la función del macronúcleo (Ruppert y Barnes, 1996).

Vacuolas contráctiles

Generalmente dos, una anterior y otra posterior y tienen movimientos alternados de contracción (sístole) y dilatación (diástole) y están conectadas con sistemas de canales colectores que le sirven como reguladoras del equilibrio hídrico. Las vacuolas se encuentran en la región más profunda del ectoplasma y se vacían a través de un poro.

Vacuolas alimenticias

Comienzan a formarse en la base del citostoma correspondiendo a un fenómeno de fagocitosis. Una vez fuera del sistema bucal, las vacuolas hacen un circuito en el citoplasma; este circuito es más o menos regular (ciclosis) después se van hacia la parte anterior antes de llevarlas de regreso a la parte posterior donde está situado el citoprocto que se abre para expeler sus desechos. El *Paramecium* es considerado como bacterívoro, ya que se alimenta de bacterias, mediante la interceptación directa de los mismos por su citostoma. El proceso de alimentación se lleva a cabo mediante la retención de las partículas que son introducidas a través del citostoma hacia la vacuola alimentaria en formación que cuando alcanza un determinado tamaño se desprende (Figura 17) y en su lugar se forma una nueva vacuola. La vacuola digestiva formada se fusiona con vesículas ácidas (acidomas), y se reduce alguna membrana celular, por lo que la vacuola disminuye su tamaño hasta un 50%, y el pH baja de 7 a 3. En este momento se unen lisosomas a la vacuola, pero los contenidos son demasiado ácidos para la acción enzimática, por lo que por razones aún desconocidas el pH aumenta a un valor de 4.5 a 5 iniciando la digestión. Al término de la digestión la vacuola residual se dirige hacia el citoprocto, en la superficie del cuerpo y expulsa su contenido. El ciclo de digestión en el *Paramecium multimicronucleatum* es bastante corto, después de 40 minutos alrededor del 90% de las células han completado la digestión y defecado (Ruppert y Barnes, 1996; Masakishida y Fok, 2001). En la cara ventral, detrás del citostoma, a la mitad entre ésta y la parte posterior, está situado el citoprocto, por donde se excretan los residuos de la digestión de las vacuolas alimenticias.

Citostoma e Infraciliatura bucal

En la parte ventral hay una depresión; ésta se localiza en la parte anterior que se extiende por debajo de la mitad o dos tercios del ciliado, curvado ligeramente hacia la izquierda, el citostoma está situado en la parte posterior más lejana de la depresión, al final de la cual se forman las vacuolas alimenticias (Madrazo, 1972).

La abertura bucal localizada ventralmente en posición subecuatorial presenta una infraciliatura vestibular formada por once cinetias. Los organoides bucales consisten en la membrana endoral, dos penículos y el cuádrulo, la membrana endoral presenta 26 gránulos basales dispuestos irregularmente. El penículo ventral y el penículo dorsal consisten cada uno de cuatro filas de cinetosomas del mismo tamaño, siendo el penículo dorsal de mayor longitud que el ventral. El cuádrulo está formado por cuatro hileras de cinetosomas separadas entre sí y colocadas en la parte más profunda del citostoma. El conjunto de estructuras infraciliares bucales tiene un aspecto tubular abierto en forma de lengüeta con sus bordes doblados hacia arriba y hacia adentro (Madrazo, 1972).

Ubicación taxonómica de acuerdo a Lynn y Small, (2000).

Phylum	Ciliophora Doflein, 1901
Subphylum:	Intramacronucleata Lynn, 1996
Clase:	Oligohymenophorea Puytorac <i>et al.</i> , 1974
Subclase:	Peniculia Fauré-Fremiet en Corliss, 1956
Orden:	Peniculida Fauré-Fremiet en Corliss, 1956
Familia:	Parameciidae Dujardin, 1840
Género:	<i>Paramecium</i> O.F müller, 1773
Especie:	<i>P. multimicronucleatum</i> Powers y Mitchell, 1910

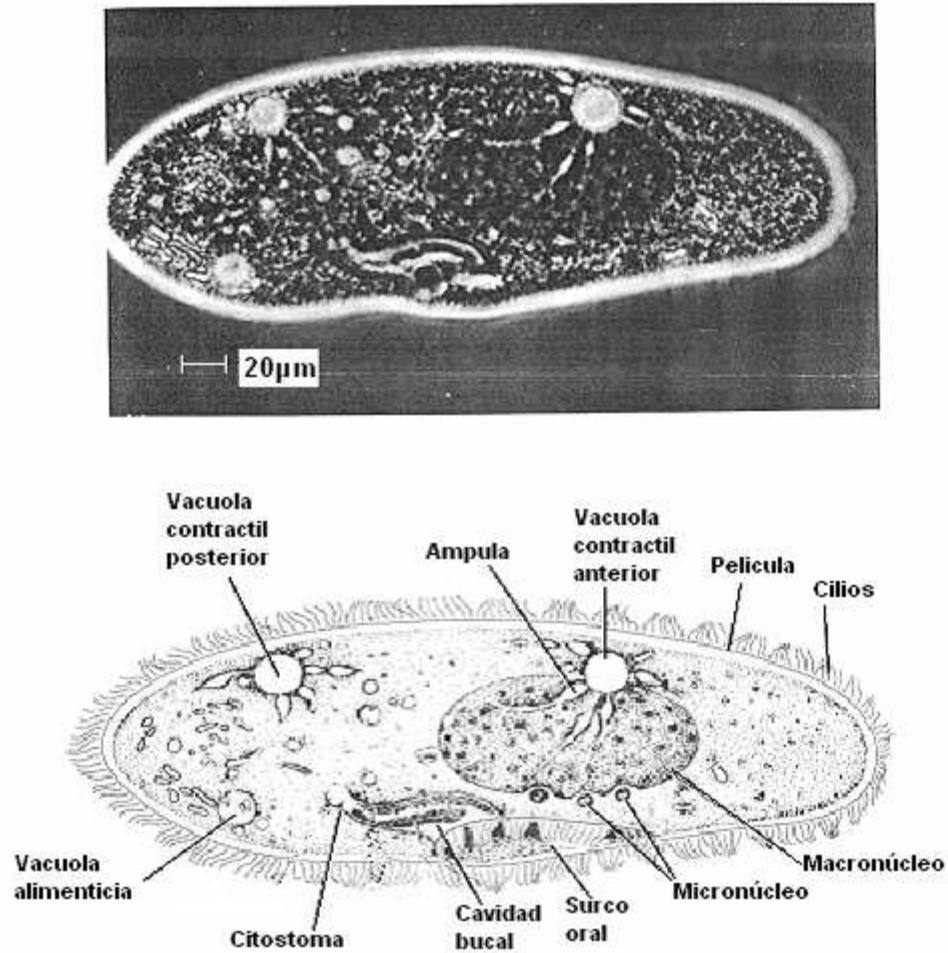


Figura 17. Micrografía y esquema del *P. multimicronucleatum*, utilizando contraste de fases. Se muestra la posición fija de las vacuolas contráctiles en diástole, y la formación de la vacuola alimenticia (Sydney *et al.*, 1987).

Microfotografías de *Paramecium multimicronucleatum*



Figura 18. Microfotografías de *P. multimicronucleatum* 40X en contraste de fases



Figura 19. Microfotografías de *P. multimicronucleatum* a 40X, donde se observa la presencia de varios micronúcleos a un costado del macronúcleo, con una tinción de carbonato de plata.



Figura 20. Microfotografías de *P. multimicronucleatum* a 40X. Donde se observa el citostoma y el macronúcleo (tinción de carbonato de plata).



Figura 21. Microfotografías de *P. multimicronucleatum* a 40X. Se observa el macronúcleo (tinción de hematoxilina de Harris).

GENERALIDADES DE *Rotaria rotatoria*

Los rotíferos son metazoarios microscópicos que contienen tejidos y órganos genuinos (Lindemann y Kleinow, 2000). Estos organismos multicelulares halozoicos se desarrollan a partir de embriones. Son netamente cosmopolitas en su distribución, pues casi todas las especies viven en el mundo entero, aunque algunas quedan restringidas a regiones determinadas. La familia rotífera posee animales de agua dulce muy conocidos y abundantes, generalmente denominados rotíferos, o “animálculos que ruedan”. El nombre deriva de la presencia de una corona ciliada que cuando entra en actividad por movimientos de los cilios, toma el aspecto de una rueda giratoria en muchas especies (Fig. 22). Aunque existen algunas especies marinas y otras, viven en ciénegas, la mayor parte residen en agua dulce. Se han descrito aproximadamente 1,500 especies. Algunas de ellas pueden alcanzar 3 mm de longitud, pero casi todos los rotíferos tienen aproximadamente el tamaño de los protozoarios ciliados, y se encuentran entre los metazoarios más pequeños. Una gran parte de los rotíferos son solitarios de movimientos libres, pero hay especies sésiles y también formas coloniales. El cuerpo suele ser transparente, aunque algunos son verdes, anaranjados, rojos o pardos, según la coloración del aparato digestivo.

Estructura externa

El cuerpo alargado o secular, que es relativamente cilíndrico, puede dividirse en una breve región anterior, un tronco largo, que forma la mayor parte del cuerpo, y un pie terminal. (Fig. 22). El cuerpo está siempre cubierto por una cutícula netamente definida, que puede ser anular, parecer esculpida, o estar ornamentada de diferentes formas. La parte anterior que puede ser ancha o estrecha forma la región de la cabeza y ostenta un órgano ciliado llamado corona, característico de todos los miembros de la clase. En etapas primitivas, se cree que la corona consistió en una gran área ciliada ventral, llamada campo bucal. Si los rotíferos evolucionaron, como generalmente se cree de un pequeño antecesor ciliado y reptante, entonces quizá el campo bucal, represente un vestigio de la ciliación ventral ancestral.

Desde el campo bucal los cilios se extienden alrededor de los bordes anteriores de la cabeza para formar un anillo en forma de corona llamada banda circumapical. El área comprendida en el interior del anillo, la cual está desprovista de cilios, recibe el nombre de campo apical. Los diferentes tipos de coronas características de los diversos grupos de rotíferos se cree derivan de este plan estructural básico. Durante la evolución de dichos tipos se pierden o adquieren desarrollo superior varias partes del campo bucal y la banda circumapical. Con alguna frecuencia ciertos cilios se modifican para formar cirros, membranelas o cerdas.

La corona de los rotíferos de la clase Bdelloidea que incluyen muchas especies de agua dulce (*Rotaria rotatoria*), representa una modificación más de las dos bandas ciliadas. El círculo anterior de cilios (tronco) se eleva sobre un pedestal y se divide en dos discos llamados troncales. El círculo posterior pasa alrededor de la base de los pedestales y corre por debajo de la boca. En las especies actuales, las membranelas en movimiento de los discos troncales parecen dos ruedas giratorias en la extremidad anterior del cuerpo, y es precisamente de este tipo de corona que derivan los nombres de rotífero y de animálculo que rueda. Los discos troncales se utilizan para nadar y para alimentarse, y los pedestales pueden retraerse cuando los discos no funcionan.

La cabeza en los individuos de la clase Bdelloidea posee una prolongación mediodorsal llamada *rostrum*, que lleva en su punta cilios y cerdas sensoriales. Otras estructuras cefálicas incluyen el órgano retrocerebral y los ojos, cuyo número y localización varían. El tronco alargado o sacular forma la mayor parte del cuerpo. La cutícula se engruesa con frecuencia para formar una cubierta llamada loriga. Como carácter típico cabe citar la presencia en el tronco de tres pequeñas proyecciones llamadas antenas, dos de ellas laterales dirigidas hacia atrás, y la otra que a veces es un par situada más anteriormente en la superficie dorsal. Las antenas con frecuencia llevan en sus puntas cerdas sensoriales.

La porción terminal del cuerpo llamada pie, es mucho más estrecha que la región del tronco. La cutícula es frecuentemente anillada y en muchos ejemplares de la clase Bdelloidea, los segmentos resultantes, o articulaciones del pie, pueden enchufarse, a modo de las piezas de un tubo de telescopio, en las articulaciones similares, aunque más grandes, del tronco; incluso la cabeza puede ser retraída de esta manera (Fig. 22). En el extremo del pie suelen observarse de una a cuatro prolongaciones llamadas dedos. Tanto en los rotíferos reptantes como en los sésiles, el pie es utilizado como órgano de fijación; en estos grupos el pie posee de dos a treinta masas sincitiales glandulares llamadas glándulas pedales, productoras de una sustancia adhesiva que es llevada al exterior por conductos que se abren sobre los dedos o en otras partes del pie. En algunos miembros de la clase Bdelloidea, como *Rotaria* las glándulas pedales se abren en el extremo de dos espolones cónicos largos y divergentes localizados cerca del extremo del pie. Desde el punto de vista funcional los espolones substituyen a los dedos, que en estos géneros son sumamente pequeños.

Pared corporal y pseudoceloma

La cutícula es secretada por la epidermis subyacente, la cual es delgada y sincitial y posee siempre un número constante de núcleos. Debajo de la epidermis están los músculos corporales, algunas de cuyas fibras son circulares (músculos anulares) y algunas longitudinales (músculos retractores). El pseudoceloma se encuentra debajo de la pared corporal rodea al intestino y los otros órganos internos, y está ocupado por líquido y una red sincitial de células amiboides ramificadas.

Locomoción

Los rotíferos se desplazan por movimientos reptantes como sanguijuelas sobre objetos sumergidos en el fondo, o mediante natación. La propulsión en este último caso depende de los latidos de los cilios de la corona, y los movimientos reptantes son ayudados por el pie. Los miembros de la clase Bdelloidea utilizan ambos métodos de locomoción. Cuando el animal se arrastra se retrae la corona, y el pie se adhiere al substrato valiéndose de la secreción adhesiva producida por las glándulas pedales. El animal extiende el cuerpo, fija el *rostrum* y separa el pie para desplazarse hacia adelante y asir de nuevo el substrato.

Nutrición

La boca de los rotíferos es típicamente ventral y usualmente rodeada por alguna parte de la corona. La farínge o mástax es característica de todos los rotíferos y es un rasgo distintivo de la clase. El mástax suele ser oval o alargado y rico en músculo y en sus paredes internas destacan siete grandes piezas o trofos, que se proyectan, compuestas de un material mucopolisacárido ácido. El mástax se utiliza para la captura y maceración del alimento, y su estructura varía mucho, por lo tanto, según el tipo de hábitos alimenticios. Los rotíferos se

alimentan por el método de la suspensión o son rapaces. Los que utilizan el primero de estos métodos, entre los cuales destacan como más notables los pertenecientes a la clase Bdelloidea se alimentan con partículas orgánicas diminutas que son llevadas a la boca por corrientes de agua producidas por los cilios de la corona. En estos animales las membranelas de cada disco troncal crean una corriente circular. Estas dos corrientes que se mueven en direcciones opuestas arrastran las partículas alimenticias hacia la línea media de la cabeza, de donde pasan a la boca por un surco situado entre los círculos anterior y posterior de las membranelas. El mástax de los alimentadores por suspensión está adaptado para triturar, dos de las piezas son muy grandes, rugosas y parecidas a placas, las cuales se oponen entre sí, al mismo tiempo que las rugosidades forman una superficie triturante. Es muy probable que el mástax de este tipo de alimentadores actúe también como bomba y aspire las partículas que se han reunido en la boca.

Situadas en las paredes del mástax pueden observarse de dos a siete masas glandulares llamadas glándulas salivales, las cuales se abren por intermedio de conductos inmediatamente delante del mástax propiamente dicho. Un esófago tubular, ciliado o revestido de cutícula, establece la unión entre la farínge y el estómago, en esta unión hay un par de glándulas gástricas, cada una de las cuales se abre separadamente por un poro de cada lado del aparato digestivo. El estómago es un saco voluminoso que pasa a un intestino breve. Los órganos excretorios y el oviducto se abren en el extremo terminal del intestino, el cual en ocasiones se llama cloaca. El ano se abre en la superficie dorsal cerca de la parte posterior del tronco. Se cree que las glándulas gástricas y quizás las salivales producen enzimas; la digestión probablemente es extracelular y la absorción se lleva a cabo en el estómago.

Equilibrio hídrico

Se destaca la presencia de dos protonefridios, uno a cada lado del cuerpo. Los dos túmulos protonefridiales desembocan en una vejiga que se abre en el lado ventral de la cloaca; en los miembros de la clase Bdelloidea existe una constricción entre el estómago y el intestino, y una cloaca algo bulbosa actúa como vejiga. El contenido de la cloaca o vejiga es expulsado por el ano mediante un mecanismo de constricción; a menudo las frecuencias de la pulsación fluctúa entre una y cuatro veces por minuto, y lo elevado de la misma constituye prueba de la función osmorreguladora de los protonefridios, el agua entra a la boca mediante deglución y no por penetración de la cutícula.

Sistema nervioso

El cerebro consta de una masa ganglionar dorsal situada sobre el mástax y da origen a un número variable de nervios que se prolongan hasta los órganos de los sentidos, situados en la parte anterior, y en otras partes del cuerpo. Los órganos de los sentidos constan de cerdas sensoriales situadas en diversas partes de la corona ciliada, de dos fosas ciliadas y de uno a cinco ojos. Estos ojos son simples ocelos compuestos por cierto número de células pigmentadas fotorreceptoras.

Reproducción

La reproducción es enteramente sexual, y como la mayor parte de los asquelmintos, los rotíferos son dioicos. Los machos son siempre más pequeños que las hembras, y algunas estructuras de los mismos, como por ejemplo la cloaca, esta degenerada o no existe. La partenogénesis es frecuente, y en la clase Bdelloidea no se ha informado nunca de la existencia de machos. El sistema reproductor de la hembra consta en la mayoría de las especies de un solo ovario y de un vitelario productor de vitelo, formando ambos un cuerpo único (germovitelario) situado en la parte anterior del pseudoceloma. Los huevos pasan luego, a través de un oviducto, a la cloaca.

Cada núcleo ovárico forma un huevo, y como en la mayor parte de las especies solamente existen de diez a veinte núcleos. Cada huevo está envuelto en una cáscara y en cierto número de membranas ovulares, secretadas por el mismo huevo. Los huevos se fijan a objetos sobre el substrato o pueden adherirse al cuerpo de la hembra. En los miembros de la clase Bdelloidea, en que no existe machos conocidos, y el desarrollo es partenogénico, se producen huevos que maduran en las hembras. Partenogénesis y la producción de huevos de cáscara delgada que incuban en poco tiempo (amíctico) y huevos latentes, son particularmente características de rotíferos que viven en estanques y corrientes temporales, sujetos a tensión ambiental.

Ubicación taxonómica

Phylum	Rotifera Cuvier, 1817
Clase:	Eurotatoria De Ridder, 1957
Subclase:	Bdelloidea Hudson, 1884
Familia:	Philodinidae Ehrenberg, 1838
Genero:	<i>Rotaria</i> Scopoli, 1777
Especie:	<i>R. rotatoria</i> Pallas, 1776

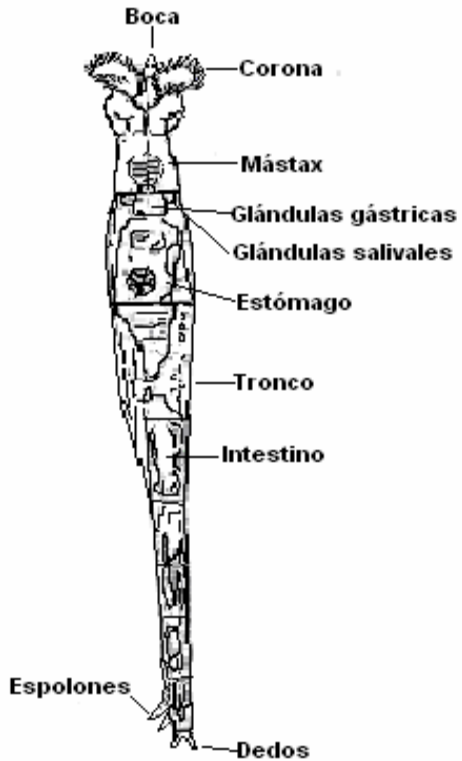


Figura 22. Esquema del rotífero *Rotaria rotatoria*. Se muestra la estructura sistémica. (Doner, 1965).

Microfotografías de *Rotaria rotatoria*



Figura 23. Microfotografía de *R. rotatoria* 10X campo claro. Se puede observar claramente la corona, el mástax y el estómago.

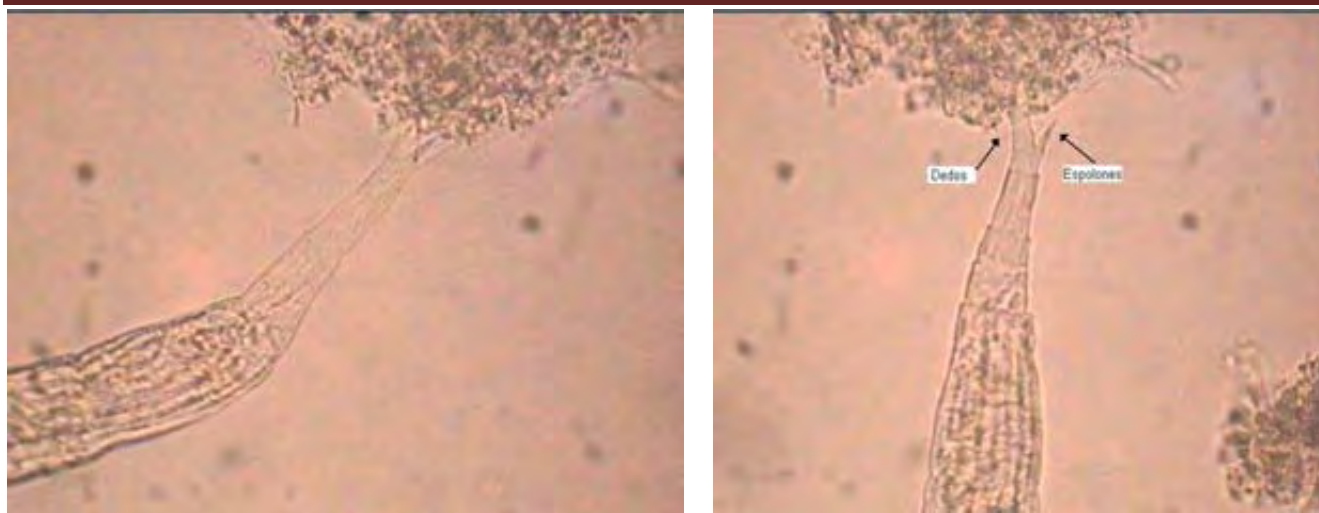


Figura 24. Microfotografía de *R. rotatoria* 40X campo claro. Se observa claramente los espolones y los dedos con los que se fija a la materia orgánica.

LITERATURA CITADA

- Acher, A., Fischer, E., Turnheim, R., y Manor, Y. 1997. Ecologically friendly wastewater disinfection techniques. *Water Res.* 6: 1398-1404.
- Aguilera, L. D. 2002. Dinámica poblacional de 4 especies seleccionadas de Cladocera (Cladocera: Crustacea) realizada en aguas residuales urbanas parcialmente tratadas. Tesis Biol. FES-I. UNAM. México.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater analysis. American Public Health Association. AWWA and WPCF, Washington D.C., E.U.A. 1924 pp.
- Ausland, G., Stevik, T. K., Hanssen, J. F., Kohler, J. C. y Jenssen P. D. 2002. Intermittent filtration of wastewater removal of fecal coliforms and fecal streptococci. *Water Res;* 36: 3507-3516.
- Aysegul, L. 2003. Formation of trihalomethanes by the disinfection of drinking water. *Indoor and Built Env.* 12 (6): 413-417.
- Beaver, P. CH., Jung, R. C. y Cupp, E. W. 1992. Parasitología Clínica. 2a ed. Salvat. México. 342 pp.
- Bitton, G. 1994. Wastewater microbiology. John Wiley and Sons. Inc. p. 101-111.
- Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F. y Berk, S. G. 2005. Enhanced Survival of *Salmonella enterica* in Vesicles Released by a Soilborne *Tetrahymena* Species. *Appl. Env. Microbiol;* 71(3): 1562-1569.
- Brooks, G. F., Janet, B. y Stephen, A. M. 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Ed. Manual Moderno. 16a. Edición, México. p. 127-140.
- Cáceres, L. O. 1990. Desinfección del agua. 1a ed. Perú (Lima): Ministerio de salud OPS/OMS. 25 pp.
- Collado, L. R. 1992. Depuración de aguas residuales en pequeñas comunidades. Colegio de Ingenieros de Caminos Canales y Puertos. Colección Señor No. 12. Editorial Paraninfo S. A. Madrid, España. p. 49-72.
- Curds, C. R. y Cockburn, A. 1971. Continuous monoxenic culture of *Tetrahymena pyriformis*. *J. of Gen. Appl. Microbiol.* 66: 95-108.
- Curds, C. R y Vandyke, J. M. 1996. The feeding habits and growth rates of some fresh-water ciliates found in activated-sludge plants. *J. Appl. Ecol,* 3 (1): 127.137.
- Davies, R. L. y Etris, S. F. 1997. The development and functions of silver industrie water purification and disease control. *Catal. Today.* 36: 107-14.
- Do, M. T., Birkett, N. J., Johnson, K. C., Krewski, D. y Villeneuve, P. 2003. Chlorination disinfection by-products and pancreatic cancer risk. *Environ. Health Persp.* 113 (4): 418-424.
- Donner, J. 1965. Ordnung Bdelloidea. Ersehieneu im Akademie-Verlag Gmbil. Berlin. p. 164-181.
- Downing, J. A. y Rigler, F. H. 1984. A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. 2ª ed. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. p. 228-265.
- Droste, R. L. 1997. Theory and practice of water and wastewater treatment. 1a ed. John Wiley and Sons. E.U.A. 124 pp.
- Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E. y Cole, R. 2000 Rotifers ingest Oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. microbiol.* 47 (2): 161-163.

- Fernandez-Galiano, D. 1976. Silver impregnation of ciliated Protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95: 557-560.
- Franceschi, M., Girou, A., Carro, D. M., Maurette, M.T. y Puech, C. E. 2002. Optimization of coagulation-flocculation process of raw water by optimal design method. *Water Res.* 36: 3561-3572.
- Freeman, B. A. 1986. *Microbiología de Burrows*, 22a. ed. Ed. Interamericana, España. 210 pp.
- González, J. M. 1999. Bacterivory rate estimates and fraction of active bacterivores in natural protist assemblages from aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1463-1469.
- González, J. M., Iriberry, J., Egea, L., y Barcina, I. 1992. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (3): 998-1004.
- Hahn, W. M. y Höfle, G. M. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *Microbial Ecol.* 35 (2): 113-121.
- Holling, C.S. 1959. The components of predation as revealed by a study of small mammal predation of the European Pine sawfly. *Can. Entomol.* 91: 293-332.
- Holling, C.S. 1966. The functional response of invertebrate predators to prey density. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 48: 1-86.
- IMTA. 1997. Informe final "Tecnologías de punta para el reúso de aguas residuales en México". Convenio SGP-IMTA. 89-100.
- Jiang, L. y Krumins, A. J. 2006. Emergent multiple predator effects in an experimental microbial community. *Ecol. Res.* 21 (5): 723-731.
- Kampioti, A. A. y Stephanou, E. G. 2002. The impact of bromide on the formation of neutral and acidic disinfection by-products (DBPs) in Mediterranean chlorinated drinking water. *Water Res.* 36: 2596-2606.
- King, C. H., Shotts, E. B., Wooley, R. E. y Porter, K. G. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol.* 54(12): 3023-3033.
- King, W. D., Marrett, L. D. y Woolcott, C. G. 2000. Case-Control Study of Colon and rectal cancers and chlorination by-products in treated water. *Cancer Epidem. Biomar.* 9: 813-818.
- Kippert, F. 1996. An ultradian clock controls locomotor behavior and cell division in isolated cells of *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell Sci.* 4: 867-873.
- Krebs, Ch. J. 1999. *Ecological Methodology*. 2ª ed. Addison-Welsey, Educational Publishers, Inc. E.U.A. p. 475-495.
- Kudo, R. 1985. *Protozoología*. Continental Inc. México. 240 pp.
- Lazarova, V., Janex, M. L., Fisksdal, L., Oberg, C., Barcina, I. y Pommepuy, M. 1998. Advanced wastewater disinfection technologies: short and long term efficiency. *Water Sci. Technol.* 12: 109-117.
- Lindemann, N. y Kleinow, W. 2000. A study of rotifer feeding and digestive processes using erythrocytes as microparticulate markers. *Hidrobioloia* 435: 27-41.
- Luna-Pabello, V. M., Aladro-Lubel, M. y Durán, B. C. 1994. Efecto del sustrato sobre las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos Casos tipo: Nejayote, vinazas y aguas blancas de papel. Vol 3, serie: Química ambiental del Agua. México (D. F.): Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA) UNAM. 46 pp.

- Lynn, D. H. y Small E. B. 2000. Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee.J. J., Leedale, G. F. y Bradbury, P (eds.). An illustrated guide to the protozoo. 2a ed. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. Pp. 371-656.
- Madigan, T. M., Martinko M. J., y Parker J. 2004. Biología de los Microorganismos. 10^a ed. Printice Hall. E.U.A. p. 825-827.
- Makarewicz, J. C. y Likens, G. E. 1979. Estructure and function of the zooplankton community of mirror lake, New Hamsphire. *Ecol. Monogr.* 49 (1): 109-127.
- Martínez, P. M., Macek, M. y Castro, G. T. 2004. Do protozoa control the elimination of *Vibrio cholerae* in brackish water?. *Hidrobiología.* 89 (2): 215-227.
- Masaklishida, A. R. D. y Fok, A. K. 2001. Phagosome formation in *Paramecium*: roles of somatic and oral cilia and of solid particles as revaluated by video microscopy. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 640-646.
- Matz, C. y Jürgen's, K. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria of feeding rates of heterotrophic Nan flagellates. *AAP. ENA. Micros.* 67 (2): 814-820.
- Mazari, H. M., Cifuentes, E., Velásquez, E. y Calva, J. 2000a. Microbiological groundwater quality and health indicators in México City. *Urban Ecosystem.* 4: 91-103.
- Mazari, H. M., Hernández, E. C., Rojo, C. F y Rivera, P. C. 2000b. Trihalometanos y haloácidos en agua de la zona sur de la ciudad de México. Instituto de Ecología y Facultad de Química. UNAM.
- McJunkin, E. F. 1988. Agua y salud humana. 1^a ed. OPS, OMS, Limusa. México. 138 pp.
- Mendoza, M. S. N. 2004. Bacterivoría de rotíferos y cladóceros en aguas residuales municipales. Tesis Biol. FES-I UNAM. México.
- Metcalf, E. y Eddy, C. 1996. Ingeniería de aguas residuales, tratamiento, vertido y reutilización. Vol I. McGraw-Hill Publishing company. México. p. 369-401.
- Nandini, S., Pérez, Ch. R. y Sarma S.S.S. 2003. The Effect of prey morphology on the feeding behaviour and population growth of the predatory rotifer *Asplanchna sieboldi*: a case study using five species of *Brachionus* (Rotifera). *Freshwater Biol.* 48: 2131-2140.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. 6 de enero de 1997.
- Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano y municipal. Diario Oficial de la Federación. 23 de abril de 2003.
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. Diario Oficial de la Federación. 23 abril del 2003.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación.
- Pauli, W., Jax, K. y Berger, S. 2001. Protozoa in wastewater treatment: Function and importance. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 2. Springer Verlag. Berlin. p. 203-252.
- Pelczar, J, Michael J. 1977. Microbiología. 2nd ed. McGraw-Hill. México. 267 pp.

- Ramírez, G. R. M., Luna, M. B., Velásquez, M. O., Vierna, G. L., Mejía, Ch. A., Tsuzuki, R. G., Hernández, G. L. y Müggenburg, L. 2000. Manual de prácticas de microbiología general. México (D.F.): Facultad de Química UNAM. 258 pp.
- Real, L. A. 1977. The kinetics of functional response. *Am. Nat.*, 111: 289-300.
- Ricci, C. 1984. Culturing of some bdelloid rotifer. *Hidrobiologia*. 112: 45-71.
- Ríus, M., Salvadó, H., y Gracia, M. P. 1996. Importancia de los rotíferos en el proceso de depuración de aguas residuales por fangos activos. XII Biental de la real sociedad Española de Historia Natural.
- Ruppert, E. y Barnes, R. D. 1996. Zoología de los invertebrados. 6ª. ed. McGraw-Hill interamericana. México. 197 pp.
- Saghir, S. A. y Schultz, I. R. 2005. Toxicokinetics and oral bioavailability of halogenated acetic acids mixtures in Naive and GSTzeta-Depleted Rats. *Toxicol. Sci.* 84: 214–224.
- Sánchez, P. H. J., Vargas, M. M. G., Méndez, S. J. D. 2000. Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Salud Pública Mex.* 42: 397-406.
- Sarma, S. S. S. y Sarma, N. 2002. Studies on functional response and prey selection using zooplankton in the anostracan *Chiricephalus diaphanous* Prevost, 1803. *Hidrobiologia*. 486: 169-174.
- Sarma, N., Pérez, Ch. R. y Sarma, S. S. S. 2003. The effect of prey morphology on the feeding behaviour and population growth of the predatory rotifer *Asplanchna sieboldi*: a case study using five species of *Brachionus* (Rotifera). México. *Freshwater Biol.* 48: 2131–2140.
- Schiller, H. 1996. Programa de implantación de técnicas naturales de tratamientos de efluentes con filtros Fito-terrestres en la Provincia de Córdoba, República de Argentina. En: Memorias del XXV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Tratamiento de aguas residuales. Tomo II. México, D.F. p. 547-562.
- Schoenen D. 2000. Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens whit drinking water: possibilities and limitations. *Water Res.* 32: 140-156.
- Schulz, C. R. y Okun, D. A. 1998. Tratamiento de aguas superficiales para países en desarrollo. 1a ed. Limusa. México.
- Sechoing, L., Liukkonen, R. J., Thom, R. E., Bastian, J. G., Lukasewycz, M. T. y Carlson, R. M. 1984. Increased chloroform production from model components of aquatic humus and mixtures of chlorine dioxide/chlorine. *Environ. Sci. Technol.* 18: 932-935.
- Scheiner, S. M. y Gurevitch, J. 2001. Design and Analysis of Ecological Experiments. 2a ed. Ed. Oxford Univ. Press.
- Smith, R. L. y Smith, T. M. 2004. Ecología. 4a ed. Pearson, Addison Wesley. México. p. 217-221.
- Stevik, T. K. A., Ausland, K. G. y Hanssen, F. 2004. Retention and removal of patogenic bacteria in wastewater percolating through porous: a review. *Water. Res.* 38: 1355-1367.
- Stott, R., Matsushita, E. y Warren, A. 2001. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewater in constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 44 (11): 191-198.
- Tellez, E. G y Bautista, L. C. M. 1991. Dynamics of Ciliated Protozoa Communities in Activated-Sludge Process. *Water Res.* 25 (8): 967-972.

- Trout, J. M., Walsh, J. E. y Fayer, R. 2002. Rotifers ingest Giardia Cysts. *J. Parasitol.* 88: 1038-1040.
- USEPA. 1998. Code of Federal Regulations. 40 CFR 302.4.
- Villanueva, C. M., Cantor, K. P., Grimalt, J. O., Malats, N., Silverman, D., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Castano-Vinyals, G., Marcos, R., Rothman, N., Real, F., Dosemeci, M., Kogevinas, M. 2007. Bladder Cancer and Exposure to Water Disinfection By-Products through Ingestion, Bathing, Showering, and Swimming in Pools. *Am. J. Epidemiol.* 165 (2):148-156.
- Villanueva, C. M., Kogevinasa, M. y Grimalt, J. O. 2001. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. *Gac. Sanit.* 15 (1): 48-53.
- Wildschutte, H., Wolfe, D. M., Tamewitz, A. y Lawrence J. G. 2004. Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *PNAS.* 101(29): | 10644-10649.
- Xu, P., Janex, L. M., Savoye, P., Cockx, A. y Lazarova, V. 2002. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. *Water Res.* 36: 1043-1055.
- Zhang, X. y Minear, R. A. 2002. Decomposition of trihaloacetic acids and formation of the corresponding trihalomethanes in drinking water. *Water Res.* 36: 3665-3673.