



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

-----  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
" I Z T A C A L A "

PROPUESTA PARA CONTROL DE CARACOLES EN  
SISTEMAS DE PELICULA BIOLOGICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**ANA MUÑOZ COLUNGA**



LOS REYES IZTACALA.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*Para*

*Lourdes Ruíz*

*con todo mi cariño gracias por brindarme tu apoyo y comprensión.*

*Martha, Guadalupe, Carlos, José, Cristina, Héctor y muy especialmente a Lucerito*

*esperando poder proporcionarles con la realización de esta tesis no por el valor intrínseco que pueda tener, sino por lo que para ellos representa, una leve recompensa a sus esfuerzos.*

*Gabriela, Pepe, Eréndira y Fernando*

*con especial afecto.*

*Guadalupe Colunga*

*Por la firmeza de carácter y la actitud respetuosa con que me has guiado.*

## RECONOCIMIENTOS

*Quiero agradecer profundamente al Dr. Simón González la valiosa dirección de esta tesis. Así como su paciencia y apoyo que fueron fundamentales para la terminación de la misma.*

*A mis amigos del Instituto de Ingeniería, UNAM quienes me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo:*

*Claudia Nava quien colaboró en los experimentos donde se utilizó el respirómetro Warburg.*

*Juan Carlos Aragón por su invaluable ayuda en la implementación de los programas de cómputo.*

*Noelia Díaz y Leonardo Cisneros por sus aportaciones en el área de química y matemáticas, respectivamente.*

*Al personal que labora en el mismo Instituto y que contribuyó en la elaboración del material experimental.*

*A los operadores de la planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria por las facilidades brindadas.*

*Al Dr. Jiménez Estrada del Instituto de Química y al Dr. Janis Rodmanis De Bayer de México.*



## INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	2
1.1 Problemática	2
1.2 Bioensayos	3
1.3 Inhibición microbiológica	4
1.4 Objetivos alcances y limitaciones	4
1.4.1 Objetivos	4
1.4.2 Alcances	5
1.4.3 Limitaciones	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales	7
2.2 Generalidades de las familias Lymnaeidae y Physidae	9
2.3 Medidas de control	10
2.3.1 Control ecológico	10
2.3.2 Control biológico	11
2.3.3 Control químico	12
3. DESCRIPCION Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE BIODISCO	13
4. MATERIAL Y METODO	17
4.1 Estudios en caracoles	17
4.1.1 Ubicación taxónomica	17
4.1.2 Bioensayos	18
4.1.2.1 Aclimatación	18
4.1.2.2 Condiciones experimentales	18
4.1.2.3 Bioensayos preliminares	19
4.1.2.4 Bioensayos definitivos	19
4.1.3 Determinación de la concentración letal media (LC50)	20

4.1.4 Determinación del tamaño y distribución de edad de la población de caracoles	23
4.1.5 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles	24
4.1.6 Determinación de la densidad y biomasa de la población de caracoles	25
4.1.7 Generación de la película biológica y consumo de la misma	26
4.2 Estudios de respirometría	26
4.2.1 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno	26
4.2.2 Utilización de soluciones para la determinación del efecto de los molusquicidas sobre la biopelícula	28
4.2.3 Medición del consumo de oxígeno de los organismos de la biopelícula	28
4.2.4 Descripción y funcionamiento del respirómetro Warburg.	29
5. RESULTADOS Y ANALISIS	32
5.1 Estudios en caracoles	32
5.1.1 Ubicación taxónomica	32
5.1.2 Determinación de la concentración letal media (LC50)	34
5.1.3 Determinación del tamaño y distribución de edad de la población de caracoles	36
5.1.4 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles	38
5.1.5 Determinación de la densidad y biomasa de la población de caracoles	40
5.1.6 Determinación del consumo de biopelícula	41
5.1.7 Efecto de los caracoles en la remoción de contaminantes	42
5.2 Estudios de respirometría	45
5.2.1 Efectos de Bayluscid sobre la biopelícula	45
5.2.2 Efectos de Piquerol sobre la biopelícula	51
5.2.3 Comentarios generales	54
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
6.1 Actividad depredadora de los caracoles y efecto de los molusquicidas en su metabolismo	55
6.2 Efectos de los molusquicidas sobre la biopelícula	56
6.3 Recomendaciones sobre la aplicación de los molusquicidas	56
BIBLIOGRAFIA	58

APENDICE A Procedimiento para el análisis probit y de máxima verosimilitud	63
APENDICE B Estimación del área de BIODISCO que ocupan los caracoles	67
APENDICE C Valores de las corridas efectuadas en el respirómetro Warburg	70

## INDICE DE FIGURAS

No. de Fig.	Pág
3.1 Unidad de biodiscos	14
3.2 Corte transversal de un biodisco	15
3.3 Flujo del agua tratada en los biodiscos	16
4.1 Curva de distribución acumulativa de la tolerancia	21
4.2 Curva sigmoide de transformación a línea recta	22
4.3 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno	27
4.4 Esquema del respirómetro Warburg	29
4.5 Esquema de los frascos de reacción	31
5.1 Morfología característica de la concha de <i>Physa</i> sp	33
5.2 Organización morfofuncional de <i>Physa</i> sp	33
5.3 Efecto de Bayluscid diluido en una solución Buffer de fosfatos	46
5.4 Respiración exógena con Bayluscid más una solución Buffer de fosfatos	47
5.5 Efecto de Bayluscid diluido en una solución de 300 mg/l de glucosa	48
5.6 Respiración exógena de Bayluscid en combinación con glucosa	48
5.7 Efecto de Bayluscid diluido en agua residual	49
5.8 Respiración exógena de Bayluscid en combinación con agua residual	50
5.9 Efecto de Piquerol diluido en una solución Buffer de fosfatos	52
5.10 Respiración exógena con Piquerol en ausencia de un sustrato orgánico	52
5.11 Efecto de Piquerol diluido en una solución de 300 mg/l de glucosa	53
5.12 Respiración exógena con Piquerol en combinación con glucosa	54

## INDICE DE TABLAS

No de Tabla	Pág
5.1 Resultados de los bioensayos con Baylucid	34
5.2 Resultados de los bioensayos con Piquerol	34
5.3 Características de <i>Physsa</i> sp en el biodisco de C.U.	38
5.4 Resultados reportados en la literatura de $DBO_{total}$ y $N-NH_3$ de 1983 y 1990	43
5.5 Comparación de la remoción entre 1983 y 1990 del sistema de biodisco	44

## RESUMEN

Se describen los métodos de control de caracoles: ecológico, biológico y químico, así como el proceso del sistema de biodiscos para tratamiento de aguas residuales instalado en Ciudad Universitaria D.F. Se identificó a los caracoles como *Physa* sp y se estimó el daño ocasionado por ellos en el BIODISCO. Se obtuvo que su población se compone de 6415 individuos con una proporción ligeramente superior de organismos jóvenes. Todos ellos consumen en un día el 6.4% de biopelícula, lo cual influye en la buena remoción de contaminantes que actualmente presenta el BIODISCO.

Se estudió el efecto de dos agentes tóxicos en los caracoles (bioensayos usando Bayluscid EC250 y Piquerol A proporcionados por Bayer S.A. de C.V. y por el Instituto de Química UNAM, respectivamente). Se obtuvo que los tóxicos causan la muerte de más del 90% de la población con concentraciones inferiores a 100 mg/l en un tiempo no mayor a 24 horas. Esto se determinó utilizando el método estadístico log-probit.

Se estudió el daño de los dos molusquicidas a la biopelícula midiendo el consumo de oxígeno de los microorganismos en ausencia y presencia de dichos compuestos. Esto se hizo utilizando un respirómetro Warburg modificado. No se observó un efecto inhibitorio severo de los tóxicos en la actividad de la biopelícula.

Por último, se propone una forma de utilizar los compuestos en sistemas de película biológica si se comprueba que esto sea necesario.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1 Problemática**

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

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

Los procesos biológicos forman parte esencial del tratamiento secundario de aguas residuales y algunos de ellos son biodiscos, biopelículas sumergidas y biofiltros, los cuales basan su funcionamiento en la formación de una película de microorganismos adherida a un material de empaque que degrada la materia orgánica contaminante. El ambiente creado en estos sistemas es favorable para la propagación de caracoles dulceacuícolas (Higgins, 1948; Ingram *et al.*, 1958; Iwai *et al.*, 1989; Learner, 1975; Lohmeyer, 1955; 1957). Estos autores, con base en observaciones visuales, coinciden en señalar que los caracoles ocasionan problemas de operación y disminuyen la eficiencia de depuración del agua tratada debido a la depredación sobre la biopelícula. Ingram *et al.* (1958) se basan en datos de colectas y en determinaciones fisicoquímicas realizadas en un filtro rociador. Iwai *et al.* (1989) observan una notable disminución en la eficiencia del tratamiento de un sistema de película sumergida, la cual atribuyen a la presencia de *Physa anatina*.

## 1.2 Bioensayos

Un medio para el control de caracoles es la aplicación de molusquicidas donde la selección de dosis-tiempo de exposición depende de la efectividad de los mismos y de la susceptibilidad de la especie.

Por su disponibilidad y de acuerdo a recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1965, 1983, 1988) se seleccionaron dos molusquicidas, uno sintético (Bayluscid EC250) y otro natural (Piquerol A), con los cuales se realizaron bioensayos sobre caracoles que "viven" en el sistema de biodiscos de la planta para tratamiento de aguas residuales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los bioensayos realizados involucran dos componentes principales: un estímulo y su efecto, el estímulo se refiere a dosis de molusquicida a las cuales se expone a los caracoles y que provocan una respuesta o efecto específico. Se considera la respuesta como la muerte de los individuos debido a que se puede reconocer fácilmente en todos los organismos y se aplica con la misma eficiencia para cualquier agente tóxico. La precisión de los bioensayos se encuentra limitada por la variación biológica normal de los



individuos de una misma especie, pero puede ser controlada mediante la selección de grupos homogéneos y otros factores como sexo, tamaño y edad. Los sujetos de prueba (caracoles) muestran una variabilidad natural de respuesta que hace necesario evaluar los bioensayos a través del uso del análisis estadístico log-probit (Maciorowski, 1981).

### **1.3 Inhibición microbiológica**

Tomando en cuenta que para llevar a cabo sus funciones metabólicas los microorganismos presentes en la biopelícula que sirven como alimento a los caracoles consumen oxígeno, la medición de dicho consumo indica si la aplicación de las concentraciones de ambos tóxicos afectan la biopelícula. La acción tóxica de los compuestos se manifiesta como una disminución en el consumo de oxígeno respecto a biopelículas no expuestas a los tóxicos. Estas determinaciones se hicieron con el uso de un respirómetro Warburg modificado. Los datos que se obtuvieron fueron procesados utilizando un programa de computadora, para describir gráficamente el consumo de oxígeno respecto al tiempo con diferentes concentraciones de ambos compuestos.

### **1.4 OBJETIVOS ALCANCES Y LIMITACIONES**

La presencia de diversas especies de caracoles en sistemas para tratamiento de aguas de desecho tipo película biológica, pueden ocasionar problemas que justifican el control de los mismos. Dicho control debe ser efectivo en un corto plazo para evitar la probable reinfestación, además de no interferir en la eficiencia del tratamiento.

#### **1.4.1 Objetivos**

Determinar taxonómicamente a los caracoles y estimar el posible daño ocasionado por ellos en el biodisco de la planta para tratamiento de aguas residuales de la UNAM.

Conocer su sensibilidad a agentes tóxicos (bioensayos).

Conocer algunas características de la población relativas a su estructura (tamaño, distribución por edades y dispersión entre otras).

Proponer un método para el control de caracoles que se encuentran en sistemas de película biológica para tratamiento de aguas residuales sin afectar el proceso de tratamiento.

#### **1.4.2 Alcances**

Con base en la revisión bibliográfica sobre control de caracoles y por su disponibilidad se utilizan dos molusquicidas Bayluscid EC250 y Piquerol A, para establecer mediante ensayos biológicos valores de concentración letal media (LC50) a distintas horas de exposición de ambos compuestos sobre la población de caracoles.

Establecer el daño de los caracoles al sistema de biodiscos de C.U., mediante un análisis parcial de su población y con base en su consumo de biopelícula. Asimismo se hace un análisis de la calidad del agua tratada con base en los datos reportados por Norouzian, 1983 (seis meses después de que dió inicio la operación del sistema), los cuales se comparan con los que se efectuaron por personal de la planta durante 1991.

Mediante pruebas con un respirómetro Warburg modificado, determinar el efecto que tienen los compuestos utilizados sobre la película de microorganismos.

#### **1.4.3 Limitaciones**

El control de caracoles que se propone en este trabajo puede aplicarse a sistemas de película biológica que tengan una biocenosis similar a la que se desarrolla en el BIODISCO y que estén invadidos con caracoles del género *Physa*.

La metodología de este trabajo puede aplicarse en otros sistemas de biopelícula (diferentes al de biodisco) si su disposición física permite tener acceso para experimentar con los microorganismos de la biopelícula y con los caracoles.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Caracoles en sistemas para tratamiento de aguas residuales

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

En los sistemas antes mencionados se ha observado la presencia de caracoles principalmente de las familias Lymnaeidae y Physidae. Los trabajos que hay al respecto son muy escasos, aunque se sabe que la invasión de estos animales es muy común (González comunicación personal; Learner 1975 y Pointier comunicación personal).

Los primeros estudios que existen sobre caracoles en sistemas de película biológica se hicieron en filtros rociadores en los cuales se identificaron diversas especies: *Agriolmix agrestis*, *Galba glabra*, *G. palustria* y *Radix peregra* en Inglaterra (Lloyd, 1940 en Learner, 1975). *Lymnaea humulis*,

*Physa anatina*, *P. integra*, *P. halei* y *P. cubensis* fueron encontrados en Estados Unidos de Norteamérica (Higgins, 1948 e Ingram et al, 1958)

Lohmeyer (1955; 1957) observó una gran cantidad de caracoles en el filtro rociador de la Universidad de Florida en E.U.A. y menciona que estos animales inducen corrosión en las bombas de recirculación del sistema. También observa que en el agua de recirculación hay un elevado número de conchas de caracol, las cuales afectan el correcto funcionamiento del brazo rociador haciendo que su movimiento sea más lento de los esperado.

La misma conclusión se presenta en el trabajo de Ingram et al (1958), estos investigadores hicieron colecta de caracoles durante un año en la salida hacia el sedimentador secundario de un sistema tipo filtro rociador en Ohio, Estados Unidos de Norteamérica. Ellos colectaron media y hasta una tonelada de conchas por día durante la primavera, esta gran cantidad de conchas bloqueó las tuberías. Hicieron además, colectas sobre la superficie del biofiltro durante dos semanas del mes de mayo, al término de las cuales la concentración de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), de nitrógeno amoniacal (NA) y de nitrógeno total (NT) disminuyeron notablemente de 131 a 59 mg/l, de 17.9 a 13.0 mg/l y de 24.8 a 24.4 mg/l, respectivamente. De igual modo se afirma que los caracoles se alimentan de la biopelícula ya que se observan grandes extensiones en forma de vereda de superficie limpia.

En el trabajo de Iwai et al (1989), realizado en un sistema de biopelícula sumergida en Japón, de junio de 1986 a septiembre de 1987, se observó una notable disminución en la eficiencia del tratamiento atribuida a la presencia de *Physa anatina*. Dicha especie invadió el sistema poco antes de junio del 87, mes en que las concentraciones en el efluente de demanda química de oxígeno (DQO), fosfato total (FT), sólidos suspendidos (SS) y DBO aumentaron sensiblemente.

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

## 2.2 Generalidades de las familias Lymnaeidae y Physidae

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

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

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

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

Son hermafroditas simultáneos con una gónada denominada ovotestis productora de óvulos y espermatozoides; la cópula comprende un miembro que actúa como macho y otro como hembra. Las etapas larvales transcurren dentro del huevo, por lo que el desarrollo es directo. La madurez reproductora se alcanza en dos o tres meses. A partir del estadio de huevo

transcurren aproximadamente 30 días para que los caracoles jóvenes alcancen longitudes de 3 a 4 mm, 60 días para longitudes de 4 a 8 mm en caracoles adultos, los cuales mantienen una actividad predominantemente reproductora y 90 días para 8 a 13 mm en caracoles viejos (Burch y Cruz 1987 y Calaw, 1978).

Los miembros del género *Physa* producen en promedio de 200 a 300 huevos por mes durante el período de mayor actividad reproductora, la cual puede llevarse a cabo entre marzo y agosto o de diciembre a agosto, durando de 6 a 9 meses. Llegan entonces a producir más de 1000 huevos por individuo. Los períodos de mayor y menor crecimiento de la población se dan entre los meses de abril y junio y de noviembre a febrero, respectivamente. Los niveles más altos de mortalidad ocurren entre junio y agosto principalmente en organismos viejos que miden 8 mm o más. Viven en temperaturas que oscilan entre 11 y 40°C (Calaw, 1978 y Malek, 1977).

### **2.3 Medidas de control**

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

Las investigaciones sobre control de caracoles se han derivado de su relación con las enfermedades mencionadas. Se impide la transmisión de enfermedades mediante el exterminio de los organismos.

#### **2.3.1 Control ecológico**

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



### 2.3.2 Control biológico

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

Aragua y Thomas (1983) sugieren tres estrategias principales que debe adoptar un depredador de caracoles dulceacuícolas; a) El depredador debe consumir obligadamente más presas en la medida que estas aumenten. b) Si la presa tiende a agruparse en sitios específicos el depredador debe responder situándose en la vecindad de estos. c) La tasa reproductiva del depredador debe ser mayor a la de la presa, lo cual permitirá mantener controlada la población de presas.

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

Han sido estudiados otros agentes de control, como los caracoles *Marisa cornuarieti*, *Pomacea* spp y *Heliosoma dury*, los cuales se alimentan de huevos y juveniles de caracoles dulceacuícolas. El consumo de masas de huevos puede ser accidental debido a que éstos se depositan sobre sustratos que forman parte de la dieta de los probables caracoles controladores. Ferguson (1977) en Aragua y Thomas (1983) ha observado que cuando el consumo es intencional las especies exhiben una conducta depredadora extremadamente variable, la cual está regulada por factores



medioambientales, de edad y estado fisiológico de los individuos depredadores.

En conclusión, los probables agentes controladores de caracoles dulceacuícolas no muestran una intensa actividad depredadora ni una capacidad reproductiva suficientemente alta. La efectividad de los depredadores está fuertemente asociada con su densidad que generalmente no sobrepasa a la de los caracoles que se desea controlar, lo cual impide que el control biológico tenga éxito.

### 2.3.3 Control químico

Los estudios en este sentido se iniciaron a principios de siglo en Japón, siendo este método el más empleado y que ha dado mejores resultados (Malek, 1977). La WHO (1965) aprobó la comercialización de más de 22 molusquicidas sintéticos entre los que se encuentra Bayluscid EC250 como uno de los más tóxicos tanto para caracoles adultos como para sus huevecillos. La sustancia activa de Bayluscid es una sal de etanolamina con composición química  $C_{15}H_{15}Cl_2N_3O_5$  (Bayluscid, 1970). La investigación realizada por Feachman y Garelick (1983) comprobó que no hay evidencia de que los caracoles hayan desarrollado resistencia al compuesto después de una prolongada aplicación.

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

### **3. DESCRIPCION Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE BIODISCOS**

La planta para tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, inicio sus operaciones en septiembre de 1982. La planta consta de dispositivos para tratamiento preliminar (rejillas y desarenador), secundario (lodos activados, filtro rociador y biodiscos), cuenta con un sistema de filtros en paralelo y complementario (desinfección con cloro). La planta tiene capacidad para tratar 40 l/s de agua residual, los cuales se distribuyen del modo siguiente: 20 l/s son tratados mediante el sistema de lodos activados, 10 l/s corresponden al filtro rociador y 10 l/s al BIODISCO.

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

Los discos que forman al biodisco son placas corrugadas de polietileno, los cuales están soportados en su centro sobre una flecha horizontal de acero y tienen un diámetro de 3.6 m. El biodisco consta de tres etapas. La primera tiene un área de 4589 m<sup>2</sup> y las dos restantes de 2080 m<sup>2</sup>. El sistema está montado sobre un tanque de concreto con un volumen útil de 49.90 m<sup>3</sup>, los

discos se encuentran parcialmente sumergidos en el agua contenida en el tanque de concreto (ver figura 3.1). Con el fin de evitar pérdidas de temperatura durante el proceso y que la lluvia o granizo puedan lavar la película y para prevenir el crecimiento de algas en la superficie de los discos; estos se encuentran protegidos por una cubierta de fibra de vidrio con ocho ventanillas laterales y puertas en los extremos, las cuales permiten la visualización y el acceso al biodisco.

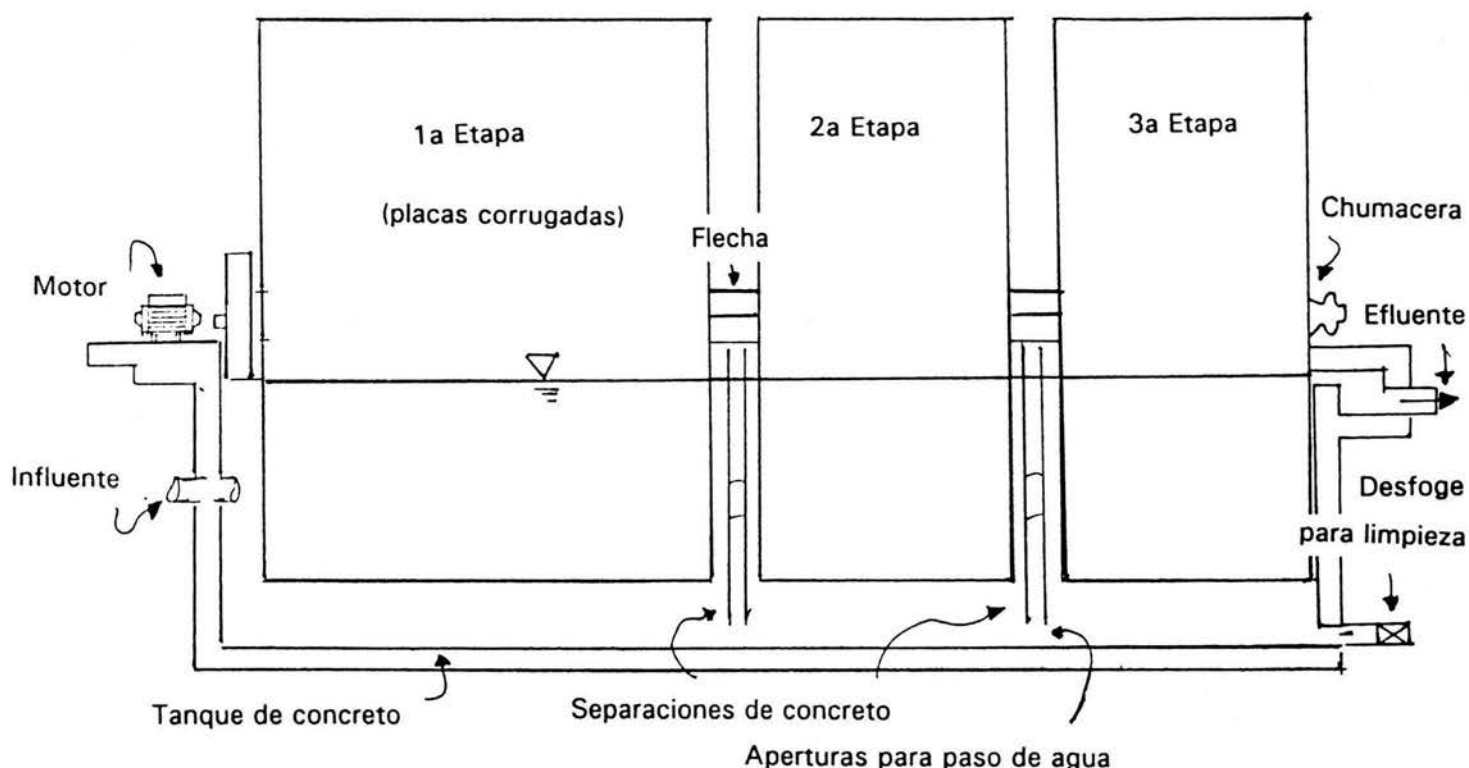


Figura 3.1 Unidad de biodiscos

En forma general, el sistema está compuesto por un sedimentador primario (la planta de C.U. no lo tiene), biodiscos y un sedimentador secundario, el biodisco opera con una rotación de 1.6 rpm, la cual se genera por medio de un motor-reductor de 5 hp. Cuando el proceso inicia su operación, los microorganismos del agua de desecho se adhieren a la superficie de los discos y se desarrollan hasta cubrirlos por completo. Los discos parcialmente sumergidos en el agua giran y los microorganismos que se encuentran adheridos sobre la superficie del material plástico entran en contacto, de forma alternada, con la materia orgánica contenida en el agua

de desecho, que es utilizada como fuente de nutrientes y con el oxígeno atmosférico que les permite respirar y efectuar la degradación aerobia de las sustancias orgánicas contaminantes (ver figura 3.2)

Los principales productos de la oxidación bioquímica son agua y bióxido de carbono. De la biopelícula se desprenden microorganismos debido a fuerzas cortantes originadas por la rotación de los discos al pasar éstos por el agua y salen del tanque con el agua tratada hacia el sedimentador secundario. Esto evita el crecimiento excesivo de la película biológica y con ello que la difusión de nutrientes y de oxígeno hacia las células pueda verse limitada.

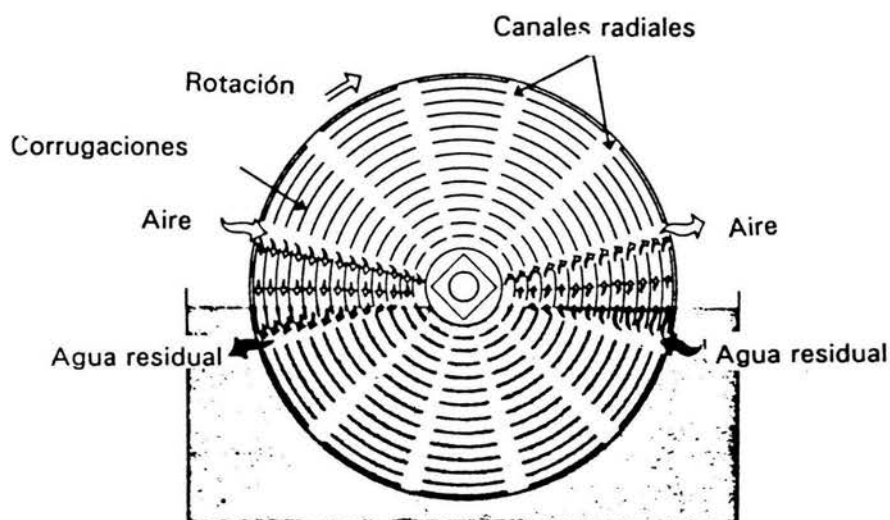


Figura 3.2 Corte transversal de un biodisco

El agua residual pasa por rejillas y desarenador antes de entrar al biodisco, el caudal se regula por medio de un canal Parshall. Por gravedad el agua entra en el centro del tanque y cubre el 40% del volumen de los discos; pasa a través de las tres etapas y sale por el otro extremo del tanque hacia un sedimentador secundario cuyo diámetro y altura son 4.75 m y 4.05 m, respectivamente (ver figura 3.3).

La división del biodisco en etapas permite el desarrollo de poblaciones microbianas especializadas en la degradación de los sustratos correspondientes. Sus tasas de crecimiento son característicamente más

altas en las primeras etapas disminuyendo en cada una de las subsecuentes, lo cual origina películas de mayor espesor en las etapas iniciales respecto de las finales

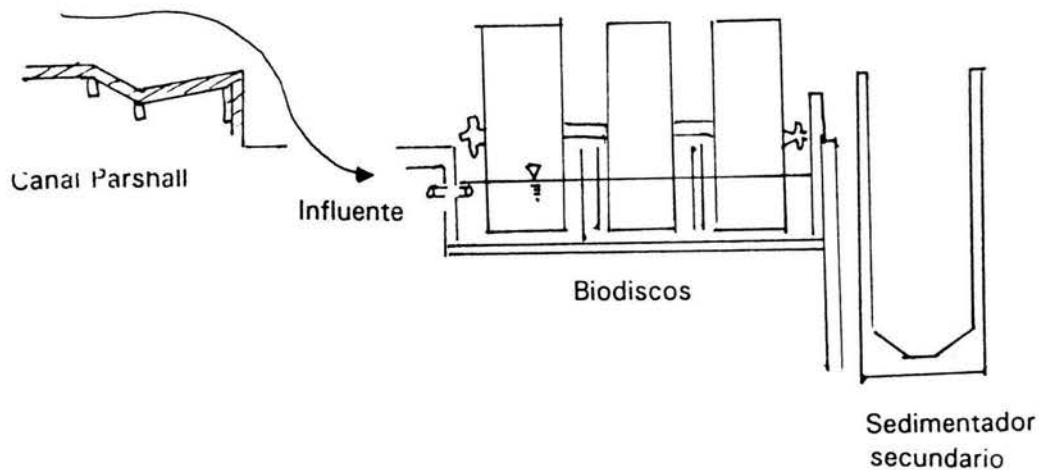


Figura 3.3 Flujo del agua tratada en los biodiscos

En cada etapa, el grado de desarrollo depende de la concentración de materia orgánica soluble en el agua, en consecuencia en las primeras etapas predominan bacterias heterótrofas. En la última etapa la concentración de materia orgánica decrece a un nivel (DBO entre 20 y 15 mg/l) que permite la proliferación de bacterias nitrificantes. La nitrificación es una reacción bioquímica secuencial, donde las bacterias *Nitrosomonas* oxidan el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y las *Nitrobacter* realizan la oxidación de nitritos a nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ).

El efluente nitrificado puede desnitrificarse fácilmente bajo condiciones adecuadas y aumenta la eficiencia de la desinfección con cloro. El proceso anterior contribuye a disminuir altas concentraciones de nitrógeno, las cuales incrementan la productividad y la eutroficación de los cuerpos receptores de aguas residuales.

## **4. MATERIAL Y METODO**

En este capítulo se hace una descripción de la metodología utilizada en los ensayos biológicos y en los estudios de inhibición del metabolismo microbológico. No es el propósito de esta tesis abundar en los conceptos teóricos sobre los cuales se basan los cálculos de ambos experimentos, de modo que sólo se enuncian brevemente los argumentos para el análisis de uno y otro caso y se referencian las fuentes.

Otros aspectos que se tratan en este capítulo se refieren a la ubicación taxonómica de los caracoles, a la determinación del tamaño de la población y al volumen de biopelícula que consumen.

### **4.1 ESTUDIOS EN CARACOLES**

#### **4.1.1 Ubicación taxonómica**

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

#### **4.1.2 Bioensayos**

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

##### **4.1.2.1 Aclimatación**

Los caracoles se seleccionaron y distribuyeron de acuerdo con su tamaño en: pequeños, de 0.01 a 4.0 mm, medianos de 4.1 a 8.0 mm y grandes de 8.1 a 13.0 mm. Los segundos fueron utilizados para la experimentación, mientras no presentaran daños aparentes.

Se colocaron lotes de 50 ejemplares en acuarios de 9 l que contenían agua declorada, residual o destilada, manteniéndolos con aeración, a temperatura ambiente y sin alimentación durante 24 horas. Para que los lotes de caracoles pudieran ser utilizados se requiere que la mortalidad sea inferior al 10 % (APHA *et al*, 1985). Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con agua destilada que se utilizó durante toda la experimentación posterior.

##### **4.1.2.2 Condiciones experimentales**

Grupos de 5 caracoles se introdujeron en frascos de vidrio de 300 ml que contenían 250 ml de agua con diversas concentraciones de Bayluscid EC250 o de Piquerol A. Los recipientes se mantuvieron sin aeración, con luz diurna normal y a temperatura ambiente; en los ensayos con Piquerol, al frasco control se le agregó la misma cantidad de alcohol empleada para preparar las concentraciones; no se proporcionó alimentación a los caracoles durante los períodos de exposición-recuperación y en aquellos que se utilizaron como organismos control.

Los caracoles exhiben una conducta de protección tendiendo a deslizarse por fuera de la solución de prueba por lo que fue necesario cubrir con una gasa justo por encima de la línea de agua.



#### **4.1.2.3 Bioensayos preliminares**

El objetivo de estos ensayos fue determinar un intervalo de concentraciones definido con el cual se tuvieran respuestas que fluctuaran de 0 a 100% de mortalidad en un lapso máximo de 24 horas. Las dosis experimentadas con Bayluscid fueron de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/l; con Piquerol fueron de 5, 10, 25 y 50 mg/l (Cruz *et al.*, 1989; Malek, 1977; Webbe, 1985; WHO, 1965, 1983). Como resultado se observó una gran sensibilidad de los caracoles a Bayluscid, siendo exterminados en su totalidad a la primera, segunda y cuarta hora de exposición a las concentraciones de 4.0, 2.0 y 1.0 mg/l respectivamente, mientras que a la de 0.5 mg/l sobrevivieron más de 10 horas. Por otra parte los caracoles expuestos a Piquerol murieron a intervalos regulares durante el tiempo de exposición.

#### **4.1.2.4 Bioensayos definitivos**

Con base en los resultados de la experimentación anterior, las concentraciones utilizadas para Bayluscid fueron de 0.01, 0.05, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 1.0 mg/l; para Piquerol, fueron las mismas de los bioensayos de prospección: 5, 10, 25 y 50 mg/l además de 20 mg/l. Para cada concentración se utilizaron dos frascos de prueba con una réplica y dos frascos de control.

Las observaciones se hicieron cada 2 horas después de la exposición, hasta la décima hora. Posteriormente y excepto en aquellos recipientes donde la mortalidad total se presentó antes, se hicieron cada 24 horas hasta el tercer día en que se dió por terminado el experimento.

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



#### 4.1.3 Determinación de la concentración letal media (LC50)

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

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

La medición directa de la tolerancia es impráctica, debido a que se requiere observar continuamente a los caracoles para saber el tiempo en que éstos mueren. Una estimación eficiente es la determinación de la concentración letal media (LC50), esta dosis se caracteriza por la cantidad de estímulo que produce la muerte en el 50% de la población.

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

El hecho de que uno de los cinco caracoles expuestos a una cierta concentración pueda o no morir origina una cierta distribución de tolerancias, la cual presenta un comportamiento sesgado (menor tolerancia a concentraciones mayores), para lograr que dicha tolerancia tome la forma de una curva de distribución de frecuencia Normal, se transforman los valores de las concentraciones a logaritmos con base 10. Esto sirve para poder

representar gráficamente el porcentaje de mortalidad (sin sesgos), respecto del logaritmo de la concentración. De acuerdo con el conjunto de concentraciones utilizadas (ver inciso 4.1.2.4 de este capítulo), se sabe que la mortalidad de la población expuesta a los molusquicidas es baja en la región cercana a 0 y a 100% y es alta en la región intermedia; en consecuencia la distribución de tolerancias toma la forma de una curva sigmoide como se muestra en la figura 4.1.

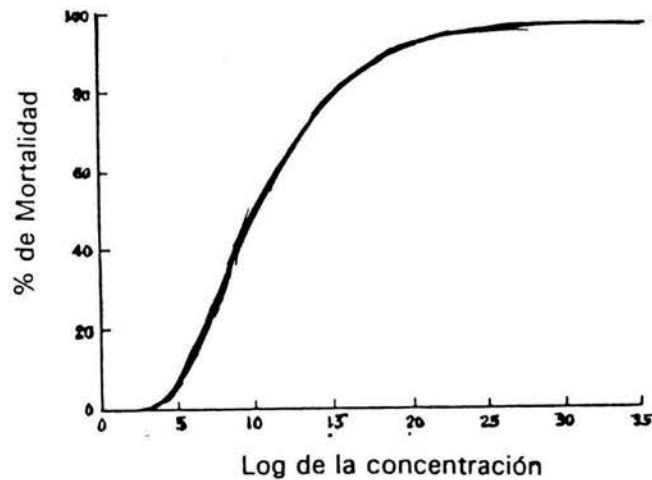


Figura 4.1 Curva de distribución acumulativa de la tolerancia.

Para reducir la curva sigmoide a una línea recta el porcentaje de mortalidad se transforma en unidades probit al 50% de la mortalidad le corresponden 5 unidades probit (ver figura 4.2). La probabilidad de respuesta toma valores entre 0 y 1 (ocurre o no ocurre) con una distribución Normal con media 0 y varianza 1

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

$$z = \frac{(x_i - \mu)}{\sigma + 5} \tag{1}$$

donde:

$z$  = desviación normal equivalente,  
 $x_i$  = valor  $i$ -ésimo observado de mortalidad,  
 $\mu$  = promedio de mortalidad de los organismos de prueba,  
 $\tilde{\sigma}$  = desviación estándar.

Unidad Probit =  $z + 5$

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

$$Y = 5 \frac{1}{\tilde{\sigma}} (x - \mu) \quad (2)$$

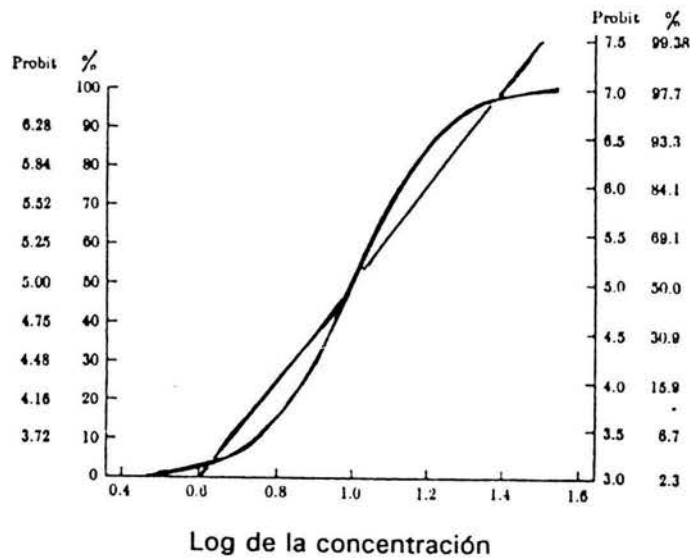


Figura 4.2 Curva sigmoide de transformación a línea recta cuando las ordenadas son medidas en la escala lineal de probits en lugar de porcentajes.

A partir de la expresión (2) se obtiene la ecuación de la línea recta  $Y = \tilde{\sigma} + \beta x$ ; la cual sirve para estimar  $\mu$  como  $\tilde{\sigma}$  (ordenada al origen) y  $1/\tilde{\sigma}$  como  $\beta$  (pendiente). Con base en criterios estadísticos de frecuencia la ecuación anterior y un modelo denominado de máxima verosimilitud fueron utilizados para determinar la concentración letal media para cada tiempo de exposición, la cual corresponde a  $x$ . El modelo de máxima verosimilitud es usado para verificar la correlación entre la mortalidad de caracoles en el

mismo grupo y de este modo la dispersión de mortalidad alrededor de la línea de regresión (línea probit).

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

#### 4.1.4 Determinación del tamaño y distribución de edad de la población de caracoles

Como se vio en el capítulo 3, el biodisco en el cual se encuentran los caracoles objeto de este estudio, consta de tres etapas. La primera tiene un área de 4589 m<sup>2</sup> y las dos restantes de 2080 m<sup>2</sup>. La mayoría de los caracoles se ubican en la tercera etapa. Tal disposición permite utilizar la técnica de muestreo por cuadrantes para estimar el tamaño de la población al utilizar los caracoles que se encuentran en la última placa de dicha etapa bajo las siguientes consideraciones: a) se puede conocer con exactitud la población de cada cuadrante b) se puede conocer con exactitud el área de cada cuadrante c) los cuadrantes son representativos del área total.

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

$$N [X \pm \bar{\sigma}_x t_{(n-1, 0.05)}] \quad (3)$$

donde:

N = número total de cuadrantes del área de muestreo,

X = media de la población,

$\bar{\sigma}_x$  = error estándar,

$t_{(n-1, 0.05)}$  = valor tomado de la tabla de distribución "t" con 5 grados de libertad y 95% de confianza.

#### 4.1.5 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles

La distribución espacial de los caracoles se obtuvo mediante un cociente entre la variancia ( $\bar{O}^2$ ) y la media ( $X$ ). La variancia es una propiedad general de las distribuciones que estima el valor de las distancias entre cada punto y la media. Así, el cociente  $\bar{O}^2/X$  se ha de aproximar a la unidad para una distribución al azar. Sin embargo, se considera que la simple media es una estima de la variancia, por lo que ha de aplicarse una prueba de significancia estándar o error estándar ( $\bar{O}_x$ ) que considere la dispersión de una serie de medias con respecto a la media  $X$ :

$$\bar{O}_x = \frac{\bar{O}}{n-1} \quad (4)$$

donde:

$\bar{O}_x$  = error estándar,

$\bar{O}$  = desviación estándar de la población,

$n$  = tamaño de las muestras.

Para una distribución al azar.

$$1 - [t_{(n-1, 0.05)} (\bar{O}_x)] < \bar{O}^2/X < 1 + [t_{(n-1, 0.05)} (\bar{O}_x)] \quad (5)$$

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

$$I_m = \frac{n \bar{O} \sum z_i (z_i - 1)}{N (N - 1)} \quad (6)$$

donde:

$n$  = número de cuadrantes,

$\bar{O}$  = desviación estándar de la población,

$z_i$  = número de individuos del cuadrante  $i$ ,  
 $N$  = número total de individuos en todos los cuadrantes.

La decisión se toma de acuerdo con lo siguiente:

Si  $I_m = 1$  se presenta una distribución al azar  
Si  $I_m < 1$  se presenta una distribución uniforme

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

La densidad de la población se puede obtener mediante la relación:

$$\text{densidad} = \frac{\text{media de la población}}{\text{área del cuadrante}} \quad (7)$$

Se estimó la biomasa de los caracoles a partir del peso individual de los organismos (medido como peso húmedo), los cuales fueron colectados en el sedimentador secundario del sistema de biodiscos. El sedimentador recibe junto con las aguas tratadas a organismos vivos que se desprenden de la superficie del biodisco, organismos muertos y conchas vacías. Se tomó en cuenta el peso de las conchas vacías (Southwood, 1978), debido a que son un testimonio de los animales muertos y del tamaño que alcanzaron y que lógicamente estuvieron vivos y participaron en la depredación de la biopelícula. Para ello se utilizó la expresión:

$$B = D (\bar{w}/n) \quad (8)$$

donde:

$B$  = biomasa expresada en peso por unidad de área ( $\text{g}/\text{m}^2$ ),

$D$  = densidad de la población (número de individuos/ $\text{m}^2$ ),

$\bar{w}$  = suma del peso de cada uno de los organismos que forman, parte de la muestra.

$n$  = número de organismos de la muestra

#### **4.1.7 Generación de la película biológica y consumo de la misma**

Con objeto de tener una biopelícula que pudiese ser utilizada como alimento de caracoles y para las pruebas de inhibición microbiológica en el respirómetro Warburg, se generó una película biológica que tuviese las mismas características de la que se desarrolla en el biodisco. Se utilizaron discos de vidrio con la superficie esmerilada para hacerlos rugosos de 10 cm de diámetro con espesor de 3 mm. Los discos se colocaron, soportados por un eje, que sobresale del material plástico del biodisco, después de aproximadamente 4 días los discos se cubrieron con una película de microorganismos. Esta biopelícula fue utilizada para cuantificar la capacidad de depredación de los caracoles y para establecer el efecto de los tóxicos sobre la biopelícula.

Para resolver el primero de los propósitos enunciados, un número conocido de discos y de caracoles se colocaron dentro de acuarios de 9 l. Posteriormente se registró el tiempo de consumo total de biopelícula, el volumen de ésta se dividió entre el número de caracoles y el resultado entre el tiempo total de consumo.

#### **4.2 ESTUDIOS DE RESPIROMETRIA**

En esta parte del trabajo se hace un breve análisis de la relación que hay entre el consumo de sustrato y de oxígeno originados por metabolismo celular. Conociendo dicha relación es posible establecer las bases de la metodología utilizada para determinar el efecto que provocan las sustancias inhibitoras del metabolismo de los caracoles en los microorganismos de la biopelícula cuando están en contacto con dichas sustancias.

##### **4.2.1 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno**

Las células aerobias obtienen la mayor parte de su energía de la respiración, esto es, gracias a una transferencia de electrones, desde las moléculas orgánicas combustibles hasta el oxígeno molecular. De acuerdo con esto, durante el metabolismo aerobio de los organismos que forman la película biológica, el consumo de sustrato se relaciona directamente con el consumo

de oxígeno. Durante la degradación aerobia de un sustrato se puede observar la disminución de la concentración del sustrato consumido ( $S_o - S_f$ ) y el aumento del consumo bioquímico de oxígeno ( $CBO_o - CBO_f$ ) respecto al tiempo (ver figura 4.3)

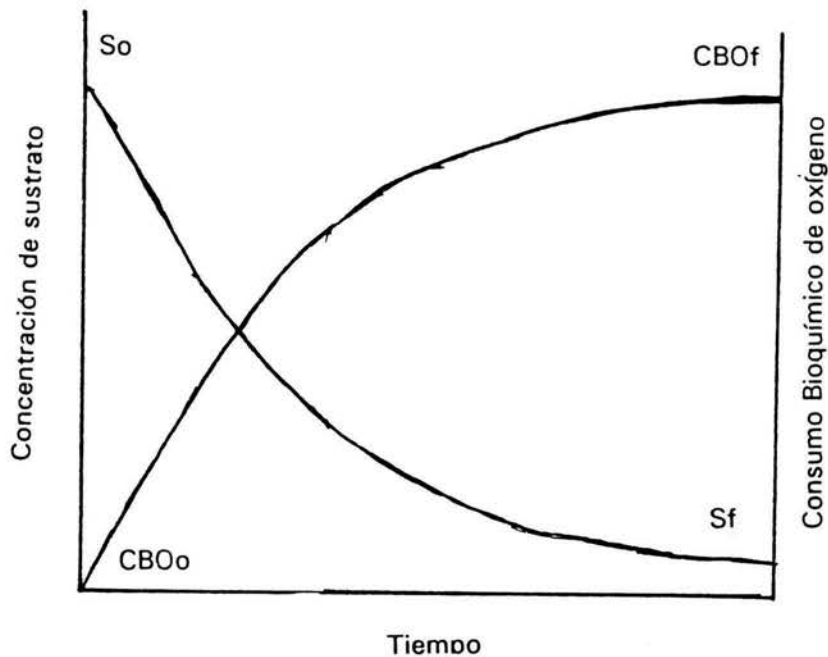


Figura 4.3 Relación entre consumo de sustrato y consumo de oxígeno.

El valor máximo de  $CBO_f$  indica que el sustrato ha sido completamente degradado.

El consumo total o combinado de oxígeno durante la degradación de un sustrato es la suma de la respiración endógena y la respiración exógena. La respiración endógena de la célula se efectúa cuando hace uso de su material de reserva (como glicogeno o polihidroxibutirato entre otros), la respiración exógena se lleva a cabo cuando la célula tiene un sustrato disponible. Los valores de respiración endógena pueden registrarse en un medio libre de sustratos y los de respiración exógena se obtienen de la diferencia entre los valores de respiración total o combinada y los de respiración endógena.



#### **4.2.2 Utilización de soluciones para la determinación del efecto de los molusquicidas sobre la biopelícula**

El efecto de los molusquicidas sobre la biopelícula puede manifestarse y detectarse de tres formas: a) que los microorganismos mueran (no hay consumo de oxígeno) b) que su metabolismo sea inhibido (valores de consumo de oxígeno menores a los que se obtienen por respiración endógena) c) que los organismos sean capaces de biodegradar los compuestos que inhiben a los caracoles (valores de consumo de oxígeno mayores a los de respiración endógena).

Con base en los resultados de los bioensayos las concentraciones de molusquicida que corresponden a un tiempo de exposición, se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfatos, Buffer de fosfatos con glucosa (300 mg/l) y con agua residual (con Piquerol A no se hizo el ensayo con agua residual). Con glucosa y agua residual se espera que el consumo de oxígeno aumente debido a que las células están en un medio energético y se sabe que en estas condiciones la respiración celular aumenta. En un medio sin sustrato (solución Buffer de fosfatos con molusquicida) se espera que el consumo de oxígeno disminuya, Todas las soluciones anteriores sirven para determinar el efecto y la capacidad de los microorganismos de biodegradar los molusquicidas en un medio con y sin sustrato.

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

En un sistema cerrado a temperatura y volumen de gas constantes, la reacción que consume oxígeno se lleva a cabo en una fase líquida, la cual está en equilibrio con la fase gaseosa encerrada, por lo que la utilización de gas disuelto se refleja en un descenso de la presión del gas en función del tiempo. El respirómetro Warburg utilizado es un aparato que sirve para medir de forma confiable y eficiente cambios en la presión de un gas originados por variaciones de su cantidad. La figura 4.4 muestra un diagrama del respirómetro utilizado.

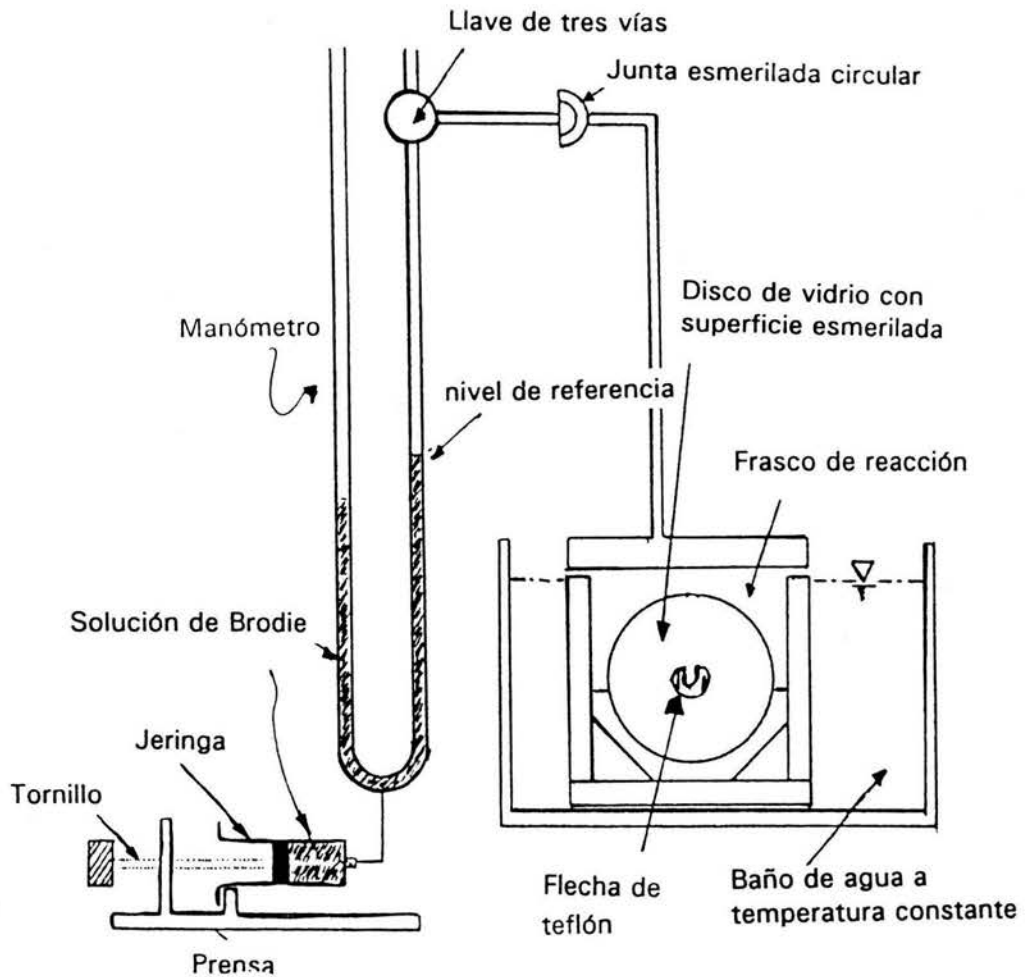


Figura 4.4 Esquema del respirómetro Warburg.

#### 4.2.4 Descripción y funcionamiento del respirómetro Warburg

El respirómetro consta de dos partes principales: Manómetro y frasco de reacción. En este último se encuentra una flecha de teflón que tiene incorporada una barra magnética a la cual se monta un disco cubierto de biopelícula (ver inciso 4.1.5 de este capítulo). La flecha con el disco gira al accionar un sistema de poleas externo provisto de magnetos que giran a velocidad controlada. En la parte superior del frasco, se encuentra un depósito sobre el que se colocan tres o cuatro lentes de KOH para absorber el  $\text{CO}_2$  liberado durante la oxidación biológica. El respirómetro utilizado consta de 6 sistemas idénticos (ver figura 4.5)

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

Los cambios de presión fueron corregidos mediante un termobárometro, que consiste de un frasco igual a los otros al que se adicionaron 65 ml de agua destilada.

El procedimiento de experimentación fue el siguiente: Se agregó la solución con molusquicida a uno de los frascos de reacción (esto se hizo con 4 concentraciones diferentes). En un quinto recipiente se adicionó solución Buffer de fosfatos para obtener valores de respiración endógena, al sexto frasco se adicionó agua destilada y sirvió como termobarómetro para corregir cambios de presión durante el tiempo de experimentación. El volumen de las soluciones cubrió el 40% de la superficie de los discos con 65 ml.

Las tapas de los frascos tienen dos perforaciones: a través de una de ellas se introduce la solución de prueba, después de que se estabiliza la respiración endógena de los microorganismos, la temperatura y las lecturas del termobarómetro; La otra división conecta los recipientes a los manómetros, los cuales tienen una rama abierta y otra cerrada, ambas graduadas en milímetros. En la unión de ambas ramas se encuentra una jeringa sujeta a una pequeña prensa de tornillo que sirve como depósito de una solución Brodie manométrica. Los niveles de dicha solución se ajustaron en la rama cerrada moviendo el émbolo de la jeringa hasta 250 mm como punto de referencia. La misma rama conecta con los frascos de reacción a través de una llave de tres vías, la cual conecta o aísla el frasco de reacción.

Durante la utilización de la solución experimental los organismos consumen oxígeno haciendo que la presión dentro de la rama cerrada del manómetro disminuya provocando que aumente el nivel de la solución manométrica en la rama abierta; se lleva entonces al nivel de referencia y se registra la lectura en la rama abierta durante los intervalos de tiempo establecidos (5 ó 10 minutos).

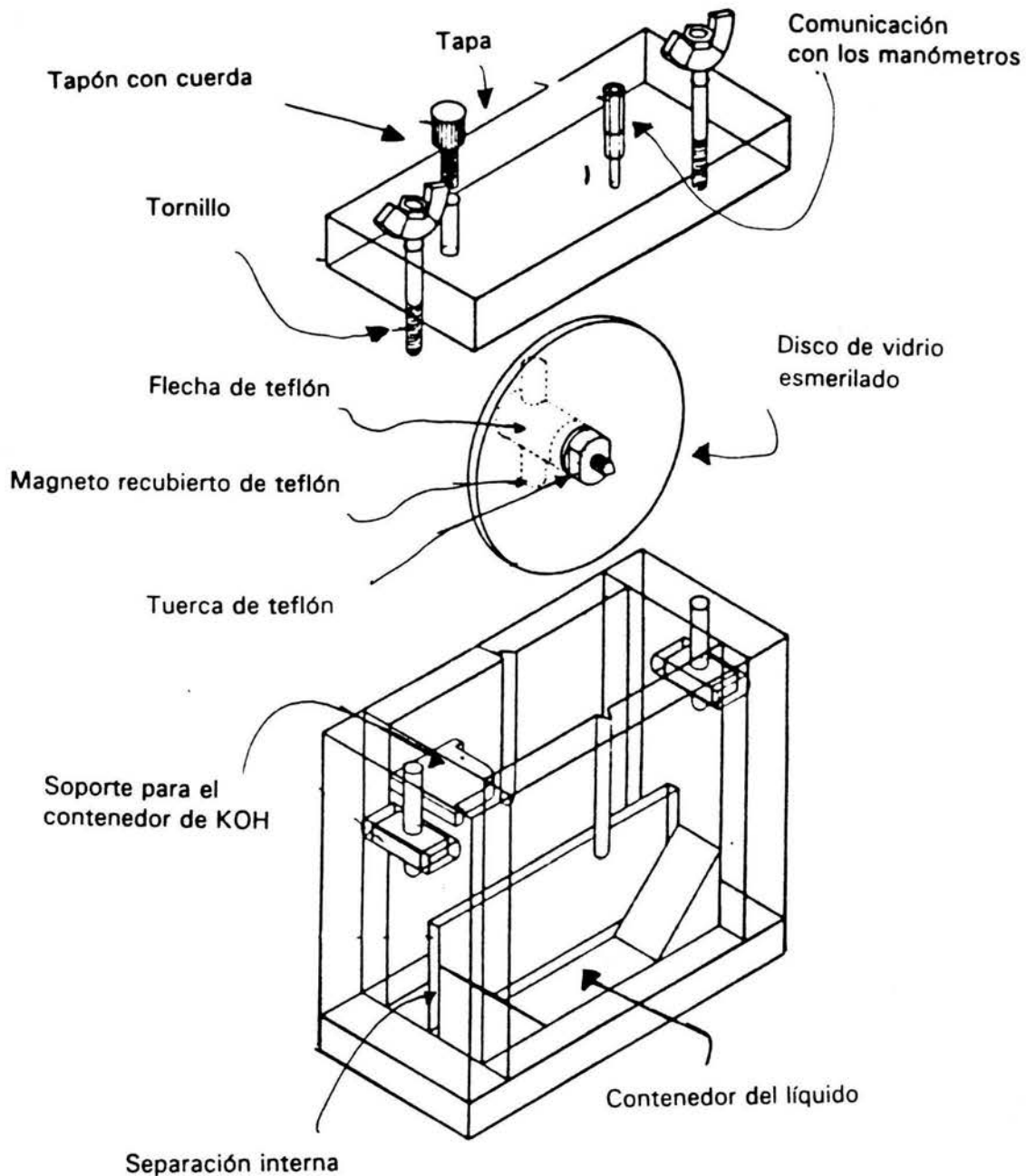


Figura 4.5 Esquema que muestra el diseño de los frascos de reacción

Los valores de respiración total mixta o combinada de la población microbiana se graficaron como consumo bioquímico de oxígeno (CBO) respecto del tiempo de experimentación. También se obtuvieron gráficas de de la respiración exógena a partir de la resta de los valores de respiración total o combinada a los de respiración endógena. Para obtener ambos tipos de gráficas se utilizó un programa de computadora y los valores que se obtuvieron de la experimentación se presentan en el apendice C. A partir de las gráficas se analiza el efecto que los tóxicos tienen sobre la película biológica.

## 5. RESULTADOS Y ANALISIS

En este capítulo se presentan y discuten los resultados del trabajo propuesto en la metodología.

### 5.1 ESTUDIOS EN CARACOLES

#### 5.1.1 Ubicación taxonómica

La siguiente es la clasificación taxonómica que corresponde a los caracoles que se encuentran en el biodisco de la planta para tratamiento de la UNAM. Para dicha clasificación se utilizaron las claves propuestas por Burch y Cruz (1987).

Phyllum Mollusca  
Clase Gastrópoda  
Subclase Pulmonata  
Superorden Bassomathophora  
Orden Lymnophila  
Superfamilia Ancyloidea  
Familia Physidae  
Subfamilia Physinae  
Género *Physa*

El género se reconoció a través de una serie de características de la morfología externa: La concha es de forma cónica, de color café oscuro con bandas sobre su superficie, carece de opérculo y de ornamentaciones, la espira de la concha se presenta levantada, espira y concha se enrollan hacia la izquierda. La cabeza tiene un par de tentáculos y ojos cerca de la base de éstos. En las figura 5.1 y 5.2 se representan algunos de los rasgos más distintivos de la concha y de la organización de *Physa*.



Figura 5.1 Morfología característica de la concha de *Physa* sp

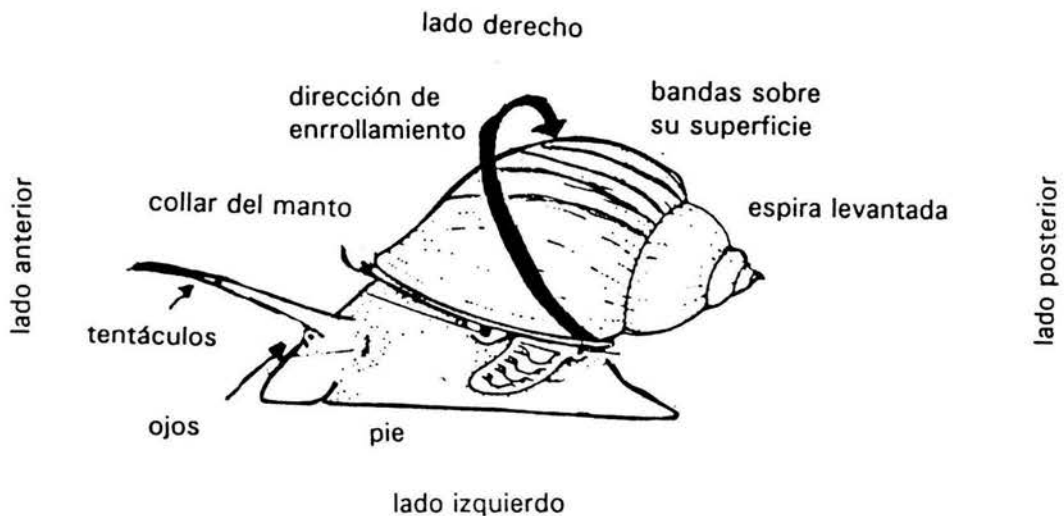


Figura 5.2 Organización morfofuncional de *Physa* sp

### 5.1.2 Determinación de la concentración letal media (LC50)

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

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

TABLA 5.1 RESULTADOS DEL ENSAYO CON BAYLUSCID EC250

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

TABLA 5.2 RESULTADOS DEL ENSAYO CON PIQUEROL A

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

Los valores positivos y diferentes de cero de la pendiente  $\beta$  indican una tasa de mortalidad positiva, la cual aumenta con respecto a la relación log de la

concentración-tiempo. Esto se observó hasta las 8 y 10 horas para Bayluscid y Piquerol, respectivamente; después, el valor de  $\beta$  decrece, lo cual significa que la efectividad de los molusquicidas está limitada respecto al tiempo e indica el límite de tolerancia fisiológico máximo de la población después del cual el efecto de los tóxicos empieza a decrecer y se vuelve independiente de la concentración. Estos valores pueden también indicar que al reaccionar los compuestos con los caracoles, las concentraciones de las dosis administradas cambian respecto al tiempo, lo cual impide que se mantengan en el mismo nivel durante todo el tiempo de experimentación.

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

Los valores de varianza de la pendiente demuestran que los caracoles manifiestan gran susceptibilidad a los tóxicos, principalmente de las 4 a las 8 horas con Bayluscid y de 6 a 10 horas con Piquerol, debido a que durante este período se observan los valores más bajos de dicha varianza durante todo el tiempo de experimentación

De acuerdo con los resultados de las LC50, Bayluscid es un producto más tóxico que Piquerol, al presentar niveles de concentración menores a éste durante todo el tiempo de bioensayo. De cualquier modo ambos compuestos se adecúan a los requerimientos de la WHO (1965, 1983, 1988), la cual establece un máximo de concentración de 100 mg/l para provocar mortalidades superiores al 90 % en un tiempo no mayor a 24 horas. La decisión de utilizar uno u otro dependerá de la disponibilidad del compuesto y de su precio.



### 5.1.3 Determinación del tamaño y distribución de edades de la población de caracoles

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

-El pie característico de los caracoles de agua dulce funciona como un órgano adhesivo y tiene forma de suela plana, está adaptado para la locomoción en diversos sustratos principalmente arena y fondos lodosos. La base del pie presenta una glándula pedal; la cual secreta un camino mucoso sobre el que se deslizan con rapidez y a pasos cortos los caracoles.

-La concha de algunos caracoles de la clase gastrópoda tiene la espira corta y elevada, la cual está adaptada al movimiento vertical (los caracoles del biodisco tienen este tipo de espira ver figura 5.1), las conchas bajas y anchas ofrecen menos resistencia a las corrientes de agua.

-Las características morfológicas mencionadas de *Physa* sp determinan que su capacidad de adherencia y desplazamiento sobre la superficie del biodisco aumenten al disminuir el espesor de biopelícula y el impacto de la entrada de agua al biodisco (ver capítulo 3), como consecuencia los caracoles prefieren "vivir" en la última etapa. En un muy pequeño número también se encuentran individuos en la primera etapa del biodisco.

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

A partir de los datos que se obtuvieron en los muestreos se estimaron algunos parámetros estadísticos, los cuales son necesarios para calcular el tamaño de la población y corresponden a:

media ( $\bar{X}$ ) = 533,  
varianza ( $\bar{O}^2$ ) = 751,  
desviación estándar ( $\bar{O}$ ) = 27.41,  
error estándar ( $\bar{O}_x$ ) = 0.63.

El tamaño de la población con respecto al área total de muestreo y su intervalo de confianza se calcularon mediante la expresión: (ver inciso 4.1.4 de este trabajo)

$$N [(X \pm \bar{O}_x t_{(n-1) 0.05})] \quad (3)$$

sustituyendo los valores,

$$12 [533 \pm (0.63) (2.6)] = \mathbf{6415; 6376} = \text{tamaño de la población de caracoles en el Biodisco de C.U.}$$

La distribución por edades constituye una característica importante de la población, la proporción de los diversos grupos de edades indica la condición de ésta. Por regla general, una población en expansión rápida comprenderá una gran proporción de individuos jóvenes y una población estable comprenderá una distribución más uniforme de edades, en tanto que la población decadente contendrá una gran proporción de individuos viejos. Se sabe que las poblaciones tienden hacia una distribución de edades estable.

La distribución por edades de la población de caracoles se muestra en la tabla 5.3: El 41.2% corresponde a organismos pequeños que miden 0.01 a 4.0 mm, el 38.3% son caracoles medianos cuyo tamaño es de 4.1 a 8.0 mm, los organismos grandes miden de 8.1 a 13.0 mm y comprenden el 20.5% de la población.

De acuerdo con estos resultados la población tiene una distribución de edades moderada y ligeramente superior de individuos jóvenes, por lo que se puede pensar que la población compuesta por 6415 individuos que "viven" en el biodisco ha llegado a la estabilidad (no está en expansión y

decadencia). Una vez que se ha logrado una distribución estable en materia de edad, los aumentos extraordinarios de natalidad o mortalidad son altamente improbables.

TABLA 5.3 CARACTERISTICAS DE *Physa* sp EN EL BIODISCO DE C.U.

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

\*Adaptado de Clappitt, (1970). \*\* En la última placa del biodisco

De acuerdo con Lotka (1956) en Odum (1984) si la estabilidad de la población se rompe a causa de cambios temporales en el medio (en este caso la adición de un compuesto no habitual al sistema) la distribución de las edades tenderá a volver a la situación anterior. Cambios más permanentes se traducen en el desarrollo de una nueva situación estable.

Esto refleja la problemática que se presenta cuando se desea controlar una población debido a que al desaparecer del medio el compuesto perturbador los individuos que "quedan" tienden a repoblar el hábitat. Por ello es necesario planear adecuadamente el método de control indicando el tiempo de aplicación con objeto de evitar la proliferación de las especies resistentes que "quedan" en el sistema. Esta problemática se retoma en el capítulo 6 donde se propone como aplicar los tóxicos en sistemas de película biológica si se comprueba que esto sea necesario.

#### 5.1.4 Determinación de la distribución espacial de la población de caracoles

Los individuos de una población pueden estar distribuidos según tres grandes grupos: a) al azar, b) uniforme y c) amontonados (Franco, 1985). La distribución al azar tiene lugar en donde el medio es muy uniforme. La distribución uniforme ocurre donde la competencia entre individuos es activa

o donde existe un antagonismo positivo que provoca un espaciamiento regular. Finalmente el amontonamiento refleja una interacción positiva entre los individuos de la población. Se han sugerido diferentes métodos que pueden utilizarse para analizar el tipo de dispersión de una población. Uno de ellos es la razón de varianza media (ver inciso 4.1.5).

La distribución calculada mediante la razón de varianza media es:

$$1 - [t_{(n-1) 0.05} (\bar{O}_x)] < \bar{O}^2/X < 1 + [t_{(n-1) 0.05} (\bar{O}_x)] \quad (5)$$

sustituyendo valores de la expresión anterior,

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

De acuerdo con la ecuación los resultados demuestran que la población se distribuye al azar en el biodisco. Para comprobarlo se aplicó el índice de Morisita ( $I_m$ ):

$$I_m = \frac{n \bar{O}_z(z_i - 1)}{N(N-1)} \quad (6)$$

sustituyendo valores,

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

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

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

La densidad de la población se expresa como número de individuos por unidad de superficie o volumen. Usando la ecuación 7 del capítulo 4 se tiene que la densidad (D) de la población de caracoles es:

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

Por otro lado cada individuo de la población se puede caracterizar por una biomasa y con ella contribuye a la biomasa total del sistema. Dos propiedades del individuo se refieren a como realiza tal contribución: a) dura un tiempo limitado, hasta que sobreviene la muerte y b) mientras vive su biomasa no permanece constante, sino que generalmente aumenta (Southwood, 1978). Ambas características de los individuos fueron tomadas en cuenta (ver inciso 4.1.6) y se calcularon mediante la ecuación:

$$B = D(\bar{w}/n) \tag{8}$$

sustituyendo los valores,

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

Esto indica que 9 caracoles pesan 1.0 g como masa húmeda, ya tomando en cuenta la distribución de tamaños presente. Se determinó que del biodisco salen diariamente 709 g de caracoles  $[(30.60\text{g/m}^2) (23.16 \text{ m}^2)]$ . El valor de  $23.16 \text{ m}^2$  es lo que mide la superficie total de la última placa del biodisco. Con base en estos valores se puede pensar que la masa de caracoles que salen del biodisco al sedimentador secundario es muy baja para que pueda obstruir las tuberías de la planta. Ingram *et al* (1958) reportan que las tuberías se taparon al fluir por ellas hasta media tonelada diaria de conchas de caracoles.

Desde el punto de vista trófico y por simplicidad puede dividirse al biodisco en solo dos niveles: organismos productores (los que forman la biopelícula) y consumidores (representados por los caracoles). Se ha visto que el nivel trófico, el tamaño de los organismos, su densidad y su metabolismo están altamente correlacionados. Los animales grandes ocupan generalmente niveles tróficos superiores como consumidores y los muy pequeños son productores. Cuanto más bajo es el nivel trófico más alta es la densidad de la población. Se ha calculado que mil millones de bacterias pesan 1.0 g (Margaleff, 1983) y se obtuvo que 9 caracoles pesan 1.0 g.

El metabolismo por gramo de biomasa de los organismos pequeños es inmensamente mayor que la velocidad metabólica de organismos mayores (Margalef, 1974). En este caso aunque pase más energía a través del nivel trófico productor, que a través de los caracoles, el metabolismo y la renovación rápida de los microorganismos genera una producción mayor, con una biomasa permanentemente más pequeña. Consecuentemente la velocidad metabólica por gramo de biomasa será superior en los microorganismos que en los caracoles.

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

#### **5.1.6 Determinación del consumo de biopelícula por la población de caracoles**

Tomando en cuenta los experimentos realizados en el laboratorio sobre consumo de biopelícula por parte de los caracoles, se obtuvo que el consumo individual por día de biopelícula fue de  $0.21 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ , lo cual significa que la población consume el 6.4% por día de un volumen de biopelícula de  $2.1 \times 10^{-3} \text{ m}^3$  en la última placa (el espesor medio aproximado de biopelícula en dicha placa es de  $0.9 \times 10^{-4} \text{ m}$  y el área de la misma es de

23.16 m<sup>2</sup>). Esto significa que los caracoles podrían consumir completamente la biopelícula en 15 días si ésta no se regenerase.

#### **5.1.7 Efecto de los caracoles en la remoción de contaminantes del sistema de biodiscos**

Como ya se mencionó (ver capítulo 3) la configuración por etapas del biodisco caracteriza la remoción secuencial de sustrato y conduce al desarrollo en la última etapa de un gran número de bacterias nitrificantes (*Nitrobacter* y *Nitrosomonas*). Oga *et al* (1991) señalan que la biomasa característica de la última etapa presenta un bajo nivel de adherencia y por lo tanto una baja densidad volumétrica, además de un lento período de crecimiento. Según Ramírez (1988) los microorganismos de la última etapa se duplican aproximadamente cada 15 a 20 días. Bajo esta perspectiva puede pensarse que el consumo de 6.4% de biopelícula afecta la eficiencia del proceso (nitrificación deficiente).

Para conocer si la presencia de caracoles ha afectado el proceso de remoción de contaminantes se hace una comparación de la cantidad de materia orgánica (medida como DBO<sub>total</sub>) y de nitrógeno (medido como nitrógeno amoniacal N-NH<sub>3</sub>) de mayo a julio de 1983 (6 meses después de estar operando el sistema) con el mismo período pero de 1990. En esta parte de la tesis se utilizan los resultados que Norouzian (1983) presenta en su trabajo donde hace una evaluación del funcionamiento del biodisco. Los datos de 1990 fueron extraídos de la bitácora de operación de la planta. En la tabla 5.4 se muestran los datos encontrados en la literatura sobre las pruebas mencionadas.

Considerando únicamente la concentración de contaminantes (no el caudal de agua tratada), el valor promedio del influente puede ser el valor total (100% de contaminantes) que recibe el sistema; la diferencia del valor promedio de influente y efluente es la cantidad de contaminantes eliminados. Esto sirve para obtener los valores que se presentan en la tabla 5.5:



TABLA 5.4 RESULTADOS REPORTADOS EN LA LITERATURA DE DBO<sub>total</sub> Y N-NH<sub>3</sub> DE 1983 Y 1990

Días del mes de:	1983		1990		1983		1990	
	Influyente		Efluyente		Influyente		Efluyente	
	DBO <sub>total</sub> (mg/l)		DBO <sub>total</sub> (mg/l)		N-NH <sub>3</sub> (mg/l)		N-NH <sub>3</sub> (mg/l)	
Marzo	162	33	51	8				
	114	50	84	11				
	105	60	66	14				
	102	30	54	7				
Abril	60	22	42	7				
	150	55	114	9				
	134	20	117	9				
	120	45	45	7				
	120	45	45	7				
	100	30	129	11				
	120	20	54	8				
	105	85	138	36				
	120	45	50	11				
	220	80	99	14				
	110	25	66	9				
	160	45	78	8				
	125	42	102	11				
	165	75	54	14				
	120	30	108	23				
	135	30	99	47				
	185	25	195	46				
	165	30	189	45				
	120	16	150	40				
	165	42	150	40				
	75	27	120	40				
	110	30	171	34				
Valor promedio	131.79	40.24	94.79	19.10	12.33	3.62	8.32	6.47

\* La muestra influente de ambos años se tomó en el Parshall (ver figura 3.3). \*\* La muestra efluente de 1983 se tomó en la salida del biodisco hacia el sedimentador. \*\*\* La muestra efluente de 1990 se tomó en el sedimentador. \*\*\*\* Las determinaciones analíticas se hicieron de acuerdo al manual Methods Standard.



TABLA 5.5 COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE REMOCION DE DBO Y N-NH<sub>3</sub> ENTRE 1983 Y 1990

1983		1990	
132 (mg/l de DBOt)	100%	95 (mg/l de DBOt)	100%
92 "	70%	76 "	80%
12.33 (mg/l de N-NH <sub>3</sub> )	100%	8.32 (mg/l de N-NH <sub>3</sub> )	100%
8.71 "	71%	1.85 "	22.33%

Las operaciones anteriores muestran que la concentración de contaminantes del agua que trata la planta ha disminuido. La proporción de materia orgánica que remueve el sistema se ha incrementado un 10% (80%-70% = 10%) y la de nitrógeno ha disminuido en un 49% (71.1%-22.23% = 49%).

Es importante aclarar que el trabajo de Norouzian (1983) abarca hasta el mes de agosto y que no es posible su comparación con 1990 debido a que el biodisco estuvo fuera de servicio durante dicho mes. Por otra parte Norouzian inicia en mayo sus determinaciones de N-NH<sub>3</sub>; esto impide que puedan compararse los meses de marzo a abril entre las fuentes consultadas

A pesar de esta limitación los porcentajes de eliminación de contaminantes reportados por Norouzian (138 mg/l de DBOt - 37 mg/l de DBOt x 100/138) = 73% y (12.24 mg/l de N-NH<sub>3</sub> - 3.37 mg/l de N-NH<sub>3</sub> x 100/12.14) = 72% son muy similares a los estimados a partir de los datos de la tabla 5.4.

Norouzian analiza la eficiencia de remoción de nitrógeno desde dos puntos de vista: De acuerdo al material nitrógenado que se esperaba eliminar conforme al diseño del biodisco y con base en determinaciones de pH, alcalinidad, temperatura, concentración de amoníaco, DBO y oxígeno disuelto, del agua que trata el sistema de biodiscos. Los resultados que obtiene indican condiciones favorables para que se lleve a cabo el proceso de nitrificación con menos de 1 mg/l de N-NH<sub>3</sub> en el efluente. El valor de 3.37 de N-NH<sub>3</sub> no concuerda con lo esperado y en 1990 el efluente fue de 6.47 mg/l de N-NH<sub>3</sub>.

Norouzian propone que la baja remoción de nitrógeno se debe a que la planta recibe material proveniente de los laboratorios de C.U. que puede ser inhibitorio o tóxico para las bacterias nitrificantes y que la presencia de organismos depredadores de las bacterias, como protozoarios, rotíferos, nemátodos y caracoles aumentan en la segunda y tercera etapa del sistema. Antonie (1976) coincide con Norouzian para explicar la ineficiente remoción de nitrógeno, observada en una planta piloto con biodiscos en Wisconsin E.U.A., la cual atribuye a la presencia de los mismos organismos depredadores (excepto los caracoles).

En lo que se refiere a la presencia de compuestos tóxicos, Ochoa (1983) en su trabajo donde hace una evaluación de la calidad del agua tratada en la planta de C.U. afirma que la concentración de sustancias que pudieran ser tóxicas para los microorganismos es muy baja y no influye en la eficiente actividad biológica que se lleva a cabo en los diferentes sistemas que conforman dicha planta.

Con base en lo expuesto es altamente probable que la población de caracoles haya aumentado desde la puesta en marcha del sistema hasta obtener la estabilidad que actualmente presenta, lo cual tiene como consecuencia que el efluente nitrificado aumente de 3.37 a 6.47 mg/l de N-NH<sub>3</sub>, de 1983 a 1990, respectivamente. Sin embargo esto podrá comprobarse cuando no haya caracoles en el sistema y se analice la calidad del agua tratada.

## **5.2 ESTUDIOS DE RESPIROMETRIA**

Como se indicó en el capítulo 4, se realizaron experimentos con el respirómetro Warburg para conocer los efectos inhibitorios de Bayluscid y Piquerol sobre la película biológica.

### **5.2.1 Efectos de Bayluscid sobre la biopelícula**

Se realizaron tres corridas en el respirómetro adicionando Bayluscid en: a) una solución Buffer de fosfatos (el sustrato lo constituye únicamente Bayluscid), b) en combinación con una solución concentrada a 300 mg/l de

glucosa y c) con agua residual proveniente del sistema de biodiscos de C.U. En las soluciones mencionadas se diluyeron las siguientes concentraciones: 0.33, 0.057, 0.0077 y 0.0026 mg/l, las cuales corresponden a las 6, 8, 10 y 24 horas de exposición, respectivamente, del compuesto actuando sobre los caracoles. Las gráficas que se presentan en esta parte del trabajo indican el Consumo Bioquímico de Oxígeno de los microorganismos, en la ordenada al origen, en función del tiempo, en el eje de la abscisa, con diferentes concentraciones de tóxico.

La figura 5.3 muestra que los frascos conteniendo Bayluscid presentan valores superiores a los de respiración endógena. Esto indica que Bayluscid es utilizado como sustrato por los microorganismos que forman la película biológica. Las pendientes de las curvas con Bayluscid aumentan al disminuir la concentración del tóxico, lo cual indica que si tiene efectos inhibidores sobre la biopelícula y que aumenta la intensidad inhibidora con la concentración.

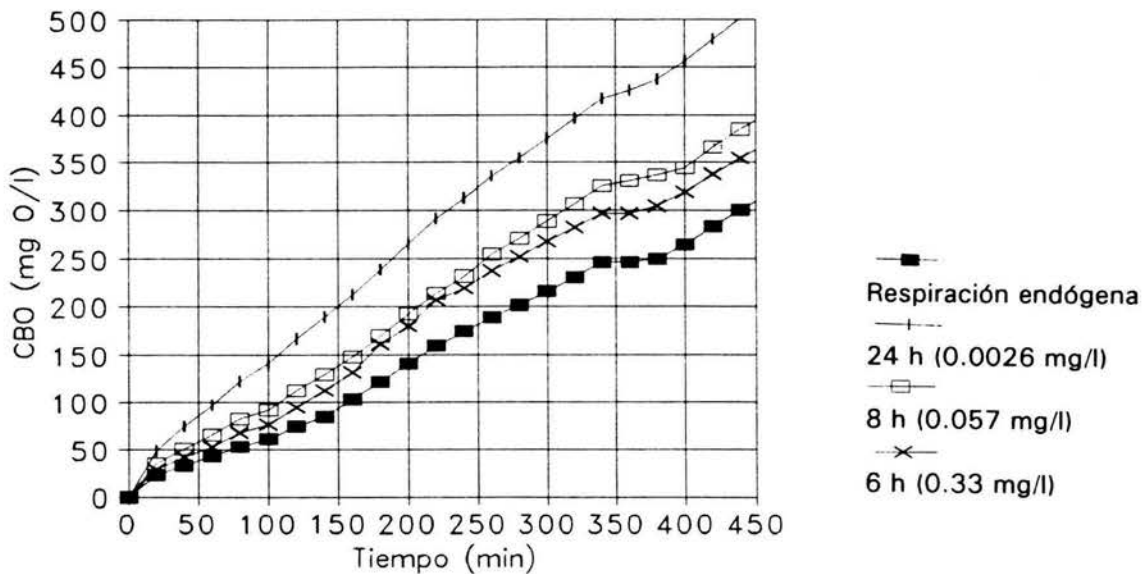


Figura 5.3 Efecto de Bayluscid diluido en una solución Buffer de fosfatos en la respiración microbiana, en ausencia de un sustrato orgánico.

La figura 5.4 muestra los valores de las curvas de la figura 5.3 después de restarles la respiración endógena (curvas reducidas). Dichas curvas muestran los valores de la respiración en presencia de Bayluscid como único

sustrato. Esta figura muestra que el Bayluscid es utilizado más rápidamente a bajas concentraciones.

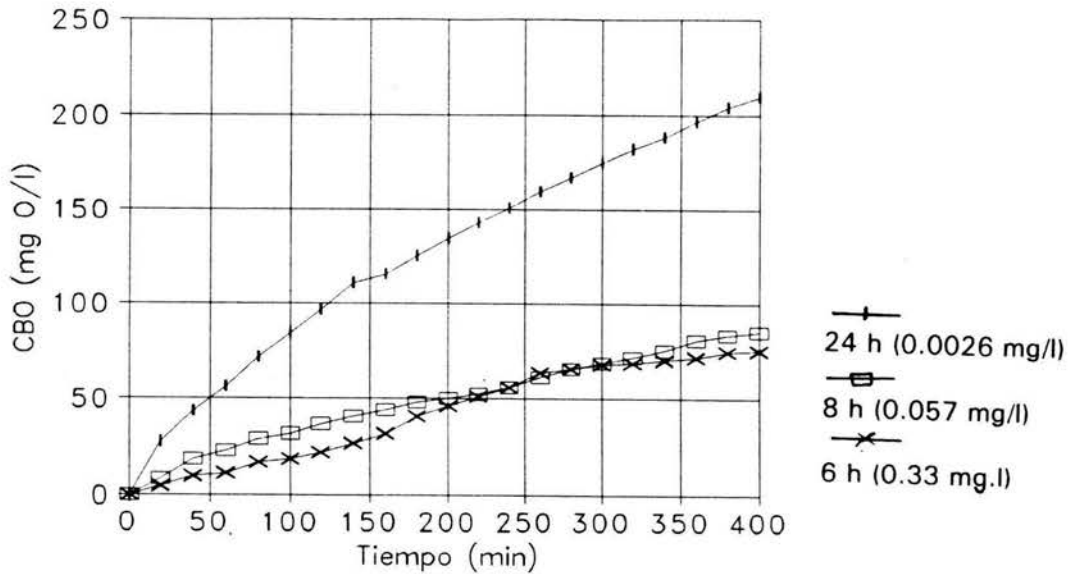


Figura 5.4 Respiración exógena con Bayluscid en ausencia de un sustrato orgánico.

Aunque las concentraciones de Bayluscid son muy bajas, no se observa una reducción significativa de las pendientes, lo cual indicaría que los microorganismos consumieron el compuesto en su totalidad en el tiempo del ensayo (más de 6 horas). Se observa también que las concentraciones de 0.057 y 0.33 mg/l no presentan diferencias significativas en su comportamiento.

En las figuras 5.5 y 5.6 se puede observar que todas las curvas de respiración de glucosa con Bayluscid tienen valores superiores a la respiración endógena. El hecho de que las pendientes de las curvas con Bayluscid sean superiores indican que este compuesto es utilizado, junto con la glucosa, como fuente de alimento por los microorganismos y que los efectos inhibitorios de Bayluscid aumentan con la concentración.

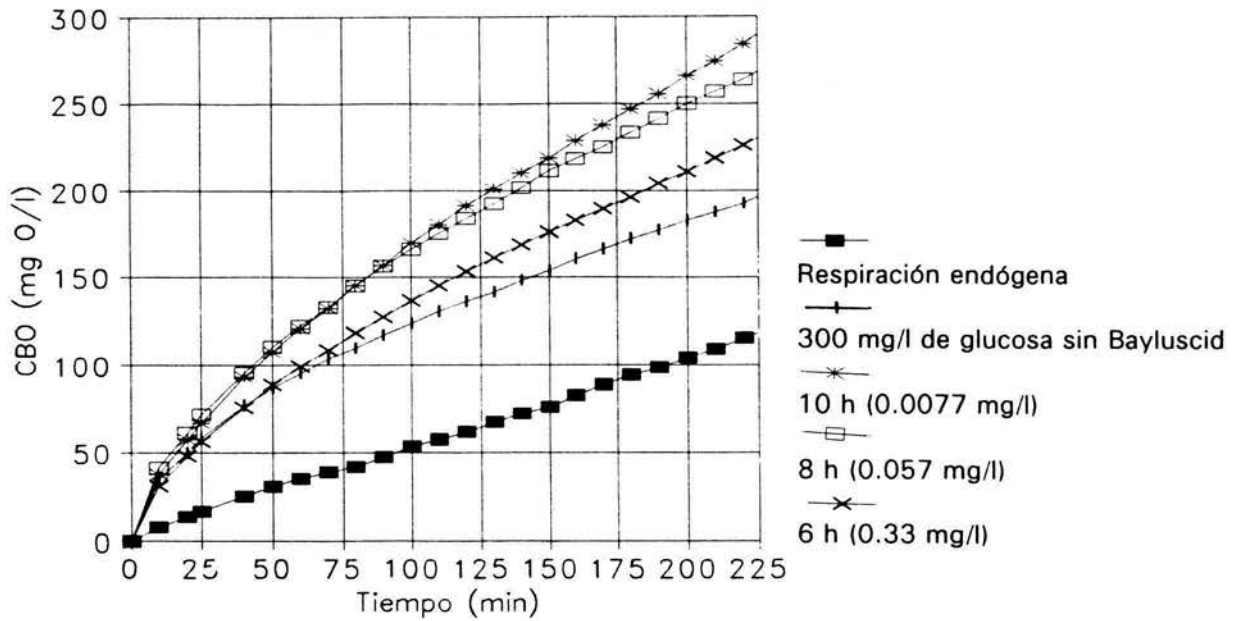


Figura 5.5 Efecto de Bayluscid diluido en una solución concentrada a 300 mg/l de glucosa en la respiración microbiana durante la degradación de glucosa

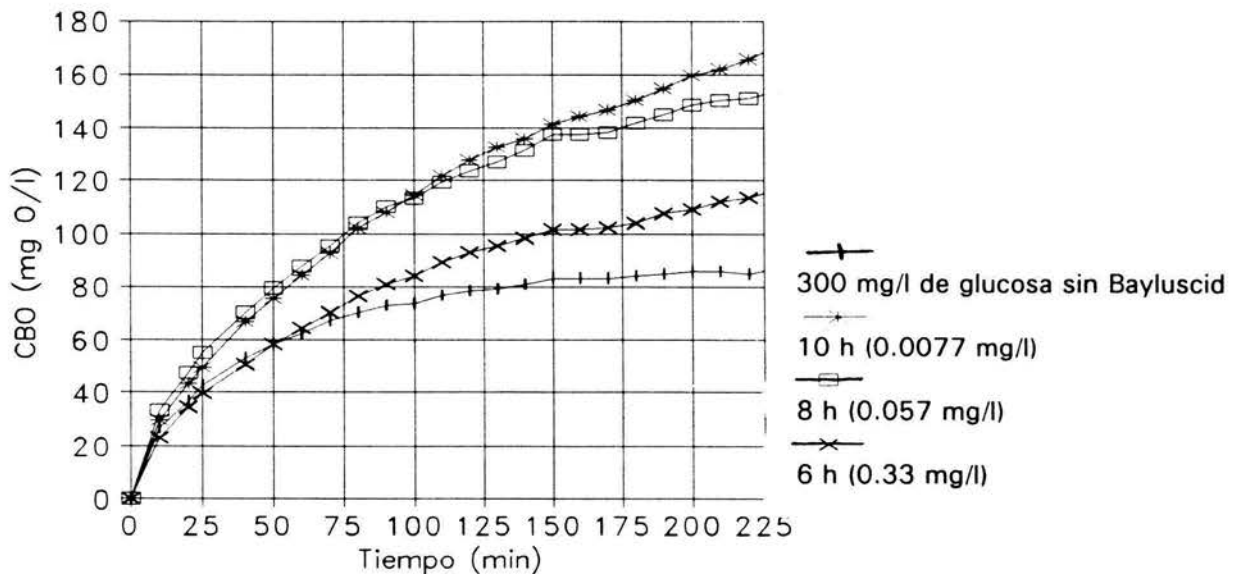


Figura 5.6 Respiración exógena de Bayluscid en combinación con glucosa.

Una comparación de las curvas de 0.057 y 0.33 mg/l de la figura 5.4 con las mismas concentraciones de la figura 5.6 muestra que los microorganismos consumieron más oxígeno en presencia de un sustrato

energético y fácil de degradar que cuando no lo tienen. También se observa que la curva del frasco con glucosa y sin Bayluscid llega a la asintótica a los 150 minutos, lo cual indica el tiempo que requieren los microorganismos para degradar 300 mg/l de glucosa bajo las condiciones estipuladas.

Al igual que en las figuras 5.3 y 5.4 las pendientes de las curvas son mayores y nunca alcanzan un valor estable a pesar de las bajas concentraciones utilizadas. Esto puede deberse a que la respiración necesaria para degradar la glucosa y el Bayluscid es mayor, de modo que el valor de respiración se mantiene sobre el valor de respiración endógena sin que se observe que el sustrato exógeno se ha agotado para que pueda regresar al valor de respiración endógena.

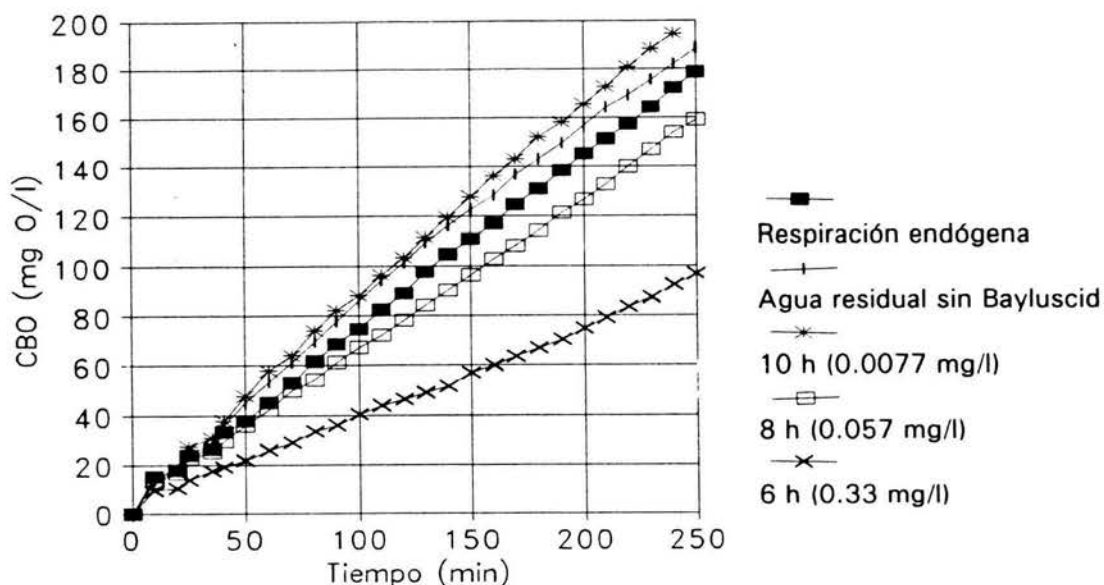


Figura 5.7 Efecto de Bayluscid diluido en agua residual de C.U. en la respiración microbiana durante la degradación de los contaminantes del agua residual.

Las figuras 5.7 y 5.8 muestran que la respiración durante el consumo de los contaminantes del agua residual es superior a la respiración endógena y que solamente la curva correspondiente a la respiración del agua residual con la concentración menor de Bayluscid (0.0077 mg/l) presenta valores superiores a los de respiración endógena. Es posible que la combinación de Bayluscid

con agua residual genere un efecto potenciador del tóxico sobre los microorganismos. Este fenómeno no se observa en ausencia de sustrato (figuras 5.3 y 5.4) y durante la degradación combinada con glucosa (figuras 5.5 y 5.6). En este caso los resultados indican que Bayluscid en presencia de aguas residuales tiene efectos inhibidores importantes durante la degradación de ambos sustratos.

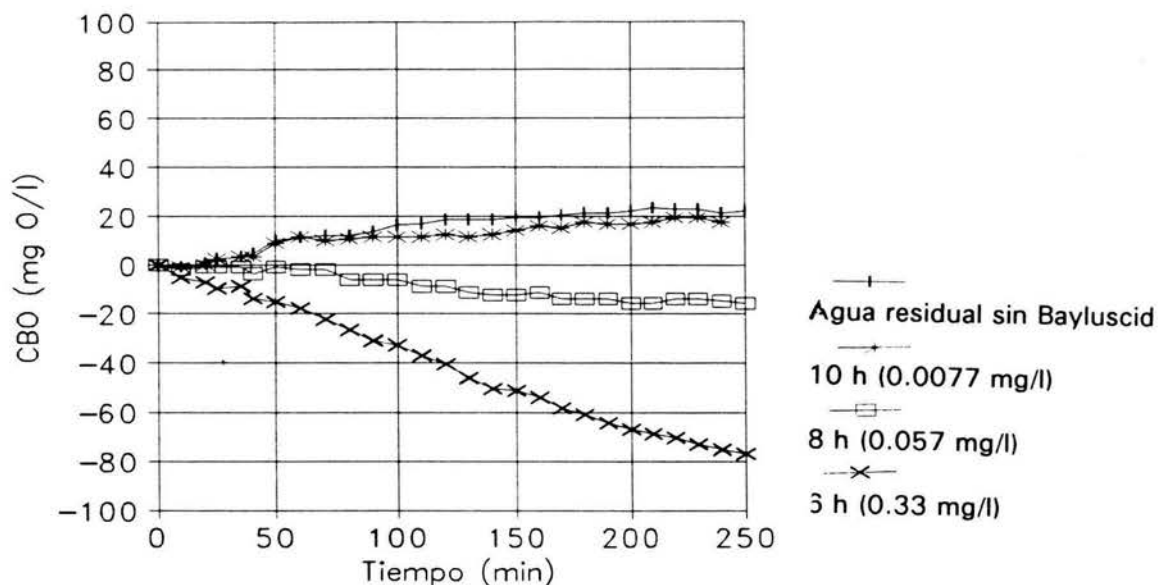


Figura 5.8 Respiración exógena de Bayluscid en combinación con agua residual.

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



química de Bayluscid corresponde a una Niclosamida por consiguiente este compuesto puede ser biodegradado con relativa facilidad. Sin embargo se observa que esto ocurre a concentraciones muy bajas, (0.0077 mg/l). Esta curva tiene un comportamiento similar a la de agua residual sin Bayluscid.

En los bioensayos se pudo observar que los efectos tóxicos de Bayluscid sobre los caracoles se atenúan después de 10 horas. Esto puede deberse a dos factores: a) Degradación biológica de Bayluscid o b) Adsorción del compuesto (sin ser metabolizado) por los organismos que entran en contacto con él. En casi todas las curvas de las figuras 5.3 a la 5.8 se observa una reducción de las pendientes de las curvas en los experimentos conteniendo Bayluscid. Esto indica una reducción de los efectos tóxicos conforme transcurre el tiempo. Según Volskay y Leslie (1990) al transcurrir el tiempo de exposición, aumenta la probabilidad de que los organismos sintetizen enzimas para la degradación de los compuestos originalmente extraños.

### **5.2.2 Efectos de Piquerol A sobre la biopelícula**

De forma similar que con Bayluscid, se realizaron experimentos con Piquerol para conocer sus efectos inhibidores sobre los microorganismos de la película biológica. Se hicieron dos experimentos en el respirómetro: a) adicionando Piquerol a una solución Buffer de fosfatos y b) adicionando Piquerol a una solución de 300 mg/l de glucosa. Las concentraciones que se utilizaron fueron: 39.86, 13.86, 7.36 y 3.41 mg/l, las cuales corresponden a las 6, 8, 10 y 24 horas del tóxico actuando en los caracoles.

Las figuras 5.9 y 5.10 muestran las curvas de respiración de la biopelícula sin sustrato y en presencia de Piquerol. Estas figuras muestran que solamente la curva de 39.86 mg/l presenta valores inferiores a los de respiración endógena, lo cual indica que a esta concentración los microorganismos están siendo inhibidos. El hecho de que los valores de respiración con las concentraciones de: 3.41, 7.37 y 13.86 mg/l sean mayores que la respiración endógena indica que Piquerol está siendo degradado por los microorganismos. La degradación de Piquerol tiene sobre la biopelícula efectos similares a los de Bayluscid. Las curvas de respiración



tienden a disminuir sus pendientes conforme transcurre el tiempo sin que lleguen a los valores de respiración endógena. Debido a que las concentraciones son muy bajas, no es de esperar que los microorganismos requieran cantidades muy elevadas de oxígeno para degradar el inhibidor.

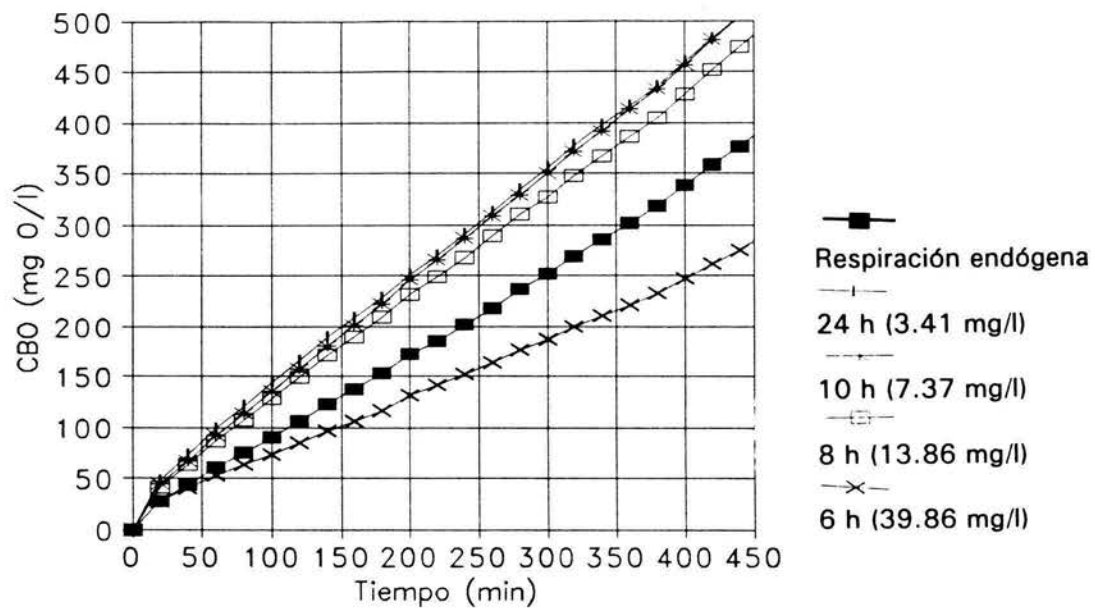


Figura 5.9 Efecto de Piquerol diluido en una solución Buffer de fosfatos en la respiración microbiana, en ausencia de un sustrato orgánico.

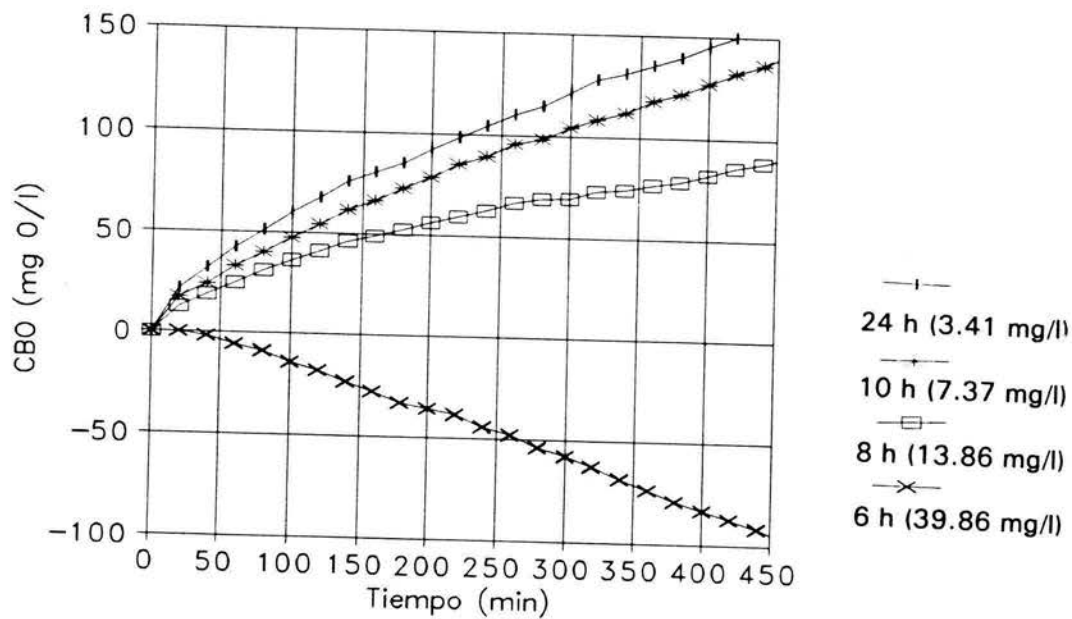


Figura 5.10 Respiración exógena con Piquerol en ausencia de un sustrato orgánico.

Con base en los valores de 0.33 y 0.0077 mg/l de la figura 5.8 y 39.86 mg/l de la figura 5.11; se puede concluir que los dos tóxicos tienen efectos activados sobre los procesos de respiración haciendo que el metabolismo microbiano sea inhibido. Las concentraciones mencionadas son las más elevadas y provocan que los organismos consuman menos cantidades de oxígeno.

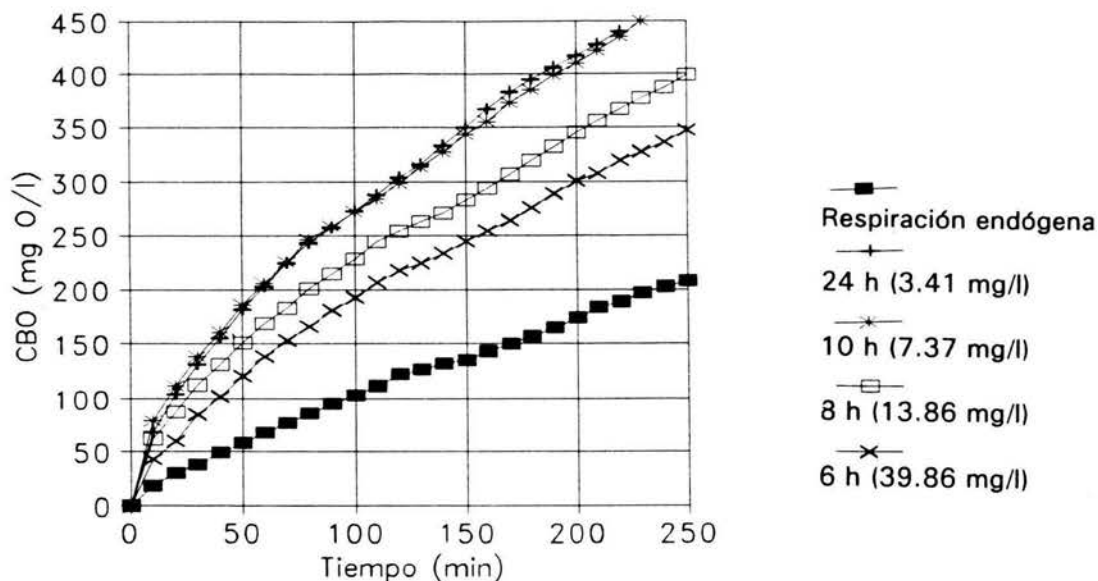


Figura 5.11 Efecto de Piquerol diluido en una solución concentrada a 300 mg/l de glucosa en la respiración microbiana, durante la degradación de glucosa.

Las figuras 5.11 y 5.12 muestran las curvas de respiración de glucosa en presencia de Piquerol. Se puede observar que, a pesar que la concentración de 6 horas inhibe radicalmente la respiración en ausencia de sustratos, en presencia de glucosa el comportamiento es similar al de las otras concentraciones: todas ellas tienen pendientes positivas y valores de consumo de oxígeno superiores a los de respiración endógena y superiores a los que se obtienen con Bayluscid bajo las mismas condiciones (ver figura 5.6).

Esto indica que Piquerol tiene efectos inhibitorios menos drásticos que Bayluscid. A menores concentraciones de Piquerol se observan los valores

más altos de respiración sin que ninguno de ellos tienda a valores similares a los de respiración endógena.

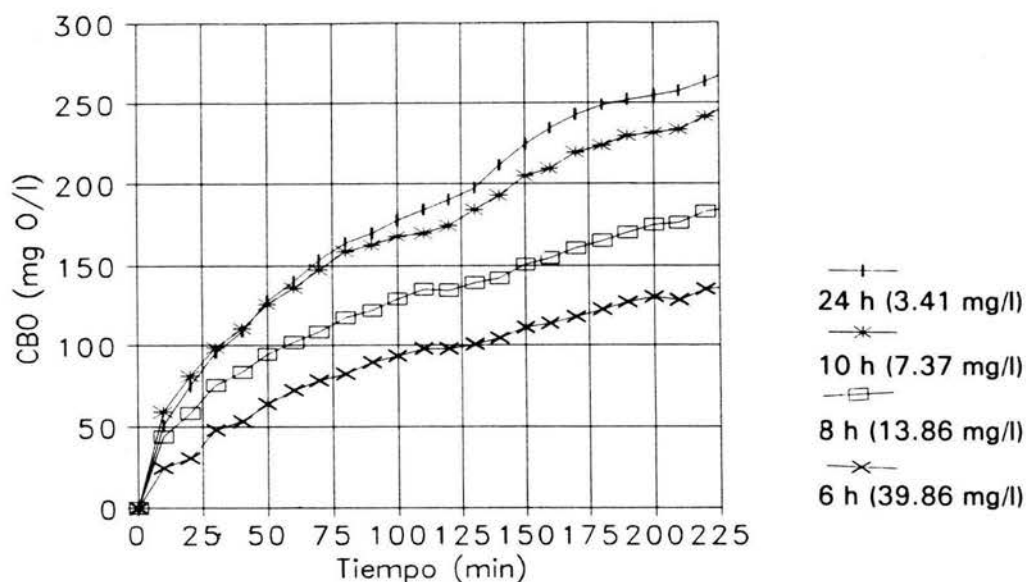


Figura 5.12 Respiración exógena con Piquerol en combinación con glucosa

### 5.2.3 Comentarios generales

Bajo condiciones experimentales similares y utilizando las concentraciones iguales (en horas), ambos moluscicidas actúan sobre la biopelícula de la misma forma. La cantidad de oxígeno consumida por los microorganismos es más alta con 24 y menor con 8 y 6 horas para Bayluscid que para Piquerol, ambos en ausencia de un sustrato orgánico (figuras 5.4 y 5.9). Las curvas de los tóxicos con glucosa son más altas a las 10 y 8 horas con Piquerol que con Bayluscid y la de 6 horas no difieren mucho entre uno y otro compuesto. Los dos tóxicos son biodegradados cuando la concentración es superior a 0.057 y 0.33 mg/l. Cuando la concentración fue de 39.86 y 0.33 mg/l para Piquerol y Bayluscid, respectivamente hubo una inhibición que no permitió a la biopelícula la oportunidad de recuperarse en los tiempos de contacto estudiados.

## **6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

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

### **6.1 Actividad depredadora de los caracoles y efectos de los molusquicidas en su metabolismo.**

1. En los sistemas para tratamiento de aguas residuales que utilizan película biológica, existen condiciones ambientales adecuadas para la propagación de caracoles dulceacuícolas, generalmente de las familias Lymnaeidae y Physidae. Su número tiende a aumentar en las partes donde la biopelícula es más delgada.

2. Bayluscid EC250 y Piquerol A cumplen los lineamientos Organización Mundial de la Salud para ser considerados molusquicidas de uso práctico y potencialmente de uso en gran escala, debido a que causan una mortalidad de caracoles superior al 90% con concentraciones inferiores a 100 mg/l en un tiempo no mayor a 24 horas.

3. Este estudio refleja que Bayluscid es más tóxico que Piquerol, debido a que presenta concentraciones letales inferiores durante todo el tiempo de bioensayo y Piquerol es más fácilmente degradado que Bayluscid debido a

que sus curvas de consumo de oxígeno son superiores para los mismos tiempos de exposición.

4. En ambos compuestos la toxicidad disminuye después de 8 horas para Bayluscid y de 10 horas para Piquerol.

5. Los caracoles que sobreviven después de 24 horas a las concentraciones más bajas empleadas para ambos tóxicos permanecen en un estado de perturbación que repercute como un efecto subletal.

## **6.2 Efectos de los molusquicidas sobre la biopelícula.**

1. Los molusquicidas estudiados actúan como un sustrato susceptible de ser biodegradado y causan una inhibición sobre la biopelícula proporcionalmente relacionada con la concentración.

2. No hay un efecto inhibitorio severo de los tóxicos sobre la biopelícula. Debido a que con prácticamente todas las concentraciones administradas se observó que los microorganismos expuestos "respiran" consumiendo cantidades de oxígeno superiores a las de respiración endógena.

3. De los resultados de bioensayo y de respirometría se concluye que para controlar la población de caracoles se pueden utilizar ambos molusquicidas porque actúan eficientemente su efecto es inmediato y su toxicidad decrece 24 horas después de aplicadó el producto.

## **6.3 Recomendaciones sobre la aplicación de los molusquicidas**

Debido a que durante los experimentos de respirometría se observó que la presencia de aguas residuales potencia el efecto tóxico se recomienda que, antes de la aplicación de los molusquicidas, se suspenda la alimentación de aguas residuales para permitir que los microorganismos degraden completamente el material orgánico presente.

En el caso de BIODISCO se aplicará la cantidad necesaria directamente en el tanque correspondiente a la zona infestada para alcanzar la concentración

deseada con los caracoles durante el tiempo seleccionado. Posteriormente se reanuda la operación normal del sistema alimentando con agua residual.

En el caso de filtro rociador es necesario, después de suspender la alimentación de aguas residuales y esperar que los microorganismos degraden el material orgánico del agua residual, que se adicione el molusquicida en el sedimentador secundario para alcanzar la concentración deseada. La recirculación de agua desde el sedimentador debe continuar durante el período seleccionado para después reanudar la operación normal alimentando aguas residuales.

El tratamiento deberá efectuarse de acuerdo con la dinámica poblacional de la especie o género de que se trate. Es conveniente utilizar los compuestos después de períodos de gran mortalidad, para disminuir aún más el tamaño de la población y prevenir su posterior multiplicación. Dichos períodos pueden ser identificados por la gran cantidad de caracoles que se desprenden de la biopelícula y fluyen junto con el agua tratada hacia el sedimentador secundario.

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

También es importante efectuar algunas determinaciones analíticas del agua tratada con los tóxicos, fundamentalmente nitrógeno amoniacal y total (método Kejdhal) DBO y DQO en el influente y efluente del sistema. Los muestreos se harán a la misma hora diariamente durante siete días antes de la aplicación de cualquiera de los compuestos e inmediatamente después del tratamiento en la misma forma. Posteriormente después de tres meses se repetirán dichos análisis, con ello se podrá obtener una evaluación de la calidad del agua y en consecuencia del funcionamiento del sistema.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrewartha H. C. (1973) *Introducción al estudio de las poblaciones animales*. Ed Alhambra, España.
- Andrews P., Thyssen, J. y Lorket D. (1986) The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. En: *The toxicology of molluscicides*. Webbe G. (ed.) Pergamon press. Inglaterra.
- Antonie R. L. (1976) *Fixed biological surfaces-wastewater treatment, the rotating biological contactor* Ed. CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio. E:U:A:
- APHA, AWWA y WPCF (1985) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 16a ed. American Public Health Association, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation, Washington, D.C. E.U.A.
- Aragua C. L. y Thomas J. D. (1983) The predatory behaviour of *Marisa cornuarietis* on eggs and neonates of *Biomphalaria glabrata*, the snails host of *Schistosoma mansoni*, *Malacología*, **24** (1-2): 198-210. E.U.A.
- Autotrol Corporation (1978) *Design manual Wastewater treatment systems*, Autotrol Corporation, Milwaukee. W.I. E.U.A.

- Barnes R. D. (1985) *Zoología de los invertebrados*. Ed. Interamericana. México
- Bayluscid (1970) *Bayer 73 preparado para el control de caracoles acúaticos*. Informe técnico. Rep. Fed. de Alemania.
- Burch B. J. y Cruz R. A. (1987) *Clave genérica para la identificación de gastrópodos de agua dulce en México*. Instituto de Biología UNAM. México.
- Calaw P. (1978) The evolution of life-cycle strategies in fresh-water. *Gastrópodos Malacología* 17 (2): 351-364. E.U.A.
- Camplitt P. V. (1970) Comparative ecology of the snails *Physa gyrina* and *Physa integra* (Bassomatophora: Physidae) *Malacología* 10 (1): 131-151. E.U.A.
- Cruz R. A., Chavarrin C., Arias C. M., Taboada J y Jimenez M. (1989) Actividad molusquicida del Piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados, *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (1): 35-40. Brasil.
- Feachman R. B. y Garelick D. (1983) Schistosoma and Schistosomiasis. En: *Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management*. Ed. John Wiley and Sons: 443-455. E.U.A.
- Finney D. J. (1971) *Probit analysis*. Ed. Cambrigde University Inglaterra
- Finney D. J. (1978) *Statistical method in biological assay*. 3a Ed. Charles Griffin. Inglaterra.
- Franco J. L. (1985) *Manual de ecología* Ed. Trillas. México.
- González M. S. (1982) Planta para tratamiento de aguas de desecho de la Ciudad Universitaria descripción del estado actual. Informe interno (proyecto No. 2326) Instituto de Ingeniería UNAM. México.



Higgins T. E. (1948) Sewage WKS. **19**: 143. Inglaterra.

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

Iwai S., Oshino Y. y Tsukada T. (1989) Desing and operation of small wastewater treatment plants by the microbial film process. En: *Small wastewater treatment plants*. Odegaard H. (ed) Tapir publishers: 151-157. Noruega.

Learner M. A. (1975) Crustacea and Mollusca. En: *Ecological aspects of used-water treatment*, Curds C. R. y Hawkes H. A. (ed) vol 1 Academic Press: 393-398. Inglaterra.

Lohmeyer G. T. (1955) Snails in the trickiling filter. *Sewage and Industrial Wastes* **27** (3): 337-338. E.U.A.

Lohmeyer G. T. (1957) Tricking filters and operation tips. *Sewage and Industrial Wastes*. **29** (1): 89-98. E.U.A.

Maciorowski A. F. (1981) Bioassay procedures and results. *Journal Water Pollution Control Federation*. **52** (6): 1630-1656. E.U.A.

Malek E. A. (1977) *Medical and economic malacology*. Ed Hafner, E.U.A.

Margalef R. (1974) *Ecología* Ed. Omega, Barcelona.

Margalef R. (1983) *Limnología* Ed. Omega, Barcelona.

Mendoza R. M. (1988) *Interferencia Bayesiana sobre cocientes lineales en un modelo de regresión lineal multiple*. Tesis de doctorado. Fac. de Ciencias UNAM. México.

Metcalf y Eddy (1985) *Ingeniería sanitaria: tratamiento evacuación y reutilización de aguas residuales*. Ed Labor. México.

- Morones A. (1986) *Algunas técnicas para análisis estadísticos de bioensayo*. Tesis de Lic Actuaría Fac. de Ciencias UNAM. México.
- Norouzian M. (1983) *A performance evaluation and kinetics determination of an RBC system operating at the C.U. wastewater treatment plant*. Informe interno (proyecto No. 3306) Instituto de Ingeniería UNAM. México.
- Ochoa A. R. (1983) *Evaluación del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria*. Tesis de Maestría en Ing Ambiental DEPI UNAM. México.
- Odum P. E. (1984) *Ecología*. Ed. Interamericana, México.
- Oga T., Suthersan S. y Ganczarczyk J. (1991) Some properties of aerobic biofilm. *Environmental Technology* 12: 431-440. E.U.A.
- Painter H. A. (1983) Metabolism and physiology of aerobic bacteria and fungi. En: *Ecological aspects of used-water treatment*. Curds C. R. y Hawkes H. A. (ed) vol 2 Academic Press: 11-75. Inglaterra.
- Ramírez C. (1988) *Nitrificación y destrucción de la alcalinidad en una unidad de biodiscos estructuralmente modificada y su efecto sobre el crecimiento de algas en el efluente*. Tesis de Maestría en Ing. Ambiental DEPI UNAM. México.
- Sampedro R. (1980) *El uso de la transformación probit en problemas biológicos*. Tesis Lic Actuaría Fac. de ciencias UNAM. México.
- Southwood T. R. (1978) *Ecological methods*. Ed. Chapman and Hall. Inglaterra.
- Volskay T. V. y Leslie G. (1990) Respiration inhibition kinetic analysis. *Water Research*. 24 (7): 863-874. Inglaterra.
- Webbe A. C. (1985) *Laboratory and field testing of Bayluscide (Bayer 73)*. Rep. Fed. de Alemania.

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

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

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

World Health Organization, (1988) *Data Sheet on Pesticides*. No. 63, Niclosamide.WHO/UBC/OS/ 88.63. Suiza.

## **APENDICE A**

### **PROCEDIMIENTO PARA EL ANALISIS PROBIT Y DE MAXIMA VEROSIMILITUD**

El siguiente es un ejemplo del procedimiento que se llevo a cabo para obtener las LC50 a distintos tiempos de exposición. Los datos que se presentan corresponden a uno de los experimentos con Bayluscid EC 250 a las 8 horas de exposición.

Dosis (mg/l)	Log de las dosis	No. de caracoles de prueba	No de caracoles muertos	% de caracoles muertos	Probit empirico	Probit esperado	$Y = a + b(x)$	nw	y	nwx	nwy
--------------	------------------	----------------------------	-------------------------	------------------------	-----------------	-----------------	----------------	----	---	-----	-----

1.0	0	10	9	6.28	6.1	4.07	6.02	0.00	24.50	26.69	24.50
0.60	-0.22	10	8	5.84	5.9	4.7	5.68	-1.05	26.69	28.90	26.69
0.50	-0.30	10	8	5.84	5.8	5.0	5.78	-1.50	28.90	30.63	28.90
0.40	-0.40	10	8	5.84	5.7	5.3	5.78	-2.12	30.63	31.43	30.63
0.10	-1.0	10	5	5.00	5.1	6.3	5.00	-6.30	31.43	29.92	31.43
0.05	-1.3	10	4	4.75	4.9	6.3	4.75	-8.19	29.92	22.50	29.92
0.01	-2.0	10	3	4.48	4.2	5.0	4.50	-10.0	22.50	94.59	22.50
Total											
36.67											
-29.14											
94.59											

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

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

El valor de nw se obtiene de una tabla que asigna un coeficiente de porcentaje natural de respuesta para cada valor de Y o probit esperado

El valor de "Y" se obtiene de tablas que relacionan los probits esperados y el porcentaje de respuesta

Se tiene entonces que:

$$\bar{E}_{nw} = S_{nw} = 36.67$$

$$\bar{E}_{nwx} = S_{nwx} = -29.14$$

$$\bar{E}_{nwy} = S_{nwy} = 194.59$$

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

$$y = S_{nwy}/S_{nw} = 194.59/36.67 = 5.306$$

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

$$S_{nwx_b} = \sum nwx(x) + = (0 \times 0) + (-1.034 \times -0.22) + (-1.50 \times -0.30) \\ \dots\dots + (-10 \times -2.0) = 38.472$$

$$S_{nwx_y_a} = \sum y(nwx) + = (6.02 \times 0) + (5.68 \times -1.034) \dots\dots + (4.50 \times -10) \\ = -142.33$$

$$S_{nwx_y_b}^2 = S_{nwx} (S_{nwx}^2) / S_{nw} = -29.14 (194.59) / 36.67 = -154.655$$

$$S_{nwy_a} = \sum nwy(y) + = (24.501 \times 6.02) + (26.69 \times 5.68) + \dots(22.50 \times 4.50) = 1043.50$$

$$S_{nwy_b}^2 = S_{nwy}^2/S_{nw} = (194.59)^2/36.67 = 1032.62$$

$$S_{nwx}^2 = S_{nwx_a}^2 - S_{nwx_b} = 38.4724 - 23.1626 = 15.3098 = S_{xx}$$

$$S_{nwx_y} = S_{nwx_y_a} - S_{nwx_y_b} = -142.136 - 154.655 = 12.5193 = S_{xy}$$

$$S_{nwy}^2 = S_{nwy_a} - S_{nwy_b}^2 = 1043.50 - 1032.62 = 10.873 = S_{yy}$$

De las ecuaciones propuestas por Finney (1971 y 1978):

$$b \text{ o } \beta = S_{xy}/S_{xx} = 12.519/15.309 = \mathbf{0.8177}$$

$$a \text{ o } Y = y - bx = Y = 5.3066 - (0.8177)(-0.7947) = \mathbf{4.6567}$$

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

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

Consultando la tabla de  $\chi^2$ ; para una  $\chi^2_{.05}$  y 5 grados de libertad = 11.1 mayor que 0.639. Por lo tanto la relación lineal probit es un resultado satisfactorio del experimento. Puede continuarse y se obtiene la varianza y la LC50 del modo siguiente.

$$\tilde{\sigma}(\beta) = 1/S_{nw} (x - \bar{x})^2 = \mathbf{0.6386}$$

Para obtener LC50.

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

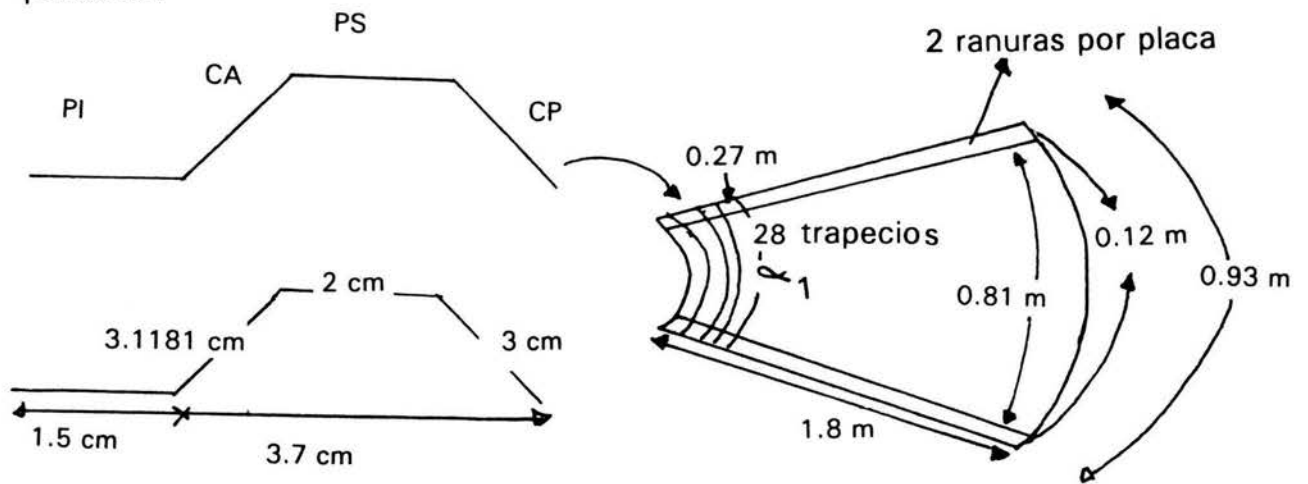
## **APENDICE B**

### **ESTIMACION DEL AREA DEL BIODISCO QUE OCUPAN LOS CARACOLES**



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

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



$$\alpha t = 12\alpha_1 = 309.3972^\circ$$

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

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

$$\alpha_1 = \frac{0.81(180^\circ)}{\pi(1.8)} = 25.783^\circ$$

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

$$0.06\text{m} \times 2 \times \frac{1.60}{2}(\text{radio de ranura}) \times 12 = 1.1520. \text{ (1.60 se obtiene de } 1.80 \times 0.20 \text{ m).}$$

**23.1648 m<sup>2</sup>** superficie total de la última placa del biodisco

23.1648 m<sup>2</sup>/12 placas de muestreo = 1.9304 m<sup>2</sup> cada cuadrante de muestreo

Areas en m<sup>2</sup>

Trapezio	piso inferior	piso superior	cara anterior	cara posterior
1	0.2904	0.3816	0.2998	0.2950
2	0.2820	0.3703	0.2911	0.2871
3	0.2758	0.3613	0.2840	0.2792
4	0.2667	0.3500	0.2753	0.2705
5	0.2583	0.3388	0.2665	0.2617
6	0.2499	0.3276	0.2577	0.2529
7	0.2415	0.3163	0.2490	0.2442
8	0.2330	0.3051	0.2402	0.2354
9	0.2246	0.2939	0.2315	0.2267
10	0.2161	0.2826	0.2227	0.2179
11	0.2078	0.2714	0.2140	0.2092
12	0.1993	0.2602	0.2052	0.2004
13	0.1909	0.2489	0.1965	0.1917
14	0.1825	0.2377	0.1877	0.1829
15	0.1741	0.2265	0.1789	0.1741
16	0.1656	0.2152	0.1702	0.1654
17	0.1572	0.2040	0.1614	0.1566
18	0.1488	0.1928	0.1527	0.1479
19	0.1404	0.1815	0.1439	0.1391
20	0.1319	0.1703	0.1352	0.1304
21	0.1235	0.1591	0.1264	0.1216
22	0.1151	0.1479	0.1177	0.1129
23	0.1067	0.1366	0.1089	0.1041
24	0.0983	0.1254	0.1001	0.0953
25	0.0898	0.1142	0.0914	0.0866
26	0.0814	0.1029	0.0826	0.0778
27	0.0730	0.0917	0.0739	0.0691
28	0.6741	—	—	—
Total	5.5988	6.4138	5.0645	4.9357

+ 1.1520 area de ranuras = 23.1648 m<sup>2</sup>.

## **APENDICE C**

### **VALORES DE LAS CORRIDAS EFECTUADAS EN EL RESPIROMETRO WARBURG**

Baylucid EC250 en combinación con una solución de Buffer de fosfatos.

tiempo (minutos)	termobar r. e.	MAN				diferencia entre lecturas					sumas acumulativas		
		MAN 4 r. e.	MAN 3 24 horas	MAN 1 8 horas	MAN 5 6 horas	termobar r. e.	24 horas	8 horas	6 horas	r. e.	24 horas	8 horas	6 horas
0	195	394	757	664	565								
10	197	383	734	645	553	-2	11	23	19	12	21	39	33
20	199	373	718	631	544	-2	10	16	14	9	26	59	49
30	201	368	698	615	532	-2	5	20	16	12	34	78	63
40	205	360	679	601	523	-4	8	19	14	9	38	91	73
50	209	356	666	591	516	-4	4	13	10	7	44	106	84
60	213	350	651	580	508	-4	6	15	11	8	49	118	93
70	217	345	639	571	503	-4	5	12	9	5	53	132	104
80	220	341	625	560	495	-3	4	14	11	8	60	148	113
90	223	334	609	551	486	-3	7	16	9	9	64	160	126
100	227	330	597	538	481	-4	4	12	13	5	69	172	136
110	225	325	585	528	475	2	5	12	10	6	77	187	144
120	226	317	570	520	464	-1	8	15	8	11	85	203	158
130	226	309	554	506	455	0	8	16	14	9	90	213	166
140	225	304	544	498	448	1	5	10	8	7	96	231	181
150	227	298	526	483	434	-2	6	18	15	14	110	246	194
160	219	284	511	470	421	8	14	15	13	13	118	259	205
170	217	276	498	459	411	2	8	13	11	10	128	275	220
180	214	266	482	444	396	3	10	16	15	15	138	291	234
190	211	256	466	430	377	3	10	16	14	19	148	306	248
200	207	246	451	416	370	4	10	15	14	7	160	324	263
210	203	234	433	401	355	4	12	18	15	15	172	340	279
220	199	222	417	385	342	4	12	16	16	13	182	356	293
230	195	212	401	371	324	4	10	16	14	18	191	369	305
240	193	203	388	359	319	2	9	13	12	5	198	382	317
250	191	196	375	347	310	2	7	13	12	9	212	396	330
260	189	182	361	334	299	2	14	14	13	11	215	410	342
270	189	179	347	322	289	0	3	14	12	10	222	422	353
280	189	172	335	311	280	0	7	12	11	9	229	433	362
290	188	165	324	302	272	1	7	11	9	8	238	447	375
300	187	156	310	289	261	1	9	14	13	11	245	458	384
310	187	149	299	280	254	0	7	11	9	7	255	471	396
320	186	139	286	268	244	1	10	13	12	10	262	484	407
330	186	132	273	257	236	0	7	13	11	8	269	495	416
340	186	125	262	248	228	0	7	11	9	8	279	509	429
350	185	115	248	235	219	1	10	14	13	9	278	514	432
360	188	116	243	232	221	-3	-1	5	3	-2	279	519	435
370	192	115	238	229	219	-4	1	5	3	2	281	524	439
380	195	113	233	225	217	-3	2	5	4	2	284	533	445
390	195	110	224	219	211	0	3	9	6	6	292	545	456
400	192	102	212	208	202	3	8	12	11	9	300	556	465
410	190	94	201	199	194	2	8	11	9	8	310	570	478
420	186	84	187	186	183	4	10	14	13	11	321	585	491
430	183	73	172	173	171	3	11	15	13	12	331	597	501
440	180	63	160	163	162	3	10	12	10	9	341	611	515
450	178	53	146	149	152	2	10	14	14	10	350	624	525

r	consumo total de oxígeno			valores netos de respiración			suma acumulativas			consumo neto de oxígeno			
	24 horas	8 horas	6 horas	24 horas	8 horas	6 horas	24 horas	8 horas	6 horas	24 horas	8 horas	6 horas	
	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
18	4842	51 9293	28 3894	18 0306	12	8	1	18	14	2	14 7366	12 0442	1 7176
22	8857	48 3033	42 1547	28 3338	6	6	1	33	20	5	27 0171	17 206	4 294
29	9768	63 8586	54 1989	36 0612	15	6	3	44	26	8	36 0228	22 3678	6 8704
33	4476	74 5017	62 8019	42 0714	11	6	3	53	32	11	43 3911	27 5296	9 4468
38	7288	86 7822	72 2652	48 9402	9	6	3	62	37	13	50 7594	31 8311	11 1644
43	1798	96 6066	80 0079	53 2332	9	5	2	69	41	13	56 4903	35 2723	11 1644
46	6506	108 0684	89 4712	60 102	7	4	0	79	48	17	64 6773	41 2944	14 5996
52	812	121 1676	97 2139	67 8294	10	7	4	88	50	19	72 0456	43 015	16 3172
56	3328	130 992	108 3978	72 1224	9	2	2	96	59	20	78 5952	50 7577	17 176
60	7338	140 8164	117 0008	77 274	8	9	1	103	62	21	84 3261	53 3386	18 0348
67	7754	153 0969	123 8832	86 7186	7	3	1	110	65	24	90 057	55 9195	20 6112
74	817	166 1961	135 9274	94 446	7	3	3	118	71	25	96 6066	61 0813	21 47
79	218	174 3831	142 8098	100 4562	8	6	1	123	74	27	100 7001	63 6622	23 1876
84	4942	189 1197	155 7143	112 4766	5	3	2	135	79	31	110 5245	67 9637	26 6228
96	822	201 4002	166 8982	123 6384	12	5	4	136	81	35	111 3432	69 6843	30 058
103	8636	212 0433	176 3615	132 2244	1	2	4	141	84	37	115 4367	72 2652	31 7756
112	6656	225 1425	189 266	145 1034	5	3	2	147	89	42	120 3489	76 5667	36 0696
121	4676	238 2417	201 3102	161 4168	6	5	5	153	93	47	125 2611	80 0079	40 3636
130	2696	250 5222	213 3544	167 427	6	4	5	158	97	51	129 3546	83 4491	43 7988
140	832	265 2588	226 2589	180 306	5	4	4	164	100	54	134 2668	86 03	46 3752
151	3444	278 358	240 0237	191 4678	6	3	3	168	104	57	137 5416	89 4712	48 9516
160	1964	291 4572	252 0679	206 9226	4	4	3	174	108	60	142 4538	92 9124	51 528
168	1182	302 1003	262 3915	211 2156	6	4	3	178	111	63	145 7286	95 4933	54 1044
174	2796	312 7434	272 7151	218 943	4	3	3	184	116	65	150 6408	99 7948	55 822
186	6024	324 2052	283 894	228 3876	6	5	2	189	119	67	154 7343	102 3757	57 5396
189	243	335 667	294 2226	236 9736	5	3	2	195	123	74	159 6465	105 8169	63 5512
195	4044	345 4914	303 6859	244 701	6	4	7	200	127	76	163 74	109 2581	65 2688
201	5658	354 4971	311 4286	251 5698	5	4	2	204	129	77	167 0148	110 9787	66 1276
209	4876	365 4589	322 6125	261 0144	4	2	1	209	133	79	171 1083	114 4199	67 8452
215	649	374 9646	330 3552	267 0246	5	4	2	213	135	79	174 3831	116 1405	67 8452
224	451	385 6077	340 6788	275 6106	4	2	0	216	137	79	176 8392	117 8611	67 8452
230	6124	396 2508	350 1421	282 4794	3	2	0	222	141	80	181 7514	121 3023	68 704
236	7738	405 2565	357 8848	289 3482	6	4	1	226	143	81	185 0262	123 0229	69 5628
245	5758	416 7183	369 0687	297 0756	4	2	1	230	146	82	188 301	125 6038	70 4216
244	6956	420 8118	371 6496	295 3584	4	3	1	236	150	83	193 2132	129 045	71 2804
245	5758	424 9053	374 2305	297 0756	6	4	1	240	152	84	196 488	130 7656	72 1392
247	3362	428 9988	377 6717	298 7928	4	2	1	243	154	84	198 9441	132 4862	72 1392
249	9768	436 3671	382 8335	303 9444	3	2	0	249	157	87	203 8563	135 0671	74 7156
257	0184	446 1915	392 2968	311 6718	6	3	3	253	160	88	207 1311	137 648	75 5744
264	06	455 1972	400 8395	318 5406	4	3	1	256	161	88	209 5872	138 5083	75 5744
272	862	466 659	411 2234	327 9852	3	1	0	260	164	89	212 862	141 0892	76 4332
282	5442	478 9395	422 4073	338 2884	4	3	1	264	166	90	216 1368	142 8098	77 292
291	3462	488 7639	431 0103	346 0158	4	2	1	266	166	91	217 7742	142 8098	78 1508
300	1482	500 2257	443 0545	354 6018	2	0	1	270	170	91	221 049	146 251	78 1508
308	07	510 8688	451 6575	363 1878	4	4	0	274	171	91	224 3238	147 1113	79 0096

Bayluscid EC 250 en combinación con una solución de glucosa a una concentración de 300 mg/l.

tiempo (minutos)	termobar	MAN					diferencia entre lecturas						
		MAN 4	MAN 3	MAN 2	MAN 1	MAN 5	termobar	r e	glucosa	10 horas	8 horas	6 horas	
0	231	387	378	382	384	373			300 mg/l				
5	229	385	365	368	370	360	2	2	13	14	14	13	
10	227	381	350	354	353	350	2	4	15	14	17	10	
15	225	378	336	340	336	337	2	3	14	14	17	13	
20	223	374	327	329	326	327	2	4	9	11	10	10	
25	222	371	317	318	313	317	1	3	10	11	13	10	
30	221	368	307	308	301	308	1	3	10	10	12	9	
35	220	365	298	297	293	300	1	3	9	11	8	8	
40	220	361	291	290	282	291	0	4	7	7	11	9	
45	220	358	284	279	273	285	0	3	7	11	9	6	
50	220	355	277	272	265	276	0	3	7	7	8	9	
55	220	352	272	263	256	270	0	3	5	9	9	6	
60	221	350	266	257	249	264	-1	2	6	6	7	6	
65	223	347	262	248	242	258	-2	3	4	9	7	6	
70	224	345	257	242	234	252	-1	2	5	6	8	6	
75	224	343	252	235	229	247	0	2	5	7	5	5	
80	225	340	248	228	220	241	-1	3	4	7	9	6	
85	225	339	244	221	215	236	0	1	4	7	5	5	
90	225	335	239	214	207	231	0	4	5	7	8	5	
95	225	333	235	208	202	225	0	2	4	6	5	6	
100	225	330	230	202	196	219	0	3	5	6	6	6	
105	226	326	227	194	191	214	-1	4	3	8	5	5	
110	226	325	222	188	186	209	0	1	5	6	5	5	
115	226	322	219	182	180	204	0	3	3	6	6	5	
120	226	319	215	176	174	199	0	3	4	6	6	5	
125	227	317	212	170	170	195	-1	2	3	6	4	4	
130	227	314	209	165	165	190	0	3	3	5	5	5	
135	227	311	205	159	160	186	0	3	4	6	5	4	
140	227	308	201	154	154	182	0	3	4	5	6	4	
145	227	305	197	149	149	177	0	3	4	5	5	5	
150	227	303	194	143	144	174	0	2	3	6	5	3	
155	226	301	190	139	138	164	1	2	4	4	6	5	
160	225	297	186	133	134	165	1	4	4	6	4	4	
165	225	293	182	128	130	161	0	4	4	5	4	4	
170	225	290	179	123	126	156	0	3	3	5	4	5	
175	224	286	175	118	122	153	1	4	4	5	4	3	
180	224	283	171	113	117	149	0	3	4	5	5	4	
185	224	280	168	108	112	145	0	3	3	5	5	4	
190	224	278	165	103	109	141	0	2	3	5	3	4	
195	224	275	162	98	103	136	0	3	3	5	6	5	
200	224	272	158	93	98	131	0	3	4	5	5	5	
205	224	269	155	87	93	128	0	3	3	6	5	3	
210	224	266	152	83	89	123	0	3	3	4	4	5	
215	224	263	149	78	85	119	0	3	3	5	4	4	
220	224	259	146	72	82	114	0	4	3	6	3	5	

r. p.	sumas acumulativas				consumo mixto de oxigeno					valores netos de respiracion								
	glucosa 300 mg/l	10 horas	8 horas	6 horas	r	e	glucosa 300 mg/l	300 mg/l	10 horas	8 horas	6 horas	glucosa 300 mg/l	10 horas	8 horas	6 horas			
6	28	28	31	23	5	2812	22	9236	25	2196	26	6166	19	7869	11	12	12	11
9	42	42	48	36	7	9218	34	3854	37	8294	41	2128	30	9708	11	10	13	6
13	51	53	58	46	11	4426	41	7537	47	7371	49	7988	39	5738	11	11	14	10
16	61	64	71	56	14	0832	49	9407	57	6448	60	9606	48	1768	5	7	6	6
19	71	74	83	65	16	7238	58	1277	66	6518	71	2638	55	9195	7	8	10	7
22	80	85	91	73	19	3644	65	496	76	5595	78	1326	62	8019	7	7	9	6
26	87	92	102	82	22	8852	71	2269	82	8644	87	5772	70	5446	6	8	5	5
29	94	103	111	88	25	5258	76	9578	92	7721	95	3046	75	7064	3	3	7	5
32	101	110	119	97	28	1664	82	6887	99	077	102	1734	83	4491	4	8	6	3
35	106	119	128	103	30	807	86	7822	107	1833	109	9008	88	6109	4	4	5	6
37	112	125	135	109	32	5674	91	6944	112	5875	115	911	93	7727	2	6	6	3
40	116	134	142	115	35	208	94	9692	120	6938	121	9212	98	9345	4	4	5	4
42	121	140	150	121	36	9684	99	0627	126	098	128	79	104	0963	1	6	4	3
44	126	147	155	126	38	7288	103	1562	132	4029	133	083	108	3978	3	4	6	4
47	130	154	164	132	41	3694	106	431	138	7078	140	8104	113	5596	3	5	3	3
48	134	161	169	137	42	2496	109	7058	145	0127	145	1034	117	8611	1	4	6	3
52	139	168	177	142	45	7704	113	7993	151	3176	151	9727	122	1626	3	6	4	4
54	143	174	182	148	47	5308	117	0741	156	7218	156	2652	127	3244	1	3	4	1
57	148	180	188	154	50	1714	121	1676	162	126	161	4168	132	4862	2	4	3	4
61	151	188	193	159	53	6922	123	6237	169	3316	165	7098	136	7877	2	3	3	3
62	156	194	198	164	54	5724	127	7172	174	7358	170	0028	141	0892	-1	4	1	1
65	159	200	204	169	57	213	130	1733	180	14	175	1544	145	3907	4	5	4	4
68	163	206	210	174	59	8536	133	4481	185	5442	180	306	149	6922	0	3	3	2
70	166	212	214	178	61	614	135	9042	190	9484	183	7404	153	1334	1	3	3	2
73	169	217	219	183	64	2546	138	3603	195	4519	188	0334	157	4349	1	4	2	2
76	173	223	224	187	66	8952	141	6351	200	8561	192	3264	160	8761	0	2	2	2
79	177	228	230	191	69	5358	144	9099	205	3596	197	478	164	3173	1	3	2	1
82	181	233	235	196	72	1764	148	1847	209	8631	201	771	168	6188	1	2	3	1
84	184	239	240	199	73	9368	150	6408	215	2673	206	064	171	1997	1	2	2	2
86	188	243	246	204	75	6972	153	9156	218	8701	211	2156	175	5012	1	4	3	1
90	192	249	250	208	79	218	157	1904	224	2743	214	65	178	9424	2	2	4	3
94	196	254	254	212	82	7388	160	4652	228	7778	218	0844	182	3836	0	2	0	0
97	199	259	258	217	85	3794	162	9213	233	2813	221	5188	186	6851	0	1	0	0
101	203	264	262	220	88	9002	166	1961	237	7848	224	9532	189	266	0	2	1	2
104	207	269	267	224	91	5408	169	4709	242	2883	229	2462	192	7072	0	1	0	-1
107	210	274	272	228	94	1814	171	927	246	7918	233	5392	196	1484	1	2	2	1
109	213	279	275	232	95	9418	174	3831	251	2953	236	115	199	5896	0	2	2	1
112	216	284	281	237	98	5824	176	8392	255	7988	241	2666	203	8911	1	3	1	2
115	220	289	286	242	101	223	180	114	260	3023	245	5596	208	1926	0	2	3	2
118	223	295	291	245	103	8636	182	5701	265	7065	249	8526	210	7735	1	2	-2	2
121	226	299	295	250	106	5042	185	0262	269	3093	253	287	215	075	0	3	2	0
124	229	304	299	254	109	1448	187	4823	273	8128	256	7214	218	5162	0	1	1	2
128	232	310	302	259	112	6656	189	9384	279	217	259	2972	222	8177	0	2	1	1
131	235	315	307	263	115	3062	192	3945	283	7205	263	5902	226	2589	-1	2	-1	1

glucosa 300 mg/l	sumas acumulativas			consumo neto de oxígeno			
	10 horas	8 horas	6 horas	glucosa 300 mg/l	10 horas	8 horas	6 horas
				0	0	0	0
27	27	25	17	18 0114	19 8154	21 47	14 6251
33	33	39	27	27 0171	29 7231	33 4432	23 2281
38	40	45	33	31 1106	36 028	38 646	28 3894
45	48	55	40	36 8415	43 2336	47 234	34 412
52	55	64	46	42 5724	49 5385	54 9632	39 5738
58	63	69	51	47 4846	56 7441	59 2572	43 8753
61	66	76	56	49 9407	59 4462	65 2688	48 1768
65	74	82	59	53 2155	66 6518	70 4216	50 7577
69	78	87	65	56 4903	70 2546	74 7156	55 9195
71	84	93	68	58 1277	75 6588	79 8684	58 5004
75	88	98	72	61 4025	79 2616	84 1624	61 9416
76	94	102	75	62 2212	84 6658	87 5976	64 5225
79	98	108	79	64 6773	88 2686	92 7504	67 9637
82	103	111	82	67 1334	92 7721	95 3268	70 5446
83	107	117	85	67 9521	96 3749	100 4796	73 1255
86	113	121	89	70 4082	101 7791	103 9148	76 5667
87	116	125	90	71 2269	104 4812	107 35	77 427
89	120	128	94	72 8643	108 084	109 9264	80 8682
91	123	131	97	74 5017	110 7861	112 5028	83 4491
90	127	132	98	73 683	114 3889	113 3616	84 3094
94	132	136	102	76 9578	118 8924	116 7968	87 7506
94	135	139	104	76 9578	121 5945	119 3732	89 4712
95	138	142	106	77 7765	124 2966	121 9496	91 1918
96	142	144	108	78 5952	127 8994	123 6672	92 9124
96	144	146	110	78 5952	129 7008	125 3848	94 633
97	147	148	111	79 4139	132 4029	127 1024	95 4933
98	149	151	112	80 2326	134 2043	129 6788	96 3536
99	151	153	114	81 0513	136 0057	131 3964	98 0742
100	155	156	115	81 87	139 6085	133 9728	98 9345
102	157	160	118	83 5074	141 4099	137 408	101 5154
102	159	160	118	83 5074	143 2113	137 408	101 5154
102	160	160	118	83 5074	144 112	137 408	101 5154
102	162	161	120	83 5074	145 9134	138 2668	103 236
102	163	161	119	83 5074	146 8141	138 2668	102 3757
103	165	163	120	84 3261	148 6155	139 9844	103 236
103	167	165	121	84 3261	150 4169	141 702	104 0963
104	170	166	123	85 1448	153 119	142 5608	105 8169
104	172	169	125	85 1448	154 9204	145 1372	107 5375
105	174	171	127	85 9635	156 7218	146 8548	109 2581
105	177	173	127	85 9635	159 4239	148 5724	109 2581
105	178	174	129	85 9635	160 3246	149 4312	110 9787
105	180	175	130	85 9635	162 126	150 29	111 839
104	182	174	131	85 1448	163 9274	149 4312	112 6993
104	184	176	132	85 1448	165 7288	151 1488	113 5596



### Bayluscid EC250 en combinación con agua residual.

tiempo (minutos)	termobar	MAN 4	MAN 3	MAN 2	MAN 1	MAN 5	diferencia entre lecturas						
		r e	agua residual	10 horas	8 horas	6 horas	termobar	r e	agua resi-	10 horas	8 horas	6 horas	
0	328	310	365	377	329	364							
5	329	305	363	373	322	361	-1	5	2	4	7	3	
10	330	301	358	368	318	358	-1	4	5	5	4	3	
15	331	297	354	366	316	355	-1	4	4	2	2	3	
20	331	293	349	361	314	353	0	4	5	5	2	2	
25	331	290	344	357	310	352	0	3	5	4	4	1	
30	331	287	339	351	305	349	0	3	5	6	5	3	
35	331	283	335	347	303	348	0	4	4	4	2	1	
40	332	280	331	343	300	344	-1	3	4	4	3	4	
45	332	276	324	338	297	343	0	4	7	5	3	1	
50	333	272	321	335	295	342	-1	4	3	3	2	1	
55	334	270	314	328	290	340	-1	2	7	7	5	2	
60	334	267	310	324	287	339	0	3	4	4	3	1	
65	334	262	305	319	287	335	0	5	5	5	0	4	
70	333	259	300	313	280	334	1	3	5	6	7	1	
75	334	255	291	309	277	333	-1	4	9	4	3	1	
80	334	250	290	306	271	330	0	5	1	3	6	3	
85	334	245	285	300	268	329	0	5	5	6	3	1	
90	334	240	280	295	266	325	0	5	5	5	2	4	
95	333	236	275	292	261	324	1	4	5	3	5	1	
100	334	232	270	286	258	322	-1	4	5	6	3	2	
105	334	230	264	282	256	320	0	2	6	4	2	2	
110	334	225	260	279	251	317	0	5	4	3	5	3	
115	334	221	256	274	247	316	0	4	4	5	4	1	
120	333	216	250	270	245	313	1	5	6	4	2	3	
125	333	212	246	265	241	310	0	4	4	5	4	3	
130	333	209	241	262	238	310	0	3	5	3	3	0	
135	332	204	235	258	235	308	1	5	6	4	3	2	
140	332	199	231	253	231	307	0	5	4	5	4	1	
145	332	196	227	248	229	305	0	3	4	5	2	2	
150	331	191	223	244	224	304	1	5	4	4	5	1	
155	331	186	218	240	220	302	0	5	5	4	4	2	
160	332	184	215	235	217	298	-1	2	3	5	3	4	
165	332	180	210	231	214	297	0	4	5	4	3	1	
170	332	177	208	226	209	294	0	3	2	5	5	3	
175	332	174	203	221	206	292	0	3	5	5	3	2	
180	331	168	198	218	203	290	1	6	5	3	3	2	
185	331	165	194	212	199	288	0	3	4	6	4	2	
190	330	161	190	208	196	286	1	4	4	4	3	2	
195	330	158	185	206	191	283	0	3	5	2	5	3	
200	329	153	182	201	188	282	1	5	3	5	3	1	
205	329	149	177	197	186	278	0	4	5	4	2	4	
210	329	145	173	193	182	277	0	4	4	4	4	1	
215	329	141	170	189	177	275	0	4	3	4	5	2	
220	328	138	164	185	175	272	1	3	6	4	2	3	
225	327	133	162	182	170	270	1	5	2	3	5	2	
230	327	131	158	176	166	267	0	2	4	6	4	3	
235	326	124	155	172	163	265	1	7	3	4	3	2	
240	327	123	150	168	158	262	-1	1	5	4	5	3	
245	327	120	146	164	154	261	0	3	4	4	4	1	
250	326	114	143	161	150	256	1	6	3	3	4	5	

sumas acumulativas				consumo mixto de oxígeno					valores netos de respiración				
r	e	agua residual	agua residual	10 horas	8 horas	6 horas	r	e	agua residual	agua residual	10 horas	8 horas	6 horas
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	7	9	11	6	7 9218	5 7309	7 7427	9 9077	5 1528	0	-1	2	-2
13	11	11	13	9	11 4426	9 0057	9 4633	11 7091	7 7292	1	1	0	-1
17	16	16	15	11	14 9634	13 0992	13 7648	13 5105	9 4468	1	-1	-2	-1
20	21	20	19	12	17 604	17 1927	17 206	17 1133	10 3056	1	-1	-2	-2
23	26	26	24	15	20 2446	21 2862	22 3678	21 6168	12 882	1	1	1	-2
27	30	30	26	16	23 7654	24 561	25 809	23 4182	13 7408	2	1	2	-2
30	34	34	29	20	26 406	27 8358	29 2502	26 1203	17 176	2	1	-2	-1
34	41	39	32	21	29 9268	33 5667	33 5517	28 8224	18 0348	1	1	0	1
38	44	42	34	22	33 4476	36 0228	36 1326	30 6238	18 8936	2	1	-1	-2
40	51	49	39	24	35 208	41 7537	42 1547	35 1273	20 6112	-1	-1	-2	-3
43	55	53	42	25	37 8486	45 0285	45 5959	37 8294	21 47	4	1	3	-2
48	60	58	42	29	42 2496	49 122	49 8974	37 8294	24 9052	2	1	0	-2
51	65	64	49	30	44 8902	53 2155	55 0592	44 1343	25 764	2	2	-5	-2
55	74	68	52	31	48 411	60 5838	58 5004	46 8364	26 6228	-1	-2	4	-3
60	75	71	58	34	52 812	61 4025	61 0813	52 2406	29 1992	1	-1	-1	-3
65	80	77	61	35	57 213	65 496	66 2431	54 9477	30 058	2	0	1	-2
70	85	82	63	39	61 614	69 5895	70 5446	56 7441	33 4932	3	2	-2	-1
74	90	85	68	40	65 1348	73 683	73 1255	61 2476	34 352	-1	-1	-3	-2
78	95	91	71	42	68 6556	77 7765	78 2873	63 9497	36 0696	1	1	1	-3
80	101	95	73	44	70 416	82 6887	81 7285	65 7511	37 7872	1	2	-1	-2
85	105	98	78	47	74 817	85 9635	84 3094	70 2546	40 3636	2	2	0	0
89	109	103	82	48	78 3378	89 2383	88 6109	73 8574	41 2224	2	1	0	-2
94	115	107	84	51	82 7388	94 1505	92 0521	75 6588	43 7988	1	1	0	-3
98	119	112	86	54	86 2596	97 4253	96 3536	79 2616	46 3752	1	1	-3	-2
101	124	115	91	54	88 9002	101 5188	98 9345	81 9637	46 3752	0	1	0	-1
106	130	119	94	56	93 3012	106 431	102 3757	84 6658	48 0928	1	0	0	-3
111	134	124	98	57	97 7022	109 7058	106 6772	88 2686	48 9516	1	1	-2	-3
114	138	129	100	59	100 3428	112 9806	110 9787	90 07	50 6692	2	0	-1	-4
119	142	133	105	60	104 7438	116 2554	114 4199	94 5735	51 528	2	2	-1	-1
124	147	137	109	62	109 1448	120 3489	117 8611	98 1763	53 2456	1	0	0	-2
126	150	142	112	66	110 9052	122 805	122 1626	100 8784	56 6808	1	-1	-1	-3
130	155	146	115	67	114 426	126 8985	125 6038	103 5805	57 5396	1	1	1	2
133	157	151	120	70	117 0666	128 5359	129 9053	108 084	60 116	1	0	-1	-3
136	162	156	123	72	119 7072	132 6294	134 2068	110 7861	61 8336	1	1	2	0
142	167	159	126	74	124 9884	136 7229	136 7877	113 4882	63 5512	0	1	0	-1
145	171	165	130	76	127 629	139 9977	141 9495	117 091	65 2688	2	2	-3	-3
149	175	169	133	78	131 1498	143 2725	145 3907	119 7931	66 9864	-1	-2	1	-1
152	180	171	138	81	133 7904	147 366	147 1113	124 2966	69 5628	3	0	-1	-2
157	183	176	141	82	138 1914	149 8221	151 4128	126 9987	70 4216	3	2	2	-1
161	188	180	143	86	141 7122	153 9156	154 854	128 8001	73 8568	0	1	-2	-2
165	192	184	147	87	145 233	157 1904	158 2952	132 4029	74 7156	4	2	-2	0
169	195	188	152	89	148 7538	159 6465	161 7364	136 9064	76 4332	-1	2	0	-3
172	201	192	154	92	151 3944	164 5587	165 1776	138 7078	79 0096	2	0	1	-2
177	203	195	159	94	155 7954	166 1961	167 7585	143 2113	80 7272	1	1	-1	0
179	207	201	163	97	157 5558	169 4709	172 9203	146 8141	83 3036	2	1	0	-3
186	210	205	166	99	163 7172	171 927	176 3615	149 5162	85 0212	-2	1	2	1
187	215	209	171	102	164 5974	176 0205	179 8027	154 0197	87 5976	3	2	-4	-2
190	219	213	175	103	167 238	179 2953	183 2439	157 6225	88 4564	2	2	4	1
196	222	216	179	108	172 5192	181 7514	185 8248	161 2253	92 7504	0	1	1	-2
200	227	216	183	110	176 04	185 8449	185 8248	164 8281	94 468	1	2	-2	-1

sumas acumulativas				consumo neto de oxígeno			
agua residual	10 horas	8 horas	6 horas	agua residual	10 horas	8 horas	6 horas
				0	0	0	0
1	0	2	-3	0.8802	0	1.7206	-2.5764
2	-1	0	-4	1.7604	-0.8187	0	-3.4352
3	0	-2	-6	2.6406	0	-1.7206	-5.1528
4	1	-1	-8	3.5208	0.8187	-0.8603	-6.8704
6	2	1	-10	5.2812	1.6374	0.8603	-8.588
8	3	-1	-11	7.0416	2.4561	-0.8603	-9.4468
9	4	-1	-10	7.9218	3.2748	-0.8603	-8.588
11	5	-2	-12	9.6822	4.0935	-1.7206	-10.3056
10	4	-4	-15	8.802	3.2748	-3.4412	-12.882
14	5	-1	-17	12.3228	4.0935	-0.8603	-14.5996
16	6	-1	-19	14.0832	4.9122	-0.8603	-16.3172
18	8	-6	-21	15.8436	6.5496	-5.1618	-18.0348
17	6	-2	-24	14.9634	4.9122	-1.7206	-20.6112
18	5	-3	-27	15.8436	4.0935	-2.5809	-23.1876
20	5	-2	-29	17.604	4.0935	-1.7206	-24.9052
23	7	-4	-30	20.2446	5.7309	-3.4412	-25.764
22	6	-7	-32	19.3644	4.9122	-6.0221	-27.4816
23	7	-6	-35	20.2446	5.7309	-5.1618	-30.058
24	9	-7	-37	21.1248	7.3683	-6.0221	-31.7756
26	11	-7	-37	22.8852	9.0057	-6.0221	-31.7756
28	12	-7	-39	24.6456	9.8244	-6.0221	-33.4932
29	13	-7	-42	25.5258	10.6431	-6.0221	-36.0696
30	14	-10	-44	26.406	11.4618	-8.603	-37.7872
30	15	-10	-45	26.406	12.2805	-8.603	-38.646
31	15	-10	-48	27.2862	12.2805	-8.603	-41.2224
32	16	-12	-51	28.1664	13.0992	-10.3236	-43.7988
34	16	-13	-55	29.0268	13.0992	-11.1839	-47.234
36	18	-14	-56	31.6872	14.7366	-12.0442	-48.0928
37	18	-14	-58	32.5674	14.7366	-12.0442	-49.8104
38	17	-15	-61	33.4476	13.9179	-12.9045	-52.3868
39	18	-14	-59	34.3278	14.7366	-12.0442	-50.6692
40	18	-15	-62	35.208	14.7366	-12.9045	-53.2456
41	19	-13	-62	36.0882	15.5553	-11.1839	-53.2456
41	20	-13	-63	36.0882	16.374	-11.1839	-54.1044
43	22	-16	-66	37.8486	18.0114	-13.7648	-56.6808
42	20	-15	-67	36.9684	16.374	-12.9045	-57.5396
45	20	-16	-69	39.609	16.374	-13.7648	-59.2572
48	22	-14	-70	42.2496	18.0114	-12.0442	-60.116
48	23	-16	-72	42.2496	18.8301	-13.7648	-61.8336
52	25	-18	-72	45.7704	20.4675	-15.4854	-61.8336
51	27	-18	-75	44.8902	22.1049	-15.4854	-64.41
53	27	-17	-77	46.6506	22.1049	-14.6251	-66.1276
54	28	-18	-77	47.5308	22.9236	-15.4854	-66.1276
56	29	-18	-80	49.2912	23.7423	-15.4854	-68.704
54	30	-16	-79	47.5308	24.561	-13.7648	-67.8452
57	32	-20	-81	50.1714	26.1984	-17.206	-69.5628
59	34	-16	-80	51.9318	27.8358	-13.7648	-68.704
59	35	-15	-82	51.9318	28.6545	-12.9045	-70.4216
60	37	-17	-83	52.812	30.2919	-14.6251	-71.2804
63	39	-17	-85	55.4526	31.9293	-14.6251	-72.998

Piquerol A en combinación con una solución de Buffer de fosfatos.

tiempo (minutos)	termobar r e	MAN 4	MAN 3	MAN 2	MAN 1	MAN 5	diferencia entre lecturas					
		r e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	termobar r e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	
0	208	554	768	769	657	447						
10	211	541	744	747	639	433	-3	13	24	22	18	14
20	215	530	725	730	623	423	-4	11	19	17	16	10
30	218	522	710	717	611	415	-3	8	15	13	12	8
40	220	512	694	704	598	407	-2	10	16	13	13	8
50	222	504	679	691	586	400	-2	8	15	13	12	7
60	224	495	664	677	574	390	-2	9	15	14	12	10
70	227	485	648	662	561	385	-3	10	16	15	13	5
80	230	477	634	649	549	379	-3	8	14	13	12	6
90	232	469	621	638	538	373	-2	8	13	11	11	6
100	235	459	605	624	525	366	-3	10	16	14	13	7
110	236	452	593	617	515	362	-1	7	12	12	10	4
120	237	442	577	598	502	354	-1	10	16	14	13	8
130	238	434	566	586	492	348	-1	8	11	12	10	6
140	240	424	551	572	479	341	-2	10	15	14	13	7
150	243	415	537	559	467	335	-3	9	14	13	12	6
160	244	408	527	549	459	331	-1	7	10	10	8	4
170	245	398	514	536	447	324	-1	10	13	13	12	7
180	247	388	501	522	435	317	-2	10	13	14	12	7
190	247	380	490	511	425	312	0	8	11	11	10	5
200	247	371	477	499	414	304	0	9	13	12	11	8
210	249	359	461	483	400	294	-2	12	16	16	14	10
220	250	352	451	473	391	290	-1	7	10	10	9	4
230	250	344	438	460	381	282	0	8	13	13	10	8
240	250	334	425	448	369	276	0	10	13	12	12	6
250	250	325	412	436	359	270	0	9	13	12	10	6
260	252	316	400	423	347	263	-2	9	12	13	12	7
270	253	307	387	411	336	256	-1	9	13	12	11	7
280	252	297	374	400	326	248	1	10	13	11	10	8
290	252	286	360	387	313	242	0	11	14	13	13	6
300	253	277	345	373	303	234	-1	9	15	14	10	8
310	254	268	334	362	294	229	-1	9	11	11	9	5
320	254	260	321	351	283	222	0	8	13	11	11	7
330	255	249	307	338	271	215	-1	11	14	13	12	7
340	255	239	295	326	259	208	0	10	12	12	12	7
350	256	229	283	314	250	202	-1	10	12	12	9	6
360	256	220	272	302	240	197	0	9	11	12	10	5
370	256	211	260	289	229	190	0	9	12	13	11	7
380	256	201	247	277	218	183	0	10	13	12	11	7
390	254	192	236	266	208	177	2	9	11	11	10	6
400	252	181	221	251	194	168	2	11	15	15	14	9
410	249	170	207	238	182	160	3	11	14	13	12	8
420	247	158	192	223	168	151	2	12	15	15	14	9
430	246	147	178	209	155	142	1	11	14	14	13	9
440	245	137	165	196	142	134	1	10	13	13	13	8
450	244	126	152	183	131	126	1	11	13	13	11	8

sumas acumulativas				consumo mixto de oxígeno				valores netos de respiración										
r	e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	r	e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas			
						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
24	34	43	39	24	21	1248	35	2041	33	5517	30	6238	20	6064	11	9	5	1
32	46	58	52	32	28	1664	47	4846	44	7356	41	4322	27	4752	8	6	5	-1
42	59	74	65	40	36	9684	60	5838	55	9195	53	1413	34	344	7	5	4	0
50	71	89	78	47	44	01	72	8643	67	1034	63	9497	40	3542	6	3	3	-2
59	83	104	92	57	51	9318	85	1448	79	1476	74	7581	48	9402	7	5	4	-1
69	96	120	107	62	60	7338	98	244	92	0521	86	4672	53	2332	6	5	3	1
77	108	134	120	68	67	7754	109	7058	103	236	97	2756	58	3848	6	5	3	-5
85	119	147	131	74	74	817	120	3489	112	6993	107	1833	63	5364	6	5	4	-2
95	132	163	145	81	83	619	133	4481	124	7435	118	8924	69	5466	5	3	3	-2
102	147	175	157	85	89	7804	143	2725	135	0671	127	8994	72	981	6	4	3	-3
112	155	191	171	93	98	5824	156	3717	147	1113	139	6085	79	8498	5	5	3	-3
120	165	202	183	99	105	624	165	3774	157	4349	148	6155	85	0014	6	4	3	-2
130	178	217	197	106	114	426	177	6579	169	4791	160	3246	91	0116	3	4	2	-2
139	190	231	210	112	122	3478	189	1197	180	663	171	133	96	1632	5	4	3	-3
146	198	241	220	116	128	5092	197	3067	189	266	178	3386	99	5976	5	4	3	-3
156	210	254	233	123	137	3112	207	9498	200	4499	189	147	105	6078	3	3	1	-3
166	222	267	247	130	146	1132	218	5929	212	4941	199	9554	111	618	3	3	2	-3
174	232	278	258	135	153	1548	227	5986	221	9574	208	9624	115	911	3	4	2	-3
183	243	291	270	143	161	0766	238	2417	232	281	218	8701	122	7798	3	3	2	-3
195	257	307	286	153	171	639	251	3409	246	0458	231	4799	131	3658	4	3	2	-1
202	266	317	296	157	177	8004	259	5279	254	6488	239	5862	134	8002	4	4	2	-2
210	276	330	309	165	184	842	270	171	265	8327	248	5932	141	669	3	3	2	-3
220	288	343	321	171	193	644	280	8141	276	1563	259	4016	146	8206	5	5	2	0
229	298	356	333	177	201	5658	291	4572	286	4799	268	4086	151	9722	3	2	2	-4
238	310	368	346	184	209	4876	301	2816	297	6638	279	217	157	9824	4	3	1	-3
247	321	381	358	191	217	4094	311	9247	307	9874	289	1247	163	9926	3	4	3	-2
257	331	394	369	199	226	2114	322	5678	317	4507	298	1317	170	8614	4	3	2	-2
268	344	408	382	205	235	8936	334	0296	328	6346	309	8408	176	013	3	1	0	-2
277	354	423	396	213	243	8154	346	3101	340	6788	318	8478	182	8818	3	2	2	-5
286	363	434	407	218	251	7372	355	3158	350	1421	326	9541	187	1748	6	5	1	-1
294	374	447	418	225	258	7788	365	9589	359	6054	336	8618	193	185	2	2	0	-4
305	386	461	431	232	268	461	377	4207	370	7893	347	6702	199	1952	5	3	3	-1
315	398	473	443	239	277	263	387	2451	381	1129	358	4786	205	2054	3	2	1	-4
325	407	485	455	245	286	065	397	0695	391	4365	366	5849	210	357	2	2	2	-3
334	417	496	467	250	293	9868	406	0752	401	7601	375	5919	214	65	2	2	-1	-4
343	428	508	480	257	301	9086	415	8996	412	944	385	4996	220	6602	2	3	1	-4
353	439	521	492	264	310	7106	426	5427	423	2676	395	4073	226	6704	3	4	2	-2
362	449	532	503	270	318	6324	435	5484	432	7309	404	4143	231	822	3	2	1	-3
373	463	547	518	279	328	3146	447	8289	445	6354	417	0241	239	5494	2	2	1	-3
384	475	561	531	287	337	9968	459	2907	456	8193	427	8325	246	4182	4	4	3	-2
396	489	576	546	296	348	5592	471	5712	469	7238	440	4423	254	1456	3	2	1	-3
407	502	590	560	305	358	2414	483	033	481	768	452	1514	261	873	3	3	2	-3
417	515	603	573	313	367	0434	493	6761	492	9519	463	8605	268	7418	3	3	2	-2
428	526	616	586	321	376	7256	504	3192	504	1358	473	7682	275	6106	3	3	3	-2
440	539	631	601	330	387	288	516	5997	517	0403	485	4773	283	338	2	2	0	-3

sumas acumulativas				consumo neto de oxígeno			
24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas
				0	0	0	0
19	15	10	0	15 5553	12 9045	9 007	0
26	20	14	0	21 2862	17 206	12 6098	0
32	23	17	-2	26 1984	19 7864	15 3114	-1 7176
39	28	21	-5	31 9293	24 0884	18 9147	-2 5764
45	33	24	-2	36 8415	28 3899	21 6168	-1 7176
51	38	27	-7	41 7537	32 6914	24 3189	-6 0116
57	43	31	-9	46 6659	36 9929	27 9217	-7 7297
62	46	34	-11	50 7594	39 5738	30 5238	-9 4468
68	50	37	-14	55 6716	43 015	33 3259	-12 0232
73	55	40	-17	59 7651	47 3165	36 028	-14 5996
79	59	43	-19	64 6773	50 7577	38 7301	-16 3172
82	63	45	-21	67 1334	54 1989	40 5315	-18 0348
87	67	48	-24	71 2269	57 6401	43 2336	-20 6112
92	71	51	-27	75 3204	61 0813	45 9357	-23 1876
95	74	52	-30	77 7765	63 6622	46 8364	-25 764
98	77	54	-33	80 2326	66 2431	48 6378	-28 3404
101	81	56	-36	82 6887	69 6843	50 4392	-30 9168
104	84	58	-39	85 1448	72 2652	52 2406	-33 4932
108	87	60	-40	88 4196	74 8461	54 042	-34 352
112	91	62	-42	91 6944	78 2873	55 8434	-36 0696
115	94	64	-45	94 1505	80 8682	57 6448	-38 646
120	99	66	-45	98 244	85 1697	59 4462	-38 646
123	101	68	-49	100 7001	86 8903	61 2476	-42 0812
127	104	69	-52	103 9749	89 4712	62 1483	-44 6576
130	108	72	-54	106 431	92 9124	64 8504	-46 3752
134	111	74	-56	109 7058	95 4933	66 6518	-48 0928
137	112	74	-58	112 1619	96 3536	66 6518	-49 8104
140	114	76	-63	114 618	98 0742	68 4532	-54 1044
146	119	77	-64	119 5302	102 3757	69 3539	-54 9632
148	121	77	-68	121 1676	104 0963	69 3539	-58 3984
153	124	80	-69	125 2611	106 6772	72 056	-59 2572
156	126	81	-73	127 7172	108 3978	72 9567	-62 6924
158	128	83	-76	129 3546	110 1184	74 7581	-65 2688
160	130	82	-80	130 992	111 839	73 8574	-68 704
162	133	83	-84	132 6294	114 4199	74 7581	-72 1392
165	137	85	-86	135 0855	117 8611	76 5595	-73 8568
168	139	86	-89	137 5416	119 5817	77 4602	-76 4332
170	141	87	-92	139 179	121 3023	78 3609	-79 0096
174	145	90	-94	142 4538	124 7435	81 063	-80 7272
177	147	91	-97	144 9099	126 4641	81 9637	-83 3036
180	150	93	-100	147 366	129 045	83 7651	-85 88
183	153	95	-102	149 8221	131 6259	85 5665	-87 5976
186	156	98	-104	152 2782	134 2068	88 2686	-89 3152
188	158	98	-107	153 9156	135 9274	88 2686	-91 8916
191	161	99	-110	156 3717	138 5083	89 1693	-94 468

Piquerol A en combinación con una solución de glucosa a una concentración de 300 mg/l.

Tiempo (minutos)	termobar	MAN					Interpretación entre lecturas							
		r	e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	termobar	r	e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas
0	183	311	597	698	592	555								
10	181	297	657	648	560	531	2	14	35	58	37	74		
20	176	290	609	611	520	505	5	7	48	37	40	26		
30	173	277	568	574	490	485	3	18	43	37	30	26		
40	166	268	532	545	461	456	7	9	34	29	29	29		
50	165	255	503	519	439	437	3	13	29	26	22	19		
60	159	245	470	492	416	415	4	10	23	27	23	22		
70	155	234	444	470	396	394	4	11	26	22	20	21		
80	152	224	418	448	379	377	3	10	26	22	17	17		
90	150	214	395	425	359	367	2	10	23	23	20	15		
100	148	204	378	411	343	344	2	10	17	14	16	18		
110	147	195	359	396	326	330	1	9	19	15	17	14		
120	146	184	340	383	308	314	1	11	19	13	18	16		
130	146	177	321	366	297	302	-3	12	19	17	11	17		
140	154	167	307	350	286	294	-5	5	14	16	11	8		
150	155	161	284	334	277	283	-1	6	23	16	9	11		
160	154	157	264	317	263	271	1	4	20	17	14	12		
170	157	148	243	303	250	259	2	9	21	14	13	12		
180	149	140	224	284	235	247	3	8	19	19	15	12		
190	146	132	204	271	221	233	3	8	15	13	14	14		
200	143	123	196	255	206	219	3	9	13	16	15	14		
210	141	113	183	243	191	205	2	10	13	12	15	14		
220	147	102	169	230	178	196	-1	11	14	13	13	9		
230	144	96	155	215	165	183	-2	6	14	15	13	13		
240	146	88	140	199	154	174	-2	8	15	16	11	9		
250	146	81		184	142	163	0	7		15	13	11		

r	sumas acumulativas				consumo medio de oxígeno				valores netos de respiración					
	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	r	e	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas
	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u	u
31	83	87	72	50	18	4842	67	9521	78	3604	61	9416	47	43
34	126	124	102	70	24	9268	103	1562	111	6868	87	7506	60	102
43	160	153	131	99	37	8486	130	992	137	8071	112	6993	85	0014
56	189	179	153	118	49	2912	154	7343	161	2253	131	6254	101	3148
66	222	206	176	146	58	0932	181	7514	185	5442	151	4128	120	204
77	248	228	196	161	67	7754	203	0376	205	3596	168	6188	138	2346
87	274	250	213	178	76	5774	224	3738	225	175	183	2439	152	8308
97	297	273	233	193	85	3794	243	1539	245	8911	200	4499	165	7098
107	314	287	249	211	94	1814	257	0718	258	5009	214	2147	181	1646
116	333	302	266	225	102	1032	272	6271	272	0114	228	8398	193	185
127	352	315	284	241	111	7854	288	1824	283	7205	244	3252	206	9226
139	371	332	295	253	122	3478	303	7377	299	0324	253	7885	217	2258
144	385	348	306	261	126	7488	315	1995	313	4436	263	2518	224	0946
150	408	364	315	272	132	03	334	0296	327	8548	270	9945	233	5392
154	428	381	329	284	135	5508	350	4036	343	1667	283	0387	243	8474
163	449	395	342	296	143	4726	367	5963	355	7765	294	2226	254	1456
171	468	414	357	308	150	5142	383	1516	372	8898	307	1271	264	4488
179	483	427	371	322	157	5558	395	4321	384	5989	319	1713	276	4692
188	496	443	386	336	165	4776	406	0752	399	0101	332	0758	288	4896
198	509	455	401	350	174	2796	416	7183	409	8185	344	9803	300	51
209	523	468	414	359	183	9618	428	1801	421	5276	356	1642	308	2374
215	537	483	427	372	189	243	439	6419	435	0381	367	3481	319	3992
223		499	438	381	196	2846			449	4493	376	8114	327	1266
230		514	450	392	202	446			462	9598	387	135	336	5712
236			464	405	207	7772					399	1792	347	753
244			480	417	214	7688					412	944	358	0362
254			493	430	223	5708					424	1279	369	198



sumas acumulativas			consumo neto de oxígeno								
24 horas	10 horas	8 horas	6 horas	24 horas	10 horas	8 horas	6 horas				
			0	0	0	0	0				
62	66	51	29	50	7544	59	4462	43	8753	24	9052
42	90	68	36	75	3204	81	063	58	5004	30	9168
112	110	88	56	95	7879	99	077	75	7064	48	0928
133	123	97	62	108	8871	110	7861	83	4491	53	2456
156	140	110	74	127	7172	126	098	94	633	63	5512
171	151	119	84	139	9977	136	0057	102	3757	72	1392
187	163	126	91	153	8969	146	8141	108	3976	78	1508
200	176	136	96	163	74	158	5232	117	0008	82	4448
207	180	142	104	169	4709	162	126	122	1626	89	3152
227	186	150	109	177	6579	167	5302	129	045	93	6092
225	188	157	114	184	2075	169	3316	135	0671	97	9032
237	193	156	114	189	9384	173	8351	134	2068	97	9632
243	204	162	117	197	3067	183	7478	139	3686	100	4796
258	214	165	122	211	2246	192	7498	141	9495	104	7736
274	227	175	130	224	3238	204	4589	150	5525	111	644
286	232	179	133	234	1487	208	9624	153	9937	114	2204
297	243	186	137	243	1539	218	8701	160	0158	117	6556
304	248	192	143	248	8848	223	3736	165	1776	122	8084
308	255	198	148	252	1596	229	6785	170	3394	127	1074
311	257	203	152	254	6157	231	4799	174	6409	130	5376
314	259	205	150	257	0718	233	2813	176	3615	128	82
322	268	212	157	263	6214	241	3876	182	3836	134	8316
329	276	215	158	269	3523	248	5932	184	9645	135	6904
322	284	220	162	263	6214	255	7988	189	266	139	1256
316	278	228	169	258	7092	250	3946	196	1484	145	1372
	270	236	173					203	0308	148	5724
		239	176							151	1488