

24
174

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DEL MICROBIOCIDA IMP-B104 Y EL
FLUIDO DE CONTROL IMP-BD, EN LA INHIBICION DE LA FOTOSINTESIS
DE TRES ESPECIES DE ALGAS FITOPLANCTONICAS DULCEACUICOLAS.

TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA
JUAN MANUEL ROMERO DOMINGUEZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

México, D.F. Mayo

1986.



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 está 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.

I N D I C E

CONTERIDO	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y METODO	11
ANALISIS DE RESULTADOS	19
RESULTADOS	21
DISCUSION Y CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFIA	34
TABLAS Y FIGURAS	37

RESUMEN

La presente investigación fue realizada con objeto de estudiar la inhibición fotosintética de tres especies de algas fitoplanctónicas dulceacuícolas: Chlorella vulgaris, -- Chlorella fusca y Scenedesmus acutus, así como la mezcla de ellas, al ser expuestas a diferentes tratamientos con microbiciocida IMP-BI04, fluido de control IMP-BD y a la combinación de ambos. Además se determinó, según el caso, la recuperación de las especies estudiadas después de cada uno de los tratamientos, al ser restablecidas las condiciones óptimas para el crecimiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que las respuestas en la inhibición fotosintética para cada tratamiento fueron diferentes en cada especie y estuvieron en relación directa a la concentración y tipo del contaminante, obteniéndose la mayor inhibición fotosintética para los tratamientos con microbiciocida IMP-BI04 concentrado, seguida de los tratamientos con fluido de control IMP-BD dosificado con microbiciocida IMP-BI04 y finalmente, los correspondientes al fluido de control IMP-BD concentrado.

En lo que se refiere a la recuperación de los microorganismos después del tratamiento, se encontró que todos los -- cultivos probados con fluido de control IMP-BD y la combinación de éste con microbiciocida IMP-BI04, fueron capaces de recuperarse al ser restablecidas las condiciones óptimas de --

crecimiento, no así con el microbiocida IMP-B104, donde se -
encontró que a partir de la concentración de 100 ppm para --
Ch. vulgaris y la mezcla de especies, y de 300 ppm para ---
Ch. fusca y S. acutus, el contaminante tiene efectos letales
para las algas.

INTRODUCCION

En una economía como la de México, donde los recursos petroleros juegan un papel importante, resulta de especial relevancia el indiscutible avance tecnológico que ha tenido la Industria Petrolera, el cual se debe en gran parte al desarrollo de nuevas tecnologías y productos que solucionan -- sus problemas operacionales y de control. Tal es el caso de la elaboración de formulaciones químicas o aditivos denominados microbiocidas. (Paniagua, 1982)

Estos productos son generalmente compuestos orgánicos -- tales como formaldehídos, pentaclorofenoles, alquilamidas, -- o mezclas de estos materiales y en ocasiones con sales inorgánicas. (Johnston, 1969)

En general un buen microbiocida debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, compatibilidad en una amplia gama de pH, estabilidad a la temperatura, no debe ser -- volátil, sus formulaciones deben ser líquidas y tener acceptabilidad ambiental. (Cappeline y Carrol, 1977)

En lo que se refiere a los mecanismos de acción de los microbiocidas, existen una gran variedad de rutas mediante -- las cuales funcionan para inhibir el crecimiento de los microorganismos, algunos alteran la permeabilidad de las paredes celulares y por lo tanto interfieren en los procesos vitales de la célula. Entre otros, los compuestos organo-estañosos son conocidos por su toxicidad en algas, mohos y bacte-

rias. Su acción microbiocida está asociada con su habilidad para permanecer ionizados en solución, de aquí que la molécula penetra rápidamente en la pared celular del microorganismo e invade el citoplasma donde forma complejos con los grupos amino y ácido carboxílico de las proteínas. Estos aminoácidos son así modificados y pierden su utilidad en las reacciones normales que sustentan la vida del organismo. (Cappelle y Carrol, op. cit.)

Los compuestos organo-estañosos están caracterizados -- por tener al menos, una ligadura estaño carbono en cada molécula. Estos funcionan mejor en rangos de pH alcalino. Para mejorar sus capacidades dispersantes, son frecuentemente asociados con compuestos cuaternarios de amonio o aminas complejas. Formulaciones combinadas de este tipo, actúan sinérgicamente mejorando la eficiencia total del microbiocida, -- excediendo la actividad esperada para cualquiera de los ingredientes individuales. (Cappelle y Carrol, op. cit.)

El uso potencial de microbiocidas dentro de la Industria, y en especial de la Petrolera, ha venido a solucionar problemas operacionales causados por microorganismos, tales como fenómenos de corrosión en los sistemas de perforación de distribución de oleoductos y gasoductos, así como en los sistemas de enfriamiento de plantas petroquímicas y de refinerías, donde constituyen una flora microbiana variable y extensa que prevalece en tales condiciones después de una adaptación a los parámetros de temperatura, pH y sólidos disueltos.

tos del agua de recirculación, llegando a establecer un equilibrio biológico entre los diversos grupos microbianos existentes; ocasionando con esto, toda una secuencia de problemas que pueden originar graves alteraciones operacionales y en consecuencia, grandes pérdidas económicas fundamentalmente desde el punto de vista de mantenimiento o reemplazo de equipo. (García, 1981)

Una actividad en la explotación de los recursos petroleros es la perforación de pozos, que provean acceso a los yacimientos. La perforación de un pozo aporta gran cantidad de información técnica y económica, es un proceso dinámico y está sustentado en gran parte en la información que se recibe de las formaciones que se van perforando y el medio que las pone en contacto con el hombre es el llamado fluido de perforación o lodo, el cual es responsable en gran medida de una perforación fácil, rápida, adecuada y económica. (UTA e IMP, 1980)

A través del tiempo, se han desarrollado formulaciones específicas de fluidos para cada caso, un ejemplo, es el fluido de control de baja densidad IMP-BD que se utiliza en operaciones tales como: limpieza de pozos invadidos por materiales pertenecientes a la formación productora, reacondicionamiento del equipo subsuperficial de bombeo, cambio del intervalo de flujo de la formación productora y conversión de un pozo invadido de agua, en inyector. (Paniagua, op. cit.)

El fluido IMP-BD, está constituido básicamente por una

emulsión de diesel en agua, utilizando un surfactante de tipo no iónico, así como biopolímeros para proporcionar características tixotrópicas (fluido no Newtoniano) y una alta resistencia a temperaturas hasta de 120. °C. (García-Rejón, -- 1981)

Este tipo de fluidos, es susceptible de degradación por bacterias, por lo que se ha hecho necesario el uso de microbocidas que abatan las poblaciones de estos microorganismos. Sin embargo, el gran adelanto tecnológico de la Industria Petrolera y el manejo de los aditivos en ella usados, ha traído consigo problemas cada vez mayores de contaminación por descuidos, accidentes y maniobras de transporte, causando un impacto negativo en el ambiente, el cual ha sido analizado, discutido y descrito ampliamente en la literatura. (IMP, -- 1985)

Actualmente la contaminación del ambiente es un problema mundial que se acentúa cada vez más, un ejemplo claro de esto es la contaminación de los cuerpos de agua tanto marinos como dulceacuícolas ya que estas zonas son de gran importancia ecológica, dada la cantidad y diversidad de los organismos que la habitan y que quedan expuestos en forma directa y por mayor tiempo al agente contaminante. (Barrera, --- 1982)

Muchos contaminantes tóxicos son concentrados a lo largo de una cadena alimenticia y muy altos niveles pueden ser acumulados en los organismos, desde muy bajas concentracio-

nes en el agua. Brooks y Rumsby (1965) sugieren algunos caminos posible para la concentración de los metales en los ecosistemas acuáticos, estos son: Ingestión de material suspendido alrededor del agua; ingestión de contaminantes preconcentrados en el alimento; incorporación de contaminantes por sistemas fisiológicos importantes y entrada de contaminantes por intercambio con el ambiente.

La importancia relativa de las diferentes rutas de entrada del producto contaminante, dependen de las características de la especie y la velocidad de acumulación de factores internos y externos de los organismos. (Mason, 1981)

No obstante que el agua dulce representa solo una pequeña proporción del total del agua contenida en la biosfera, - comparada con el 98% de los océanos, desde muchos aspectos, tiene una importancia vital para el hombre por lo que se hace necesaria la implementación de programas de uso y protección. En muchos casos, el análisis del fitoplancton dulceacuático se relaciona con problemas de diferentes tipos de -- contaminación, así mismo estudios de especies y biomasa fitoplanctónicas de agua dulce, proveen información de los cambios en los incrementos y decrementos de nutrientes, lo que da por resultado disturbios en el ecosistema. (APHA, 1980)

Elke e Irwing (1977) reportan también que el fitoplancton afecta directamente la composición del agua, en lo que - se refiere al oxígeno disuelto, el pH, la concentración de - ciertos solutos y sus propiedades ópticas.

Otra característica que hace del fitoplancton ser de vi tal importancia desde el punto de vista biológico, es su conocida capacidad para la realización de fotosíntesis, fenómeno que constituye la primera etapa del flujo de energía a través de la biosfera, y que puede ser considerado como el modo en que la energía luminosa, fuente última de toda energía biológica, es absorbida por las células fotosintéticas y convertida en energía química para ser a su vez utilizada en la reducción del anhídrido carbónico y formar glucosa. (Lehninger, 1981)

Por las características antes citadas, resulta ser importante la realización de análisis del ambiente por lo que son necesarios no sólo estudios de línea básica para conocer las condiciones físicas, químicas y biológicas de determinadas zonas, sino también bioensayos o análisis de dosis respuesta. En este tipo de experimentos, se determina la respuesta de los organismos a una serie gradual de concentraciones de sustancias que pueden o no ser tóxicas; en general, un aumento en la dosis del contaminante trae como consecuencia un incremento en la respuesta del organismo. (Barrera, op. cit.)

Los bioensayos con algas consisten de tres etapas: selección y mantenimiento de factores y condiciones apropiadas durante el ensayo; presentación y evaluación estadística de las condiciones estudiadas; e interpretación de resultados. (APHA, op. cit.)

Este tipo de estudios permiten conocer el rango de concentraciones de sustancias que son nocivas o benéficas para los organismos en cuestión. Así mismo, nos dan la pauta para determinar si las especies de un ecosistema son o no susceptibles a exposiciones subletales crónicas, y así posteriormente ser usadas como indicadoras para una contaminación específica. (Barrera, op. cit.)

Aunque parece evidente a muchos investigadores que géneros e incluso especies particulares de algas, si se consideran aisladamente, no son indicio fidedigno de algún tipo de contaminación, pueden serlo cuando se considera a cierta clase de algas como comunidad. (Palmer, 1962)

No obstante, la confiabilidad o precisión del plancton como indicador de la calidad del agua puede ser limitada, - por ejemplo, en ríos su origen puede ser incierto y la duración de la exposición al contaminante desconocida. (APHA, - op. cit.)

Además de la realización de bioensayos o análisis de dosis respuesta, se hace necesario el monitoreo de la contaminación. Holdgate (1979) propone que para un control efectivo de la sustancia contaminante que recibe el medio, se debe - conocer información concerniente a: la sustancia que ingresa al ambiente y sus cantidades y fuentes de dispersión; los efectos que esas sustancias provoca al ambiente; tendencias en las concentraciones, efectos y causas de esos cambios; - que tanto esas concentraciones, tendencias y efectos dentro

del ambiente, pueden ser modificadas, por que medios y a que costos.

Por todo lo anteriormente expuesto, se consideró importante establecer la metodología experimental necesaria, con la finalidad de cumplir con los siguientes objetivos:

- Determinar la fase logarítmica del crecimiento de -- Chlorella vulgaris, Chlorella fusca y Scenedesmus acutus.

- Evaluar por medio de bioensayos, el efecto en la inhibición fotosintética del microbiocida IMP-BI04, el fluido de control IMP-BD y la combinación de ambos en las especies de algas fitoplanctónicas dulceacuicolas estudiadas, además de la mezcla de ellas.

- Determinar la posible recuperación del cultivo, después del tiempo de prueba para cada tratamiento.

MATERIAL Y METODO

Para desarrollar la presente investigación, se dispuso - de tres especies de algas fitoplanctónicas de agua dulce, de la División Chlorophyta:

- Chlorella vulgaris
- Chlorella fusca
- Scenedesmus acutus

El flujo de la metodología, fue el siguiente:

Obtención de los microorganismos para prueba.

(1)

Determinación de la fase logarítmica de crecimiento para cada especie, por la técnica turbidimétrica.

(2)

Propagación de cada una de las especies de prueba.

(3)

Cuantificación de algas para la prueba de inhibición de la fotosíntesis.

(4)

Prueba de inhibición de la fotosíntesis a diferentes concentraciones del microbicida IMP-BI04, del fluido de control IMP-BD y de la combinación de ambos.

(5)

Prueba para determinar la recuperación de los microorganismos, después del tratamiento con IMP-BI04 y/o IMP-BD.

(6)

Resultados

(7)

Las especies de algas estudiadas en esta investigación, Chlorella vulgaris, Chlorella fusca y Scenedesmus acutus, fueron proporcionadas por el laboratorio de Química de la Atmósfera y Estudios del Agua, del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para determinar la fase logarítmica del crecimiento de cada una de las especies estudiadas, se usó una técnica turbidimétrica de la siguiente manera:

Se prepararon cuatro matraces nefelométricos de vidrio transparente de 300 ml de capacidad, con 100 ml de medio de cultivo; tres se inocularon en proporción 1:10 con cada una de las especies, y el último se dejó como control o blanco. Una vez listos los recipientes de cultivo, se procedió a incubarlos en una cámara de crecimiento, cuyas características se describen en la figura 1. Y se tomaron lecturas de la turbidez (índice de crecimiento) cada 24 horas durante 24 días, en un turbidímetro Sargent Welch, agitando previamente los matraces para homogeneizar el cultivo. Durante la preparación y lecturas de los matraces de cultivo, se cuidó de tener condiciones de esterilidad para la manipulación.

Los cultivos de propagación de los organismos, se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento (figura 1), equipada con lámparas fluorescentes de 40 watts (APHA, 1930) y un termómetro con un rango de temperatura de -35 a 50 °C.

Las condiciones para los cultivos fueron:

- Medio de cultivo: Medio Basal de Bold (Bold, 1978)
- Intensidad luminosa: 350 c/ft; reportada como adecuada para el crecimiento de la mayoría de las algas (Stein, 1979)
- Fotoperíodo: 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad --- (Smith, 1973)
- Temperatura: Se mantuvo en la cámara de crecimiento a 24 ± 2 °C durante el período de cultivo (APHA, 1980)

La incubación de los cultivos en la cámara de crecimiento se hizo en matraces Erlenmeyer de vidrio transparente, con capacidad de:

- | | |
|------------------------------|--|
| 125 ml con 40 ml de cultivo | Cepa de propagación para cada especie. |
| 500 ml con 100 ml de cultivo | Cultivos de prueba para cada especie. |

Estas condiciones se establecieron con objeto de dejar un amplio espacio de aire disponible para el metabolismo celular.

Todos los matraces fueron inoculados en proporción 1:10 de la muestra de alga para cada especie (excepto el testigo o control del experimento), e inmediatamente después, fueron tapados con tapones de algodón y gasa, y protegidos con capuchones de papel para evitar el intercambio de agua y partículas con el medio (Rivera, 1985)

Una vez inoculados los recipientes de cultivo, se distrib

buyeron en la cámara de crecimiento de tal manera que la luz llegara homogéneamente a los cultivos, colocándolos a una distancia de 60 cm entre las lámparas y la base del matraz. Esta distancia corresponde a la requerida para tener una intensidad de luz de 350 c/ft. (Stein, 1979)

Posteriormente, se esperó a que los cultivos alcanzaran la fase logarítmica en su crecimiento, para continuar con la cuantificación de algas, y prueba de inhibición de la fotosíntesis.

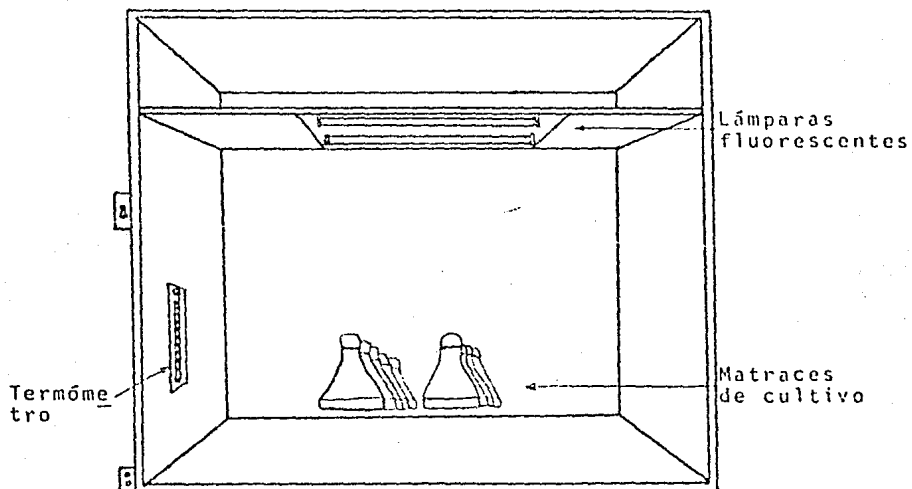


Figura 1. Cámara de crecimiento y propagación.

Representación esquemática, de las condiciones experimentales del crecimiento y propagación de las especies de algas estudiadas.

Para la prueba de inhibición de la fotosíntesis, se requirió de una población de 15×10^6 algas/ml, por lo que fue necesario realizar los pasos que a continuación se describen:

El cultivo se concentró por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. y se resuspendió en solución Ringer estéril.

La cuantificación se hizo por técnica microscópica, utilizando la cámara de Neubauer.

Después de concentrar y resuspender los microorganismos, se hicieron tres diluciones seriadas hasta 10^{-3} .

La última dilución (10^{-3}), se homogeneizó perfectamente y se dispuso de una gota para cargar la cámara de Neubauer.

Se observó al microscopio, se contó y se anotó el número de algas de cada uno de los cuatro cuadrantes adyacentes al central.

Para el recuento final, se promediaron los cuatro cuadrantes contados y se multiplicó por el factor de 10,000; obteniéndose así el número de algas por mililitro de muestra para esa dilución.

De la muestra con 15×10^6 algas/ml, se tomaron tres ml. en cada una de las pruebas de inhibición fotosintética.

La prueba de inhibición de la fotosíntesis por el microbicida IMP-BIO4, el fluido de control IMP-BD y la combinación de ambos, se realizó después de que los cultivos (para cada especie) habían proliferado y se encontraban en su fase de crecimiento logarítmico.

Esta prueba se basa en la medición de O_2 desprendido en el proceso fotosintético, realizado por los organismos estudiados, por lo que cualquier perturbación en el proceso provocada por un agente químico, se manifestará en la variación del desprendimiento de O_2 . (García, 1981)

Para la realización de la prueba antes mencionada, se utilizó el oxímetro YSI modelo 53 OXYGEN MONITOR, de la siguiente manera:

Se conectó el electrodo de Clark al galvanómetro y este a su vez al graficador (Electronic 196 Honeywell), y se dejó funcionando durante 30 mins.

Se adaptó el electrodo a una cámara con agitación que contenía agua destilada previamente aireada.

Se ajustó el graficador y el galvanómetro hasta saturación de oxígeno.

Se adicionó ditionita (bisulfito de sodio) para extraer el oxígeno del medio y fijar el cero de la escala.

Se adicionaron en la cámara de agitación 3 ml de solución Ringer y se mantuvo durante 3 minutos para que el equipo se estabilizara, después de este tiempo, se dosificó con una concentración conocida de microbiocida de IMP-B104 y de fluido de control IMP-BD por separado, con objeto de comprobar que el consumo de oxígeno era ajeno a la muestra del contaminante, exenta de la suspensión de algas.

Una vez calibrado el equipo, se hizo la prueba de referencia.

Esta se realizó con una suspensión de algas en solución Ringer sin microbiocida ni fluido de control, de la siguiente manera:

Se sustituyó el agua de la cámara de agitación, por una suspensión de algas con una densidad de población de 15×10^6 células/ml.

Se estandarizó el graficador, y se fijó el cero de la escala mediante burbujeo con nitrógeno de alta pureza, esto con objeto de desplazar el oxígeno presente; y se adicionó NaHCO_3 como fuente de CO_2 . (Colowich y Kaplan, 1972)

Se conectó la fuente luminosa de la cámara y se estandarizó la temperatura a 28 ± 1 °C, tomándose la lectura cada 3 minutos.

De los datos obtenidos en % de oxígeno, se hizo la conversión a μl de oxígeno producido en la prueba de referencia.

En la misma suspensión de algas se burbujeó nuevamente nitrógeno de alta pureza, para eliminar el oxígeno de la cámara, y se adicionó NaHCO_3 (0.5 %) como fuente de CO_2 .

Se conectó la fuente luminosa y se tomaron las tres primeras lecturas.

Se adicionó una alícuota para dar una concentración conocida de microbiocida IMP-B104 (50, 100, 300 y 600 ppm); de fluido de control IMP-BD (50, 100, 300 y 600 ppm) y de fluido de control dosificado a 100, 300 y 600 ppm con IMP-B104 (50, 100, 300 y 600 ppm).

Se realizó una prueba para cada una de las concentracio-

nes mencionadas, para el microbiocida, el fluido de control y la combinación de ambos.

Después de dosificado el microbiocida, el fluido de control y la combinación respectiva y a la concentración por analizar, se tomaron lecturas cada 3 minutos hasta 27 minutos en cada prueba.

Se realizaron las conversiones de las lecturas a μl de oxígeno liberado durante la fotosíntesis.

Para evaluar la recuperación de los microorganismos, después del tratamiento con microbiocida IMP-BI04, fluido de control IMP-BD y la combinación de ellos, se realizó una prueba que determinó si el daño provocado por los diferentes tratamientos a las especies de algas estudiadas era tan severo como para provocar la muerte del organismo, o el cultivo llegaba a restablecerse indicando la recuperación de las especies de algas.

Para esto, se utilizaron tubos de ensayo con 6 ml de medio basal de Bold y tapones de algodón perfectamente estériles y se inocularon en proporción 1:10 con los cultivos probados para la inhibición fotosintética, después de una hora de tratamiento con el contaminante respectivo. Inmediatamente después se incubaron en la cámara de crecimiento (fig. 1) durante 15 días, tiempo después del cual se observaron los resultados.

ANALISIS DE RESULTADOS

De las lecturas obtenidas en por ciento (%) de O_2 , se realizaron las conversiones a microlitros de oxígeno liberado durante la fotosíntesis.

Los datos así obtenidos, fueron en cada caso ajustados a una recta de regresión por el método de mínimos cuadrados. - Posteriormente, se realizó un análisis de covarianza para pendientes e interceptos, con objeto de determinar si existieron diferencias en cada caso; esto se hizo para cada especie además de la mezcla de ellas, y sus correspondientes tratamientos. (Zar, 1974)

Una vez determinadas dichas diferencias, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANVA) de dos vías (Dixon y Massey, 1957), a los tiempos de 15, 21 y 27 minutos y a las concentraciones de 50 y 600 ppm; para determinar si el efecto provocado por cada tratamiento fué debido a la respuesta aislada de cada especie, al tratamiento y dosificación empleada, o era una respuesta conjunta de la especie y el tratamiento en cada caso.

Para establecer si existieron diferencias significativas entre el control del experimento y los diferentes tratamientos a cada una de sus dosificaciones, se hizo la prueba de - Dunnett (1955) para cada tratamiento, a los tiempos de 15, 21 y 27 minutos, para las concentraciones de 50 y 600 ppm.

Posteriormente, se hizo la prueba comparativa de rango -

múltiple de Newman-Keuls, para determinar si existieron diferencias en la respuesta para cada tratamiento por separado, - a los tiempos de 15, 21 y 27 minutos, y a las concentraciones de 50 y 600 ppm (Zar, op. cit.)

RESULTADOS

DETERMINACION DE LA FASE LOGARITMICA DEL CRECIMIENTO.

Se encontró que el tiempo de incubación necesario para que cada especie iniciara su fase de crecimiento logarítmico fue de cinco días; esta fase en el crecimiento se mantuvo hasta el día 18 en Chlorella vulgaris y hasta el día 20 en Chlorella fusca y Scenedesmus acutus; después de estos tiempos se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. (Tabla 1 y figura 2)

PRUEBAS DE INHIBICION DE LA FOTOSINTESIS.

Para la evaluación del efecto del microbiocida IMP-B104, del fluido de control IMP-BD, y de la combinación de ambos sobre la inhibición de la fotosíntesis de las especies estudiadas, se eligió el tiempo de incubación de los cultivos de algas entre un rango de 11 a 15 días, tiempo durante el cual las tres especies tuvieron un crecimiento logarítmico similar; así se obtuvo que:

Para Ch. vulgaris (tablas II a IV y figs. 3 a 7), el efecto en la inhibición fotosintética fue directamente proporcional al contaminante trabajado. Se observó un mayor efecto en los tratamientos con microbiocida IMP-B104, a sus diferentes dosificaciones (tabla II y fig. 3), se encontró también que las pendientes de las rectas de regresión de este trata-

miento, fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En lo que se refiere a los tratamientos con fluido de control IMP-BD (tabla III y fig. 4), el efecto en la inhibición fotosintética de las diferentes dosificaciones, fue menor que con microbiocida y no se encontraron diferencias en las pendientes de las rectas de regresión para las distintas concentraciones estudiadas ($p > 0.05$). Para los tratamientos con IMP-BD + IMP-BI04, se observó un efecto inhibitorio en la fotosíntesis que fué directamente proporcional al tratamiento y concentración empleada, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las pendientes de las rectas de regresión, sólo para los tratamientos con IMP-BD + 600 ppm de IMP-BI04, a sus diferentes dosificaciones (tabla VI y fig.7).

Para Ch. fusca (tablas VII a IX y figs. 8 a 12), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las pendientes de las rectas de regresión de todos los tratamientos, se observó un mayor efecto en la inhibición fotosintética, para los tratamientos con microbiocida IMP-BI04 (tabla VII y fig. 8) y el menor efecto de inhibición fotosintética correspondió al tratamiento con fluido de control IMP-BD (tabla VIII y fig. 9). Por lo que respecta a los tratamientos con IMP-BD + IMP-BI04 a sus diferentes concentraciones y dosificaciones, el efecto inhibitorio fué directamente proporcional al tratamiento y dosificación empleada, el mayor efecto se encontró en las dosificaciones con IMP-BD + 600 ppm de IMP-BI04 (tabla

XI y fig. 12)

Para S. acutus (tablas XII a XVI y figs. 13 a 17), se observó que el mayor efecto de inhibición fotosintética, fue -- con el tratamiento con microbiocida IMP-BI04 (tabla XII y -- fig. 13), se obtuvo una proporcionalidad directa a la concentración estudiada, en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las pendientes de las rectas de regresión para cada una de las dosificaciones. El menor efecto se obtuvo en el tratamiento con fluido de control IMP-BD (tabla XIII y fig. 14), aunque no se encontraron diferencias en las pendientes de sus rectas de regresión --- ($p > 0.05$). En lo que se refiere a los tratamientos con - - - IMP-BD + IMP-BI04, se encontró el mayor efecto inhibitorio -- con las dosificaciones de IMP-BD + 600 ppm de IMP-BI04 (tabla XVI y fig. 17), sin embargo tampoco hubo diferencias en las - pendientes de sus rectas de regresión ($p > 0.05$).

Para la mezcla de especies (tablas XVII a XXI y figs. 18 a 22), al igual que en las especies aisladas, se encontró que el mayor efecto en la inhibición fotosintética fue con el tratamiento con microbiocida IMP-BI04 (tabla XVII y fig. 18) donde las pendientes de las rectas de regresión fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Así mismo se encontró, que el menor efecto de la inhibición fotosintética fue en el tratamiento con el fluido de control IMP-BD (tabla XVIII y fig.

19), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las pendientes de sus rectas de regresión. Para los tratamientos con IMP-BD + IMP-BI04 se encontró que el mayor efecto inhibitorio fue para las dosificaciones con IMP-BD + 600 ppm de IMP-BI04 (Tabla XXI y fig. 22), se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las pendientes de las rectas de regresión de este tratamiento, además de las del tratamiento con IMP-BD + 300 ppm de IMP-BI04 (tabla XX y fig. 21).

Para determinar el factor responsable de las respuestas en la inhibición fotosintética, se procesaron los resultados del desprendimiento de O_2 mediante un análisis de varianza (ANVA), a los tiempos de 15, 21 y 27 minutos, para cada uno de los tratamientos y a las concentraciones mínimas y máximas 50 y 600 ppm respectivamente, mediante este análisis se obtuvo que para las concentraciones mínimas, y a los tiempos de 15 mins. (tabla XXII), 21 mins (tabla XXIII) y 27 mins. (tabla XXIV); la inhibición fotosintética se debió al efecto combinado de la especie y el tratamiento ($p < 0.05$). Con respecto a las concentraciones máximas, a los tiempos de 15 mins. (tabla XXV), 21 mins. (tabla XXVI) y 27 mins. (tabla XXVII), se encontró que al tiempo de 15 minutos, el efecto en la inhibición fotosintética, fue debido a las respuestas de las especies más que a los tratamientos, y a los tiempos de 21 y 27 mins., el efecto provocado se debió a una respuesta combinada

de la especie y el tratamiento ($p < 0.05$).

En referencia a la prueba comparativa de Dunnett (1955), entre el control del experimento y cada uno de los tratamientos y dosificaciones, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todos los casos.

De la prueba comparativa de rango múltiple de Newman-Keuls, para determinar las diferencias en las respuestas para cada tratamiento por separado, se encontró que:

Tratamientos mínimos:

15 minutos - - - - - $m_1 = m_2 \neq m_3 = m_4 = m_5$.
21 minutos - - - - - $m_1 = m_2 = m_3 \neq m_4 = m_5$.
27 minutos - - - - - $m_1 = m_2 \neq m_3 \neq m_4 = m_5$.

Tratamientos máximos:

15 minutos - - - - - $m_1 = m_2 = m_3 = m_4 = m_5$.
21 minutos - - - - - $m_1 \neq m_2 = m_3 = m_4 \neq m_5$.
27 minutos - - - - - $m_1 \neq m_2 \neq m_3 = m_4 \neq m_5$.

Donde cada tratamiento tiene la siguiente correspondencia: $m_1 = \text{IMP-BI04}$, $m_2 = \text{IMP-BD}$, $m_3 = \text{IMP-BD} + 100 \text{ ppm de IMP-BI04}$, $m_4 = \text{IMP-BD} + 300 \text{ ppm de IMP-BI04}$ y $m_5 = \text{IMP-BD} + 600 \text{ ppm de IMP-BI04}$.

En la prueba para evaluar la posible recuperación de los organismos estudiados, se encontró que todos los cultivos probados con fluido de control IMP-BD y fluido de control IMP-BD

con sus diferentes dosificaciones de microbiocida IMP-BI04, - fueron capaces de recuperarse al ser restablecidas las condiciones óptimas del crecimiento (nutrientes, temperatura y fotoperíodo).

Sin embargo, para las dosificaciones con microbiocida -- IMP-BI04, sólo se observó recuperación a las concentraciones de 50 ppm para todos los cultivos y 100 ppm para Ch. fusca y S. acutus. Se encontró que a partir de las concentraciones de 300 ppm con microbiocida IMP-BI04 en Ch. fusca y S. acutus, y de 100 ppm en Ch. vulgaris, el contaminante tiene efectos letales para las algas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Tomando en cuenta la importancia que por si misma tienen los organismos que constituyen el fitoplancton, al ser la base de la cadena alimenticia acuática, además de que a partir de ellos y por medio de bioensayos, se pueden predecir y determinar el efecto potencial de una sustancia que ingresa al ambiente acuático, ya sea marino o dulceacuícola, se realizaron bioensayos con tres especies de algas fitoplanctónicas de agua dulce, las cuales son: Chlorella vulgaris que se encuentra ampliamente distribuida en toda clase de hábitats, y es la más frecuente de todas las especies de ese género (Fott and Novakova, 1969); Chlorella fusca que se distingue de todas las especies de Chlorella, por algunas diferencias de hábitat, su distribución es mucho más reducida (Fott and Novakova, 1969) lo que la hace ser también menos resistente que la especie anterior; y Scenedesmus acutus que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente acuático, aunque también se reporta en ambientes subacuáticos (Rivera, 1985).

Por las características antes citadas, se puede establecer la resistencia de cada especie al ser modificadas sus condiciones naturales de vida, por lo que en cuanto a resistencia, las especies estudiadas pueden agruparse decrecientemente de la siguiente manera: Ch. vulgaris, S. acutus y

Ch. fusca.

De los resultados obtenidos en la fase logarítmica del crecimiento para cada especie, se encontró que éstos no concuerdan con los reportados por APHA, 1980 y Fogg, 1975 para la mayoría de las algas, los cuales reportan que la fase logarítmica del crecimiento usualmente se da entre el día 0 y 5 y se mantiene hasta el día 10. Los resultados obtenidos indican el mantenimiento de la fase logarítmica del crecimiento hasta el día 18 para Ch. vulgaris y hasta el día 20 para Ch. fusca y S. acutus (Fig. 2). Estas diferencias encontradas, se atribuyen a que para una especie dada, la constante relativa de crecimiento está en función de la temperatura, intensidad de luz, edad del inóculo y otros factores ambientales como pueden ser, la concentración de ciertos nutrientes. Así mismo, la adaptación a parámetros tales como altas o bajas temperaturas puede ocurrir en algún momento observándose consecuentemente una modificación en la constante relativa del crecimiento para la especie en cuestión (Fogg, 1975).

Se encontró también que de las tres especies, Chlorella vulgaris presenta la menor velocidad en su constante relativa de crecimiento (Fig. 2), esto pudo ser debido, a que existen evidencias claras de que esta especie produce sustancias tóxicas para sí misma en el curso de su metabolismo, y la acumulación de dichas sustancias puede eventualmente pro

vocar que se detenga el crecimiento exponencial, ya que la producción de un autoinhibidor es usualmente proporcional al crecimiento (Pratt and Fong, 1940).

Por lo que respecta a las pruebas para determinar el efecto en la inhibición fotosintética de las tres especies de algas estudiadas además de la mezcla de ellas, se encontró que el grado de inhibición de la fotosíntesis varió con respecto a los diferentes tratamientos, observándose siempre una mayor inhibición en las dosificaciones con microbiocida IMP-BI04 concentrado, seguida de las dosificaciones con fluido de control IMP-BD + microbiocida IMP-BI04 y finalmente, el menor grado de inhibición fotosintética se obtuvo en los tratamientos con fluido de control IMP-BD concentrado. Por consiguiente los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencias que apoyan la hipótesis de Cappeline y Carrol (1977), quienes establecen que el uso de microbiocidas en forma concentrada, traería consigo en caso de ser derramados al ambiente, problemas graves de contaminación y toxicidad persistente, los cuales dependerán de la concentración y tipo de contaminante en el medio.

Por otro lado, los resultados obtenidos del efecto del microbiocida IMP-BI04 en la inhibición fotosintética de la mezcla de especies, son similares a los presentados por García (1981) en sus evaluaciones con tributílo óxido de estaño,

esta similitud se atribuye a que esta substancia, constituye uno de los ingredientes activos del microbiocida IMP-B104 el cual tiene la propiedad de penetrar en la pared celular del microorganismo y difundir en el citoplasma donde forma complejos con los grupos amino y ácido carboxílico de las proteínas (Cappeline y Carroll, 1977).

En base al análisis de varianza (ANVA) realizado a los datos obtenidos (Tablas XXII a XXVII), se determinó que la inhibición de la fotosíntesis fué debida al efecto combinado de la especie y el tratamiento para todos los casos, excepto para las concentraciones máximas (600ppm) a los 15 minutos de prueba, donde la inhibición estuvo dada por la respuesta de las especies más que por los tratamientos. Así mismo, por la prueba comparativa de rango múltiple de Newman Keuls, pudo establecerse que la respuesta en la inhibición fotosintética fue directamente proporcional a la concentración y tipo de contaminante, observándose además pequeñas alteraciones morfológicas con formación posterior de agregados celulares después de cada tratamiento, resultados que son comparables con los reportados por Ferraz (1973) en la asimilación de DDT de especies fitoplanctónicas marinas.

En lo que se refiere a las pruebas para evaluar la recuperación de las especies de algas estudiadas después del tratamiento respectivo (Tabla XXVIII), se encontró que los -

cultivos que fueron tratados con fluido de control IMP-BD - concentrado, y fluido de control IMP-BD dosificado a diferentes concentraciones de microbiocida IMP-B104, fueron capaces de recuperarse al restablecerles las condiciones óptimas del crecimiento. Este comportamiento de los cultivos de algas, se atribuye a que el fluido IMP-BD, está constituido por compuestos químicos que no son contaminantes severos, tal es el caso de los biopolímeros utilizados para proporcionar las características tixotrópicas del propio fluido (Paniagua, 1982)-

La respuesta a las dosificaciones con fluido de control IMP-BD + microbiocida IMP-B104 puede estar dada por la excesiva dilución del microbiocida al ser dosificado al fluido y este a su vez al cultivo.

Se encontró también que en las dosificaciones con microbiocida IMP-B104 a partir de la concentración de 100ppm para Ch. vulgaris y la mezcla de especies y de 300ppm para --- Ch. fusca y S. acutus, el microbiocida tiene efectos letales para las especies de algas estudiadas. Estos resultados difieren de los presentados en los informes técnicos de Agua Treat (1982) y Rohm and Haas (1983); los cuales sugieren el uso de microbiocidas, en concentraciones menores que van desde 0 a 50 ppm. para el control del crecimiento microbiano, incluyendo algas. Estas diferencias pueden atribuirse a la cantidad excesiva de microorganismos que fué necesario utilizar para cada una de las pruebas de este estudio, así como

la diferente composición de cada uno de los microbiocidas, - en cuanto al ingrediente activo que los constituye, siendo este más o menos tóxico para determinados tipos de microorganismos (García, 1981).

Finalmente se concluye que no obstante que el microbiocida IMP-BI04 requiere de mayores concentraciones para inhibir la fotosíntesis y causar la muerte de los organismos estudiados, comparado con otros microbiocidas comerciales, esta sustancia no deja de ser contaminante potencial.

Por lo que respecta al fluido de control IMP-BD y a la combinación de éste más microbiocida IMP-BI04, se determinó que la toxicidad de éstos para las condiciones experimentales y tiempos de exposición al contaminante, no causa la -- muerte de las especies estudiadas y la inhibición fotosintética, es menor que la provocada por el microbiocida concen-- trado.

Sin embargo, la toxicidad de ambas sustancias y la - combinación de ellas, estará en relación directa con la concentración que se derrame al ambiente. Es por esto que el - uso de ciertos microbiocidas en muchas áreas es limitado, so bre todo por los problemas de contaminación ambiental y toxicidad persistente que provocan, especialmente en organismos fitoplanctónicos que son la base de la red trófica.

En forma adicional, se recomienda la realización de es-

tudios que determinen la posible acumulación de este tipo de sustancias en organismos planctónicos, ya que de ser acumuladas, dichas sustancias podrían pasar por medio de la red trófica, a otros organismos superiores e incluso al hombre.

Cabe hacer notar que el efecto toxicólogo del microbio-cida IMP-B104, el fluido de control IMP-BD y la combinación de ambos, se analizó con tres especies de algas y en condiciones controladas de experimentación, por lo que se hace necesaria la experimentación con un mayor número de especies y en condiciones de experimentación variadas; con el fin de establecer la verdadera toxicidad de los contaminantes y su influencia en el ecosistema acuático.

BIBLIOGRAFIA

1. Agua Treat. (1982) Microbiocida AT-38. Informe técnico, México. 3 p.
2. APHA, AWWA y WPCF., (1980) Standar Methods, for the examination of water and wastewater American Public Health Associaton, Washington. 874 p.
3. Barrera, V.R., (1982) Bases metodológicas experimentales para determinar el efecto de la fracción soluble en agua del petróleo crudo sobre las respuestas fisiológicas: Supervivencia y Osmorregulación del camarón café Penaeus aztecus, Ives. (TESIS). Universidad Nacional Autónoma de México, México. 80 p.
4. Bold, H. C. (1978) Introduction to The Algae. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, U.S.A. p: 571-578.
5. Cappeline, G. A. y Carroll, G. G. (1977) "Enhance your cooling systems performance through proper use of microbiocides". Power. U. S. A. Vol. Octubre p: 56-61.
6. Colowich, S. P. and Kaplan, N. O. (1972) Methods in Enzymology "Photosynthesis and nitrogen fixation" Vol. - XXIV. Academic Press. New York. p: 60-64.
7. Darley, W. M. (1982) Algal Biology: a physiological approach. Blackwell Scientific Publications. London. 168p.
8. Dixon and Massey (1957) Introduction to Statistical Analysis. Mc. Graw-Hill. New York. 488 p.

9. Ferraz, E. (1973) Efectos de los insecticidas clorinados sobre el fitoplancton. *Lagena* No. 31 pp. 23-26.
10. Fogg, G. E. (1975) *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. U. S. A. 175 p.
11. Fott, B. y Novakova, M. (1969). A monograph of the genus Chlorella. The fresh Water species. Ed. *Studies in Phycology*. Academia. Prague. 241 p.
12. García, E. R. (1981) "Estudio Microbiológico del agua de los sistemas de enfriamiento del complejo petroquímico de Pajaritos, Ver. y evaluación de biocidas". (TESIS). Instituto Politécnico Nacional. México. 54 p.
13. García Tejón, A. (1981) "Introducción a la reología de los polímeros" Plastinotocidas. México. Vol. Septiembre. p:37-55.
14. Garduño, R. et al. (1984) Microorganismos para degradar residuos de derrames de petróleo crudo en suelos. Instituto Mexicano del Petróleo. Vol. XVI; no. 4, p:61-77.
15. Johnston, D. P. (1969) "An effective biocide for drilling and completion fluids". Baroid New Bulletin. Houston, Tex. U. S. A. Vol. 21, No. 4, p:8-11.
16. Lehninger, A. L. (1981) *Bioquímica*. Omega. Barcelona. 1117p.
17. Mason, C. F. (1981) *Biology of Freshwater pollution*. ---- Longman. New York. 250 p.
18. Palmer, M. C. (1962) *Algas en los abastecimientos de agua*.

Centro Regional de Ayuda Técnica (AID). México. p: 38-40.

19. Paniagua, R. M. (1982) Cuantificación y control de la contaminación bacteriana, en un fluido de control para la reparación y determinación de pozos petroleros, en áreas de - presionadas. (TESIS). Universidad Nacional Autónoma de - México, México. 84 p.
20. Pratt and Fong (1940) Studies on Chlorella vulgaris. II. Further evidence that Chlorella cells form a growth-inhibiting substance Am. J. Bot. 27: 431-436.
21. Rivera, G. L. (1985) Aislamiento e identificación de algas muestradas de la atmósfera de una zona urbana "Ciudad U- versitaria". (TESIS). Universidad Nacional Autónoma de México, México. 64 p.
22. Rohm and Hass. (1983) RATHON 886 Microbiocide. Informe Técnico, México. 15 p.
23. Smith, G. M. (1973) Fresh-Water Algae of the United States. Mc.Graw-Hill Book. New York. 716 p.
24. Stein, J. R. (1979) Handbook of Phycological methods, -- culture methods and growth measurements. Sponsored by the Phycological Society of America Inc. Cambridge University Press. U. S. A. 488 p.
25. Universidad de Texas en Austin e Instituto Mexicano del - Petróleo. (1980) Perforación Rotatoria. 3a. Ed., I. M. P.,
26. Zar, H. J. (1974) Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. London. 620 p.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Determinación de la fase logarítmica de crecimiento, por la técnica turbidimétrica, durante un periodo de incubación de 24 días para cada especie estudiada.

TIEMPO (días)	CONTROL (NTU)	<u>Chlorella</u> <u>vulgaris</u> (NTU)	<u>Chlorella</u> <u>fusca</u> (NTU)	<u>Scenedesmus</u> <u>acutus</u> (NTU)
0	0.3	1.0	2.0	1.2
1	0.3	1.0	2.1	1.4
2	0.3	1.2	2.0	1.8
3	0.3	1.6	2.8	2.0
4	0.3	2.1	3.2	2.8
5	0.3	2.4	4.5	3.9
6	0.3	3.1	5.8	5.2
7	0.3	3.3	6.7	6.9
8	0.3	4.6	7.8	8.8
9	0.3	5.9	9.1	9.5
10	0.3	6.6	10.8	11.6
11	0.3	8.4	11.9	13.4
12	0.3	9.6	13.0	15.0
13	0.3	10.8	14.2	16.9
14	0.3	12.4	15.4	18.6
15	0.3	14.0	17.2	20.8
16	0.3	15.9	18.0	22.7
17	0.3	16.6	19.6	24.4
18	0.3	17.1	21.2	25.8
19	0.3	17.5	22.4	27.0
20	0.3	17.8	23.8	27.8
21	0.3	18.0	25.0	28.2
22	0.3	18.1	25.5	28.4
23	0.3	18.1	26.1	28.9
24	0.3	18.2	26.4	29.1

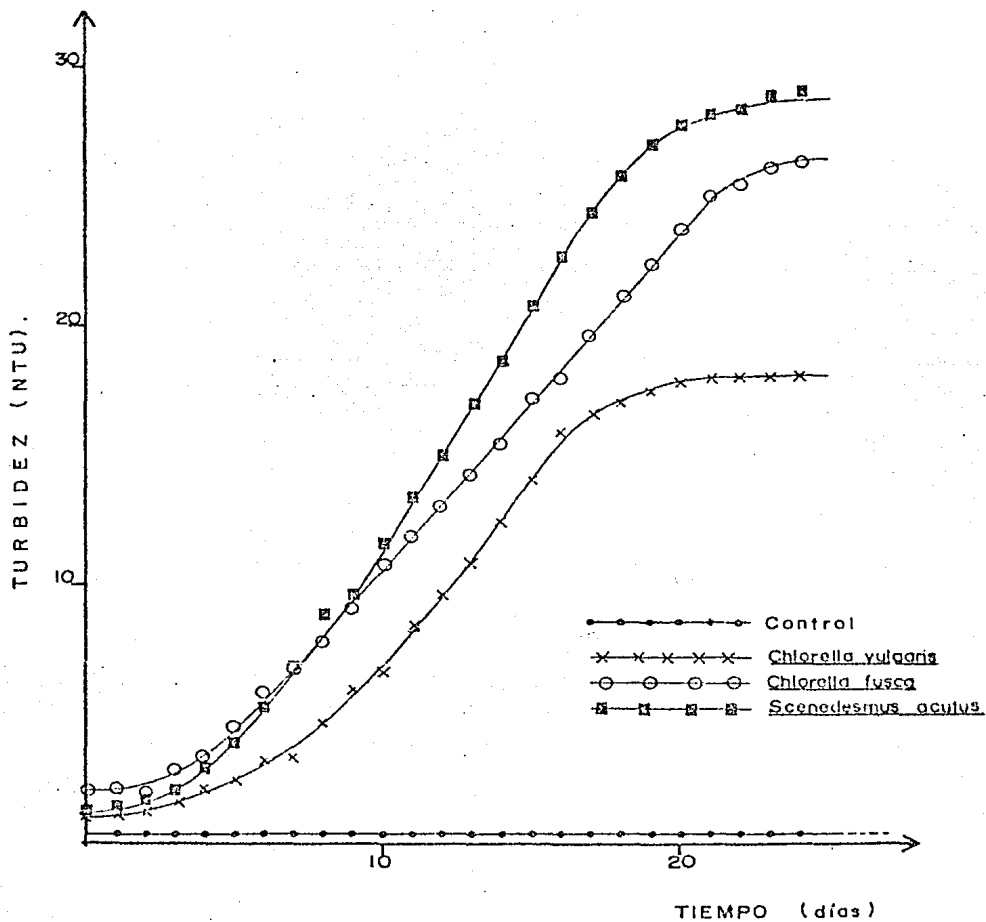


FIGURA 2. Determinación de la fase logarítmica del crecimiento para cada especie estudiada. Turbidez (NTU) vs. Tiempo.

Tabla II. Inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	1.95	2.10	2.10	1.95	2.10
6	2.55	2.55	2.70	2.55	2.55
9	3.55	3.15	3.30	3.07	3.15
12	3.75	3.75	3.90	3.75	3.75
15	4.50	4.20	4.20	3.90	3.75
18	5.10	4.50	4.35	3.90	3.60
21	5.70	4.80	4.50	3.75	3.45
24	6.30	5.10	4.50	3.60	3.30
27	6.90	5.25	4.50	3.45	3.15

Tabla III. Inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	1.95	2.10	2.10	2.10	2.10
6	2.55	2.55	2.70	2.55	2.70
9	3.55	3.15	3.30	3.15	3.30
12	3.75	3.75	3.75	3.90	3.75
15	4.50	4.35	4.20	4.05	3.90
18	5.10	4.65	4.50	4.20	4.05
21	5.70	5.40	4.80	4.20	4.05
24	6.30	6.00	5.10	4.35	4.05
27	6.90	6.30	5.40	4.35	4.05

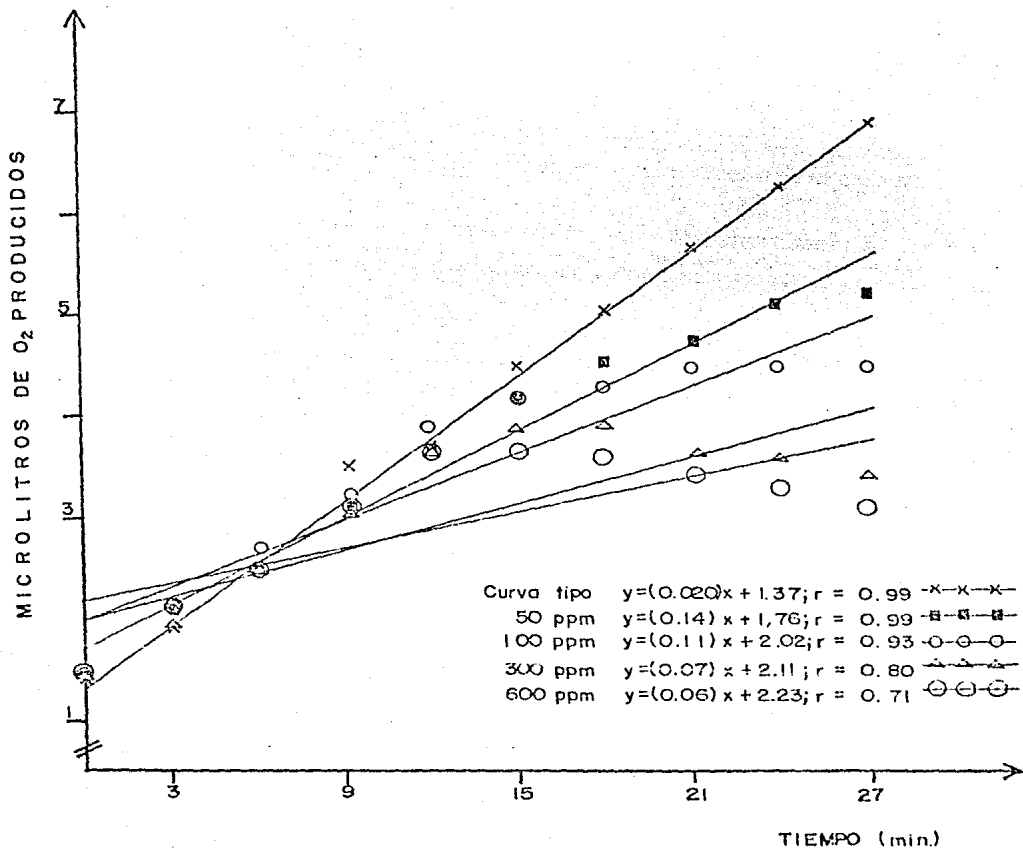


FIGURA 3. Efecto de diferentes concentraciones de microbocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris.

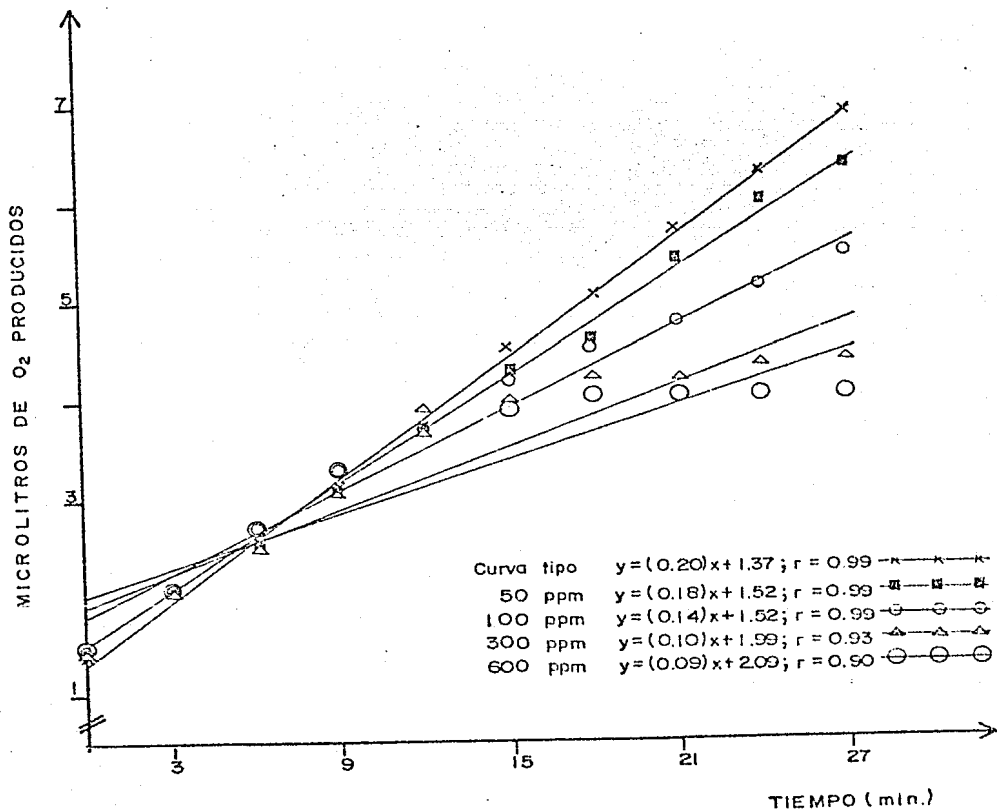


FIGURA 4. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD en la inhibición fotosintética de *Chlorella vulgaris*.

Tabla IV. Inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 100 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	1.95	1.95	2.10	1.95	1.95
6	2.55	2.70	2.70	2.55	2.55
9	3.55	3.15	3.30	3.15	3.15
12	3.75	3.75	3.90	3.75	3.60
15	4.50	4.20	4.20	3.90	3.75
18	5.10	4.80	4.65	4.05	3.90
21	5.70	5.40	4.80	4.20	3.90
24	6.30	5.85	4.95	4.20	3.90
27	6.90	6.15	5.10	4.20	3.90

Tabla V. Inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 300 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	1.95	2.10	2.10	1.95	2.10
6	2.55	2.70	2.70	2.55	2.70
9	3.55	3.30	3.15	3.15	3.30
12	3.75	3.90	3.75	3.75	3.75
15	4.50	4.35	4.05	4.05	3.90
18	5.10	4.95	4.20	4.20	3.90
21	5.70	5.10	4.35	4.20	4.05
24	6.30	5.40	4.50	4.20	4.05
27	6.90	5.70	4.65	4.20	4.05

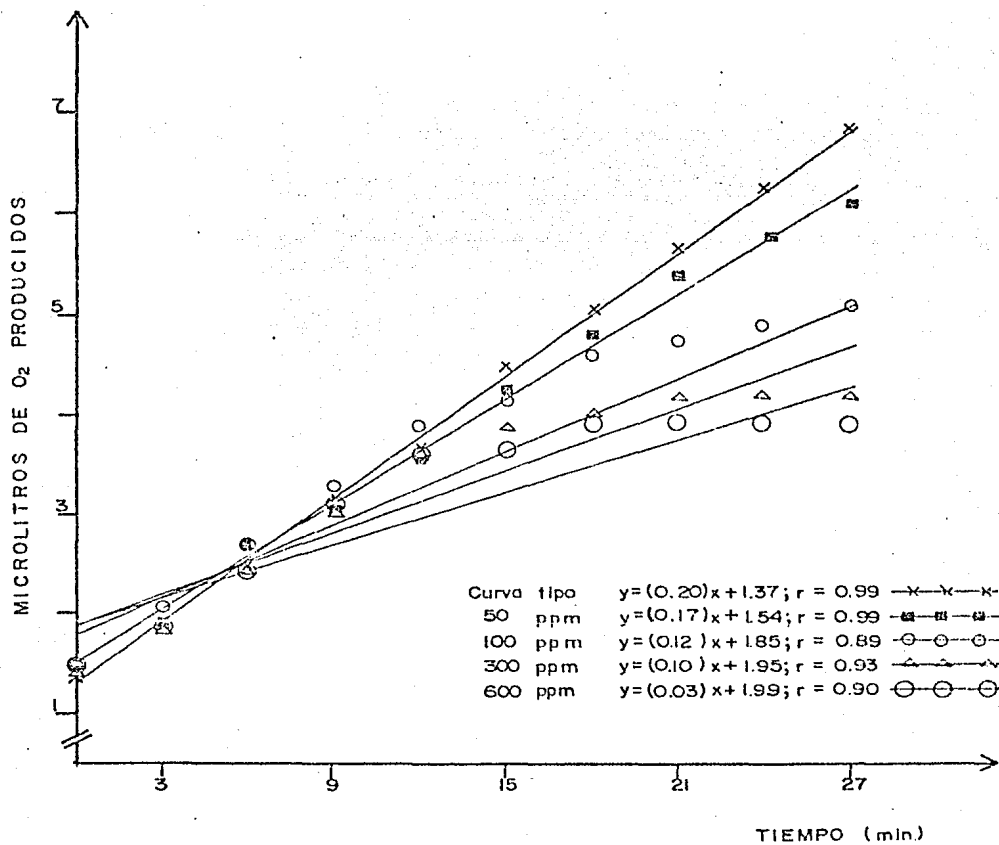


FIGURA 5. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado a 100 ppm con microbiocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de *Chlorella vulgaris*.

Tabla VI. Inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 600 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95
6	2.55	2.70	2.70	2.70	2.55
9	3.55	3.30	3.30	3.30	3.15
12	3.75	3.60	3.75	3.60	3.45
15	4.50	3.90	3.90	3.75	3.30
18	5.10	4.20	3.75	3.75	3.30
21	5.70	4.50	3.90	3.75	3.45
24	6.30	4.65	3.90	3.75	3.30
27	6.90	4.80	3.90	3.75	3.30

Tabla VII. Inhibición fotosintética de Chlorella fusca a diferentes concentraciones de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.40
6	4.20	4.20	4.35	4.20	4.20
9	5.85	5.70	5.70	5.70	5.85
12	7.05	6.15	6.30	6.30	6.45
15	8.55	6.90	7.20	6.90	7.05
18	9.90	7.65	8.10	7.50	7.20
21	11.40	8.55	9.00	8.10	7.35
24	12.90	9.60	10.05	8.25	7.35
27	14.40	10.50	11.10	8.40	7.35

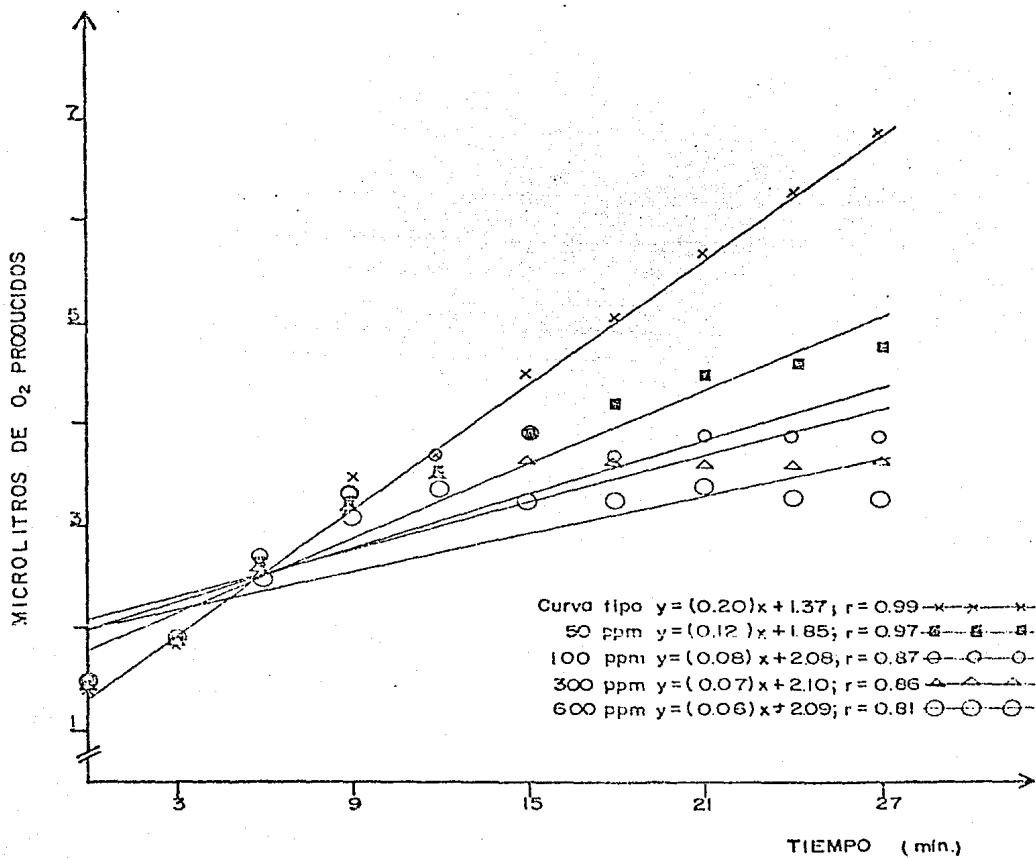


FIGURA 7.

Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 600 ppm con microbiocida IMP-BIO 4 en la inhibición fotosintética de Chlorella vulgaris.

Tabla VIII. Inhibición fotosintética de Chlorella fusca a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
6	4.20	4.05	4.20	4.05	4.05
9	5.85	6.00	5.70	5.55	5.55
12	7.05	7.05	6.90	6.60	6.30
15	8.55	8.40	8.10	7.65	7.20
18	9.90	9.90	9.30	8.70	8.10
21	11.40	11.25	10.50	9.75	9.00
24	12.90	12.75	11.70	10.95	10.05
27	14.40	14.25	12.90	12.00	10.95

Tabla IX. Inhibición fotosintética de Chlorella fusca a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 100 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
6	4.20	4.20	4.05	4.05	4.20
9	5.85	5.85	5.70	5.55	5.70
12	7.05	6.75	6.60	6.30	6.30
15	8.55	7.95	7.80	7.65	6.90
18	9.90	9.30	9.00	8.55	7.65
21	11.40	10.65	10.35	9.30	8.55
24	12.90	12.30	11.40	10.65	9.75
27	14.40	13.65	12.60	11.85	10.50

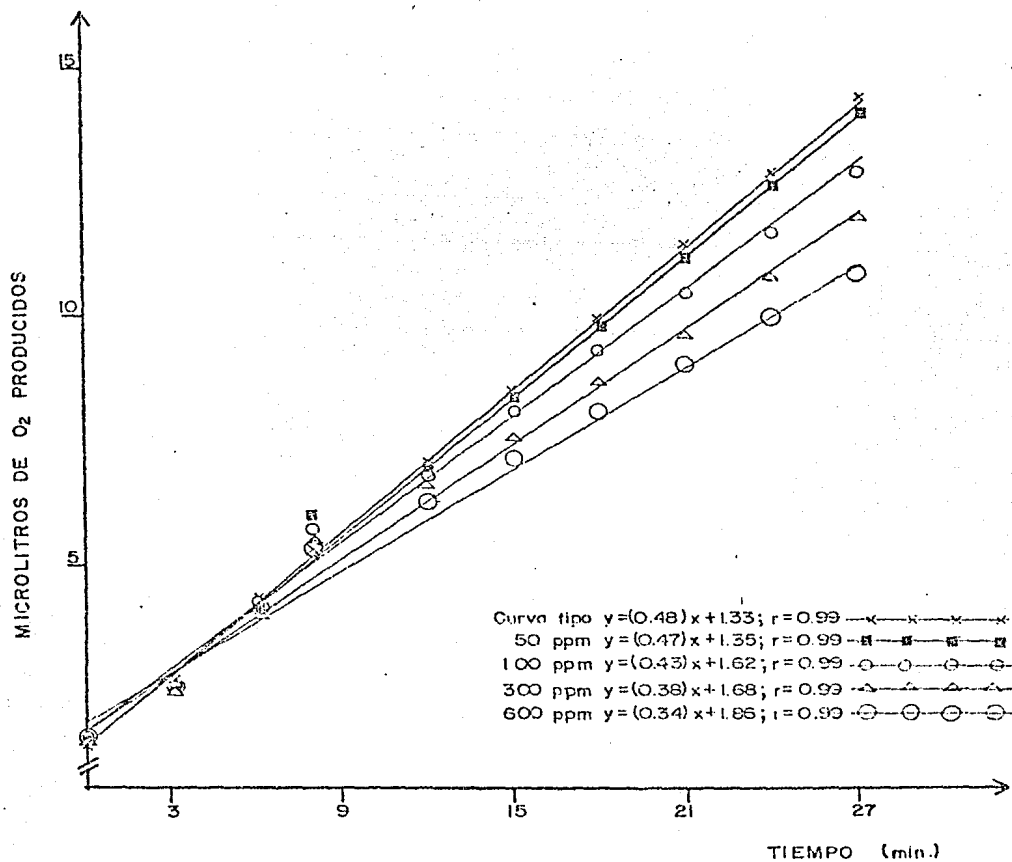


FIGURA 9. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, en la inhibición fotosintética de Chlorella fusca.

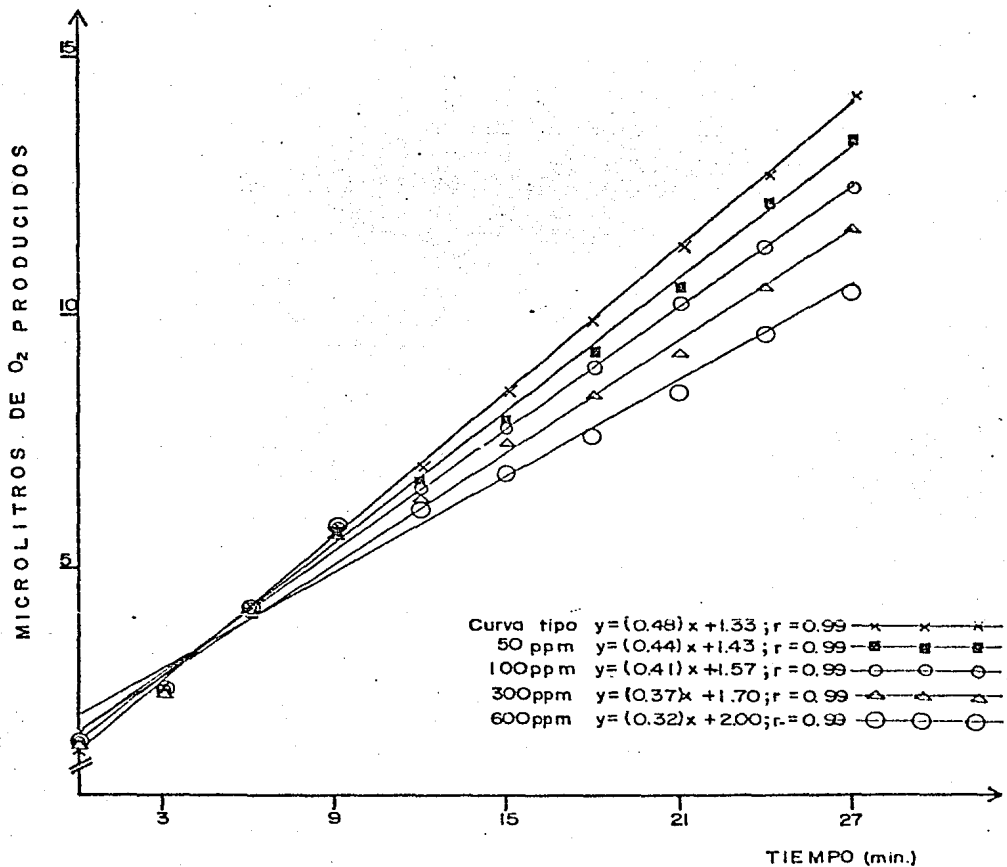


FIGURA 10. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 100 ppm con microbicida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de *Chlorocytis fusca*.

Tabla X. Inhibición fotosintética de Chlorella fusca a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 300 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.70	2.55
6	4.20	4.20	4.05	4.20	4.05
9	5.85	5.70	5.70	5.85	5.55
12	7.05	6.30	6.30	6.30	6.15
15	8.55	7.80	7.65	7.50	6.60
18	9.90	9.00	8.85	8.25	7.50
21	11.40	10.35	10.20	9.00	8.10
24	12.90	12.00	11.10	10.50	9.30
27	14.40	13.35	12.30	11.55	10.20

Tabla XI. Inhibición fotosintética de Chlorella fusca a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 600 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.70
6	4.20	4.20	4.05	4.05	4.20
9	5.85	5.55	5.55	5.70	5.85
12	7.05	6.00	6.15	6.00	6.15
15	8.55	7.50	7.35	7.05	6.75
18	9.90	8.85	8.55	7.80	7.50
21	11.40	10.05	9.75	8.85	8.10
24	12.90	11.25	10.65	10.05	8.70
27	14.40	12.45	11.85	10.80	9.00

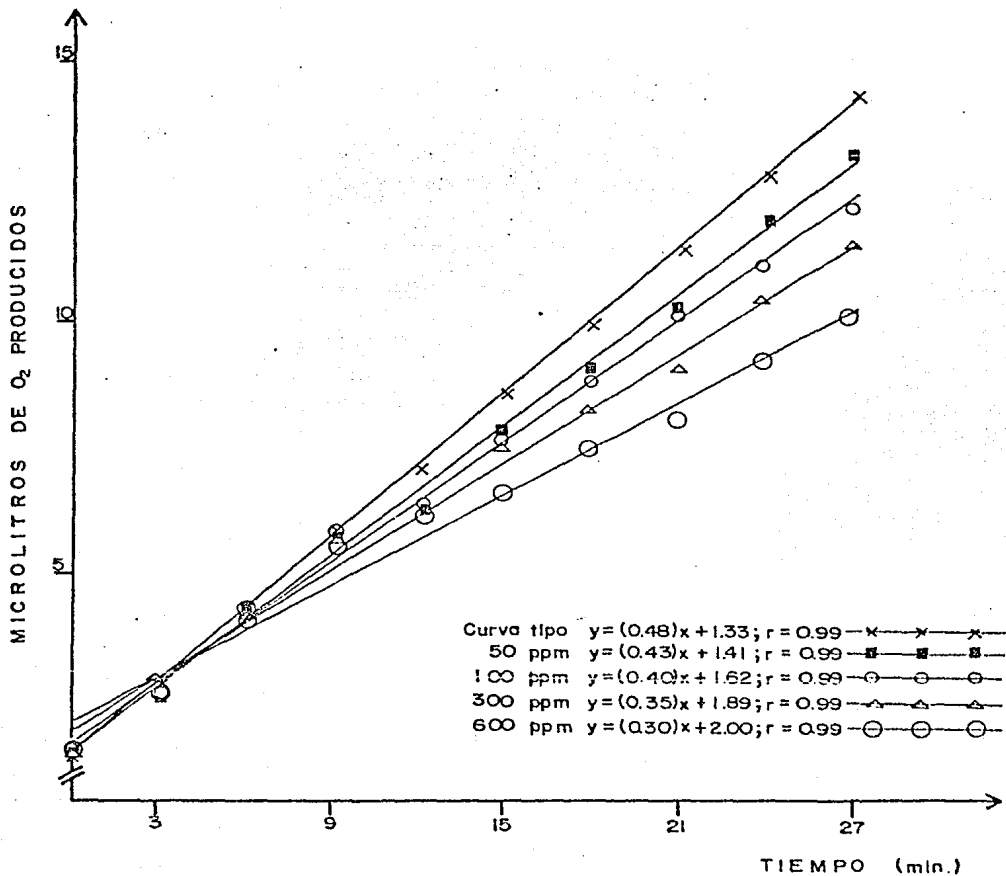


FIGURA II. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 300 ppm con microbicida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de *Chlorella fusca*.

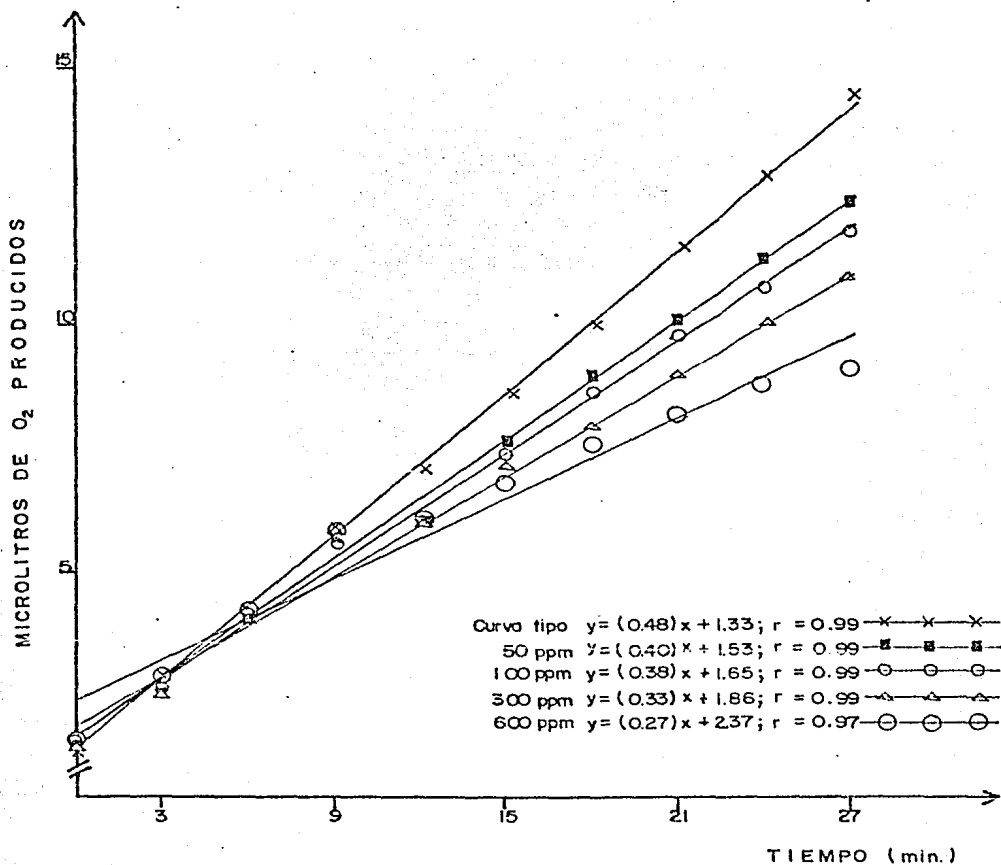


FIGURA 12. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 600 ppm con microbiocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de *Chlorocidium fusca*.

Tabla XII. Inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus a diferentes concentraciones de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
6	3.90	4.05	4.05	4.20	4.05
9	5.25	5.40	5.25	5.55	5.40
12	6.45	6.00	5.85	6.00	5.35
15	7.50	6.75	6.60	6.45	6.15
18	8.25	7.35	7.20	6.75	6.30
21	9.00	7.95	7.65	7.20	6.45
24	10.65	8.85	8.10	7.65	6.45
27	11.10	9.45	8.10	8.10	6.45

Tabla XIII. Inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.70	2.55
6	3.90	4.05	4.05	4.05	4.05
9	5.25	5.40	5.55	5.70	5.70
12	6.45	6.30	6.30	6.15	6.00
15	7.50	7.35	7.20	6.90	6.60
18	8.25	8.10	7.95	7.50	7.20
21	9.00	8.85	8.55	8.25	7.95
24	10.65	10.05	9.75	9.00	8.55
27	11.10	10.65	10.20	9.75	9.45

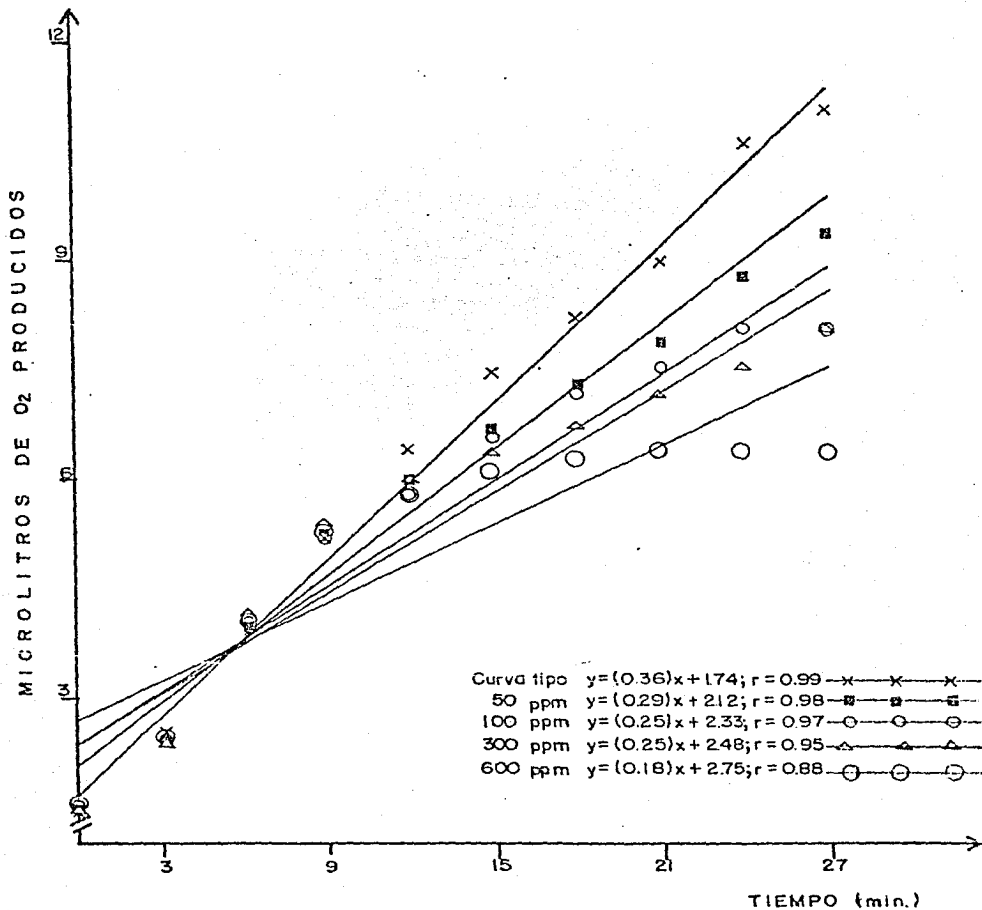


FIGURA 13. Efecto de diferentes concentraciones de microbiciida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de Scenedesmus ocutus.

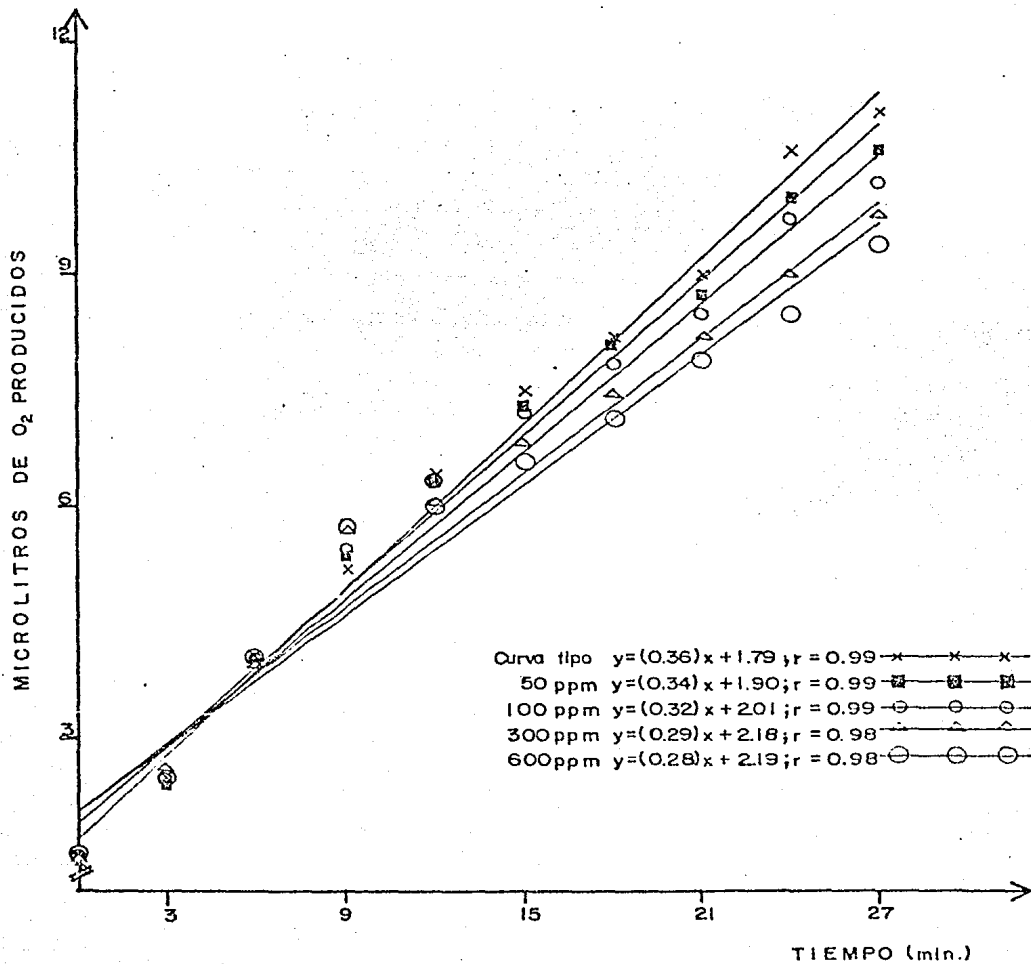


FIGURA 14. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, en la inhibición fotosintética de *Scenedesmus acutus*.

Tabla XIV. Inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 100 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	500 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
6	3.90	4.05	4.05	4.05	4.05
9	5.25	5.25	5.40	5.40	5.25
12	6.45	6.30	6.15	6.00	6.00
15	7.50	7.05	7.05	6.90	6.75
18	8.25	7.80	7.65	7.35	7.35
21	9.00	8.55	8.25	7.95	7.80
24	10.65	9.60	9.45	8.85	8.25
27	11.10	10.35	9.90	9.15	9.30

Tabla XV. Inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 300 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
6	3.90	4.05	4.05	4.05	4.05
9	5.25	5.40	5.40	5.25	5.40
12	6.45	6.30	6.15	5.85	6.15
15	7.50	6.75	7.05	6.60	6.60
18	8.25	7.65	7.50	7.20	7.05
21	9.00	8.10	7.95	7.80	7.65
24	10.65	8.85	9.00	8.55	8.10
27	11.10	9.75	9.45	8.85	8.85

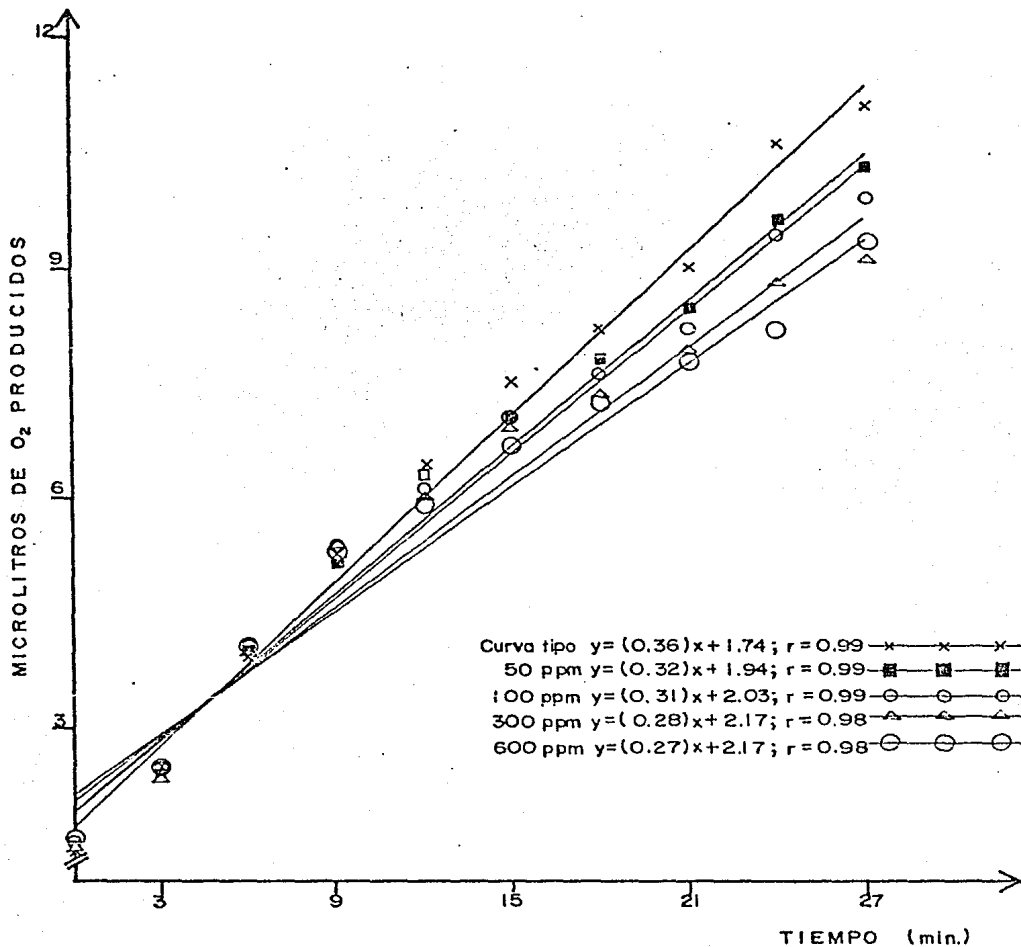


FIGURA 15. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 100 ppm con microbocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de *Scenedesmus acutus*.

Tabla XVI. Inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 600 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.55	2.70	2.70	2.55	2.55
6	3.90	4.05	4.05	4.05	4.20
9	5.25	5.25	5.40	5.40	5.25
12	6.45	6.30	6.15	5.85	6.00
15	7.50	6.60	6.90	6.45	5.45
18	8.25	7.50	7.35	6.75	6.90
21	9.00	8.10	7.80	7.35	7.35
24	10.65	8.85	8.70	7.95	7.95
27	11.10	9.60	9.15	8.55	8.40

Tabla XVII. Inhibición fotosintética de la mezcla de especies a diferentes concentraciones de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.40	2.40	2.40	2.55	2.55
6	3.45	3.45	3.60	3.45	3.45
9	4.35	4.35	4.50	4.35	4.35
12	5.40	4.95	4.95	4.65	4.65
15	6.45	5.55	5.40	5.10	4.95
18	7.50	6.15	5.85	5.55	5.25
21	8.55	6.75	6.30	6.00	5.40
24	9.60	7.35	6.60	6.30	5.55
27	10.50	7.95	6.90	6.60	5.55

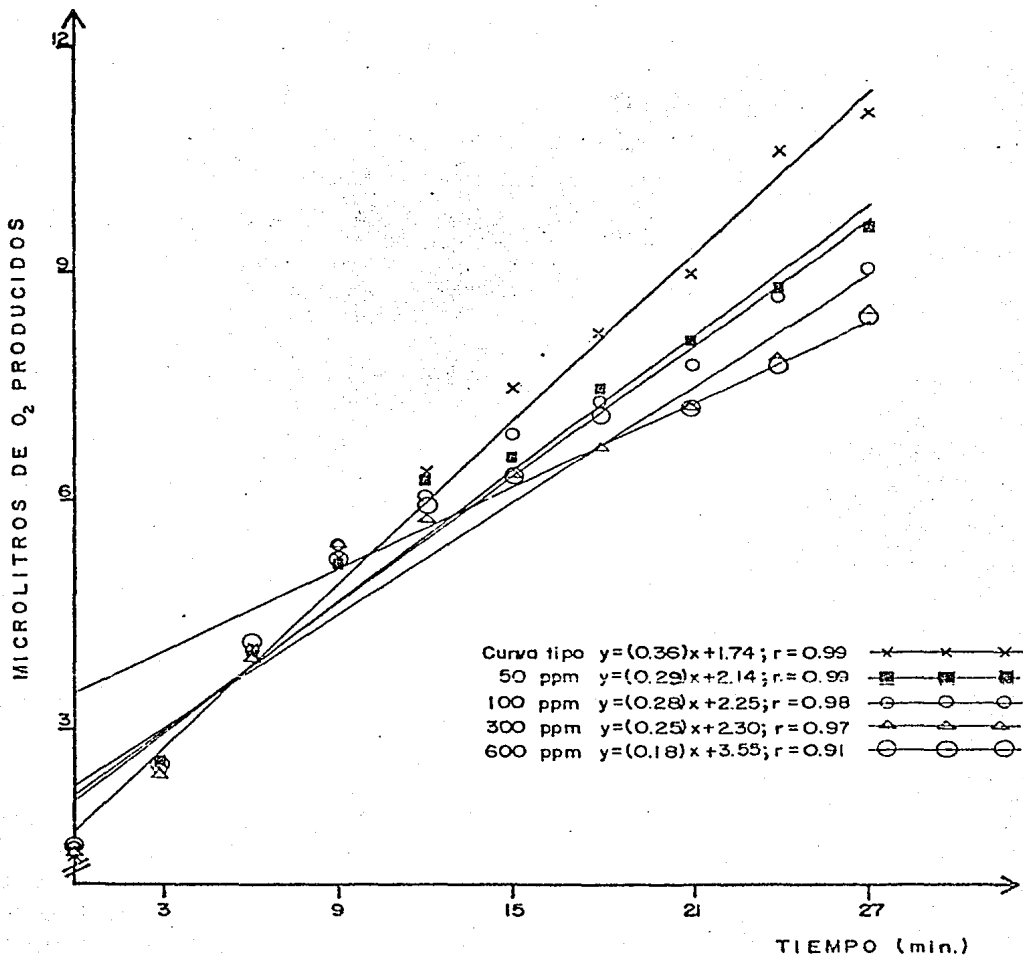


FIGURA 17. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 600 ppm con microbocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de Scenedesmus acutus.

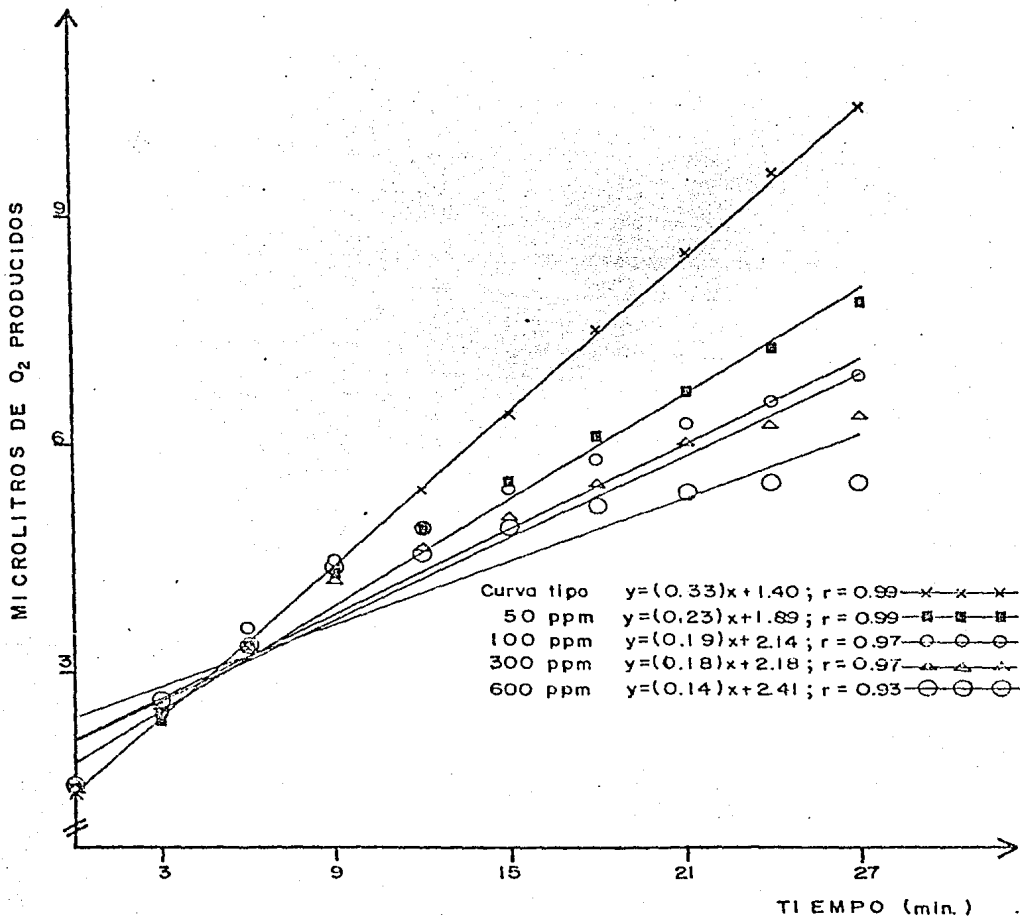


FIGURA 18. Efecto de diferentes concentraciones de microblocka IMP-BIO 4 , en la inhibición fotosintética de la mezcla de especies.

Tabla XVIII. Inhibición fotosintética de la mezcla de especies a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.40	2.40	2.55	2.55	2.40
6	3.45	3.30	3.45	3.45	3.45
9	4.35	4.50	4.50	4.35	4.35
12	5.40	5.40	5.25	5.25	5.25
15	6.45	6.30	6.15	6.15	6.00
18	7.50	7.35	7.05	6.90	6.75
21	8.55	8.40	7.95	7.65	7.50
24	9.60	9.30	8.70	8.40	8.25
27	10.50	10.20	9.60	9.15	8.85

Tabla XIX. Inhibición fotosintética de la mezcla de especies a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, con 100 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.40	2.40	2.55	2.40	2.55
6	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
9	4.35	4.35	4.35	4.35	4.35
12	5.40	5.25	5.10	4.95	5.10
15	6.45	6.15	6.00	5.70	5.70
18	7.50	7.05	6.90	6.60	6.30
21	8.55	7.95	7.80	7.35	6.90
24	9.60	8.85	8.70	8.10	7.50
27	10.50	9.90	9.45	8.85	8.10

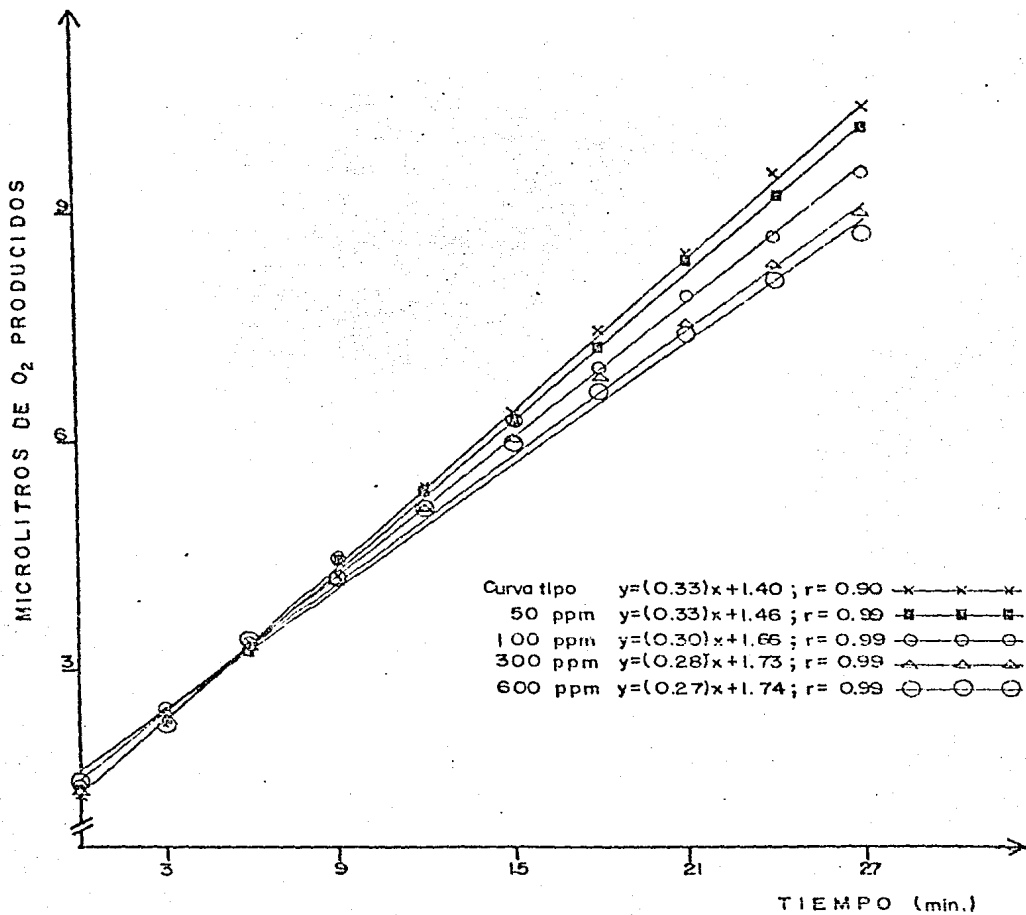


FIGURA 19. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, en la inhibición fotosintética de la mezcla de especies.

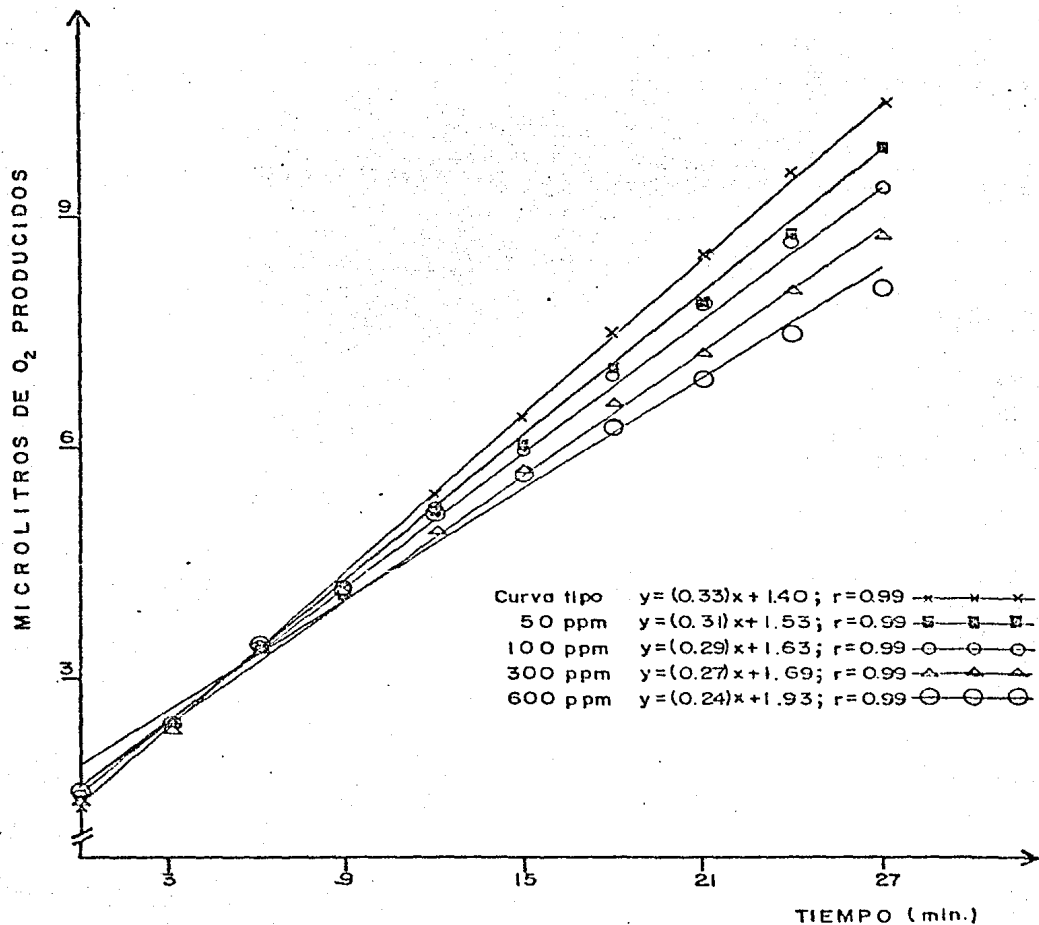


FIGURA 20. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 100 ppm con microbioicida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de la mezcla de especies.

Tabla XX. Inhibición fotosintética de la mezcla de especies a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, dosificado con 300 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.40	2.40	2.55	2.55	2.55
6	3.45	3.45	3.60	3.45	3.45
9	4.35	4.35	4.50	4.35	4.35
12	5.40	5.10	5.10	4.95	4.80
15	6.45	6.00	5.85	5.55	5.40
18	7.50	6.90	6.60	6.15	6.00
21	8.55	7.80	7.35	6.75	6.60
24	9.60	8.55	8.25	7.35	7.20
27	10.50	9.30	9.00	8.10	7.80

Tabla XXI. Inhibición fotosintética de la mezcla de especies a diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD, con 600 ppm de microbiocida IMP-BIO 4.

TIEMPO (min.)	CURVA TIPO	MICROLITROS DE O ₂ PRODUCIDOS			
		50 ppm	100 ppm	300 ppm	600 ppm
0	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
3	2.40	2.40	2.40	2.55	2.40
6	3.45	3.45	3.45	3.45	3.45
9	4.35	4.35	4.35	4.35	4.35
12	5.40	5.10	5.10	4.95	4.80
15	6.45	5.85	5.70	5.40	5.25
18	7.50	6.60	6.30	6.00	5.70
21	8.55	7.35	6.90	6.45	6.15
24	9.60	8.10	7.50	6.90	6.60
27	10.50	9.00	8.10	7.35	7.05

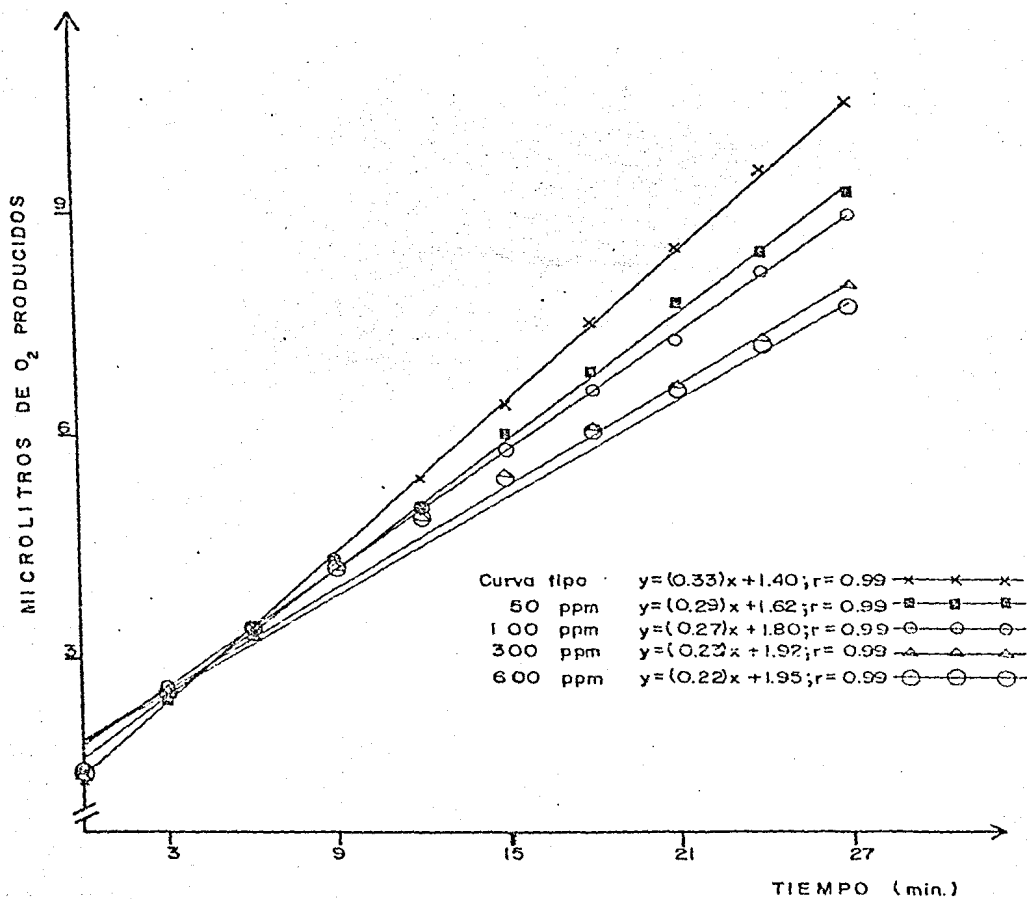


FIGURA 21. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 300 ppm con microbicida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintético de la mezcla de especies.

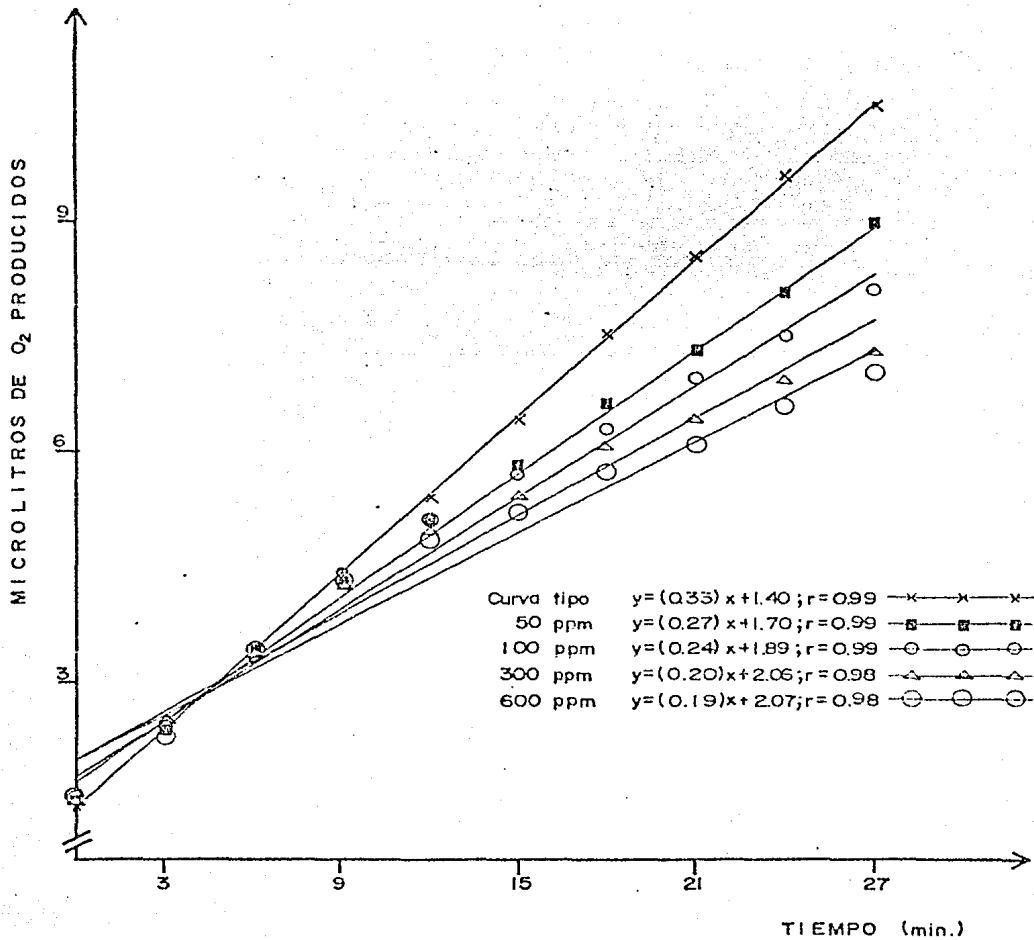


FIGURA 22. Efecto de diferentes concentraciones de fluido de control IMP-BD dosificado a 600 ppm con microbiocida IMP-BIO 4, en la inhibición fotosintética de la mezcla de especies.

Tabla XXII. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 50 ppm de contaminantes a los 15 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Especies estudiadas	34.11	3.0	11.37
Tratamientos	1.43	4.0	0.36
Residual	0.64	12.0	0.05
T o t a l	36.18		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 214.30 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 6.75 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

Tabla XXIII. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 50 ppm de contaminantes a los 21 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Especies estudiadas	67.58	3.0	22.53
Tratamientos	5.12	4.0	1.28
Residual	1.70	12.0	0.14
T o t a l	74.40		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 159.14 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 9.05 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

Tabla XXIV. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 50 ppm de contaminantes a los 27 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Especies estudiadas	131.87	3.0	43.96
Tratamientos	10.82	4.0	2.70
Residual	3.36	12.0	0.28
T o t a l	146.05		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 156.82 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 9.65 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

Tabla XXV. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 600 ppm de contaminantes a los 15 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios
Especies estudiadas	30.32	3.0	10.11
Tratamientos	0.67	4.0	0.17
Residual	0.66	12.0	0.06
T o t a l	31.65		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 183.31 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 3.04 $P > 0.05$ Ho = Ha

Tabla XXVI. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 600 ppm de contaminantes a los 21 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Especies estudiadas	56.20	3.0	18.73
Tratamientos	4.96	4.0	1.24
Residual	0.84	12.0	0.07
T o t a l	62.0		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 266.43 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 17.64 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

Tabla XXVII. Resumen ANVA (Dixon y Massey, 1957) de la inhibición fotosintética de las especies fitoplanctónicas sometidas a los tratamientos de 600 ppm de contaminantes a los 27 minutos.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios
Especies estudiadas	98.83	3.0	32.94
Tratamientos	18.36	4.0	4.59
Residual	2.95	12.0	0.25
T o t a l	120.14		

F 0.05 (1), 3, 12 = 3.49 ; F calculada = 133.92 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

F 0.05 (1), 4, 12 = 3.26 ; F calculada = 18.66 $P < 0.05$ Ho \neq Ha

Tabla XXVIII. Determinación de la recuperación del cultivo, después de una hora de tratamiento con microbiocida IMP-BIO 4, fluido de control IMP-BD y la mezcla de ambos, al cabo de 15 días de incubación.

Tratamientos	Dosificación (ppm)	<u>Chlorella vulgaris</u>	<u>Chlorella fusca</u>	<u>Scendesmus acutus</u>	Mezcla de especies
Microbiocida IMP-BIO 4	50	+	+	+	+
	100	-	+	+	-
	300	-	-	-	-
	600	-	-	-	-
Fluido de control IMP-BD	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	300	+	+	+	+
	600	+	+	+	+
Fluido IMP-BD a 100 ppm con IMP-BIO 4	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	300	+	+	+	+
	600	+	+	+	+
Fluido IMP-BD a 300 ppm con IMP-BIO 4	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	300	+	+	+	+
	600	+	+	+	+
Fluido IMP-BD a 600 ppm con IMP-BIO 4	50	+	+	+	+
	100	+	+	+	+
	300	+	+	+	+
	600	+	+	+	+

(+) Crecimiento del cultivo.
(recuperación del organismo)

(-) Inhibición del crecimiento.
(muerte del organismo)