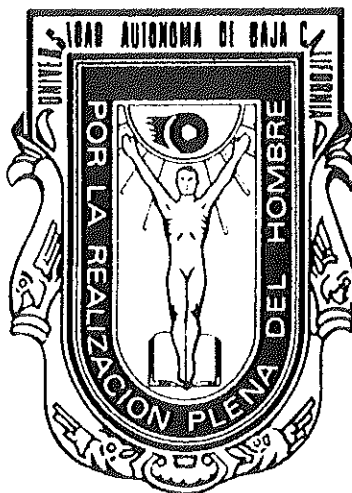

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“RESPUESTA BACTERIANA EN AGUAS COSTERAS POR
LA UTILIZACIÓN DE BIOESTIMULANTES, EMPLEADOS EN
EL TRATAMIENTO DE AGUAS DE DESECHO”**



**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
O C E A N Ó L O G O**

PRESENTA:

JORGE RENÉ VALDIVIA CRUZ

Ensenada, Baja California, Octubre de 1997.

**RESPUESTA BACTERIANA EN AGUAS COSTERAS POR LA UTILIZACIÓN
DE BIOESTIMULANTES, EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS DE
DESECHO**

TESIS

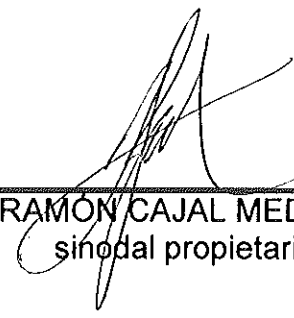
QUE PRESENTA:

JORGE RENÉ VALDIVIA CRUZ

APROBADA POR:



M.C. SERGIO RAÚL CANINO HERRERA
Presidente el jurado



M.C. RAMÓN CAJAL MEDRANO
sinodal propietario



M.C. VICTORIA ORÓZCO BORBÓN
sinodal propietario

DEDICATORIA

A mis padres que por su gran apoyo y sacrificio pude concluir mis estudios.
Gracias por darme más de lo que merecía.

A mi esposa, por su gran paciencia y comprensión, y por darle el amor y cariño que
nuestro hijo necesitó y que yo, no pude darle en su momento.

A mi hijo Jorge Alberto, por soportar todos estos años la ausencia de un padre
que no compartió los primeros grandes momentos de su existencia.

*Cuando una persona crece es porque mira hacia arriba, pero cuando
una persona se queda es porque su conformismo lo venció*
René 1997

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis M.C. Sergio Raúl Canino Herrera, por su brindarme su confianza y ser más que un director de tesis; sino un amigo, al igual que su familia.

A mis sinodales, Victoria Orózco Borbón y Ramón Caja Medrano, por sus acertadas aportaciones y comentarios para mejorar este trabajo, así como por su paciencia y consejos en su momento.

A todos mis hermanos y sus familias: Carlos, Rogelio, Nelba, Leticia, Pepe, Rosaura, Juan, Araceli Valdivia Cruz, que creyeron en mí y me brindaron todo el apoyo que necesite y por las molestias que ocasione, mil gracias. German Melo por su gran ayuda, y a toda mi familia en general por apoyarme y nunca darme la espalda cuando los necesite, a la familia Valdivia Quintanilla, por soportarme durante toda la carrera como un hijo, gracias a todos. Es imposible mencionarlos a todos pero no por eso merecen menos reconocimiento, gracias.

A los profesores, M.C. Irma Soria, M.C. Manuel Moreno, M.C. Felipe Correa, por brindarme su amistan y apoyó.

A los Snorquel's por su compañía durante la carrera y convivir gratos momentos: Oscar, Liza, Jocelyn, Luis, Gilberto "Gilillo", Plata, Cuahutemoc "Temo", Gerardo, Katia, Hector "Trenecito", Daniel, Cecilia "Apoda", Gerardo "Batis", José María "Chema", Juan Carlos, Erika, Diego "Panzón", Diego "El gringo", Raquel, Luis Guzman "Vaquero".

A los colegas del almacén; Milagros, Nacho, Arturo, Epi, Gracias por las facilidades y apoyo durante la realización de la tesis.

A vanessa por pasar horas ayudándome durante el experimento, así como a su familia, A Yadira y Laura Dorantes y Gilillo por su ayuda en la recta final, gracias.

A francisco Delgadilo, A Albino y al Tex por sus acertados comentarios y ayuda muchas gracias.

Al Miguel Ángel "Vaquero", Ángel Salas "La güera", Ana Ramírez Por compartir gratos momentos, y el apoyo durante la tesis.

A Fabiola, Nataly, Alda y a todos aquellos que no mencione pero no menos importantes, por su amistad durante la carrera.

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos con la finalidad de probar el efecto de bioestimulante sobre las bacterias marinas y coliformes, en un medio marino contaminado con aguas residuales y sin contaminar. En ambos se midieron DBO_5 , NO_3 , NO_2 , NH_4 , PO_4 , Nitrógeno orgánico disuelto (NOD) y Fósforo orgánico disuelto (POD), así como bacterias marinas, coliformes totales y fecales, y la abundancia bacteriana, con el objeto de observar los cambios de los compuestos orgánicos e inorgánicos debido a la tasa de asimilación y crecimiento bacteriano producido por el bioestimulante. Se realizaron muestreos diarios para las variables orgánicas e inorgánicas. Los análisis bacteriológicos se muestrearon cada tercer día. En el primer experimento se probaron diferentes concentraciones de bioestimulante en agua de mar para observar su eficiencia de biodegradación y como acelerador de la actividad bacteriana. El segundo experimento proporcionó información acerca de la reproducibilidad de los resultados obtenidos y en el tipo de material orgánico que se degrada, con la mínima concentración de bioestimulante. Los resultados mostraron que la utilización de estos productos para el tratamiento de las aguas residuales que posteriormente son vertidas al mar, incrementan la población bacteriana marina, así como aceleran la degradación de materia orgánica biodegradable y aumentan la DBO_5 en un lapso de dos días. Así mismo, se encontró que la concentración de 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante presentó la misma eficiencia de degradación que concentraciones mayores de bioestimulante. Por otra parte, se observó que la actividad bacteriana y la asimilación de los compuestos orgánicos (NOD y POD) se ve incrementada por la adición del bioestimulante, sólo en las primeras 48 h. de aplicado el producto. El efecto del bioestimulante es de acelerar la degradación de compuestos orgánicos en poco tiempo y tienden a consumir oxígeno, provocando anoxia. Por lo anterior el uso de bioestimulante no se recomienda en zonas con baja concentración de O_2 ó bajo recambio de agua.

ÍNDICE

	Página
1 Introducción.....	1
2 Hipótesis.....	2
3 Objetivos.....	3
3.1 Objetivos particulares.....	3
4 Metodología.....	4
5 Resultados.....	7
6 Discusiones.....	36
7.0 - Conclusiones.....	39
8.0 - Bibliografía.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS.

figura		Página
1	Cambios de la DBO_5 con el tiempo para estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante.....	8
2	Cambios en la concentración de amonio (NH_4) con el tiempo para estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante.....	10
3	Cambios en la concentración de nitratos (NO_3) con diferentes concentraciones de bioestimulante.....	11
4	Cambios en la concentración de los nitritos (NO_2) con el tiempo para estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante.....	13
5	Cambios en la concentración de fosfatos (PO_4) con el tiempo para estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante.	15
6	Comportamiento del crecimiento bacteriano heterótrofo marino con el tiempo para estanques diferentes concentraciones de bioestimulante.....	16
7	Matriz de correlaciones, para las variables que presentaron la mejor correlación con el bioestimulante.....	18
8.	Cambio de la DBO_5 con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	20
9	Cambio en la concentración de amonio (NH_4) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	21
10	Cambio en la concentración de nitratos (NO_3) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	23
11	Cambio en la concentración de nitritos (NO_2) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	24
12	Cambio en la concentración de fosfatos (PO_4) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	26
13	Cambio en la concentración de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	27
14	Cambio en la concentración de fósforo orgánico disuelto ^{POD} con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	29
15	Cambio en el número de coliformes totales (CT) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	30
16	Cambio en el número de células de coliformes fecales (CF) con el tiempo para estanques con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, con y sin agua residual.....	32

17	Crecimiento bacteriano heterotrófico marino con el tiempo para estanques con 0.02 ml L ⁻¹ de bioestimulante, con y sin agua residual.....	33
18	Estimación del crecimiento bacteriano por conteo directo para estanques con 0.02 ml L ⁻¹ de bioestimulante, con y sin agua residual.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Concentración de bioestimulante y agua residual utilizada en la primera parte del experimento.....	6
II	Concentración de bioestimulante y agua residual utilizados en la segunda parte del experimento.....	6

1 INTRODUCCIÓN

Cuando se presenta una contaminación en aguas costeras por aguas residuales sin tener una previa depuración, se alteran todos los procesos naturales, traduciendo en un deterioro ambiental. Las inversiones para su rehabilitación son de muy alto costo y con perspectivas de lenta solución. (López-Portillo, 1982). Tal es el caso de lugares destinados al turismo, que por su mal planeamiento requieren de métodos eficientes para disminuir su impacto, a un bajo costo. Es por esto, que la contaminación marina ha tenido una gran importancia en cuanto a identificar, analizar y evaluar las consecuencias sobre la salud y bienestar del hombre, así como del medio ambiente marino y terrestre (López, 1982). En Estados Unidos de Norteamérica, actualmente se buscan alternativas que aumenten la eficiencia en el tratamiento de las aguas negras, y así mismo disminuir los costos.

Se busca una atención en la fito y bio-remediación, la cual esta basada en la utilización de plantas y organismos que asimilen una gran cantidad de nutrientes evitando la nitrificación, y de esta manera regenerar zonas contaminadas (Schnoor, *et al*, 1995). Así mismo, los extractos naturales de plantas, aceleran la actividad bacteriana en la degradación de la materia orgánica. Por esto, empresas privadas como Bac-terra (1994) y Biotreat (1995), se dan a la tarea de probar y emplear productos químicos que cubran estas demandas, apegándose a los límites máximos permisibles marcados por la ley. Estos productos son llamados bioestimulantes, los cuales pueden estar constituidos por enzimas, nutrientes, así como compuestos esteroideos y glicósidos de origen vegetal, que promueven la multiplicación de las bacterias tanto aeróbicas como anaeróbicas, creándoles mejores condiciones ambientales para su desarrollo, acelerando las reacciones de las mismas, y aumentando en consecuencia la degradación de la materia orgánica, en sistemas de tratamiento de aguas negras (Biotreat, 1995). Estas sustancias no han mostrado efectos negativos durante el tratamiento de aguas residuales. Así mismo se ha observado su corta duración en el medio en el que ha sido agregado, debido a que es biodegradable a los siete días (Williams, 1994).

Se asegura que estas sustancias disminuirán el grado de contaminación en las aguas tratadas y en consecuencia disminuir el impacto sobre el medio al que son vertidas, ya sean destinadas para riego ó vertidas directamente en el mar (Bac-terra, 1994). Existen algunos productos que satisfacen al medio ambiente, ya que no son tóxicos para el hombre ni para los animales (Williams, 1994). Por esta razón, estos productos pueden ser destinados para diversas actividades.

La importancia de estos productos en México, se refleja en el incremento de su uso para mejorar su procedimiento en el tratamiento biológico y químico de los sistemas de depuración de las industrias, ya que las zonas urbanas exigen una mejor calidad en el tratamiento de las aguas residuales municipales e industriales (López-Portillo, 1982).

A pesar de que se han obtenido buenos resultados en plantas de tratamiento, no se han reportado estudios que prueben su efecto dentro del medio marino, por tal motivo es de gran importancia realizar este tipo de experimentos para conocer el posible efecto que pudiesen ocasionar al ser utilizados en el tratamiento de aguas negras, que posteriormente son vertidas a las zonas costeras.

El conocer el impacto ocasionado en el mar al utilizar un bioestimulante, en la depuración de aguas negras, es de vital importancia para el país, dado que puede ser una alternativa para solucionar o disminuir la contaminación de aguas marinas. Así, como para validar su uso debido a la creciente demanda que comienza a tener.

2 HIPÓTESIS

La utilización bacteriana del bioestimulante, produce un aumento en la tasa de asimilación y crecimiento, por lo tanto se espera en el medio marino: Una mayor eficiencia de degradación de nitrógeno y fósforo orgánico disuelto (NOD y POD) y una disminución en el contenido de materia orgánica biodegradable, con el tiempo de incubación. Esta materia orgánica es determinada mediante los valores de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅). Así mismo, se espera que exista una menor concentración de materia orgánica en los estanques con bioestimulante, que en aquellos en las que sólo actúa el sistema autodepurador del medio marino.

3 OBJETIVO GENERAL

Conocer la eficiencia y los efectos del bioestimulante para la restauración de zonas costeras contaminadas.

3.1 Objetivos particulares

Conocer la eficiencia de bioestimulantes, en el tratamiento de zonas costeras contaminadas, mediante la respuesta bacteriana, y la velocidad de degradación de materia orgánica.

Identificar el efecto sobre la actividad bacteriana ocasionado por la utilización de bioestimulantes en agua de mar.

4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La fase experimental consistió de dos partes: La primera, con duración de siete días, sirvió para determinar el efecto del bioestimulante en la degradación de nitrógeno y fósforo orgánico disuelto (NOD,POD) y de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) en agua de mar, a diferentes concentraciones de bioestimulante. El segundo experimento, con duración de diez días, consistió en evaluar la reproducibilidad de la mínima concentración de bioestimulante, que provocó la degradación de los compuestos orgánicos disueltos en el agua de mar.

Experimento I

Se usaron siete estanques, con 20 l de agua de mar, colectada frente al hotel Punta Morro. Este lugar se escogió por presentar la menor concentración de bacterias en la zona norte de la bahía (Delgadillo-Hinojosa y Orozco-Borbón, 1987; Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa, 1989 y Canino-Herrera, 1993). A cada estanque se le adicionaron diferentes volúmenes de bioestimulante y agua residual tomada de la planta de tratamiento de la U.A.B.C. unidad Ensenada, con la finalidad de simular agua de mar contaminada por aguas negras (Tabla I).

Al estanque denominado A1 (testigo) no se le agregó bioestimulante ni agua residual, para observar el comportamiento autodepurador del medio marino sin perturbación de agentes ajenos.

Los estanques A2 y A3, sirvieron para observar el efecto del bioestimulante y del agua residual sobre el medio marino respectivamente. Los recipientes restantes presentan un gradiente de concentración del bioestimulante y con un volumen constante de agua residual. El volumen de agua residual adicionada, se seleccionó tomando como base la dilución de aguas negras que se vierten en la Bahía de Todos Santos (Canino-Herrera, 1993).

Las concentraciones de bioestimulante utilizadas fueron semejantes a las recomendadas por el fabricante (Williams, 1994).

Todos los estanques se mantuvieron a temperatura ambiente, y cada 12h se sometieron a aeración, por 45 min. Al término del periodo de aereación se colectaron muestras de agua por triplicado. La toma de muestras se hizo de forma diaria, para el análisis de: demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), por el método directo descrito por Lee (1987); NOD y POD, por el método de la oxidación con persulfato, descrito por Grasshoff (1983); nutrientes (nitratos (NO₃), nitritos (NO₂), fosfatos (PO₄), amonio (NH₄)) mediante las técnicas espectrofotométricas descritas por Parsons *et al.* (1984).

En todas las mediciones se empleó un espectrofotómetro digital marca Milton Roy, modelo 301.

También, se probó el efecto del bioestimulante sobre las bacterias, mediante el análisis de bacterias coliformes por el método del número más probable (NMP) con serie de cinco tubos

(APHA,1985) y las bacterias heterotróficas marinas mediante la técnica de cuenta en placa utilizando medio Zobell (Orozco -Borbón *et al*; 1993). Para estas variables se tomaron muestras cada tercer día.

Experimento II

En esta parte se contó con cuatro tipos de estanques, por duplicado. También se usó agua de mar, agua residual y bioestimulante (tabla II).

Los estanques usados en el segundo experimento se identificaron como B1, B2, B3 y B4.

El estanque B1 sirvió como control (muestra de agua mar sin bioestimulante y sin agua residual), al estanque B2 sólo se le adicionó bioestimulante, para conocer su efecto en el agua de mar, sin influencia del agua residual. El estanque B3 contenía agua residual sin efecto de bioestimulante, con el fin de simular una zona impactada y al estanque B4 se le agregó agua residual y bioestimulante para simular el efecto causado por el bioestimulante en aguas marinas contaminadas. La aereación, toma de muestras y el análisis, se realizó de la misma manera que en el primer experimento. Adicionalmente, se realizó un conteo directo de bacterias marinas por epifluorescencia con DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol) mediante la técnica descrita por Porter y Feig (1980), con el fin de conocer la población de bacterias.

Análisis estadístico

Se aplicó una prueba de Bartlett para conocer la homogeneidad de las varianzas.

Los datos obtenidos se trataron mediante un Análisis de varianza (ANOVA) para muestras independientes, para comprobar las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos (con y sin bioestimulante). Para esta prueba se utilizó el programa STATISTICA versión 4.2 para Windows.

Tabla I Concentración de bioestimulante (ml L^{-1}) y agua residual (ml L^{-1}) utilizada en los estanques del experimento I.

Estanque (#)	Agua de mar (l)	Bioestimulante [ml L^{-1}]	Agua residual [ml L^{-1}]
A1	20	0.00	0.0
A2	20	0.02	0.0
A3	20	0.00	1.0
A4	20	0.02	1.0
A5	20	0.04	1.0
A6	20	0.08	1.0
A7	20	0.10	1.0

Tabla II Concentración de bioestimulante (ml L^{-1}) y agua residual (ml L^{-1}), utilizada en los estanques del segundo experimento.

Recipiente (#)	Agua de mar (l)	Bioestimulante [ml L^{-1}]	Agua residual [ml L^{-1}]
B1	20	0.00	0.0
B2	20	0.02	0.0
B3	20	0.00	1.0
B4	20	0.02	1.0

5 RESULTADOS

Experimento I DBO₅

En la figura 1a se muestra el comportamiento de la DBO₅ con respecto al tiempo. Para el estanque A1 (control) y A2 (con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante, y sin agua residual). El estanque A1 presenta un incremento en el valor de DBO₅ hasta el segundo día y posteriormente el valor decrece, manteniéndose sin cambios importantes hasta el final del experimento. El incremento de la DBO₅ al segundo día se debe posiblemente a la degradación del material orgánico. Por otra parte el estanque A2 presentó una mayor degradación de material orgánico al inicio del experimento, con respecto al estanque A1, posteriormente presentó un decremento de la DBO₅, con valores de DBO₅ menores a los del estanque A1 hasta el cuarto día. Al quinto y sexto día, el comportamiento en ambos estanques es el mismo. Los máximos valores de DBO₅ que presentaron los estanques fueron de 1.35 mg O₂ L⁻¹ para el estanque A1 al segundo día y de 5.88 mg O₂ L⁻¹ para el estanque A2, al inicio del experimento. Los estanques presentaron diferencias significativas al inicio del experimento, al primer, segundo y cuarto día ($p < 0.001$).

En la figura 1b se observa la variación de la DBO₅ con el tiempo, para los estanques con diferente concentración de bioestimulante, en agua de mar contaminada con agua residual. Los valores de DBO₅ no mostraron cambios significativos, entre los estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante, a lo largo del experimento. En el estanque A6, se presentó el máximo valor de DBO₅ 6.9 mg O₂ L⁻¹, al inicio del experimento (con 0.8 ml L⁻¹ de bioestimulante). Este valor, posiblemente se deba a un error en su análisis. No se encontraron diferencias significativas entre los estanques que contenían diferente concentración bioestimulante. El C.V. de cada estanque, fue menor a 10.3 % para las réplicas.

AMONIO

En la figura 2a se observa la variación en la concentración de amonio (NH₄) con respecto al tiempo, para los estanques sin agua residual (A1) y con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante (A2). Las concentraciones de NH₄ para ambos estanques presentan un comportamiento muy similar, a lo largo del experimento, sin presentar diferencias significativas entre ambos estanques. Se observa un decremento de la concentración de NH₄ en los estanques durante los primeros días del experimento. Las mayores concentraciones de amonio se observan en el estanque A2 (7.5 µg-at N-NH₄ L⁻¹), posteriormente la concentración de amonio no varía significativamente a través del tiempo (3.5 a 5 µg-at N-NH₄ L⁻¹). El decremento de la concentración de NH₄ al inicio del experimento, puede ser debida a que el NH₄ es utilizado como nutriente por los organismos del medio.

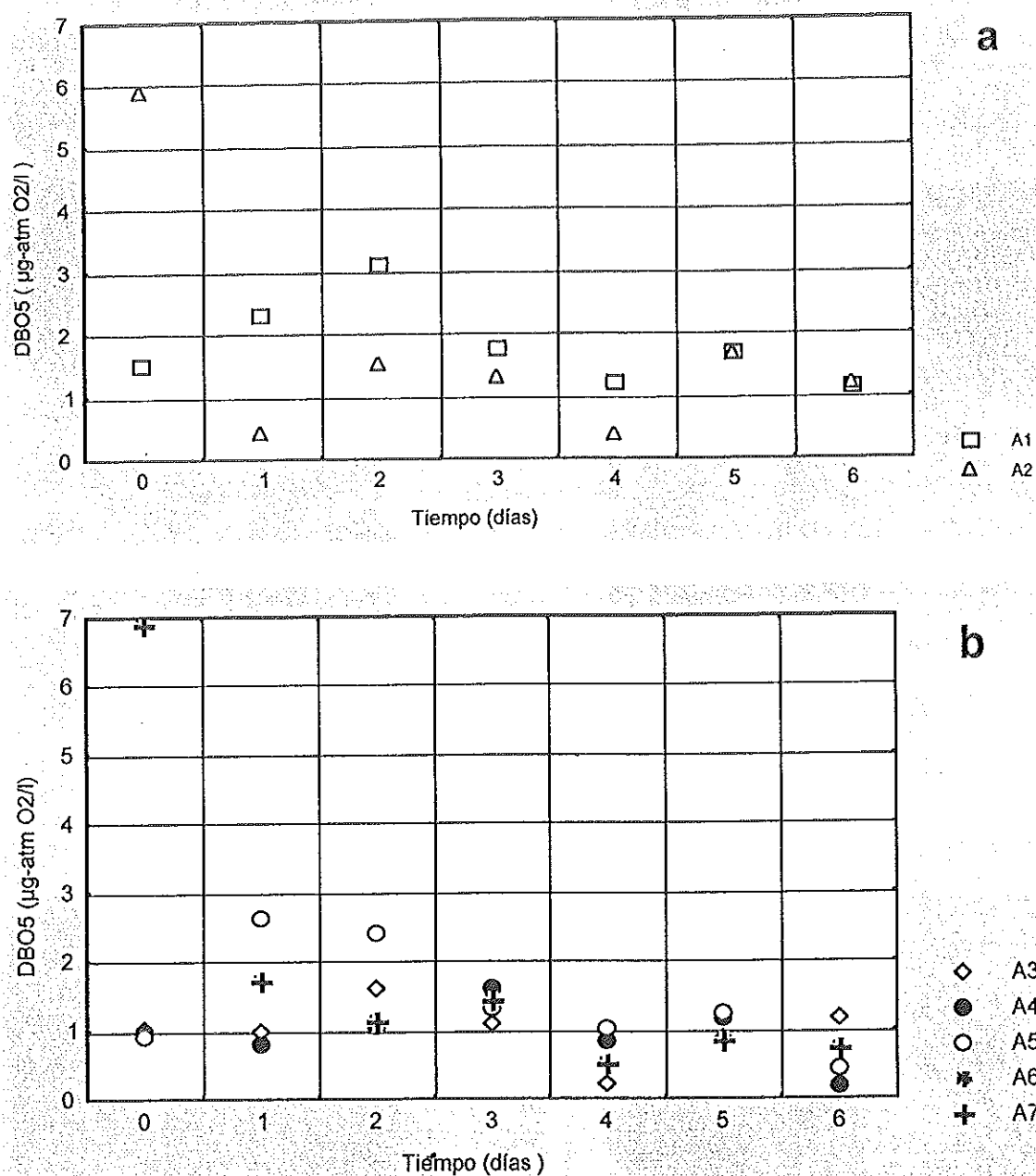


Figura 1. Cambios de la DBO₅ con el tiempo para a) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante) y b) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L⁻¹, A5 con 0.04 ml L⁻¹, A6 con 0.08 ml L⁻¹ y A7 con 1.6 ml L⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

La variación de la concentración del NH_4 con el tiempo para los estanques con diferente concentración de bioestimulante, se observa en la figura 2b. La variación de la concentración de NH_4 en los estanques con agua residual y sin bioestimulante, fue muy similar a la variación observada en la figura 2a. Las mínimas concentraciones de NH_4 se observan al segundo día para todas las concentraciones de bioestimulante. Al inicio del experimento se encontraron las mayores concentraciones de amonio: $11.4 \pm 0.02 \mu\text{g-at N L}^{-1}$ en el estanque con 0.01 ml L^{-1} de bioestimulante, $9.76 \mu\text{g-at N L}^{-1}$ en el estanque con 0.04 ml L^{-1} de bioestimulante y $8.6 \mu\text{g-at N L}^{-1}$ en el estanque con 0.08 ml L^{-1} de bioestimulante.

Se encontraron diferencias significativas al inicio del experimento, en los estanques A3 y A4 (0 y 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, respectivamente) y al primer día, en el estanque A5 (0.04 ml L^{-1} de bioestimulante) con el respecto al resto de los estanques ($p < 0.001$). La concentración de amonio tiende a disminuir con el tiempo a todas las concentraciones de bioestimulante, manteniéndose constante a partir del segundo día. Esta tendencia, puede deberse a la utilización del amonio como nutriente por las bacterias, en la asimilación de materia orgánica. El C.V de las réplicas de cada estanque fue menor a 6.31% .

NITRATOS

En la figura 3a se observa la variación de la concentración de los nitratos (NO_3) con respecto al tiempo, para los estanques A1(control) y A2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). La concentración de NO_3 en el estanque A1 presenta un ligero incremento al primer día (de 4.5 a $5.08 \mu\text{g-at N L}^{-1}$), posteriormente decrece con el tiempo, hasta el final del experimento ($0 \mu\text{g-at N L}^{-1}$). El estanque A2 presenta un incremento en la concentración de los NO_3 , al segundo día (de 4.1 a $5.1 \mu\text{g-at N L}^{-1}$), posteriormente se observa un decremento hasta el cuarto día, y se mantiene durante el resto del experimento sin variaciones importantes ($0-0.5 \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Los incrementos observados en ambos estanques se deben, posiblemente, a la degradación de los compuestos orgánicos por las bacterias. Ambos estanques presentaron diferencias significativas, a lo largo del experimento ($p < 0.001$), excepto al inicio y quinto día del experimento. Es importante mencionar, que existe un desfase entre ambos estanques en el comportamiento de la concentración de nitratos en el segundo y tercer día del experimento, posiblemente debido a que la velocidad de asimilación de nitratos es mayor en el estanque A1 (control).

La figura 3b muestra la variación en la concentración de los nitratos con respecto al tiempo, para los estanques contaminados con agua residual y con diferentes concentraciones de bioestimulante (del estanque A3 al A7). El estanque A3 (sin bioestimulante) presenta un decremento a partir del segundo día, mientras que el resto de los estanques lo presentan desde el inicio del experimento. Los estanques con agua residual y bioestimulante (fig. 3b), presentaron la mayor concentración de NO_3 (de 5 a $6.9 \mu\text{g-at N L}^{-1}$) al inicio del experimento, con excepción

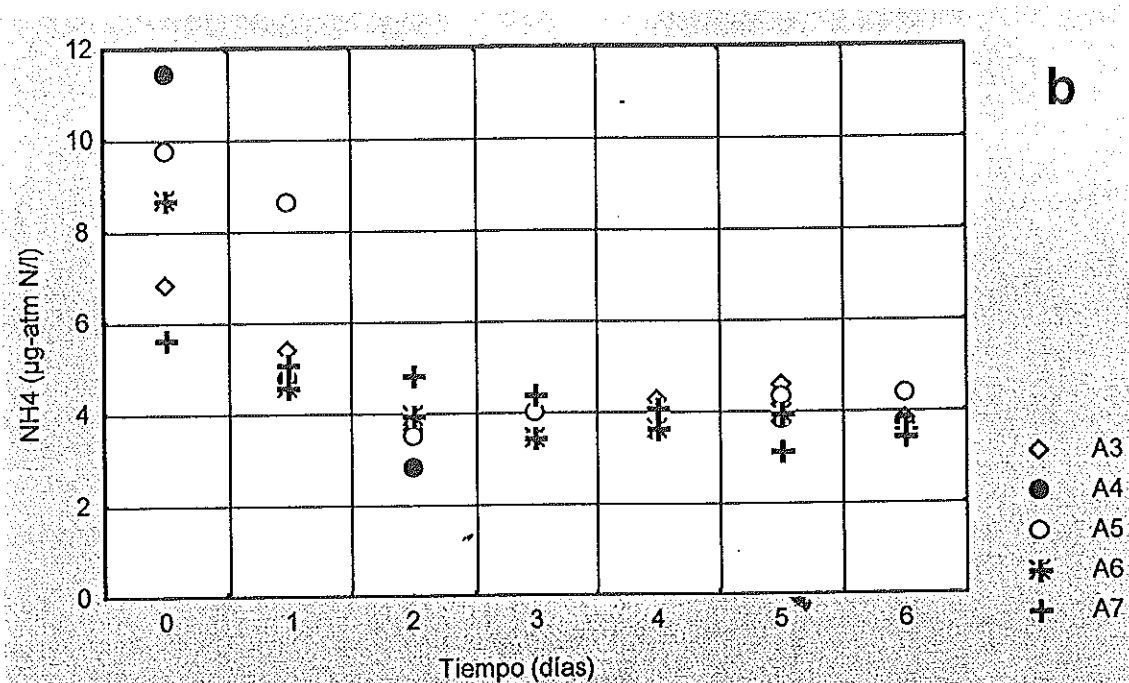
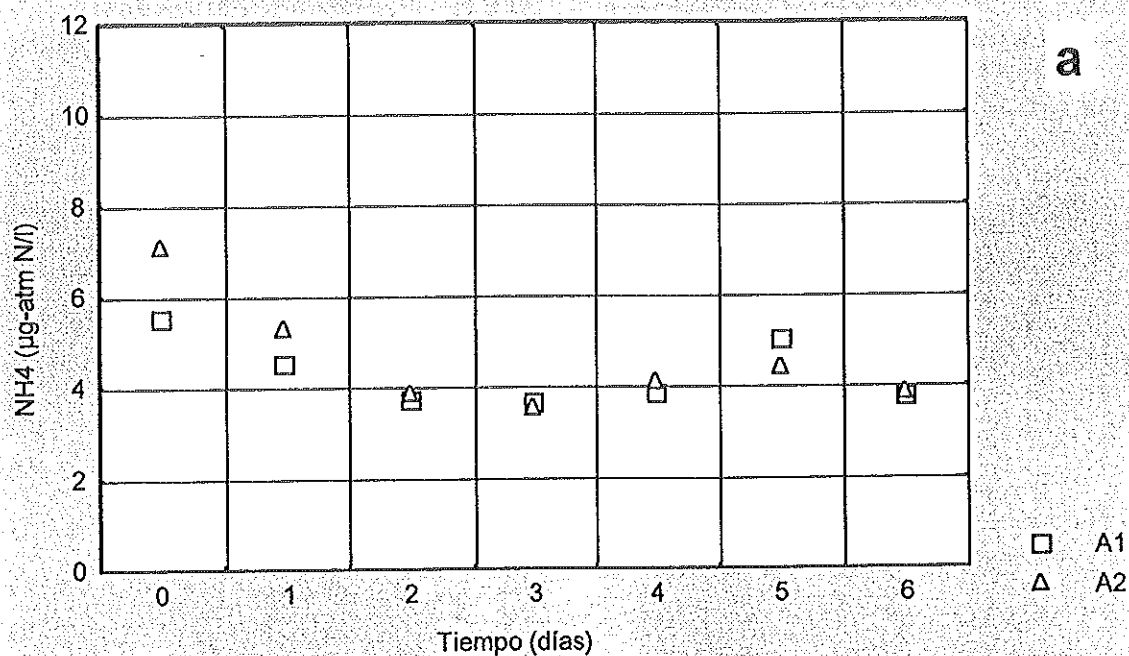


Figura 2. Cambios en la concentración de amonio (NH_4) con el tiempo para a) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) y b) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L^{-1} , A5 con 0.04 ml L^{-1} , A6 con 0.08 ml L^{-1} y A7 con 1.6 ml L^{-1} de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

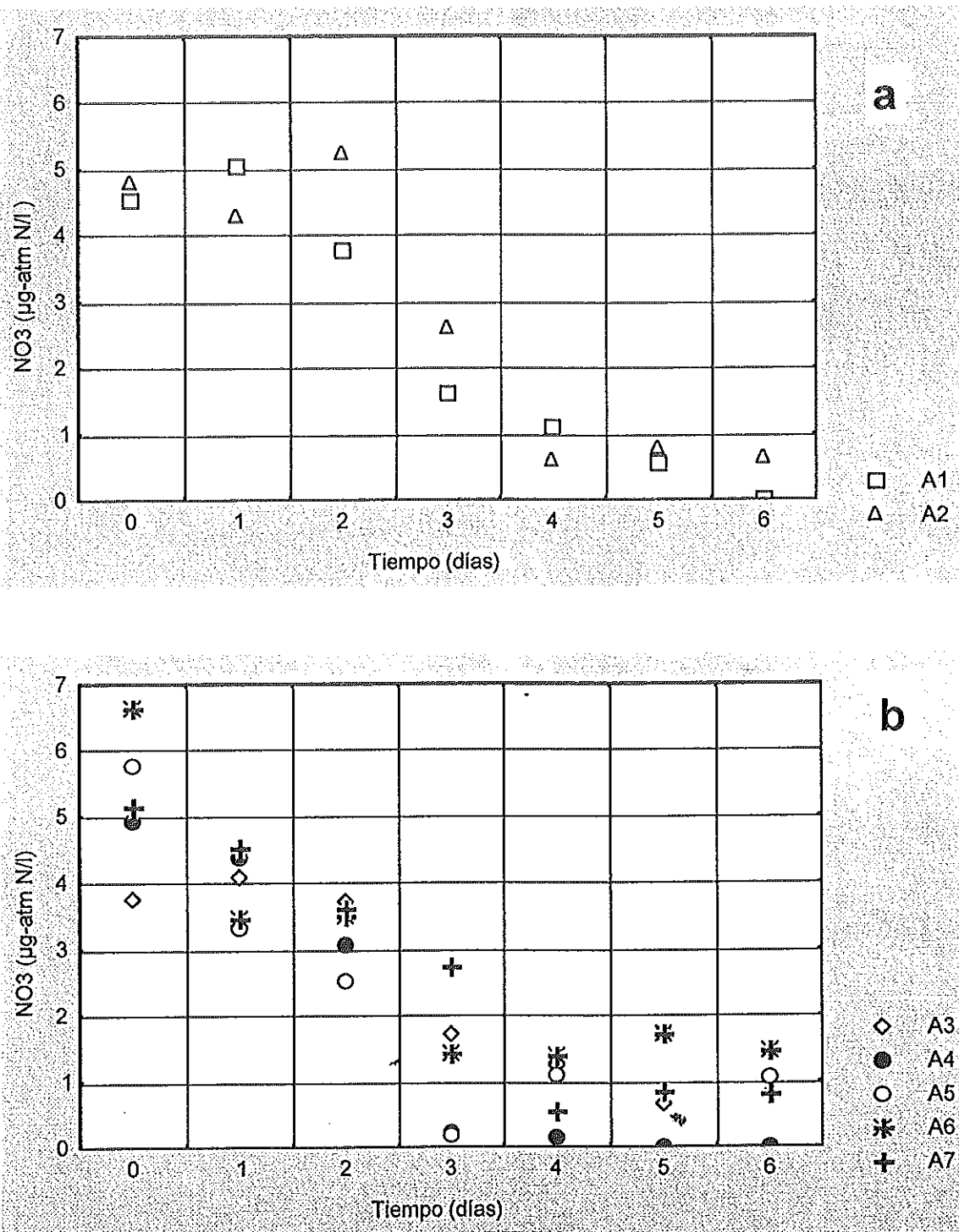


Figura 3. Cambios en la concentración de nitratos (NO_3 con el tiempo para a) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) y b) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L^{-1} , A5 con 0.04 ml L^{-1} , A6 con 0.08 ml L^{-1} y A7 con 1.6 ml L^{-1} de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

del estanque A3. Los estanques con las concentraciones de bioestimulante más altas, presentaron las mayores concentraciones de NO_3 , al inicio del experimento, excepto el estanque A7 (con 0.16 ml L^{-1} de bioestimulante) que presentó una concentración similar al del estanque A4 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). Esto puede indicarnos que el bioestimulante presenta un contenido importante de nitratos en su composición. A partir del tercer día, las menores concentraciones de nitratos se presentaron en el estanque A4.

Las diferencias significativas entre el estanque A3 y los estanques con bioestimulante (A4-A7) fue de $p < 0.001$, solamente durante el primer día. En el segundo día no se encontraron diferencias significativas en ningún estanque. A partir del tercer día, sólo se presentaron diferencias significativas en los estanques A4 y A6 ($p < 0.001$) con respecto a los estanques restantes. El C.V. de las réplicas de cada estanque, para los NO_3 fue menor a 4.37 %.

NITRITOS

En la figura 4a se muestra el cambio de la concentración de nitritos (NO_2) con respecto al tiempo en los estanques A1(control) y A2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). La concentración de NO_2 presentó un comportamiento irregular en ambos estanques a lo largo del tiempo de incubación. Sin embargo, se aprecian valores máximos al cuarto día para el estanque A1 ($1.85 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$) y al inicio del experimento en el estanque A2 ($1.1 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). En el estanque A2 se logra observar un ligero incremento en la concentración de NO_2 hasta el cuarto día. Este comportamiento tal vez sea producto de la formación intermedia de nitritos en el proceso de oxidación del NH_4 . Se presentaron diferencias significativas entre ambos estanques durante todo el experimento ($p < 0.001$), excepto en el tercer y sexto día.

Para los estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante y agua residual (fig. 4b), se observó un ligero incremento en la concentración de NO_2 con respecto al tiempo. Dada la variabilidad en la concentración de nitritos y a que no existieron diferencias significativas entre los distintos estanques, no se consideran de gran importancia para explicar el efecto del bioestimulante. El C.V. de las réplicas de cada estanque para los NO_2 fue, de 1.36%

FOSFATOS

La variación de la concentración de fosfatos (PO_4) con respecto al tiempo para los estanques, A1 (control) y A2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) sin agua residual se observa en la figura 5a. El estanque A1 presentó un incremento en la concentración de PO_4 en el primer día del experimento, manteniéndose constante durante el resto del experimento, excepto al cuarto día que presentó un decremento. El estanque A2 presentó un máximo al primer día que posteriormente disminuye. Se encontraron diferencias significativas entre el estanque A1 y A2 con $p < 0.001$, excepto para el segundo y cuarto día. El incremento en la concentración de PO_4

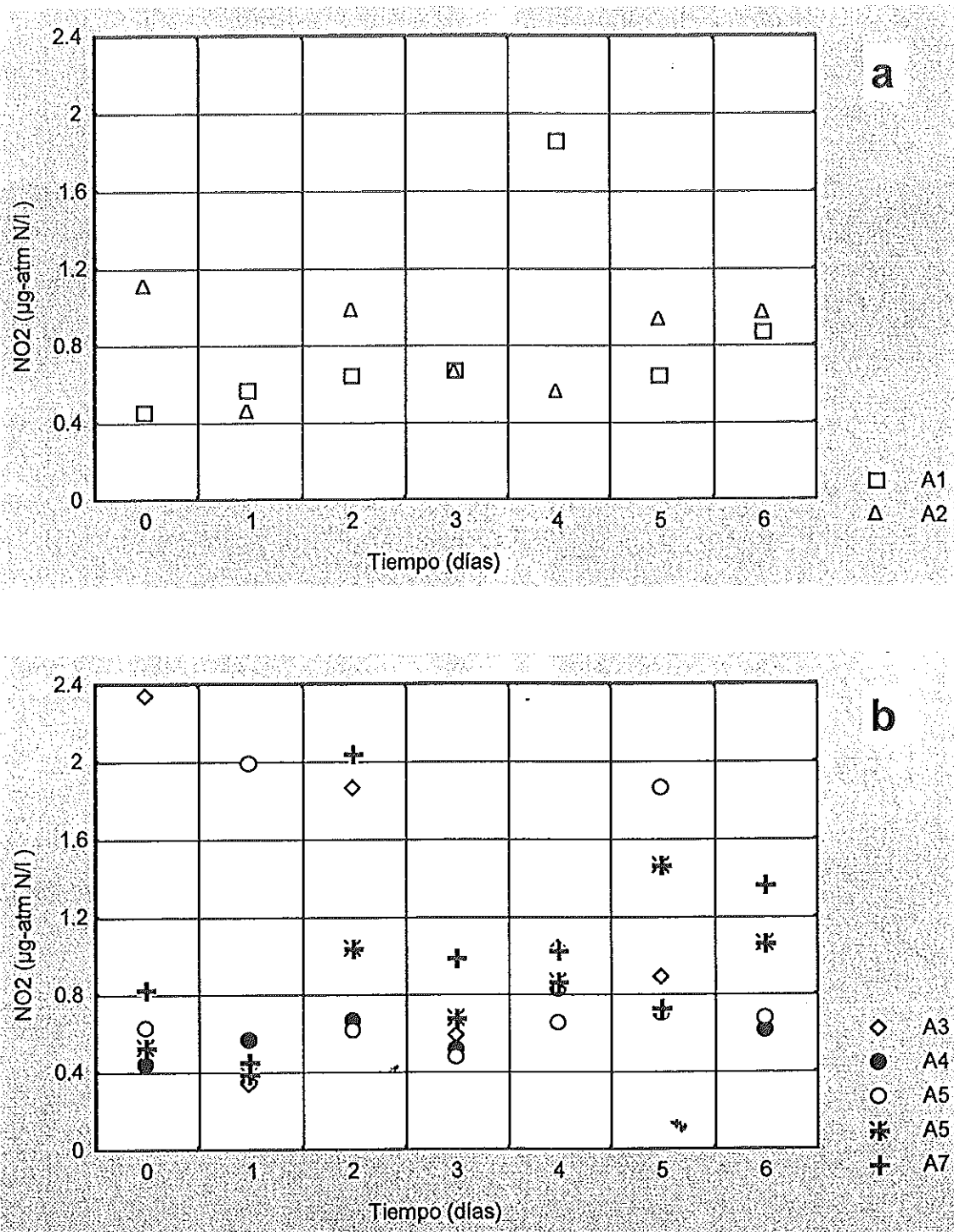


Figura 4. Cambios en la concentración de los nitritos (NO₂ con el tiempo para **a**) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante) y **b**) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L⁻¹, A5 con 0.04 ml L⁻¹, A6 con 0.08 ml L⁻¹ y A7 con 1.6 ml L⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

en el primer día es debido posiblemente a que el material orgánico fosfatado fue degradado, por la actividad bacteriana.

La variación en la concentración de PO_4 con el tiempo en los estanques contaminados con agua residual (A3 a A7) por efecto del biestimulante, se observa en la figura 5b. Las concentraciones de PO_4 no presentaron un patrón bien definido con respecto al tiempo, en todos los estanques. Debido a la gran variabilidad que presentaron los estanques en la concentración de PO_4 , no se pudo observar si existe algún efecto por las diferentes concentraciones de bioestimulante. El C.V de las réplicas para cada estanque, en los PO_4 fue menor a 2.537 %.

BACTERIAS HETEROTRÓFICAS MARINAS

El crecimiento bacteriano en los estanque A1 (control) y A2 (con 0.02 ml L^{-1}), con respecto al tiempo se observa en la figura 6a. El número de unidades formadoras de colonias (UFC ml^{-1}) en el estanque A1 (Control) tiende a incrementarse durante todo el experimento, con los máximos valores al final del experimento. Por otra parte en el estanque A2 (con bioestimulante) este incremento sólo se presentó hasta el segundo día donde se observaron los máximos valores de UFC ml^{-1} ($2.4 \times 10^3 \text{ UFC ml}^{-1}$). Posteriormente el número de colonias presentaron un decremento hasta casi cero unidades, siendo mayor el número de colonias en el estanque control a partir del cuarto día. El bioestimulante posiblemente, aceleró el proceso de crecimiento de las bacterias del estanque A2, en los dos primeros días, ya que el crecimiento bacteriano en el estanque A1 presentó un retraso de dos días en presentar su crecimiento exponencial. Las diferencias entre ambos estanques fueron significativas ($p < 0.001$) durante todo el experimento, excepto para el cuarto día.

La figura 6b muestra el crecimiento de las bacterias marinas, en los estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, con respecto al tiempo. El estanque A3 (sin bioestimulante) presenta un decremento durante todo el experimento en las UFC, hasta casi cero, posiblemente por el efecto adverso del agua residual sobre las bacterias marinas. Los estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante presentan un máximo valor de UFC, al segundo día ($2.8 \times 10^4 \text{ UFC ml}^{-1}$, en el estanque con mayor concentración de bioestimulante, A7). En este día, se observó una relación entre el incremento de UFC y la concentración de bioestimulante agregado, excepto en el estanque A6 con 0.08 ml L^{-1} de bioestimulante. Las diferencias significativas entre los estanques, fue únicamente al segundo día ($p < 0.001$).

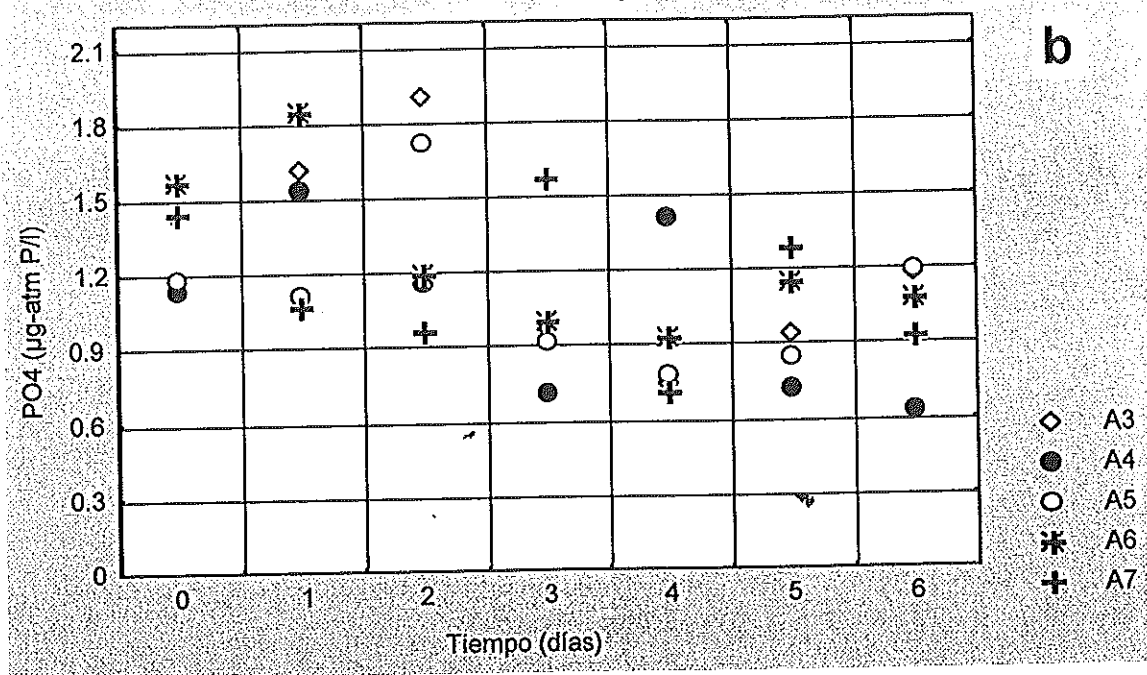
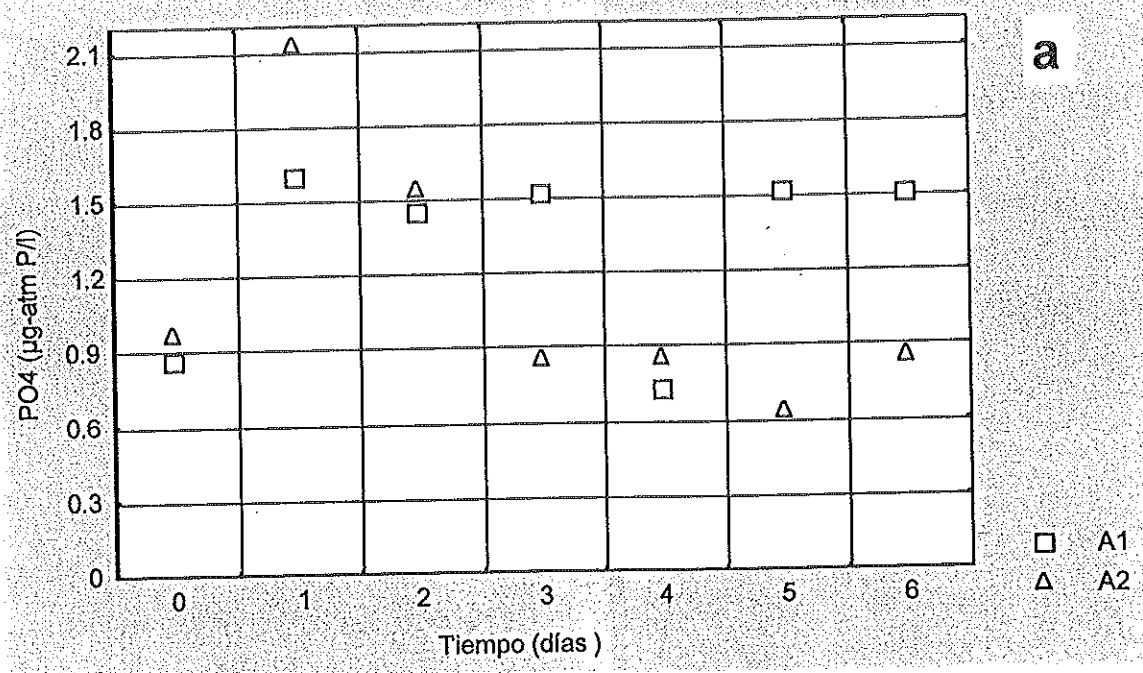


Figura 5. Cambios en la concentración de fosfatos (PO₄) con el tiempo para a) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante) y b) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L⁻¹, A5 con 0.04 ml L⁻¹, A6 con 0.08 ml L⁻¹ y A7 con 1.6 ml L⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

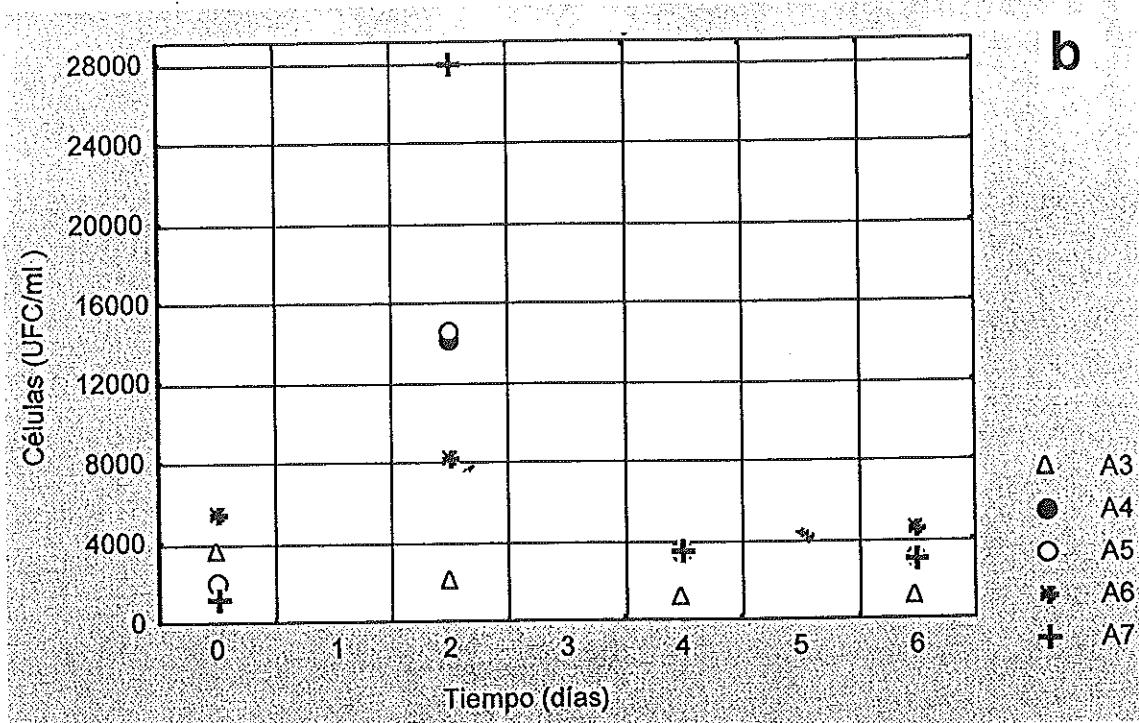
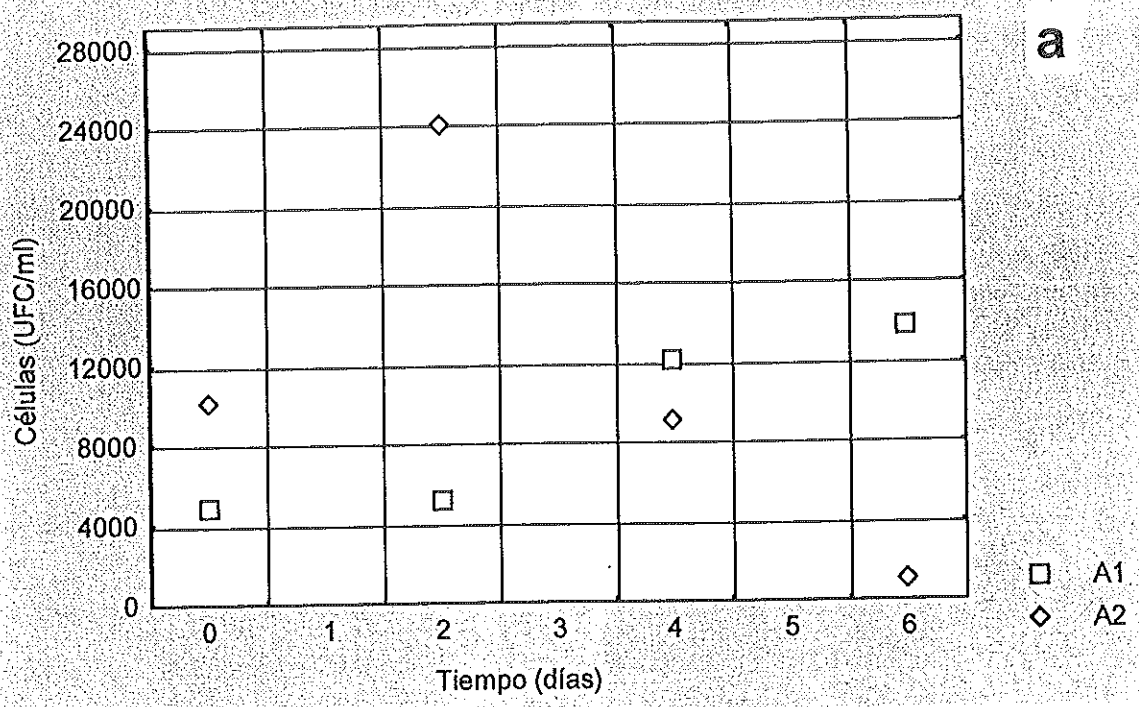


Figura 6. Comportamiento del crecimiento bacteriano heterotrófico marino (UFC ml^{-1}) con el tiempo para a) estanques sin agua residual, A1 (control) y A2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) y b) estanques con agua residual y diferentes concentraciones de bioestimulante, (A3 sin bioestimulante, A4 con 0.02 ml L^{-1} , A5 con 0.04 ml L^{-1} , A6 con 0.08 ml L^{-1} y A7 con 1.6 ml L^{-1} de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio de cada estanque.

CORRELACIÓN DEL BIOESTIMULANTE CON LAS VARIABLES

Las concentraciones de los PO_4 y NO_3 , fueron las únicas variables que presentaron una correlación con el bioestimulante agregado al inicio del experimento con una $r^2 = 0.568$ (fig. 7a). Aquí se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de estos nutrientes y la concentración de bioestimulante adicionado.

Las concentraciones de los PO_4 , NH_4 , NO_3 y bacterias heterotróficas marinas, presentaron una correlación con la concentración de bioestimulante agregado, al segundo día de iniciado el experimento con una $r^2 = 0.773$ (fig. 7b). Aquí se observa una correlación inversa entre el fosfato y el bioestimulante mientras que con el NH_4 , NO_3 y las bacterias heterotróficas marinas presentaron un incremento en su concentración con la adición de bioestimulante.

Experimento II

En este experimento se probó la reproducibilidad del efecto del bioestimulante con una sola concentración (Tabla II). Se seleccionó la menor concentración de bioestimulante (0.02 ml L^{-1}) debido a que en el experimento I, las diferencias entre los estanques con bioestimulante fueron pequeñas y en algunos casos no existieron.

En este experimento se graficaron los promedios y la desviación estándar de dos réplicas, en todas las variables analizadas, con el fin de mostrar la gran variabilidad presentada durante este experimento. Esta variabilidad no se presentó en el primer experimento. Para conocer la posible fuente de error se calculó el coeficiente de variación (C.V.), de cada estanque y su réplica por separado, para cada variable.

DBO_5

En la figura 8a se muestran los cambios de la DBO_5 con el tiempo, en agua de mar sin la adición de agua residual (sin bioestimulante y con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante, B1 y B2 respectivamente). El máximo valor de DBO_5 se presentó al segundo día, para el estanque B1 ($1.35 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), posteriormente el valor de la DBO_5 disminuye. El máximo valor de la DBO_5 al segundo día, posiblemente se debió a una alta degradación del material orgánico. Por otra parte el estanque B2 presenta el máximo valor de DBO_5 al cuarto día ($1.35 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Este incremento, posiblemente es por una degradación del material orgánico con un retraso de tiempo con respecto al estanque B1. Los valores de DBO_5 para el resto del experimento, presentaron gran variabilidad lo que no permitió observar diferencias significativas entre ambos estanques.

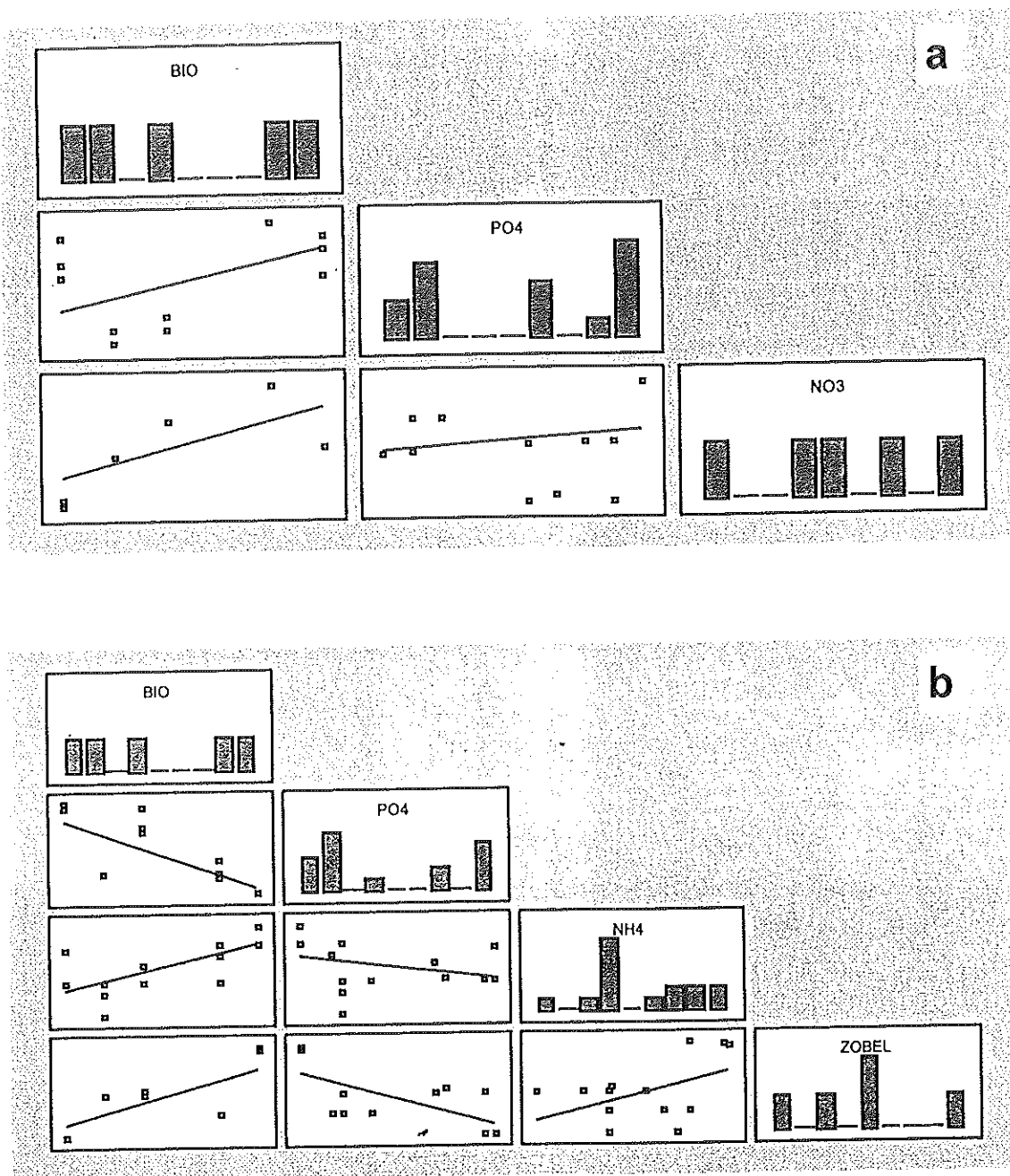


Figura 7. Matriz de correlaciones para la primera parte del experimento a) al inicio del experimento; b) al segundo día; para las variables que presentaron la mejor correlación con el bioestimulante, las líneas sólidas representan la mejor regresión lineal entre las variables.

En la figura 8b se muestra la variación de la DBO_5 con respecto al tiempo, para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) en un medio contaminado con agua residual. El estanque B3 presenta un decremento en los valores de DBO_5 con respecto al tiempo, durante todo el experimento, con un valor máximo de $1.8 \text{ (mg O}_2 \text{ L}^{-1})$ y el mínimo de $0.41 \text{ (mg O}_2 \text{ L}^{-1})$. Por otra parte, el estanque B4 no presentó un comportamiento bien definido. Así mismo, se observa una fluctuación en el valor de DBO_5 entre 1.2 y $0.5 \text{ (mgO}_2 \text{ L}^{-1})$, durante todo el experimento. Los valores de DBO_5 en el estanque B4 son menores al estanque B3 durante los primeros días. Las diferencias significativas entre los estanques B3 y B4 se presentan solamente al inicio del experimento ($p < 0.05$). El C.V. de las determinaciones para la DBO_5 fue menor a 5.87% , indicando que el error por la técnica no es tan importante. Sin embargo, la variabilidad presentada entre réplicas fué significativa (como se muestra en la figura).

AMONIO

En la figura 9a se muestran los cambios en la concentración de amonio (NH_4), con el tiempo para los estanques B1 (control) y B2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) sin agua residual. En el estanque B1, la concentración de amonio disminuye en los primeros dos días, manteniéndose el mínimo ($3 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$) hasta el cuarto día. Posteriormente se observa una tendencia a incrementarse al final del experimento. En el estanque B2, se observa el mismo comportamiento con un desfase de 1 día, pero con concentraciones similares (en promedio $5 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). La máxima concentración de amonio en el estanque B1 fue de $7 \text{ (} \mu\text{g-at N L}^{-1})$ al quinto día y para el B2 de $8.4 \text{ (} \mu\text{g-at N L}^{-1})$ al octavo día. Las mayores concentraciones de NH_4 coinciden con los valores de DBO_5 más bajos, posiblemente por la regeneración del nitrógeno orgánico por las bacterias. Los estanques B1 y B2, solamente presentaron diferencias significativas al sexto día ($p < 0.001$).

En la figura 9b, se observa la variación de la concentración del NH_4 con el tiempo, en un medio contaminado con agua residual, para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). Los estanques B3 y B4, presentan un comportamiento irregular en la concentración de NH_4 durante el experimento, con mayores concentraciones en el estanque B3. Así mismo las concentraciones de estos estanques fueron ligeramente mayores con respecto a los estanques, sin agua residual (B1 y B2, fig. 9a). Las diferencias significativas encontradas entre el estanque B3 y B4 al quinto y sexto día fue de $p < 0.001$. El C.V. de tres determinaciones de cada estanque fue menor a 5.0% , lo cual indica que la desviación estándar, mostrada en la gráfica no se debe a la técnica, sino a la reproducibilidad entre los estanques.

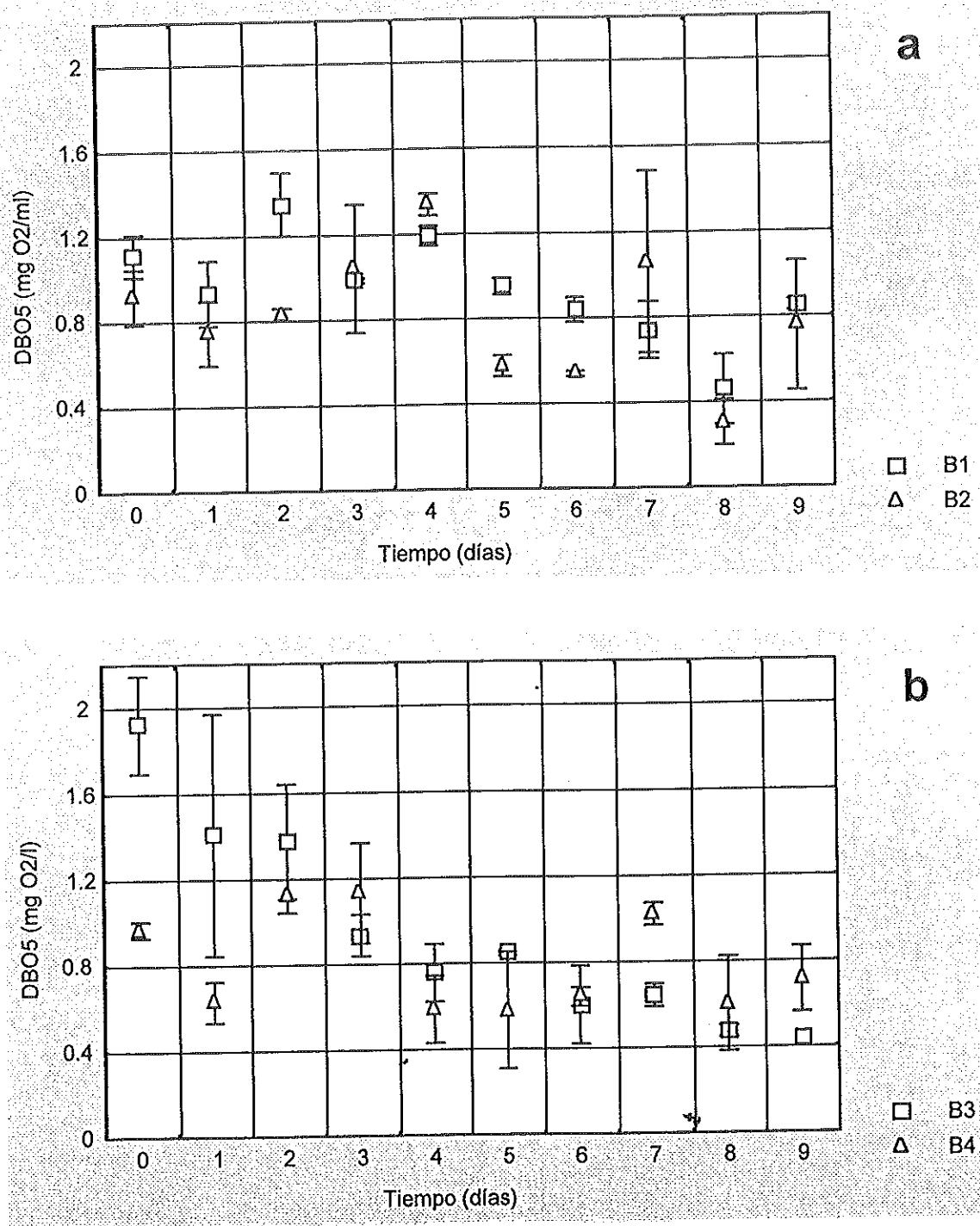


Figura 8. Cambio de la DBO5 con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

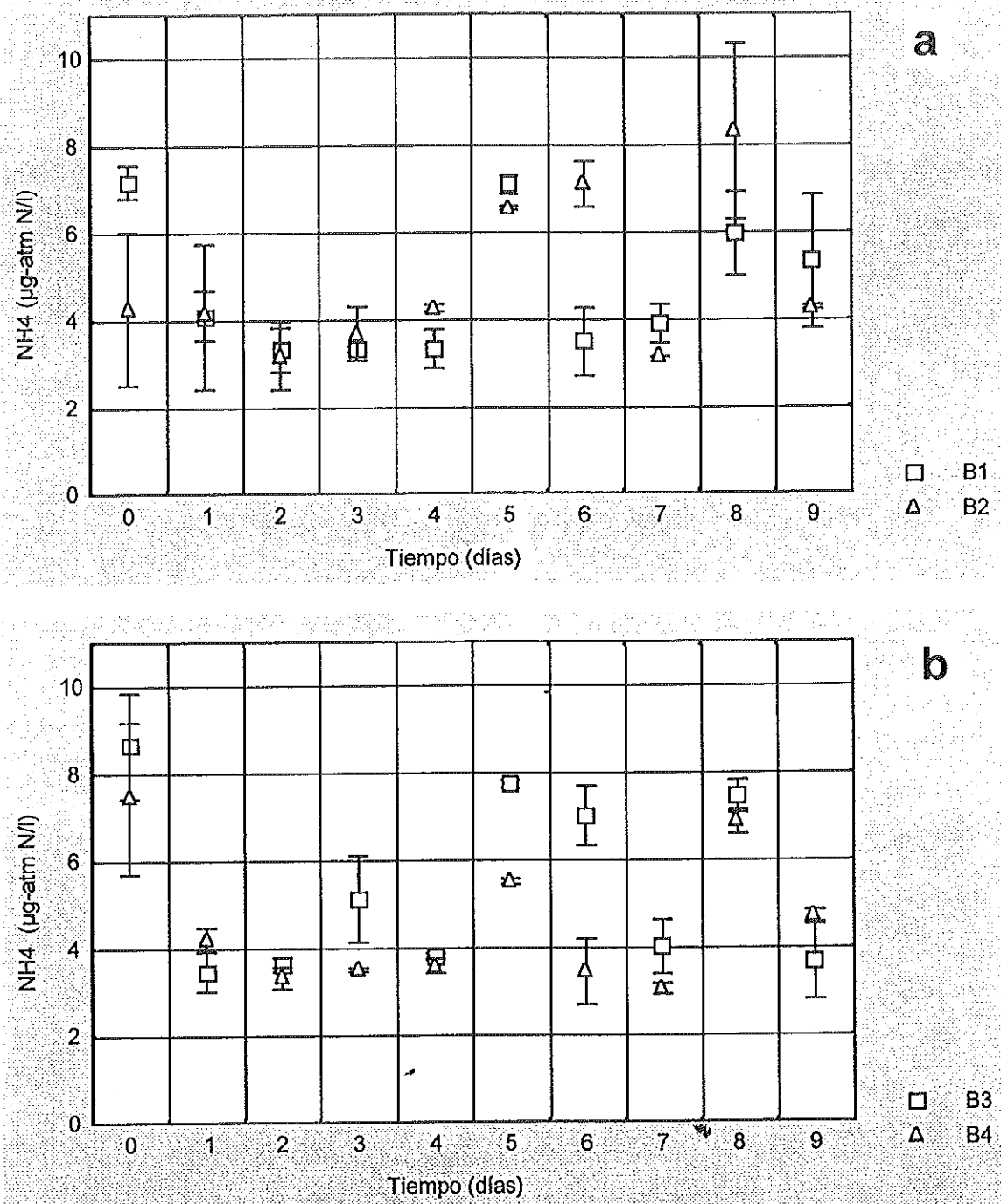


Figura 9. Cambio en la concentración de amonio (NH_4) con el tiempo a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estándar de dos réplicas.

NITRATOS

Los cambios en la concentración de los nitratos (NO_3) con el tiempo para los estanques B1 (control) y B2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) sin agua residual, se observan en la figura 10a. En ambos estanques, la concentración de nitratos, presenta un comportamiento similar durante el experimento, a excepción del tercer día donde el estanque con bioestimulante presentó una mayor concentración ($3.5 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Esto probablemente se deba a una degradación de material orgánico nitrogenado, ya que coincide con el máximo valor de DBO_5 . Las diferencias significativas encontradas entre los estanques B1 y B2 se observaron al tercero y sexto día ($p < 0.001$).

La figura 10b muestra el cambio de la concentración de los NO_3 con el tiempo, en un medio contaminado con agua residual, para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). El estanque B3 presentó valores máximos de concentración al primero ($4 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$), cuarto ($3.5 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$) y séptimo día ($3.7 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$), mientras que el estanque B4 presentó una máxima concentración al noveno día ($5.45 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Las menores concentraciones de NO_3 las presentó el estanque B3. Las concentraciones al final del experimento fueron provocadas por una posible oxidación del amonio. El C.V. para los NO_3 , fue menor a 3.02 %, en tres determinaciones, por lo que la desviación estándar mostrada en la gráfica es provocada por la reproducibilidad de los estanques. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los estanques B3 y B4 en el segundo, cuarto, octavo y noveno día.

NITRITOS

En la figura 11a se muestra el cambio en la concentración de los NO_2 con respecto al tiempo, para los estanques B1 (control) y B2 (0.02 ml L^{-1} de bioestimulante). Ambos estanques presentaron un comportamiento similar durante el experimento, con un ligero desfase al final del mismo. Inicialmente la concentración de nitritos disminuye a valores cercanos a cero, posiblemente por la oxidación bacteriana de NH_4 a NO_3 y como producto intermedio al NO_2 . Posteriormente se observa una tendencia a incrementar sus valores hasta $0.4 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$, lo cual puede atribuirse a la remineralización de nitrógeno. Las diferencias significativas entre los estanques B1 y B2, se presentan al séptimo y octavo día ($p < 0.05$).

La variación en la concentración de NO_2 con el tiempo para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) en un medio contaminado con agua residual, se muestra en la figura 11b. Ambos estanques presentan una tendencia similar, a incrementar su concentración con respecto al tiempo, posiblemente por la oxidación de los compuestos nitrogenados. Los máximos valores encontrados fueron $0.35 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$ para el estanque B3 y $0.5 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$ para el estanque B4. Lo cual puede indicar una aceleración en la remineralización del nitrógeno bajo la presencia de bioestimulante. Las diferencias significativas

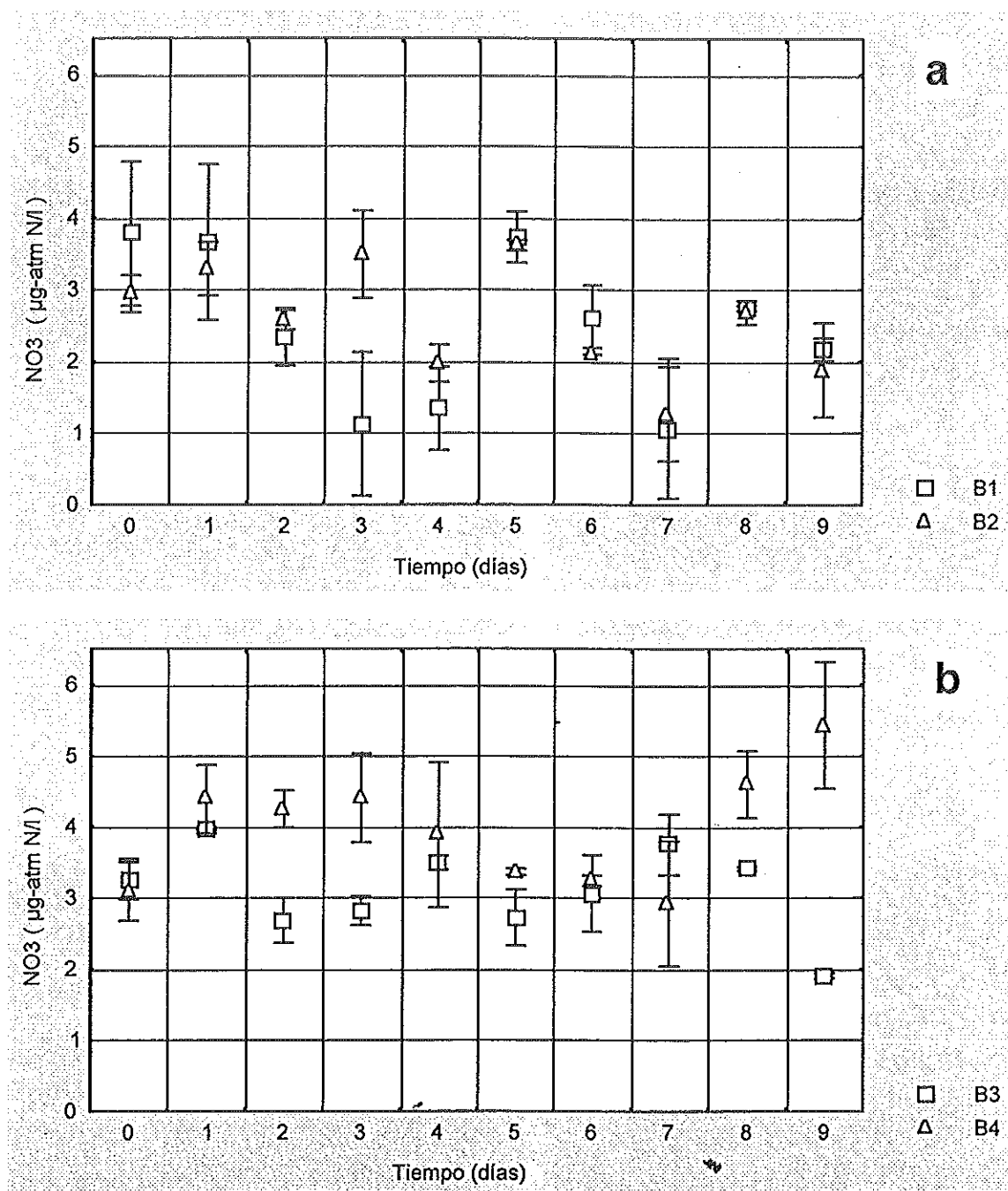


Figura 10. Cambio en la concentración de nitratos (NO₃) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con 0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 (0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

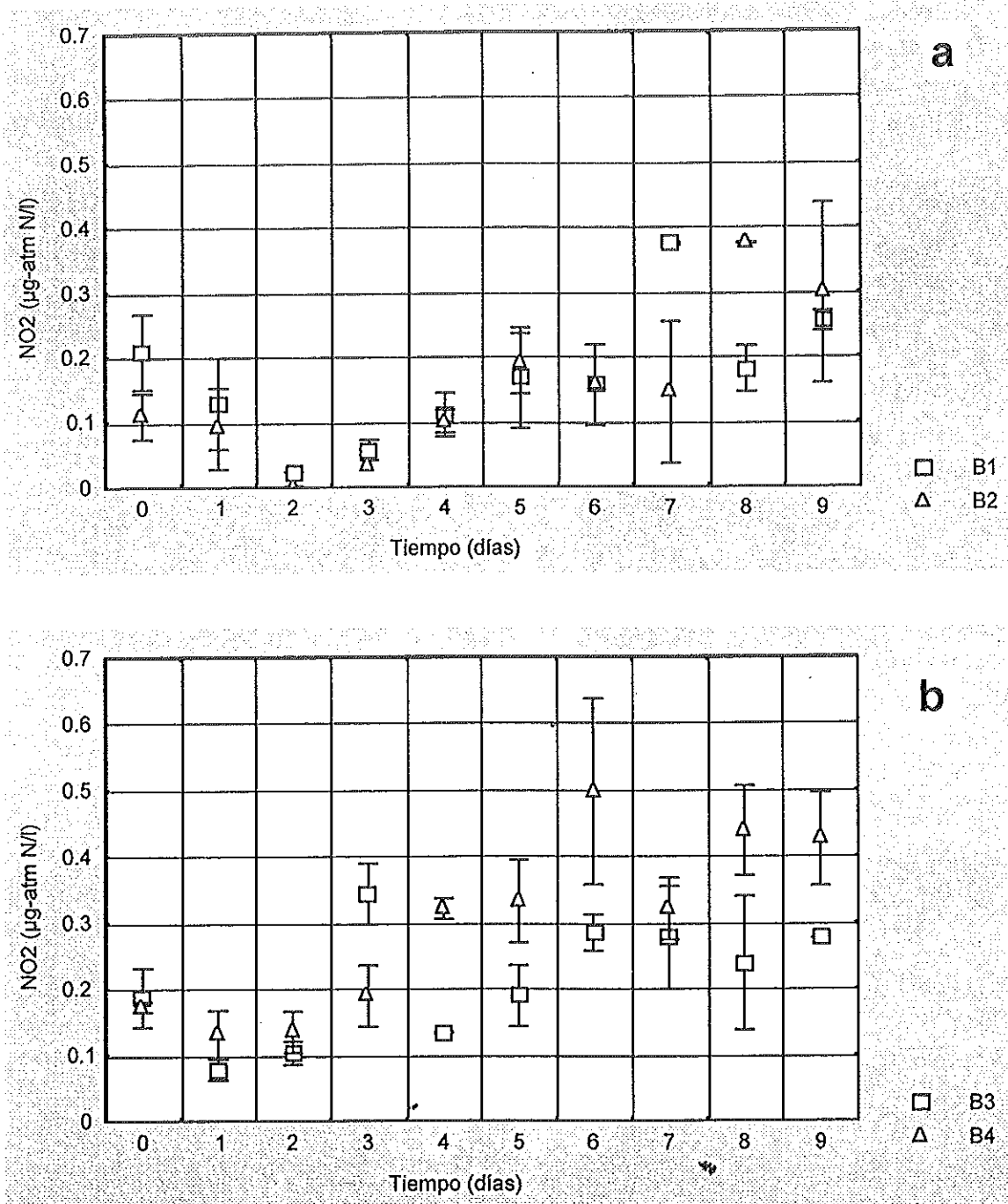


Figura 11. Cambio en la concentración de nitritos (NO₂) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con 0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 (0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estándar de dos réplicas.

entre los estanques B3 y B4 se presentaron del tercer al sexto día y del octavo al noveno día ($p < 0.05$). El C.V. en la determinación de los NO_2 , fue menor a 1.4 %, este valor indica el error por la técnica en cada estanque, por lo que las desviaciones estandar mostradas en la figura son debidas a la variabilidad entre réplicas.

FOSFATOS

Los cambios en la concentración de fosfatos (PO_4) con el tiempo para los estanques B1 (control) y B2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante), son mostrados en la figura 12a. El estanque B1 presentó una ligera tendencia a disminuir, del inicio del experimento al quinto día con un posterior incremento hacia el final del experimento, alcanzando un valor máximo al noveno día ($1.54 \text{ } \mu\text{g-at P L}^{-1}$). El estanque B2 presentó el mismo comportamiento del estanque B1 pero con mayores concentraciones. Este incremento en la concentración de PO_4 , posiblemente se debió a la degradación de la materia orgánica por las bacterias, estimuladas por la adición de bioestimulante en el estanque.

En la figura 12b se muestra el cambio en la concentración de los PO_4 con respecto al tiempo, para los estanques B3 y B4, contaminados con agua residual. Debido a las desviaciones tan grandes que presentan las concentraciones durante todo el experimento, no fue posible establecer una tendencia clara sobre el cambio de la concentración de los PO_4 . No se encontraron diferencias significativas entre estos estanques. El estanque B4 fue el que presentó las mayores desviaciones estándar. El C.V. de los PO_4 , fue menor a 1.06 %, entre dos determinaciones.

NITRÓGENO ORGÁNICO DISUELTO

En la figura 13a se muestra la variación de la concentración de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) con el tiempo, para los estanques B1 y B2. Ambos estanques presentaron una tendencia a incrementar las concentraciones de NOD desde el inicio del experimento hasta el séptimo día, en el cual alcanzan el máximo valor ($16 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$), posteriormente la concentración disminuye hasta concentraciones similares a las iniciales ($8.5 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Los estanques B1 y B2, presentaron diferencias significativas al sexto día ($p < 0.001$).

La variación en la concentración de NOD para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) con el tiempo, es mostrada en la figura 13b. Ambos estanques presentaron sus máximos valores al quinto y sexto día ($13 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Posteriormente, la concentración disminuyó a valores cercanos a los iniciales ($10\text{--}12 \text{ } \mu\text{g-at N L}^{-1}$). Mostrando un comportamiento similar a los estanques B1 y B2 (sin agua residual). La disminución al séptimo día, es debido posiblemente a la degradación de material orgánico. Los estanques B3 y B4 presentaron únicamente diferencias significativas al octavo día ($p < 0.001$).

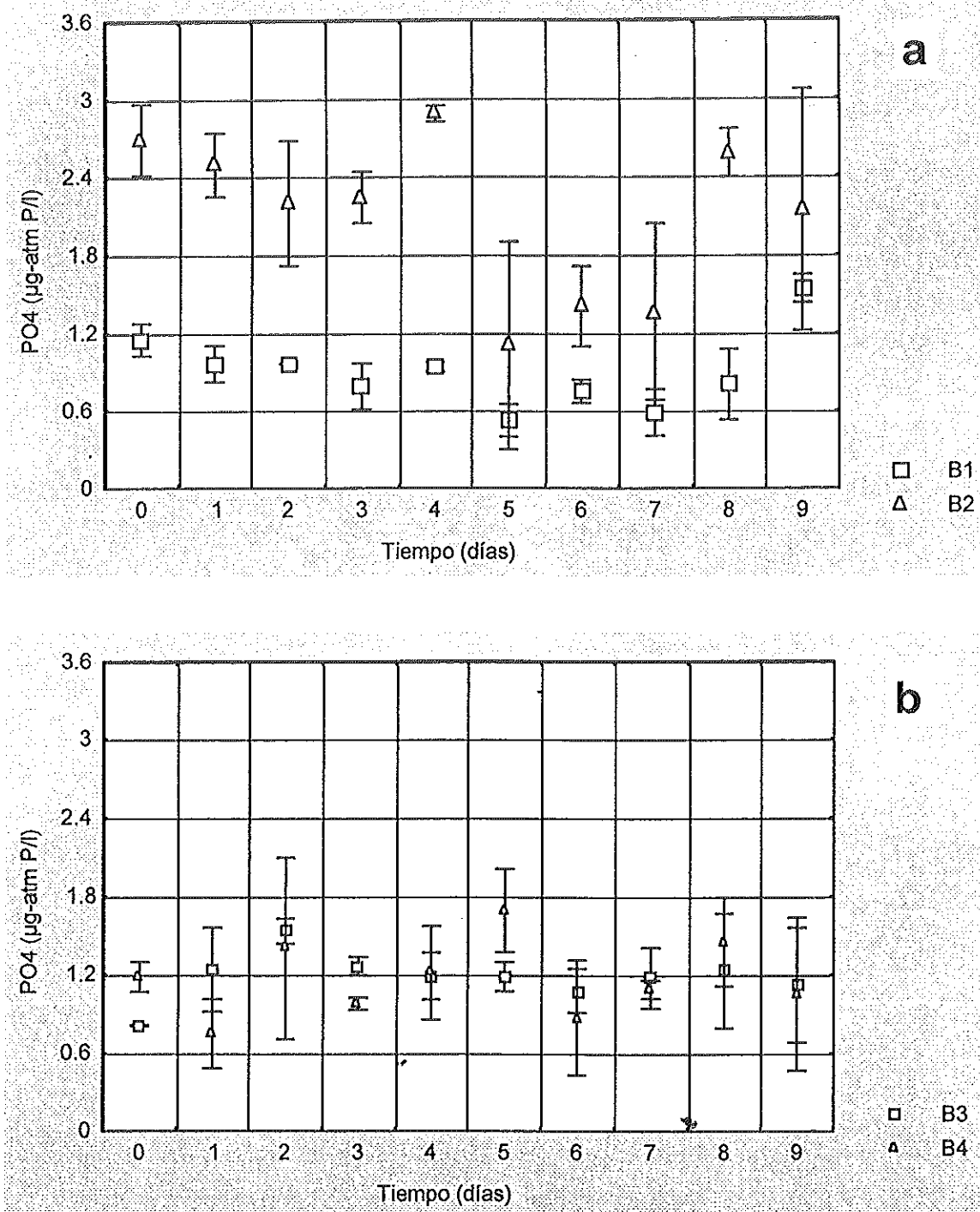


Figura 12. Cambio en la concentración de fosfatos (PO₄) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con 0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 (0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

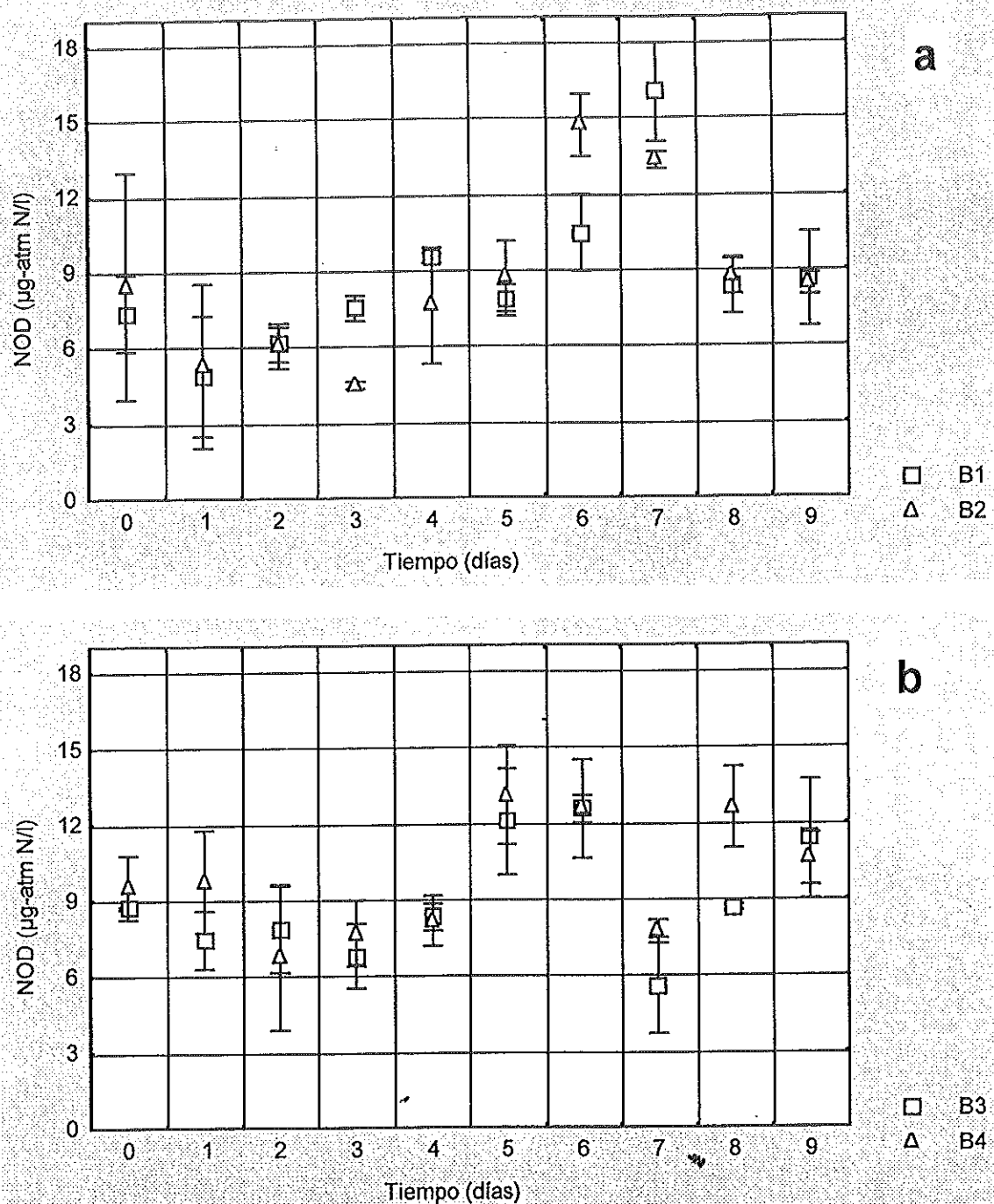


Figura 13. Cambio en la concentración de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estándar de dos réplicas.

El C.V. en dos determinaciones de NOD fue menor a 8.9 %, indicando que el error no es debido a la técnica, sino entre réplicas.

FÓSFORO ORGÁNICO DISUELTO

Los cambios en la concentración de fósforo orgánico disuelto (POD), en los estanques B1 (control) y B2 (con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante) presentan una ligera tendencia a disminuir con respecto al tiempo (fig. 14a). Las menores concentraciones de POD, se encontraron al noveno día (0.45 µg-at N L⁻¹). Esta disminución en la concentración posiblemente es debida a la actividad bacteriana. Únicamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al tercer día, debido a la desviación tan grande que presentaron los tratamientos, por tal motivo no se puede observar algún efecto producido por el bioestimulante, en el medio marino.

En la figura 14b se muestran los cambios en la concentración de POD con el tiempo, para los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante), contaminados con agua residual. Se observó un comportamiento similar durante el experimento en los estanques B3 y B4. Ambos presentaron disminución en la concentración de POD a lo largo del experimento alcanzando valores mínimos al octavo día (1 µg-at N L⁻¹, aproximadamente). No presentaron diferencias significativas los estanques, por la variabilidad existente entre réplicas, por lo que no se pudo evidenciar ningún efecto por la adición del bioestimulante.

Los C.V. de dos determinaciones fueron menores a 2.5 %, encontrándose que el error no se debió a la técnica, sino por la diferencia entre las concentraciones de las réplicas.

Análisis bacteriológico:

COLIFORMES TOTALES (Ct)

El comportamiento de las coliformes totales (Ct) con el tiempo, para el estanque B1 (control) y B2 (con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante), se muestra en la figura 15a. La concentración de bacterias coliformes totales en el estanque B2 presenta un incremento al segundo día de 75000 NMP 100 ml⁻¹ con valores menores a 2000 NMP 100 ml⁻¹ para el resto del experimento. Por otra parte el estanque con bioestimulante presentó un máximo en el segundo día con valores de 21,500 NMP 100 ml⁻¹. Esto indica que la estimulación bacteriana tiene lugar en los primeros dos días después de adicionado el bioestimulante, lo cual concuerda con las otras variables medidas durante el experimento.

En la figura 15b se observa el comportamiento bacteriano de los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante) con respecto al tiempo, en un medio contaminado con agua residual. Estos estanques presentaron el mismo comportamiento de los estanques sin agua residual (fig. 15a). En ambos estanques (B3 y B4) se observa una concentración mayor de bacterias (25,000 NMP 100 ml⁻¹, aproximadamente) al segundo día.

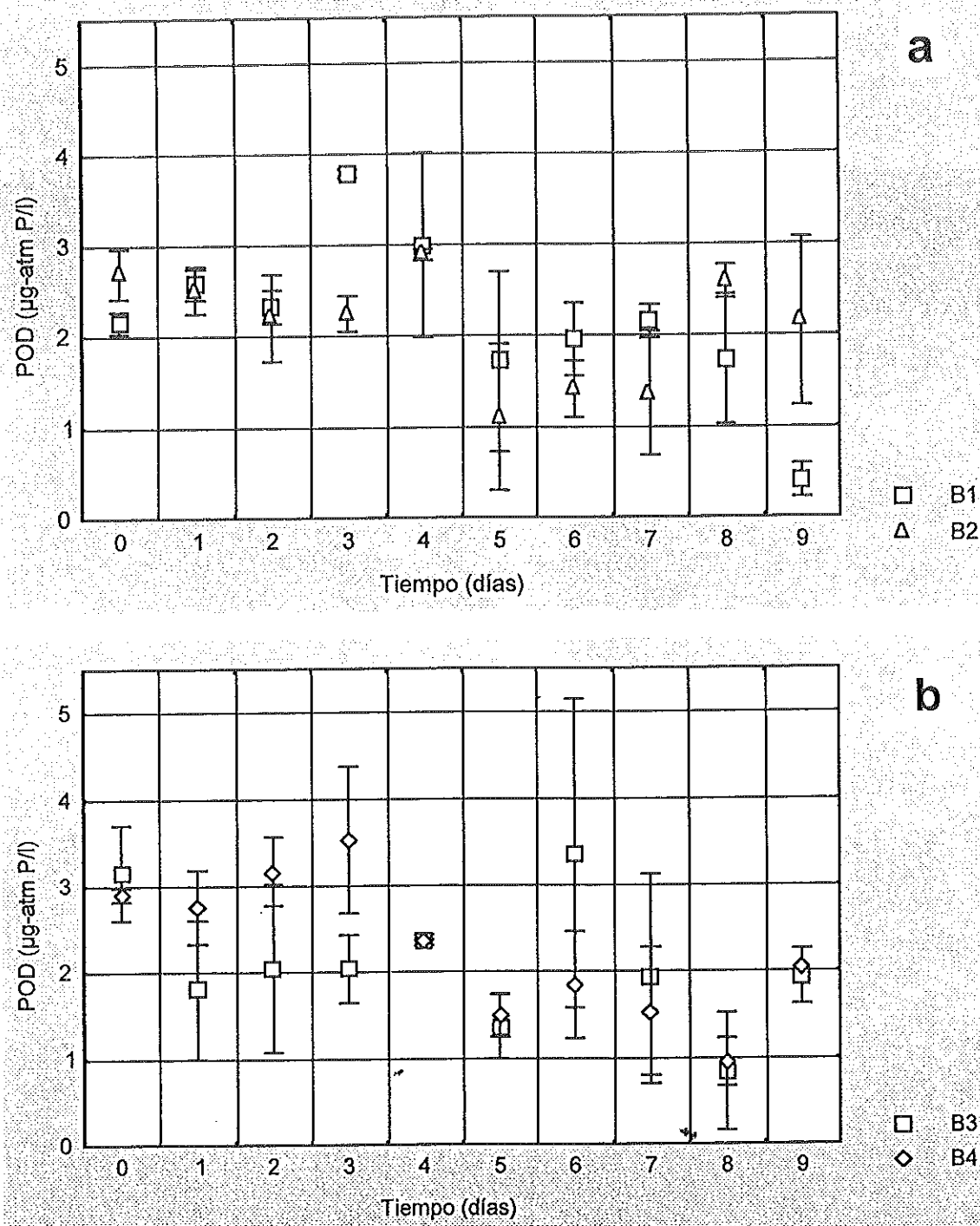


Figura 14. Cambio en la concentración de fósforo orgánico disuelto (POD) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

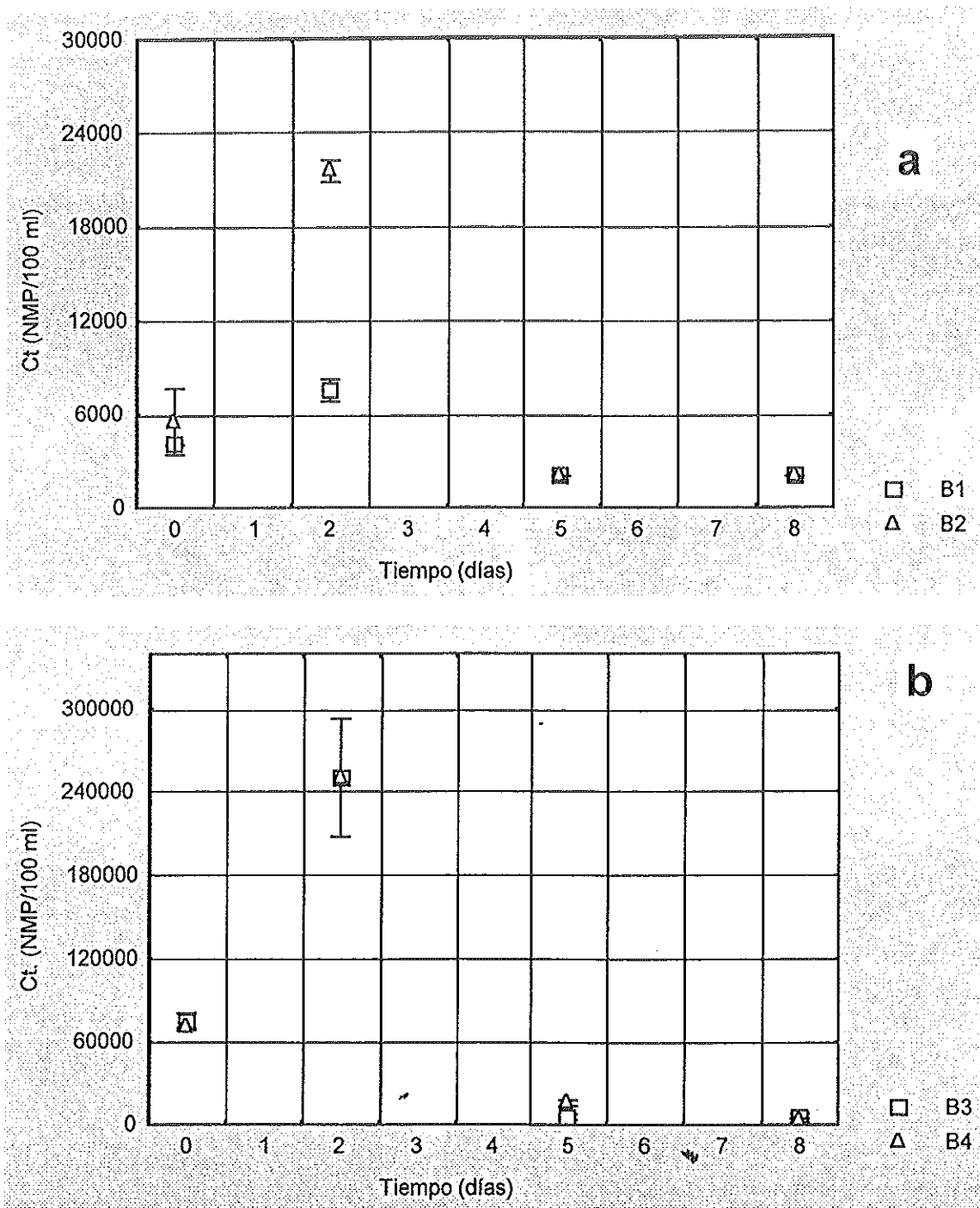


Figura 15. Cambio en el número de coliformes totales (CT) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

No presentaron diferencias significativas entre los estanques B3 y B4, debido posiblemente a que el bioestimulante no tienen ningún efecto en un medio contaminado para las bacterias coliformes

COLIFORMES FECALES (Cf)

En la figura 16a se aprecia el comportamiento de las bacterias coliformes fecales, con el tiempo, para los estanques B1 y B2. Los valores de las coliformes fecales (Cf) presentan un comportamiento muy similar a las Ct de la figura 15a. El estanque B2 presentó la mayor concentración de bacterias ($19,500 \text{ NMP } 100 \text{ ml}^{-1}$) en el segundo día. El estanque sin bioestimulante, presentó un crecimiento bacteriano menor a $4000 \text{ (NMP } 100 \text{ ml}^{-1})$. Se encontró diferencias significativas únicamente al segundo día ($p < 0.05$).

En la figura 16b se muestra el crecimiento de las Cf con el tiempo en un medio contaminado con agua residual, para los estanques B3 y B4. Las bacterias Cf para estos estanques, presentan el mismo comportamiento durante todo el experimento, con el crecimiento exponencial al segundo día. El mayor número de células del estanque B3 es de $20,500 \text{ (NMP } 100 \text{ ml}^{-1})$ y $14,000 \text{ (NMP } 100 \text{ ml}^{-1})$ para el estanque B4, sin embargo no existen diferencias significativas entre los estanques. Sin embargo, el estanque control (B3) en este caso presentó una concentración mayor de bacterias ($20,000 \text{ NMP } 100 \text{ ml}^{-1}$, aproximadamente) que el estanque con bioestimulante. Esto puede sugerir que las aguas residuales producen el mismo efecto sobre las bacterias que el bioestimulante. No presentaron diferencias significativas entre los estanques B3 y B4, debido posiblemente a que el bioestimulante no tienen ningún efecto en un medio contaminado para las bacterias coliformes fecales.

BACTERIAS HETEROTRÓFICAS MARINAS

La concentración de las bacterias heterótrofas en los estanques B1 (sin bioestimulante) y B2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) en un medio sin contaminar se presenta en la figura 17a. En el estanque B1 se observa un ligero incremento al quinto día, mientras el estanque B2 presenta la mayor concentración de bacterias ($36550 \text{ UFC ml}^{-1}$), al segundo día, con una diferencia significativa entre los estanques de $p < 0.05$ en el segundo y quinto día.

El comportamiento de las bacterias heterótrofas con el tiempo en un medio contaminado con agua residual para los estanques B3 y B4 se muestra en la figura 17b. El estanque B4 presentó la mayor concentración de las bacterias heterótrofas (9750 UFC ml^{-1}) a partir del segundo día. Las diferencias encontradas fueron significativas para los mismos días ($p < 0.05$). El incremento en la concentración de las bacterias heterótrofas que presentó el estanque B4 es posiblemente por la adición del bioestimulante, ya que no se observó un crecimiento típico de las bacterias en el estanque B3 con agua residual y sin bioestimulante.

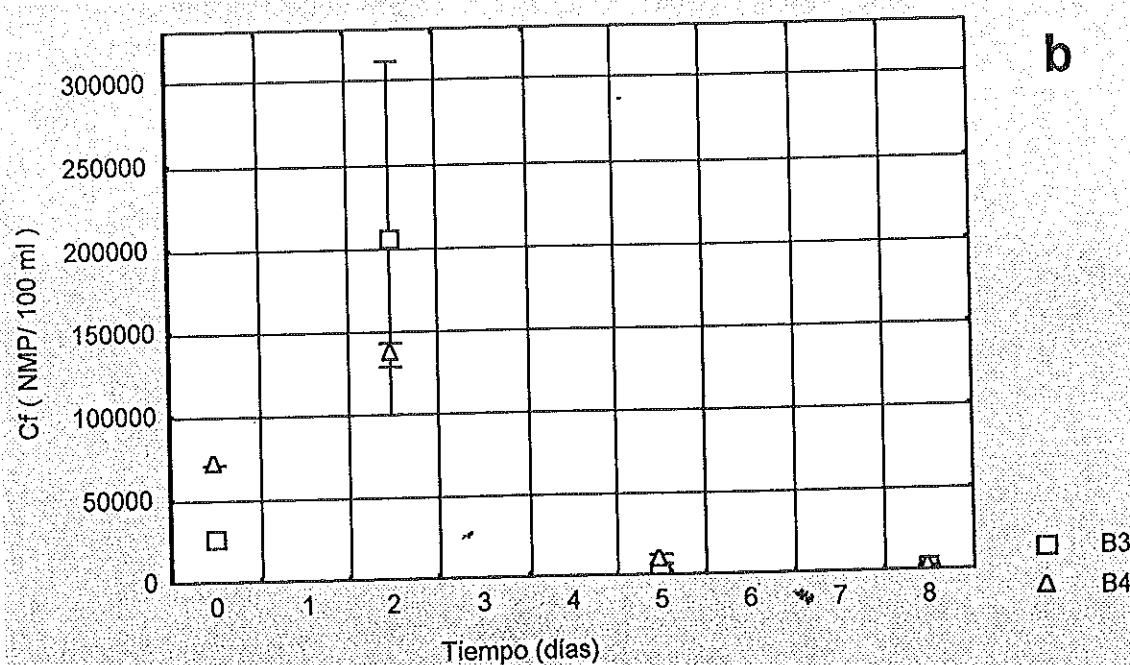
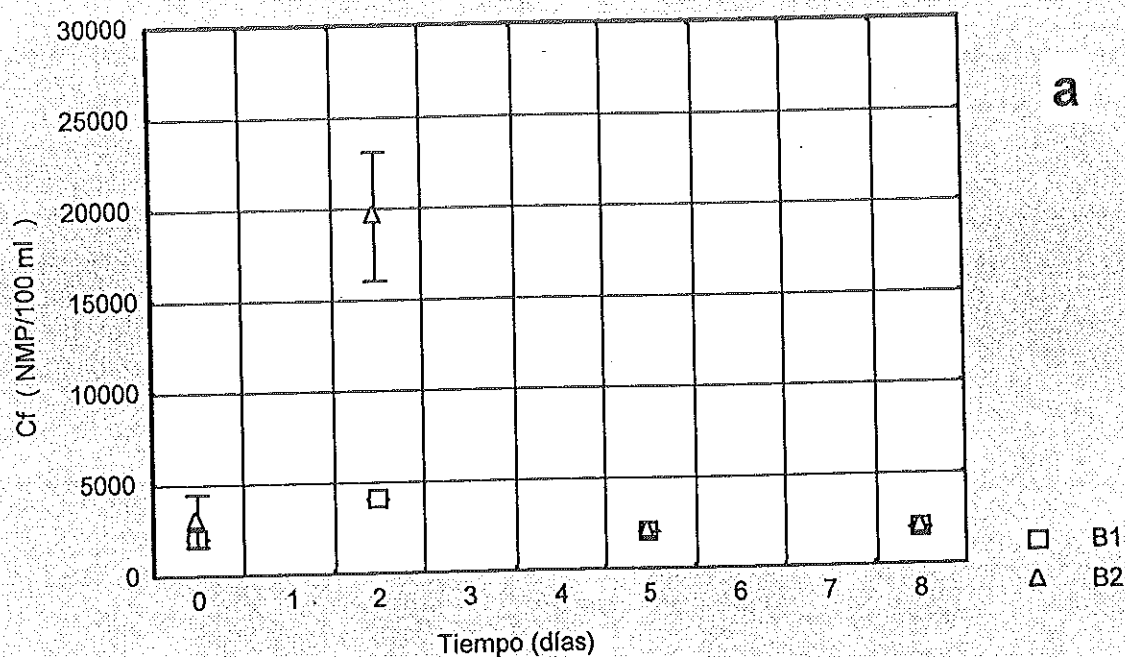


Figura 16. Cambio en el número de células de coliformes fecales (CF) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estándar de dos réplicas.

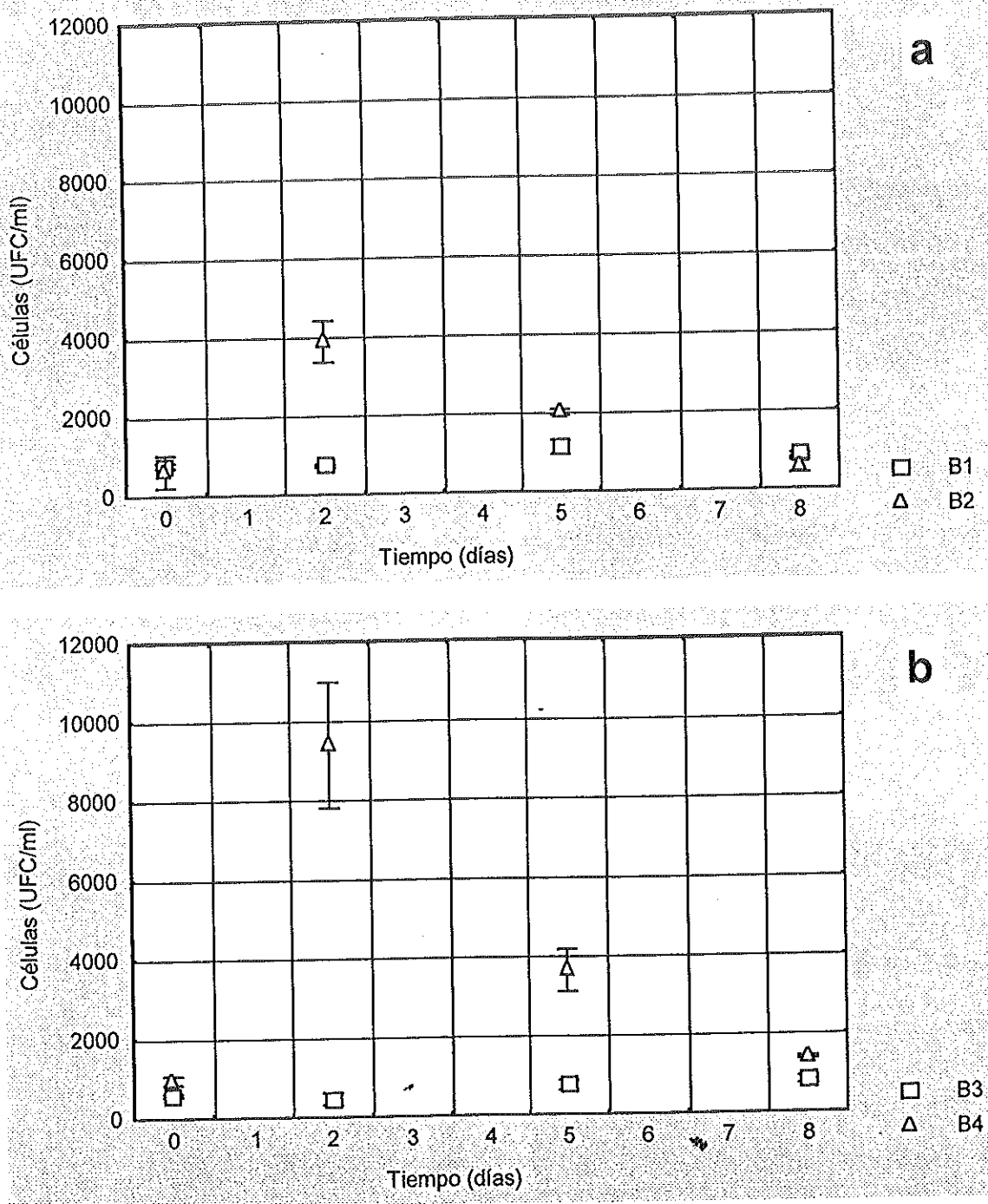


Figura 17. Crecimiento de bacterias heterotróficas marinas (UFC ml⁻¹) con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con 0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 (0.02 ml·l⁻¹ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estandar de dos réplicas.

CONTEO DIRECTO POR EPIFLOURESCENCIA (DAPI)

Se determinó la abundancia bacteriana, en estanques con agua de mar y agua de mar contaminada con agua residual, para determinar si existía algún efecto por el bioestimulante. El comportamiento de los estanques B1 (control) y B2 (con 0.02 ml L^{-1} de bioestimulante) sin agua residual se muestra en la figura 18a. Ambos estanques presentaron el mismo comportamiento, con diferencias significativas al inicio y al séptimo día, del experimento. La mayor abundancia bacteriana se encontró en el estanque B2 (con bioestimulante) al tercer día ($3.5 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$). La utilización de nutrientes del medio, durante los primeros días pudo propiciar el incremento al tercer día, en la abundancia bacteriana. La posterior disminución en el número de bacterias, concuerda con incrementos en la concentración de nutrientes inorgánicos, por lo que se intuye, es un reflejo de la remineralización de materia orgánica. Se pudieron observar diferencias significativas al inicio y al séptimo día del experimento ($p < 0.008$).

El comportamiento de los estanques contaminados con agua residual y bioestimulante se observa en la figura 18b, donde el comportamiento fue diferente, a los observados en todos los análisis bacteriológicos realizados. La abundancia bacteriana presenta un decremento con el tiempo, en los estanques B3 (sin bioestimulante) y B4 (con agua residual) del inicio del experimento al quinto día. El estanque B4 presentó la mayor abundancia bacteriana ($2.8 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$). Este valor se puede explicar por la adición del agua residual, la cual presenta una alta concentración de nutrientes.

A partir del quinto día observa un incremento, debido a que se esta llevando a cabo una remineralización, ya mencionada en el comportamiento de los nutrientes.

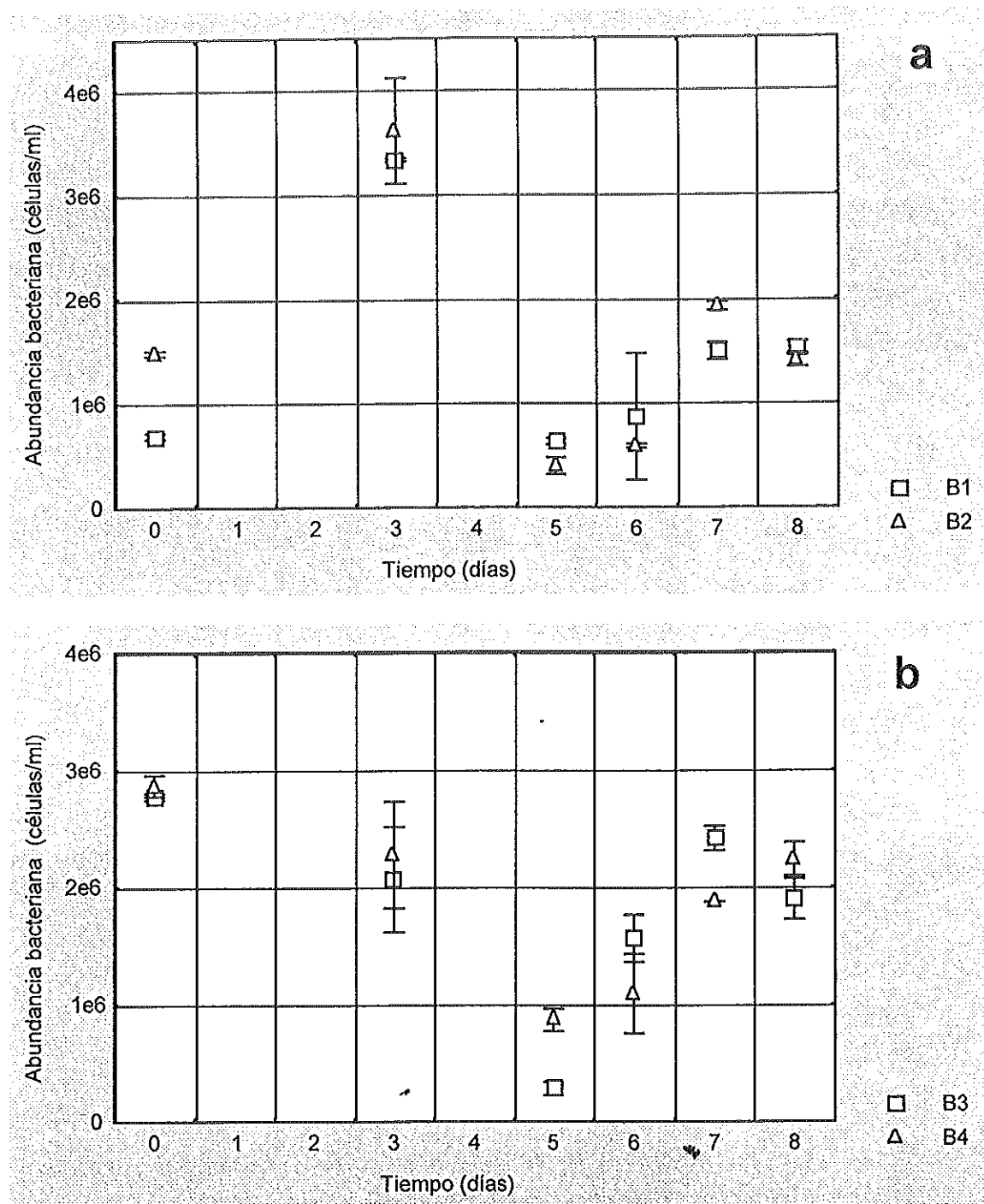


Figura 18. Cambio en la abundancia bacteriana con el tiempo para a) estanques sin agua residual B1 (control) y B2 (con $0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante), b) estanques con agua residual B3 (sin bioestimulante) y B4 ($0.02 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ de bioestimulante). Los símbolos indican el promedio y las barras la desviación estándar de dos réplicas. El valor de abundancia bacteriana es en notación científica

6 DISCUSIONES

El efecto del bioestimulante para disminuir la contaminación provocada por el agua residual con diferentes concentraciones; no presentó diferencias significativas entre los estanques con bioestimulante. Sin embargo hubo una mayor degradación del material orgánico oxidable al segundo día. Esto se evidenció por el aumento de la DBO_5 y el incremento bacteriano que se presentó en los estanques con bioestimulante. Esto trajo como consecuencia que gran parte de la materia orgánica oxidable se degradara en los primeros días y por tal motivo la demanda de oxígeno disminuyó en los días subsecuentes. Lo encontrado concuerda con lo reportado por BAC-TERRA (1994), y BIONATUR S.A. de C.V.(1997), Biotreat (1995), las cuales aseguran la efectividad de los estimulantes bacterianos para degradar el material orgánico y disminuir la DBO_5 , de las aguas residuales, al crear condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Por esta razón el mayor incremento bacteriano durante los primeros días, se registró en el estanque que presentaba bioestimulante (A2, figura 6a). Las altas concentraciones de nitratos (NO_3) para estos días son producto de la misma actividad bacteriana, así como las mayores concentraciones de NH_4 que se presentan al inicio del experimento. Los valores encontrados para estas variables fueron debidas a la actividad bacteriana, ya que son excretados o exudados, durante la degradación de material orgánico, oxidado posteriormente hasta NO_3 , realizandose la nitrificación (Riley 1989). Esto puede explicar la utilización del oxígeno para la oxidación y posiblemente una remineralización de las fuentes de nitrógeno orgánico en forma de nitritos y nitratos (Sosa, 1994).

La adición del bioestimulante provocó un incremento de PO_4 en el estanque A2 durante los primeros días. Este aumento en la concentración de PO_4 , probablemente, hizo que este nutriente no fuera limitante en las actividad metabólica de las bacterias. Por esta razón, tal vez las bacterias, utilizaron los fosfatos para satisfacer sus necesidades de compuestos de alta energía (De Robertis *et al*, 1977), por lo cual se vió incrementada la asimilación de PO_4 , a partir del segundo día. Este comportamiento no fue observado en el estanque control (A1) sin bioestimulante.

El gradiente de concentración de bioestimulante presentó una correlación significativa ($r=0.77$) con el incremento de la biomasa bacteriana (fig. 7b) para el segundo día. Esto indica que la adición del bioestimulante, estimula el crecimiento y acelera la degradación de la materia orgánica oxidable por las bacterias, por lo cual la DBO_5 se ve incrementado durante este periodo.

Por otra parte, al inicio del experimento se encontró una alta correlación ($r=0.57$) entre las diferentes concentraciones de bioestimulante y la concentración de nutrientes (PO_4 , NO_3). Esto nos sugiere que los nutrientes son una parte importante en la composición del bioestimulante. Referente a esto BAC-TERRA S.A. de C.V. (1994) menciona que estos productos

pueden estar constituidos por enzimas o nutrientes, que promueven la multiplicación de bacterias, para la degradación de materia orgánica, grasas y aceites.

Sin embargo, después del segundo día no se observaron diferencias significativas entre los valores de las variables analizadas para los estanques con diferentes concentraciones de bioestimulante. Por ello, se consideró emplear la mínima concentración de bioestimulante (0.02 ml L^{-1}) para aplicarlo al segundo experimento. Esta concentración fue utilizada para determinar su efecto en un periodo más largo de tiempo, y su efecto sobre la degradación de los diferentes tipos de materia orgánica (nitrogenada y fosforada).

El bioestimulante tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento bacteriano, en un medio sin contaminar, incrementando el número de células bacterianas marinas con respecto a un estanque sin bioestimulante. De igual forma que las coliformes totales y fecales ya que presentan el mismo comportamiento, debido a que el adicionar nutrientes la bacteria continuará prosperando y multiplicándose siempre que disponga de un alimento adecuado y condiciones apropiadas (Riley, 1989).

Otro efecto del bioestimulante en un medio sin contaminar es la disminución de la DBO_5 , al final del experimento. Esto se puede explicar si se considera que existe un decremento del carbono durante los primeros días, debido a que fue asimilado de manera natural. El material orgánico nitrogenado es el material que fue degradado durante los primeros días y que causó el incremento en la DBO_5 . Esto se ve reflejado en la disminución del NOD durante los primeros días, mientras que el POD no presentó este comportamiento. Por ello podemos decir que el bioestimulante acelera la degradación de la materia orgánica nitrogenada.

A partir del cuarto día se presenta una remineralización, posiblemente debida a que existe una disminución bacteriana que al ser degradadas incrementan la concentración de nutrientes. Esta remineralización es comprobada con el conteo con epifluorescencia (DAPI) que presentó dos incrementos en la abundancia bacteriana. El segundo incremento puede ser debida a la regeneración de los compuestos inorgánicos al medio como: el amonio, nitratos y fosfatos, por degradación de los organismos muertos. El nitrógeno liberado en su mayoría es en forma de NH_4 . Riley (1989) menciona que la degradación de organismos ocurre por: autólisis y acción bacteriana, ambos actúan juntos y varían de acuerdo a las condiciones de muerte y a la disponibilidad de éstas. Así mismo, los estudios de la remineralización del nitrógeno y el fósforo a partir de los organismos muertos han demostrado que es un proceso rápido y que casi la mitad del nitrógeno presente en los organismos muertos es transformado a amoniaco.

La adición de agua residual en los estanques B3 y B4 provocó una disminución en el crecimiento bacteriano marino, ya que fue menor al observado en estanques sin agua residual (B1 y B2). Sin embargo el bioestimulante únicamente presentó efecto en las bacterias marinas, en un medio contaminado ya que las coliformes totales y fecales presentan el mismo comportamiento con y sin bioestimulante. Esto pudiera sugerirnos que en la composición del

bioestimulante, también existen enzimas. Tal vez, por ello sólo las bacterias marinas responden a la adición de bioestimulante.

Por otra parte el conteo por epifluorescencia (DAPI), reveló que la abundancia bacteriana al inicio del experimento fue alta, por la adición del agua residual, presentando una tendencia a disminuir con el tiempo. Posteriormente se observa un incremento a partir del sexto día, posiblemente por la regeneración de los nutrientes al medio, tal incremento no lo presentan las coliformes, probablemente por que el sistema autodepurador del medio marino, impidió que las bacterias terrestres tuvieran un medio óptimo. Pérez (1980) encontró que las bacterias patógenas terrestres son destruidas por el agua marina después de 24 horas hasta una semana, la duración de estas bacterias patógenas depende de los fenómenos biológicos que condicionan el equilibrio de los ecosistemas marinos. Los compuestos orgánicos (NOD y POD) y la abundancia bacteriana, permitieron observar que los organismos muertos fueran degradados rápidamente en presencia del bioestimulante.

La utilización del bioestimulante aceleró la degradación del material orgánico oxidable durante los primeros dos días, requiriendo un mayor consumo de oxígeno para este proceso, por lo tanto el utilizarlo en medios contaminados y con poca oxigenación podría generar zonas anóxicas, que dañarían al medio.

Los coeficientes de variación (C.V.) calculados en el segundo experimento, se aplicaron para determinar el origen de las desviaciones estándar que presentaron todas las variables. Los C.V. presentaron valores que indicaban que el error por la técnica no influyó significativamente en la variabilidad de las distintas variables analizadas. Por ello, podemos decir que la variabilidad presentada en los diferentes estanques era producida por las réplicas de cada estanque. No se pudo explicar la alta variabilidad que presentaron los resultados de los estanques y sus réplicas, mantenidas bajo las mismas condiciones. Los experimentos de biorremediación, presentan un gran problema en cuanto a su reproducibilidad cuando se manejan en condiciones naturales, reflejándose en los resultados al presentar una gran variabilidad. Venosa *et al* (1996) encontró que la asimilación de aceites por bacterias marinas, no eran reproducibles en estanques con las mismas condiciones de laboratorio. Por otra parte Cozzarelli *et al* (1995), mostró que la variabilidad encontrada en los experimentos de bioremediación se deben a que las bacterias tienen una capacidad diferente para degradar material orgánico. Lo cual demuestra que los experimentos, relacionados con la biorremediación, tienen una gran variabilidad en cuanto a su reproducibilidad, en condiciones naturales.

7 CONCLUSIONES

- ✓La utilización de bioestimulantes para el tratamiento de las aguas residuales que posteriormente son vertidas al mar, incrementa la población bacteriana marina, así como aceleran la degradación de materia orgánica biodegradable y aumentan la DBO₅ en un lapso de tiempo corto.
- ✓La concentración de 0.02 ml L⁻¹ de bioestimulante presentó la misma eficiencia de degradación que concentraciones mayores de bioestimulante.
- ✓La actividad bacteriana y la asimilación de los compuestos orgánicos (NOD y POD) se ve incrementada por la adición del bioestimulante, sólo en las primeras 48 h. de adicionado el producto.
- ✓No se recomienda la utilización de estimuladores bacterianos para la ayuda de zonas contaminadas, debido a que el acelerar la degradación de compuestos orgánicos en menor tiempo y tienden a consumir oxígeno, lo cual puede provocar severos daños a zonas con bajo contenido de oxígeno disuelto ó bajo recambio de agua, ya que puede generar zonas anóxicas.
- ✓Se encontró que el efecto del bioestimulante duró hasta el segundo día. Por lo cual se recomienda realizar estudios de biorremediación que consideren adiciones periódicas de bioestimulante. De esta manera, tal vez la aplicación de estas sustancias provean de una eficiencia de degradación en áreas contaminadas.

8 BIBLIOGRAFÍA

- * APHA-AWWA-WPCP, 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. 15a Ed. American Public Health Association, Washintongton D.C. p.1134.
- * BAC-TERRA™ Porducts Characterization; 2120 Main street - San Diego, California 92113; (619) 233-4538 * Fax (619) 231 - 03997.
- * Bionatur (1995), comunicación personal.
- * Biotreat (1995); A.V. México y Cortez 225-12, Ensenada Baja California, México 22840; tel. (61)77-04-75, fax (61) 77-05-47
- * Cozzarelli Isabelle M., Herman Janet S., and Baedecker Mary Jo., (1995); Fate of Microbial Metabolites of Hydrocarbons in a Coastal Plain Aquifer: The Role of Electron Acceptors; Enviromental Science & Technology, 29(2), pag. 458-469.
- * De Robertis Sarz De Robertis (1977); Biología Célular; Edit. Ateneo, Buenos Aires, Argentina; pp.528.
- * Delgadillo-Hinijosa y Orozco-Borbón (1987); Bacterias Patógenas en Sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California; Ciencias Marinas 13(3):31-38.
- * Grasshoff, K, M.Ehrhardt, K.Kremling. 1983. Methods of Seawater Analisis. 2da Ed. Verlag Chemie, Germany, p 419.
- * Lee, S. y Fuhrman, J.A., 1987; Relathionships Between Biovoluma and Biomass of Naturally de Vives Marine Bacterioplankton. Appl. Environ Microbial.
- * López Portillo Manuel y Ramos, 1982; El medio Ambiente en México: Temas, Problemas y Alternativas. Ed. Fondo de Cultura Económica México. México.
- * Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa (1989); Contaminación Fecal en Sedimentos Superficiales de la Bahía de Todos Santos, Baja California, Ciencias Marinas; 15(1):47-62.
- * Orozco-Borbón, Rico-Mora, Montijo-Ante y Cajal-Medrano, 1993; Manual de Laboratorio de Microbiología; Facultad de Ciencias Marinas, U.A.B.C. Ensenada México; p. 51
- * Parsons, T.R. y Maita y C.M. Lallie, 1984; Manual of Chemical Methods for Sea Water Analisis. Five Ed. Pergamon Press London., pp 173 .
- * Pérez J.M. (1980); La Polución de las Aguas Marinas; Edit. Omega S.A.; Barcelona España; pp.250
- * Porter G: Karen and Feig S. Yvette, 1980. The use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora, American Society of Limnology and Oceanography, inc. p. 943-948
- * Riley. J.P y Chester R. (1989); Introducción a la Química Marina, AGT editor, S.A.; México; pp.459.

- *Schnoor Jerald L., Louis A. Licht, Steven C., Mc Cutcheon, N. Lee Wolfe, Laura H. Carreira,(1995); Phytoremediation of Organic and Nutrient Contaminants; Enviromental Science & Technology, vol. 29, N°. 7.
- *Sosa Avalos Ramón (1994); Estimación de la Productividad Primaria por el Método del Carbono Catorce y Oxígeno, en el Estero de Punta Banda; Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera; U.A. B. C., Ensenada B.C., México pp.73
- *Venosa Albert D, Suidan Makram T., Wrenn,Brian A., Strohmeier Kevin L., Haines John R., Eberhart Loye B., King Dennis and Holder Edith, (1996); Bioremediation of Experimental Oil Spill on the Shoreline of Delaware Bay; Enviromental Science & Technology, vol. 30, N°.5, pp. 1764-1775
- *Williams R. Jackhson (1994); Enviromental Care & Share; Ed.,Library of Congress Catalogog in United States of America, pp.735.