



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

00551  
1

UNAM  
POSGRADO



DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

FACULTAD DE QUIMICA

295487

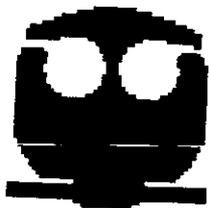
ESTUDIO FISICOQUIMICO Y MICROBIOLOGICO DE LA  
BIODEGRADABILIDAD AEROBIA RAPIDA DE  
INHIBIDORES DE HIDRATACION DE ARCILLAS  
EMPLEADOS EN LA FORMULACION  
DE FLUIDOS DE PERFORACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :  
QFB. KAREN TATIANA AMBRIZ RIVAS

ASESOR: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO



MEXICO D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



# PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/281/2001

**QFB. KAREN TATIANA AMBRIZ RIVAS**  
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación", dirigida por el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dr. Adalberto Noyola Robles
SECRETARIO	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
SUPLENTE	Dra. Refugio Rodríguez Vázquez
SUPLENTE	Dr. Simón González Martínez

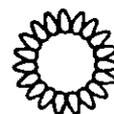
Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de abril del 2001.  
**LA COORDINADORA DEL PROGRAMA**

*Amelia Farrés González-Saravia*  
**DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA**

C.c.p. Archivo

AFGS\*lgg.





# PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

A LOS MIEMBROS DE  
JURADO DE EXAMEN

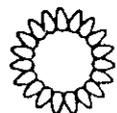
Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto sometido a su consideración del alumno de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Q.F.B. KAREN TATIANA AMBRIZ RIVAS titulado:

“Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación”

ATENTAMENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'V. Luna Pabello'.

DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO  
TUTOR PRINCIPAL



*Con infinito agradecimiento a todos aquellos a los que debo la inspiración, el coraje, la entereza y miles de cosas más de las que se tiene que echar mano para alcanzar una meta*

- ✓ Mis padres*
- ✓ Mis hermanos: Alexander y Marco*
- ✓ Mis familiares que están tan lejos y tan cerca*
- ✓ Mis mejores amigas: Gaby y Laura*
- ✓ Personas que estuvieron involucradas en que este proyecto llegara a buen término; profesores que me dieron su tiempo y compañeros con los que compartí triunfos y frustraciones.*

*Y todos aquellos que de una u otra manera tuvieron una participación directa o indirecta, aquellos que quizás no estén aquí y ahora, pero que permanecerán por siempre entre las figuras y los cálculos de esta tesis.*

*Agosto 2001*

## **RECONOCIMIENTOS:**

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado en el Laboratorio 301, Conjunto E perteneciente al Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (PIQAYQA), Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el laboratorio de Fluidos de Perforación, perteneciente a la Dirección Ejecutiva de Exploración del Petróleo del Instituto Mexicano del Petróleo

Este trabajo fue financiado en el marco del proyecto FIES- 97-03-I. “Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en los fluidos de perforación de pozos petroleros”.

Asimismo se agradece el apoyo económico y técnico prestado por:

- ❖ Beca para realización de estudios de posgrado otorgada por CONACyT (1998-2000).
- ❖ Beca asignada por el Instituto Mexicano del Petróleo a través del Proyecto FIES 97-03-I.
- ❖ Laboratorio de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se llevaron a cabo la análisis de COD.

## **ASESOR:**

**Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**

**ÍNDICE**

<b>RELACION DE ABREVIATURAS</b> .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1. Generalidades acerca de los fluidos de perforación.....	5
2.1.1. Perspectiva desde el punto de vista de protección al ambiente sobre el uso de fluidos de perforación.....	7
2.2. Aspectos generales sobre biodegradación.....	9
2.3. Pruebas de biodegradabilidad.....	14
2.3.1. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida.....	18
2.4. El papel del inóculo en las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida.....	20
2.4.1. Origen y/o composición del inóculo microbiano.....	21
2.4.2. Densidad celular del inóculo.....	23
2.4.3. Relación $S_0/X_0$ .....	25
2.4.4. Estandarización del inóculo.....	26
2.5. Actividad enzimática.....	27
2.6. Fundamento teórico de la respirometría.....	34
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO</b> .....	37
3.1. Objetivo general.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
3.3. Estrategia de trabajo.....	38

<b>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
4.1. Estudios para la selección de los IHA y pruebas de biodegradabilidad preliminares.....	41
4.1.1. Estudios para la selección de los IHA.....	41
4.1.2. Pruebas de biodegradabilidad aerobia preliminares.....	43
4.2. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301- F.....	44
4.2.1. Preparación del medio mineral, soluciones de prueba e inóculo microbiano.....	44
4.2.2. Montaje de las pruebas empleando el respirómetro VOITH-Sapromat B-12.....	45
4.2.3. Análisis fisiocoquímico y microbiológico de las muestras.....	47
4.3. Análisis estadístico.....	49
 <b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b> .....	 51
5.1. Estudios para la selección de los IHA.....	51
5.1.2. Pruebas de biodegradabilidad aerobia preliminares.....	57
5.2. Comportamiento de los controles propuestos por la prueba OECD 301-F.....	58
5.3. Remoción de materia orgánica medida como COD.....	60
5.4. Perfiles de consumo de oxígeno .....	64
5.5. Cinética de degradación de los IHA.....	66
5.6. pH.....	72
5.7. Sólidos totales (STT, STV y STF).....	75
5.8. Nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	77
5.9. Nitritos (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	79
5.10. Nitratos (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	80
5.11. Ortofosfatos (P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).....	82
5.12. Cuenta de bacterias heterótrofas totales (BHT).....	84
5.13. Perfiles de actividad enzimática.....	86
5.13.1. Perfil de actividad enzimática inicial del inóculo.....	95
5.13.2. Perfiles de actividad enzimática desarrollados durante la biodegradación de los IHA.....	98
5.14. Análisis integral.....	102

---

<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>106</b>
6.1. Conclusiones.....	106
6.2. Recomendaciones.....	108
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo A. Tablas de resultados obtenidos de la aplicación de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida.....	120
A.1. Tablas de valores puntuales y promedio de los parámetros.....	120
A.2. Tablas de parámetros cinéticos e índices de actividad microbiana.....	164
Anexo B. Tablas de resultados del análisis estadístico.....	174
B.1. Análisis multivariado de los parámetros.....	174
B.2. Análisis para los comportamientos cinéticos de degradación.....	185
B.3. Análisis de los perfiles de actividad enzimática de las fuentes de inóculo.....	189

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- ❖  $\alpha$ Fuc =  $\alpha$ -fucosidasa
- ❖  $\alpha$ Gal =  $\alpha$ -galactosidasa
- ❖  $\alpha$ Glc =  $\alpha$ -glucosidasa
- ❖  $\alpha$ Man =  $\alpha$ -manosidasa
- ❖ ANDEVA = Análisis de varianza
- ❖ ANDEVAMU = Análisis de varianza multivariado
- ❖  $\alpha$ QUIM =  $\alpha$ -Quimotripsina
- ❖  $\beta$ Gal =  $\beta$ -galactosidasa
- ❖  $\beta$ Glc =  $\beta$ -glucosidasa
- ❖  $\beta$ Gur =  $\beta$ -glucuronidasa
- ❖ CisA = Cistina arilamidasa
- ❖ COD = Carbono orgánico disuelto
- ❖ CV = Coeficiente de variación
- ❖ BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales como unidades formadoras de colonias por litro (UFC/L)
- ❖ d = días
- ❖ DBO = Demanda bioquímica de oxígeno
- ❖ DQO = Demanda química de oxígeno
- ❖ EST = Esterasa (C4)
- ❖ GlcNAc = N-acetil- $\beta$ -glucosaminasa
- ❖ IHA = Inhibidores de hidratación de arcillas
- ❖ IHAG = Inhibidor de hidratación de arcillas G
- ❖ IHAK = Inhibidor de hidratación de arcillas K
- ❖ IHAGIPCE = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas G empleando el inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas de Cerro de la Estrella
- ❖ IHAGIPCU = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas G empleando el inóculo proveniente de la planta de tratamiento aguas de Ciudad Universitaria

- ❖ IHAKISTJ = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas G empleando el inóculo proveniente de sobrenadante de tierra de jardín de casa habitación
- ❖ IHAKIPCE = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas K empleando el inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas de Cerro de la Estrella
- ❖ IHAKIPCU = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas K empleando el inóculo proveniente de la planta de tratamiento aguas de Ciudad Universitaria
- ❖ IHAKISTJ = Pruebas con el inhibidor de hidratación de arcillas K empleando el inóculo proveniente de sobrenadante de tierra de jardín de casa habitación
- ❖ IPCE = Inóculo proveniente de la planta de tratamiento de aguas de Cerro de la Estrella
- ❖ IPCU = Inóculo proveniente de la planta de tratamiento aguas de Ciudad Universitaria
- ❖ ISTJ = Inóculo proveniente de sobrenadante de tierra de jardín de casa habitación
- ❖ LEST = Lipasa esterasa (C6)
- ❖ LeuA = Leucina arilamidasa
- ❖ LIP = Lipasa (C14)
- ❖ MM = Medio mineral
- ❖ NAFPH = Naftol AS-BI-fosfohidrolosa
- ❖ N-NH<sub>3</sub> = Amoniac
- ❖ N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito
- ❖ N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato
- ❖ PBAR = Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida
- ❖ PAC = Fosfatasa ácida
- ❖ PAL = Fosfatasa alcalina
- ❖ P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfatos
- ❖  $\sigma$  = Desviación estándar
- ❖ STF = Sólidos totales fijos
- ❖ STT = Sólidos totales totales
- ❖ STV = Sólidos totales volátiles
- ❖ TPCO= Tasa promedio de consumo de oxígeno
- ❖ TRIP = Tripsina
- ❖ ValA = Valina arilamidasa

## **RESUMEN**

Con objeto de reconocer la influencia del origen y/o composición de la fuente de inóculo sobre las pruebas de biodegradabilidad aerobia para inhibidores de hidratación de arcillas, se escogieron tres fuentes de inóculo (dos procedentes de tanques de aireación de plantas de tratamiento de aguas residuales y uno derivado de suelo de jardín). A efecto de estandarizar el inóculo se controló la relación  $S_0/X_0$ , mediante la concentración materia orgánica vía carbono orgánico disuelto (COD) y un parámetro de densidad celular con lo es la cuenta de bacterias heterótrofas totales, respectivamente.

Con las tres fuentes de inóculo se observó la remoción de más del 90% de la materia orgánica vía COD en 7 días para un inhibidor base amina (IHAK). Mientras que en las pruebas con el inhibidor base glicol (IHAG) se obtuvo más del 70% en 14 días. De esta manera y bajo los criterios establecidos por la OECD 301-F, ambos inhibidores pueden catalogarse como rápidamente biodegradables. Los parámetros más adecuados para el seguimiento de la biodegradación de ambos inhibidores fueron la concentración de COD, el pH, el consumo de oxígeno y la cuenta de bacterias heterótrofas totales. El amoníaco y los nitritos fueron útiles para corroborar la biodegradación del IHAK. Para el IHAG ningún parámetro mostró ser útil en particular. Por último, los valores de sólidos totales, nitratos y ortofosfatos no aportaron datos que permitieran una mayor comprensión del fenómeno de biodegradación. El origen de la fuente de inóculo influyó en el comportamiento cinético de degradación del IHAG, mientras que no resultó significativo para el IHAK.

Los perfiles de actividad enzimática permitieron identificar que, independientemente del origen, composición y/o manejo del inóculo, las tres fuentes empleadas presentaban niveles y actividades semejantes al inicio de los experimentos. Algunas actividades enzimáticas sugieren datos corroboran la degradación del IHA con base en los grupos funcionales que se presume contienen estas sustancias. Conforme avanzó el período experimental de cero a 7 ó 14 días, se detectó el incremento de la actividad de la tripsina y la quimotripsina para el inhibidor base amina, misma que no se detectó para en inhibidor base glicol. Ambos inhibidores compartieron el aumento en la actividad de la leucina y valina arilamidasa, esterasa y lipasa-esterasa. Asimismo el incremento de la actividad de la N-acetilglucosaminidasa, corrobora que el descenso en la cuenta de bacterias heterótrofas totales hacia el final de los periodos de prueba se debe al agotamiento de los sustratos disponibles para oxidación y muerte de las bacterias.

La estandarización del inóculo controlando la relación  $S_0/X_0$  permitió obtener resultados reproducibles para el seguimiento del proceso de biodegradación con las tres fuentes de inóculo empleadas, minimizando el efecto del origen de éstas.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

La degradación y remoción de residuos industriales es hoy en día, un campo de estudio prioritario mundialmente. Para la solución de estos retos, han sido desarrolladas diversas tecnologías encaminadas a la eliminación de los contaminantes. De entre ellas, las de tipo biológico han demostrado ser las que generan menor cantidad de subproductos no deseados y permiten la reutilización del recurso afectado (por ejemplo, aguas y suelos contaminados orgánicamente).

La Biotecnología tiene numerosas aplicaciones y ha provisto de nuevas soluciones económicas y seguras para tratar el problema de la contaminación ambiental; asimismo, presenta un gran potencial de aplicaciones a futuro. Estas nuevas soluciones dependen en gran medida de la expansión de las capacidades metabólicas naturales de los microorganismos.

De acuerdo con la teoría de Margulis (1986), las capacidades catabólicas y biosintéticas de los microorganismos han co-evolucionado a lo largo de 3.5 billones de años, de tal forma que cuando aparecía un nuevo sustrato, algunos microorganismos adquirieron la capacidad de emplearlos como fuente de carbono y energía. Aparentemente, este proceso aseguró que bajo condiciones favorables para la actividad microbiana, ningún producto natural presentara resistencia indefinida a la biodegradación. Sin embargo, en la actualidad la comunidad microbiana es expuesta día con día a nuevos productos orgánicos sintéticos, algunos de ellos radicalmente diferentes en composición y estructura con respecto a su contraparte natural. Ejemplo de este tipo de productos son los inhibidores de hidratación de arcillas (IHA) que se emplean como aditivos en los fluidos de perforación base agua para pozos petroleros.

Las actividades de perforación en México se encuentran localizadas mayoritariamente en el sudeste del país, en la zona delimitada por los estados de Campeche, Tabasco y Chiapas; así como los yacimientos marinos de la Sonda de Campeche y la franja continental de los estados de Veracruz y Tamaulipas. Las actividades petroleras en la Sonda de Campeche comenzaron en 1972 con los primeros estudios geofísicos para verificar su potencial. En 1977, el pozo Akal-1 puso al descubierto el Campo Cantarell, uno de los pocos megayacimientos en el mundo.

Actualmente la zona petrolera de la Sonda de Campeche abarca una superficie de 215 000 km<sup>2</sup> y cuenta con 33 plataformas de perforación.

En México la industria petrolera ha permitido alcanzar un cierto grado de industrialización y desarrollo. Sin embargo, ese desarrollo y la falta de una legislación adecuada han traído como consecuencia el deterioro ambiental de amplios territorios localizados tanto en las cercanías de los pozos de explotación como en los sistemas que conducen la materia prima hasta refinerías y plantas petroquímicas. El deterioro del ecosistema marino puede ocasionar efectos negativos en las actividades pesqueras y turísticas. Cabe hacer mención que la zona del Golfo de México concentra el 30% de la actividad pesquera nacional y destacan por su valor comercial la captura de camarón, tiburón, mero, sierra y lisa (<http://www.inegi.mx>).

Las restricciones para el uso de productos, así como diversos instrumentos legales y administrativos para conocer y regular la calidad ecológica de las sustancias, han sido adoptadas por diferentes países (por ejemplo, en la Unión Europea y Estados Unidos). En ellos existen diversas pruebas estandarizadas para realizar este tipo de valoraciones y se han dictado reglamentaciones específicas para el cuidado de las especies que habitan el área. Actualmente los lineamientos ambientales de la industria química establecen que durante el desarrollo de sustancias y de nuevos productos, deben tomarse en cuenta los requerimientos de protección ambiental, entre los que se pueden contar evaluaciones de toxicidad, biodegradabilidad y bioacumulación, que proporcionan información acerca de su destino en el ambiente (Pagga, 1997).

El artículo 140 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente vigente establece que: "La generación, manejo y disposición final de los residuos de degradación lenta, deberá sujetarse a lo que establezcan las Normas Oficiales Mexicanas que al respecto expida la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) en coordinación con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI)". Sin embargo, hasta la fecha en México no se cuenta con un procedimiento oficialmente reconocido que permita evaluar la biodegradabilidad de compuestos orgánicos solubles en agua. Este tipo de procedimientos permitirían que el generador o usuario de productos industriales, cuente con elementos que

contribuyan a fundamentar la selección del tipo de compuestos que implique el menor daño posible para el ambiente.

Por tal motivo, este trabajo busca estudiar la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas, tomando como referencia dos procedimientos ya establecidos en otros países: las pruebas OECD 301-A “DOC Die Away Test” y OECD 301-F “Manometric Respirometry Test”, así como el efecto de la fuente de inóculo sobre los resultados generados a partir del empleo de estas metodologías.

En el siguiente capítulo se abundará en las características generales de los fluidos de perforación, así como la importancia que tienen las pruebas de biodegradabilidad para el estudio de los procesos de biodegradación, haciendo especial énfasis en el papel de la fuente de inóculo empleada.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades acerca de los fluidos de perforación

Para extraer los hidrocarburos se requiere entre otras actividades perforar pozos, cuyas condiciones y longitud varían de acuerdo a las características de las formaciones perforadas y la profundidad a la que se localiza el yacimiento (León-Fajardo, *et al.* 1995). Los pozos se perforan en tierra firme y costa afuera con ayuda de instalaciones de perforación especiales, cuyo propósito es investigar geológicamente la región y efectuar la búsqueda para la exploración y explotación de yacimientos. Se han diseñado varios métodos para perforar pozos petroleros, el más común y aceptado es mediante la operación de un equipo de perforación que hace rotar una barrena a través de un tubo hueco. Una de las características esenciales de la perforación rotatoria es el requerimiento del sistema de circulación, conocido como lodo de perforación.

La función principal de los fluidos de perforación es evacuar continuamente del fondo del pozo los recortes de las rocas perforadas. Durante las operaciones de perforación, los fluidos deben cumplir con las siguientes funciones (Bleir *et al.* 1992; Domínguez-Cuéllar, 2001):

- ❖ Asegurar la estabilidad de las paredes del pozo así como la limpieza completa y eficiente del fondo, manteniendo las partículas en estado de suspensión.
- ❖ Controlar las presiones de la formación al ejercer sobre las paredes del pozo una contrapresión suficiente para prevenir la afluencia de líquidos y gases de la formación.
- ❖ Reducir la fricción, enfriar y limpiar la barrena.

Los aditivos empleados en los fluidos de perforación deben de cumplir con una serie de características para ser empleados (Bland *et al.* 1993; Domínguez-Cuéllar, 2001):

- ❖ No deben ser abrasivos ni corrosivos: En ocasiones el fluido de perforación contiene sales disueltas que actúan como un medio donde tiene lugar la corrosión. La contaminación por

gases ácidos  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  y la formación de salmueras pueden causar corrosión severa, aún cuando los componentes originales del fluido no lo sean.

- ❖ Estabilidad térmica, pues conforme se alcanza mayor profundidad del pozo se incrementa proporcionalmente la temperatura
- ❖ Deben evitar la proliferación de microorganismos, debido a que en ciertas etapas de perforación se utilizan aditivos orgánicos naturales susceptibles al ataque microbiano, afectando con ello las propiedades del fluido.
- ❖ Deben ser económicos y formularse fundamentalmente con materiales baratos y eficaces que estén ampliamente disponibles en el mercado.
- ❖ Compatibles con otros aditivos, inertes y de fácil mantenimiento, por ejemplo que no resientan la incorporación de materia perforada (sólidos, calcio, carbonatos, yeso, sal,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , etcétera) y en el caso que presenten cambios, que acepten el tratamiento químico para reestablecer sus propiedades originales
- ❖ Baja toxicidad y alta biodegradabilidad. Desde el punto de vista de seguridad industrial y protección al ambiente es importante que el sistema empleado sea fácil de manipular y que cuente con bajos índices de toxicidad para seres humanos (Reid *et al.* 1995).

Los inhibidores de hidratación de arcillas (en lo sucesivo, IHA), son aditivos que previenen el ensanchamiento del pozo mientras se realiza la perforación en sitios con lutitas sensibles al agua. En forma resumida se puede decir que tan pronto se agregan a un sistema base agua, las moléculas los IHA reaccionan con las partes activas presentes en las placas de los minerales de arcilla, los cuales enlaza electrostáticamente con la consiguiente disminución de la tendencia de la arcilla a absorber el agua que la rodea. Esta acción limita la hidratación e hinchamiento de las lutitas en presencia de los fluidos base agua.

El agua es el líquido natural más accesible y barato, por ello es el principal componente de muchos fluidos de perforación. Los fluidos de perforación base agua que incluyen IHA (tabla 1), se dividen en 3 grandes grupos (Reid *et al.* 1995; Jarrett, 1995; Stamatakis *et al.* 1996; Brady *et al.* 1998).

Tabla 1. Clasificación general de los inhibidores de hidratación de arcillas (IHA)

Grupos	Características
Catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ampliamente disponibles en el mercado, actúan por intercambio catiónico con las arcillas</li> <li>❖ Mayor grado de inhibición que otros sistemas</li> <li>❖ Cuidadosa selección e inclusión de otro tipo de aditivos (reaccionan con polímeros aniónicos)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <b>Polímeros orgánicos (aminas cuaternarias):</b></li> </ul> </li> <li>❖ Incrementan la eficiencia y calidad del proceso pero a un mayor costo ya que presentan altas velocidades de consumo</li> <li>❖ Baja toxicidad y alta biodegradabilidad</li> <li>❖ Estabilidad, tanto térmica (aproximadamente 200°C) como en el intervalo de pH de los fluidos</li> <li>❖ Compatibles con aditivos comúnmente empleados                             <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <b>Sales inorgánicas (KCl, NaCl y CaCl<sub>2</sub>)</b></li> </ul> </li> <li>❖ Reducen la hidratación de las arcillas lo que previene la dispersión y desintegración del pozo</li> <li>❖ Aumentan la salinidad del sitio donde son descargados, por lo que su uso no es recomendado en algunas regulaciones agrícolas y pueden ocasionar impacto negativo en los organismos marinos</li> </ul>
Con polímeros anfóteros	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ejemplo: poliaminoácidos</li> <li>❖ Actúan por un mecanismo similar al de los materiales catiónicos; sin embargo, sus características catiónicas son menores, en especial a altos valores de pH</li> <li>❖ Compatibles con los aditivos aniónicos; lo que extiende su aplicación a situaciones con altas temperaturas</li> <li>❖ Menor costo, tanto del material como reducción en los volúmenes de consumo</li> <li>❖ No son tóxicos</li> </ul>
Con polímeros no iónicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ejemplo: glicoles, polioles, glucósidos y alcohol polivinílico</li> <li>❖ Incrementan la eficiencia de la perforación ayudando a estabilizar las arcillas a través de la formación de complejos estables</li> <li>❖ Empleados en concentraciones que van del 3 al 10% en volumen (Reid <i>et al.</i> 1995).</li> <li>❖ La mayoría se consideran como rápidamente biodegradables (Reid <i>et al.</i> 1995).</li> </ul>

### 2.1.1. Perspectiva desde el punto de vista de protección al ambiente sobre el uso de fluidos de perforación.

La industria petrolera ha enfocando su atención en desarrollar alternativas para el diseño de fluidos de perforación base agua como sustitutos para los fluidos base aceite que se consideran como peligrosos para el ambiente (Bleir *et al.* 1992; Crews y Malachosky, 1993; León Fajardo *et al.* 1995). Los fluidos de perforación base agua son una alternativa atractiva, ya que se reducen la

concentración de sustancias orgánicas empleadas, lo que resulta en menor concentración de residuos descargados. La reducción en el contenido de materia orgánica aunado con la mayor disponibilidad de oxígeno y la biodiversidad en el ambiente, ofrecen condiciones más favorables para la asimilación de las sustancias orgánicas descargadas (Stamatakis *et al.* 1996).

La información acerca de la biodegradabilidad aerobia de los aditivos empleados en los fluidos de perforación, es una herramienta muy útil para apreciar el impacto de las actividades de descarga de fluidos en el ambiente del Mar del Norte (Jarrett, 1995). En esta región las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida se realizan desde 1993, siendo Holanda el primer país en adoptar la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301 D o prueba de la botella cerrada, para fluidos de perforación. (Bland *et al.* 1993). Las pruebas de biodegradabilidad se están haciendo un requisito indispensable en Europa, como respuesta a la preocupación por la persistencia en el ambiente de los fluidos base aceite y la descarga al mar que durante muchos años se realizó de los recortes impregnados con fluidos de perforación, por ejemplo Chaineau *et al.* (1995), demostraron la biodegradabilidad de recortes impregnados con fluidos de perforación base aceite después de 270 días de etapa experimental y caracterizaron las bacterias y hongos responsables del proceso.

Las agencias de gobierno están conscientes del daño potencial que pueden ocasionar los fluidos de perforación y la descarga de los recortes generados durante la perforación de pozos. Por ello, las regulaciones para la protección del ambiente se han vuelto más restrictivas tanto en las operaciones en tierra como costa afuera, particularmente en los Estados Unidos de Norteamérica, el Mar del Norte y el Adriático (Jachnik, 1994).

Aunque se alcanzó un acuerdo general entre los países miembros de la Comisión de París y Oslo (OSPARCOM) en 1994 con respecto a la aplicación de pruebas para aprobar el uso y descarga de los fluidos de perforación, existen aún dudas acerca de las pruebas diseñadas para evaluar la toxicidad, biodegradación y bioacumulación (Reid *et al.* 1993). El creciente interés en la aplicación de pruebas de biodegradabilidad es consecuencia de las controversias respecto a datos experimentales no muy claros, donde no se especifica la duración de la prueba, nivel de

degradación obtenido, protocolo de prueba empleado y las características de los organismos que realizaron el proceso. Lo anterior genera confusión en cuanto a cuáles productos son biodegradables, ya que los resultados de velocidad de degradación e impacto ambiental llegan a variar de manera dramática (Bland *et al.* 1993; Slater *et al.* 1995; Jones y Leuterman, 1996; Garland *et al.* 1998). Un ejemplo de esta situación también fue señalado por Vik *et al.* (1996) con la evaluación de los fluidos de perforación sintéticos.

Entre las autoridades del Mar del Norte se tiene la opinión generalizada de que la rápida degradación de los fluidos de perforación minimizará el impacto ambiental lo que permitiría la rápida recuperación del ambiente marino. Sin embargo, se ha observado que la degradación aerobia en un área muy localizada permite el establecimiento de un ambiente anóxico en los sedimentos marinos, que inmediatamente tendría un impacto negativo en la fauna béntica (Jones y Leuterman, 1996). Otro argumento es que aunque las sustancias sean relativamente no tóxicas, los intermediarios metabólicos o cualquier otro constituyente del fluido pueden no serlo. Por lo tanto, la preocupación final con respecto al uso de los fluidos de perforación debería estar enfocada su potencial impacto ambiental más que a su destino (Garland *et al.* 1998), por lo que actualmente se incluye la evaluación de efectos a largo plazo derivados de la biodegradación del fluido y su posible bioacumulación en el ambiente que van a estar determinadas por las características químicas de la sustancia y su concentración en el ambiente.

## **2.2. Aspectos generales sobre biodegradación**

En los últimos años la contaminación ambiental se ha convertido en un tema de preocupación y polémica generalizada en cuanto a sus causas, impacto social y consecuencias a mediano y largo plazo. El avance tecnológico, industrial y agropecuario ha sido uno de los causantes de la aparición de nuevos agentes contaminantes. Un gran número de ellos, particularmente aquellos estructuralmente relacionados con compuestos naturales, son fácilmente degradados por los microorganismos del suelo y agua. Sin embargo existen los llamados compuestos xenobióticos, que incluyen en su composición elementos estructurales nuevos o sustituyentes raramente

encontrados en la naturaleza, que son catabolizados lentamente y tienden a persistir y acumularse en el ambiente (Atlas, 1993b; Albert *et al.* 1995).

De acuerdo con Albert *et al.* (1995), Madsen (1996) y Manahan (1998), se denomina biodegradación a la descomposición de la materia orgánica natural o sintética causada por la acción de los microorganismos para obtener moléculas más simples. En consecuencia, la biodegradabilidad es la capacidad o susceptibilidad de una sustancia, para ser alterada por la acción microbiana. Dicha biotransformación implica un proceso mediante el cual un compuesto previamente absorbido por el organismo es modificado, generándose productos que pueden ser excretados o reabsorbidos. Los mecanismos involucrados en la interacción microorganismos-sustrato son (Madsen, 1996):

- ❖ Ataque enzimático (enzimas intra y/o extracelulares) al sustrato que permite emplearlo como fuente de carbono, nitrógeno, otros nutrimentos o aceptor final de electrones.
- ❖ Ataque enzimático que es benéfico porque tiene un propósito protector (por ejemplo, la movilización del mercurio tóxico lejos de la vecindad de las células).
- ❖ Ataque enzimático que no rinde un beneficio detectable al microorganismo (el cometabolismo)
- ❖ Las reacciones no enzimáticas derivadas de los subproductos microbianos que causan cambios químicos (consumo de oxígeno, subproductos de fermentación o alteraciones del pH)

Pitter (1976) y Manahan (1998) reconocen que los factores que determinan la biodegradabilidad de las sustancias pueden ser divididos en tres grupos:

- ❖ **Parámetros fisicoquímicos:** Temperatura, solubilidad, grado de dispersión del compuesto en el medio, pH y oxígeno disuelto.
- ❖ **Características químicas:** Largo de la cadena, clase, número y posición de los sustituyentes en la molécula, estereoquímica y tonicidad del medio.

- ❖ **Características biológicas:** Origen del cultivo microbiano, edad, tiempo y forma de adaptación, tolerancia a la toxicidad del compuesto de prueba y efecto de otros sustratos.

Típicamente, en el caso de tratamiento de aguas residuales, un estimado de la capacidad de ser biodegradadas se obtiene a partir de la relación  $DBO_5/DQO$ . A partir del cálculo de esta razón de proporcionalidad es posible clasificar, *a grosso modo*, dentro de una escala convencional si la o las sustancias a depurar son o no fácilmente biodegradables, o bien, si presentan características que determinan su recalcitrancia y/o toxicidad para los microorganismos responsables de llevar a cabo el proceso de depuración (Eckenfelder y Grau, 1992). El valor obtenido de esta relación puede ser entre 0 y 1: mientras más cercano se encuentre de la unidad indica una alta existencia de compuestos biodegradables y en consecuencia una mayor posibilidad de ser depurada por métodos biológicos. En consecuencia, mientras más pequeño sea dicho valor, el contenido de contaminantes será menos biodegradable y por lo tanto los tratamientos de tipo fisicoquímico serán más recomendables. Convencionalmente, para clasificar los efluentes líquidos residuales, se han adoptado las siguientes relaciones:

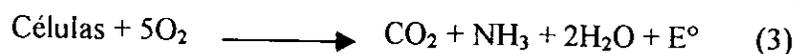
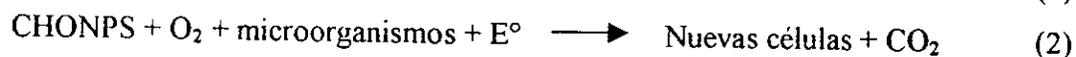
- ❖  **$DBO_5/DQO > 0.4$ :** Es biodegradable, se puede emplear un sistema biológico con organismos floculados o fijos en un lecho, tanto aerobios como anaerobios.
- ❖  **$0.2 < DBO_5/DQO < 0.4$ :** Es medianamente biodegradable, se recomienda emplear lechos bacterianos tanto aerobios como anaerobios.
- ❖  **$0 < DBO_5/DQO < 0.2$ :** Es muy poco o no biodegradable, no es adecuado y/o factible utilizar métodos biológicos para el tratamiento. Por lo tanto, es conveniente emplear métodos fisicoquímicos.

Cabe señalar que no obstante que la relación  $DBO_5/DQO$  resulta importante en la selección del tipo de tratamiento a utilizar, la concentración de contaminantes presentes constituye otro factor importante. Al respecto, Eckenfelder y Grau (1992) señalan que para concentraciones mayores a 1000 mg $DBO_5/L$ , es preferible, desde el punto de vista técnico-económico, que sean tratadas por medio de sistemas anaerobios y para concentraciones por debajo de los 1000 mg $DBO_5/L$ , que sean tratadas en sistemas aerobios.

Los procesos de biodegradación pueden agruparse en dos categorías (Pagga, 1997):

- ❖ **Biodegradación primaria:** Implica pequeñas alteraciones en la estructura química del compuesto, debida a la acción de los microorganismos que resulta en la pérdida de propiedades específicas de la sustancia.
- ❖ **Biodegradación última:** Este término se aplica cuando el compuesto orgánico es totalmente utilizado por los microorganismos y da como resultado dióxido de carbono, agua, sales minerales y biomasa.

La biodegradación aerobia se lleva a cabo en ambientes con suficiente aireación, en los cuales se busca mantener una concentración de oxígeno molecular libre disuelto de al menos 2 mg/L. Los principales productos de este proceso son dióxido de carbono, agua (debido a la reducción de oxígeno molecular) y biomasa microbiana (Tórtora *et al.* 1992; Manahan, 1998). Durante los procesos de biodegradación aerobia, los microorganismos utilizan el oxígeno de acuerdo con las siguientes reacciones:



La reacción (1) corresponde a la actividad catabólica u oxidación de compuestos orgánicos complejos durante la cual se produce energía. La reacción (2) describe la actividad anabólica o parte de construcción del metabolismo en donde se utiliza la materia orgánica y la energía producida durante el catabolismo para producir nuevas células. Por último, la reacción (3) representa la respiración endógena o sea el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos cuando el sustrato ha sido degradado.

Las ventajas de la biodegradación incluyen la mineralización parcial o total del contaminante y el hecho de que las reacciones enzimáticas mediadas por microorganismos son en general, más rápidas que las realizadas en su ausencia (Atlas y Bartha, 1993). Sin embargo el éxito de este tipo

de procesos depende de conocer las condiciones óptimas de biodegradación para cada tipo de contaminante (Alexander, 1981; Manahan, 1998). Por lo tanto, es necesario considerar las principales dificultades técnicas para estos procesos que están relacionadas con limitantes en la velocidad de degradación y el carácter recalcitrante del contaminante.

La recalcitrancia es un término relativo e implica que un compuesto orgánico resiste su reciclaje mediante la mineralización. Los enlaces carbono-cloro de compuestos halogenados, los poliaromáticos poco solubles en agua, el carácter lipófilo de los organoclorados que coadyuva a su bioacumulación y los enlaces fósforo-éster en el caso de los organofosforados, son ejemplos de compuestos recalcitrantes (Alexander, 1981; Bouwer y Zehnder, 1993).

Ahora bien, de acuerdo con Bartha (1990) y Manahan (1998) la recalcitrancia no es exclusiva de las sustancias xenobióticas, por ejemplo la lignina, la melanina y la pared celular de los granos de polen son de biodegradación lenta. Adicionalmente, algunas sustancias recalcitrantes no necesariamente son tóxicas para los microorganismos, sino que sencillamente son menos susceptibles de ser atacadas por enzimas. A continuación se enumeran las condiciones que determinan la recalcitrancia:

- ❖ Potencial redox inadecuado, temperaturas desfavorables y/o valores extremos de pH (Bouwer 1992; Crews *et al.* 1993; Zitomer y Speece, 1993). Ausencia de microorganismos adecuados.
- ❖ Balance de nutrientes inorgánicos desfavorable. La concentración disponible de oxígeno, fósforo y/o nitrógeno puede disminuir si dos o más compuestos son rápidamente biodegradables. La presencia de microorganismos que utilizan los mismos nutrientes inorgánicos para metabolizar otros sustratos orgánicos disponibles origina competencia por uno o varios de estos nutrientes que puede afectar la velocidad de degradación del contaminante de interés (Schmidt y Alexander, 1985). Sin embargo, la adición de nutrientes inorgánicos no siempre estimula la biodegradación, sobre todo si existen otros factores que pueden por sí mismos suprimir la actividad microbiana o interactuar con la limitante de nutrientes (Steffensen y Alexander, 1995).

- ❖ Concentraciones de sustrato muy altas o muy bajas (Alexander, 1981). Utilización preferencial de otros sustratos (diauxia) debido a que los ambientes contaminados muy rara vez presentan un sólo tipo de contaminante orgánico (Schmidt y Alexander, 1985).
- ❖ Inhibición por un segundo compuesto (Wiggins y Alexander, 1988) o conversión de la sustancia a un producto tóxico (Murakami y Alexander, 1989).
- ❖ Reducción de la biodisponibilidad del contaminante de interés, ya sea por adsorción o por insolubilidad en agua (Gutiérrez-Rojas, 1997).
- ❖ La polimerización y formación de complejos, pueden originar una sustancia recalcitrante, aunque en un principio no lo fuera. Las estructuras poliméricas al azar ocasionan que los microorganismos requieran sintetizar muchas enzimas catabólicas y que cada una de ellas pueda llevar a cabo solamente una transformación limitada del polímero, lo que convierte al proceso en muy lento e ineficiente (Bouwer y Zehnder, 1992; Manahan, 1998).

### 2.3 Pruebas de biodegradabilidad

Las pruebas de biodegradabilidad tienen como objetivo simular, en un ambiente controlado de laboratorio, el proceso de biodegradación que ocurre en la naturaleza (Bland *et al.* 1993; Slater *et al.* 1995; Madsen, 1996; Pagga 1997). El método clásico para demostrar la biodegradabilidad de una sustancia consiste en incubar una solución o suspensión de la misma en un medio mineral con un inóculo microbiano, bajo condiciones ambientales controladas, durante un lapso determinado (usualmente 28 días). Para llevar a cabo una prueba de biodegradabilidad se requiere una serie de matraces cuyas características se indican a continuación:

- ❖ **Sustancia de prueba:** Contiene una dilución de la sustancia de prueba con una concentración de 100 mg COD/L en el medio mineral y un volumen determinado de inóculo (equivalente al 10% del volumen total del matraz empleado).
- ❖ **Control de inóculo:** Es necesario para obtener los valores absolutos de concentración de carbono orgánico disuelto y porcentaje de biodegradación, su valor debe restarse de los obtenidos en los matraces con sustancia de prueba.

- ❖ **Control de procedimiento:** Evalúa el desarrollo de la prueba y la viabilidad del inóculo. Incluye una sustancia de referencia cuya biodegradabilidad es conocida, por ejemplo: benzoato de sodio, acetato de sodio o anilina. Éste debe alcanzar al menos un 50% de remoción vía COD para que la prueba sea considerada válida. Un porcentaje menor del 50% en 5 días es indicativo de actividad microbiana insuficiente (Bland *et al.* 1993), lo que obliga a descartar los resultados obtenidos.
- ❖ **Control de toxicidad:** El porcentaje de remoción de COD debe ser al menos igual al obtenido en el control de procedimiento (Bland *et al.* 1993). En caso de que fueran más bajos o nulos se concluye que la sustancia de prueba es tóxica para los microorganismos o suprime su actividad. Si ello ocurre, se recomienda emplear en los ensayos subsecuentes una concentración menor de la sustancia de prueba.
- ❖ **Control de degradación abiótica:** Evalúa la posible degradación abiótica (fotodegradación, oxidación química, dilución, etcétera) de la sustancia de prueba. Este control no incluye inóculo y es esterilizado ya sea por filtración en membrana (0.45  $\mu\text{m}$ ) o por adición de una sustancia tóxica, por ejemplo  $\text{HgCl}_2$  al 1% (León *et al.* 1998).
- ❖ **Control de adsorción:** Evalúa si el compuesto de prueba es adsorbido a las superficies, especialmente cuando se utiliza un inóculo de lodos activados. Su composición es similar al control de degradación abiótica, pero con inóculo.

El monitoreo de la prueba es realizado a intervalos de tiempo frecuentes que permitan identificar, tanto el principio como el final del proceso y puede incluir la determinación de crecimiento celular, descenso en la concentración de sustrato, consumo de aceptores finales de electrones y producción de metabolitos secundarios o productos finales de degradación (Madsen, 1996). La tabla 2 presenta una relación comparativa de los principales métodos empleados para cuantificar la biodegradación.

En general, las pruebas de biodegradabilidad pueden clasificarse en tres grandes grupos. La tabla 3, presenta una breve descripción de dicha clasificación.

Tabla 2. Métodos para cuantificar la biodegradación de sustancias orgánicas

Método	Ventajas	Desventajas
Directos (Concentración del compuesto original)	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Permiten cuantificar la desaparición del compuesto original</li> <li>❖ Es factible determinar la concentración de los metabolitos formados durante el proceso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Mayor inversión de tiempo y dinero para las determinaciones</li> <li>❖ Únicamente cuantifican la biotransformación inicial y no la total mineralización del compuesto</li> <li>❖ Para la interpretación de resultados, otros mecanismos de remoción como la adsorción del compuesto a la biomasa, la fotólisis, entre otros, deben ser cuidadosamente controlados y tomados en cuenta</li> </ul>
Indirectos (Bioconversión del compuesto original)	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Métodos relativamente fáciles y con posibilidades de automatización</li> <li>❖ Generan información de la biodegradabilidad máxima del compuesto, ya que cuantifican cualquier subproducto, residuo o intermediario presente en el medio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ <b>COD (Carbono orgánico disuelto):</b> No puede ser empleado cuando la sustancia es insoluble en el medio. Asimismo, mide a la vez sustrato, intermediarios y metabolitos, lo que impide conocer la distribución final del carbono</li> <li>❖ <b>DBO (Demanda bioquímica de oxígeno):</b> Puede haber interpretación errónea de los resultados. Por ejemplo el O<sub>2</sub> puede ser consumido durante la oxidación biológica del etanol a ácido acético sin registrarse cambios en la concentración de COD</li> <li>❖ <b>CO<sub>2</sub> (Producción de dióxido de carbono):</b> El CO<sub>2</sub> total producido representa la mineralización del sustrato; sin embargo, hasta un 20% del carbono del sustrato es incorporado a la biomasa dependiendo de las condiciones de inoculación. Su cuantificación a partir de su captura en trampas alcalinas, no refleja la producción real, debido a la acumulación de formas inorgánicas de carbono que causan un retardo en las curvas de producción de CO<sub>2</sub></li> <li>❖ <b>Incremento de biomasa:</b> Un cambio en el número de microorganismos normalmente se correlaciona con cambios en la cantidad de biomasa y la actividad. Debido a los ciclos de vida y/o disponibilidad de nutrientes, el tamaño y/o peso de las células microbianas puede cambiar. En esta situación, la biomasa puede incrementarse o disminuir sin un cambio en el número de microorganismos</li> </ul>

Tomado de: Means y Andersen (1981); Grady (1985); Chudoba *et al.* (1992); Slater *et al.* (1995); Madsen, (1996); Govind *et al.* (1997); Pagga (1997) y Vázquez-Rodríguez *et al.* (1999a)

**Tabla 3. Clasificación general de las pruebas de biodegradabilidad aerobia**

Nivel	Objetivo	Características generales	Interpretación
<p>Nivel cero: Biodegradabilidad rápida</p>	<p>Evaluar la facilidad con que una sustancia puede ser mineralizada bajo condiciones experimentales estrictas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ La sustancia de prueba es la única fuente de carbono y energía disponible</li> <li>❖ Se utiliza un inóculo de baja concentración celular que no haya tenido contacto previo con la sustancia de prueba</li> <li>❖ Oportunidad limitada de que ocurra la aclimatación del inóculo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Un resultado positivo, ya sea 70% de remoción de materia orgánica medida como COD, o bien un 60% del correspondiente al valor de DTO o de producción de CO<sub>2</sub>, en un lapso de 28 días, permite suponer que la sustancia evaluada podrá ser biodegradada rápida y completamente en el ambiente</li> <li>❖ Deben considerarse los factores fisicoquímicos y microbiológicos del sitio, así como el flujo de la sustancia en estudio, ya que pueden generarse subproductos más tóxicos o bien, depósitos de sustancias peligrosas dentro del ecosistema</li> <li>❖ Un porcentaje bajo de biodegradación no necesariamente significa que la sustancia evaluada no sea biodegradable, sino que las condiciones experimentales no fueron las adecuadas para ello</li> </ul>
<p>Nivel uno: Biodegradabilidad intrínseca</p>	<p>Evaluar la biodegradabilidad al proporcionar condiciones ambientales que la promueven</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Permiten la exposición prolongada de la sustancia de prueba/microorganismos; por lo tanto, hay una mayor posibilidad de que ocurra la adaptación del inóculo</li> <li>❖ Relación biomasa/sustancia de prueba más equilibrada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Un resultado positivo indica que la sustancia no permanecerá indefinidamente en el ambiente, o que desaparecerá rápidamente en plantas de tratamiento con microorganismos adaptados</li> <li>❖ No puede suponerse que la cinética de biodegradación ocurrirá de la misma manera en el sitio contaminado, ya que no necesariamente fueron proporcionadas las condiciones del sitio</li> <li>❖ Si existe evidencia de que la biodegradación no se llevó a cabo de la manera esperada, conviene considerar el posible efecto de subproductos que pueden inducir inhibición</li> </ul>
<p>Nivel dos: De simulación</p>	<p>Información acerca de la cinética de biodegradación bajo condiciones ambientales específicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Las pruebas se dividen de acuerdo al lugar que simulan ser: tratamiento biológico aerobio, río, lago, estuario, etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Los resultados sientan las bases para el cálculo de concentraciones dentro del ecosistema, por lo que es necesario validar el modelo empleado para la simulación del sitio en estudio (por ejemplo, para sustancias que se producen en grandes cantidades puede ser necesario como paso final en la evaluación, simular las condiciones de una planta de tratamiento de aguas)</li> <li>❖ Debe conocerse la distribución de la sustancia en el ambiente, así como su toxicidad potencial.</li> </ul>

Tomado de Grady (1985); (OECD) 1992a; Kilroy y Gray (1995); Pagga, (1997) y Vázquez-Rodríguez *et al.* (1999a)

Una vez visualizada la ubicación de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida (PBAR), dentro de la clasificación general de las pruebas de biodegradabilidad y dada su importancia para el desarrollo del presente trabajo, se ampliará la información sobre las mismas.

### **2.3.1 Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida (PBAR)**

Varios organismos internacionales han creado metodologías para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de compuestos orgánicos; entre las que se pueden citar:

- ❖ "Guidelines for Testing of Chemicals. Sección 3: Degradation and bioaccumulation" (OECD, 1992).
- ❖ "Water Quality. Evaluation in an aqueous medium of the " ultimate " biodegradability of organic compounds. International Standard Organization (ISO, 1994).
- ❖ "Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3110 Ready Biodegradability". EPA (<http://www.epa.gov/epahome/research.htm>).

En particular, el Grupo de Expertos de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD por sus siglas en inglés) recomienda para evaluar la biodegradabilidad aerobia rápida de sustancias orgánicas, los métodos clasificados como OECD 301 para agua dulce y los métodos OECD 306 para agua marina. Estos métodos están diseñados para sustancias solubles en agua, no volátiles, sin adsorción a superficies (vidrio) y que no ocasionen efectos inhibitorios sobre la población microbiana. De igual manera, es deseable conocer la estructura química o fórmula de la sustancia ensayada, con objeto de contar con una base de cálculo para el porcentaje de biodegradación alcanzado a través del tiempo, lo cual evidentemente no es posible de realizar en muestras con multisustratos en concentraciones variadas (Mao y Smith, 1995). De ahí la necesidad de adaptar las metodologías de evaluación para sustancias que no cumplan con alguno de estos requisitos.

En la tabla 4, se presentan algunas características generales de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida (Grady, 1985; OECD, 1992; Bland, *et al.* 1993; Madsen, 1996; Pagga, 1997).

**Tabla 4. Comparación cualitativa general entre pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida (OECD, 1992)**

Semejanzas	Diferencias
Las pruebas son aplicables a una gran variedad de compuestos orgánicos	La concentración de la sustancia de prueba
La sustancia de prueba se encuentra a baja concentración, es la única fuente de carbono disponible y es expuesta a una biomasa relativamente baja en concentración	Diferentes concentraciones de algunos elementos en el medio mineral.
El seguimiento de la cinética de degradación no requiere métodos analíticos específicos	El método analítico requerido para seguir el curso de la cinética de biodegradación
Se emplea un inóculo mixto. En el caso de los inóculos procedentes de lodos activados, se recomiendan algunos métodos para su preparación como son la decantación, la aeración (sin un sustrato suplementario) y la aclimatación (precultivo con una fuente de carbono fácilmente asimilable)	Origen del inóculo (lodos activados, aguas superficiales, aguas residuales domésticas, aguas municipales, sobrenadante de suelo de jardín, etcétera)
Su duración está estandarizada a 28 días, con el fin de obtener resultados comparables. Si en este tiempo la biodegradación ha comenzado pero no se alcanza una meseta, se recomienda continuar hasta los 42 días	
No debe permitirse la preadaptación del inóculo a la sustancia de prueba, ya que ello implicaría la obtención de datos inadecuados para evaluar la biodegradabilidad rápida de éste	

La aplicación de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida presenta como desventaja la obtención de resultados difíciles de extrapolar a pruebas de campo, debido a que las condiciones de ensayo pueden no ser similares a las del ambiente del que proviene la muestra. Las pruebas de campo son influidas por muchos otros factores difíciles de predecir y controlar. Existen referencias en la literatura (Blok, 1994b; Struijs y Van den Berg, 1995) que demuestran la validez de la extrapolación de los resultados de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida a estudios de campo. Las principales causas que determinan la dificultad de extrapolar resultados a pruebas de campo son:

- ❖ Las condiciones ambientales específicas, esenciales para el inicio de la biotransformación de contaminantes en su medio natural.
- ❖ Existen sustancias que por ellas mismas no pueden servir como única fuente de carbono pero pueden ser degradadas por una comunidad microbiana compleja en presencia de otros sustratos. El cometabolismo implica una transformación enzimática que no reporta un beneficio directo en términos de energía o fuente de carbono para el microorganismo que la

realiza, pero indirectamente puede emplear intermediarios metabólicos que producen los microorganismos que si obtienen un beneficio (Manahan, 1998).

- ❖ El desarrollo de métodos analíticos específicos para el seguimiento de la biodegradación, debido a metabolitos intermediarios o sustancias desconocidas presentes en la muestra una vez iniciado el proceso.
- ❖ La aclimatación del inóculo, ya que los microorganismos aislados en el medio bajo estudio pueden no ser los más activos o bien, no estar presentes en el ambiente.

En la mayoría de los casos documentados en la bibliografía acerca de la biodegradación y su potencial aplicación para recuperar sitios contaminados con compuestos orgánicos (por ejemplo hidrocarburos), el proceso se lleva a cabo estimulando las actividades metabólicas de los microorganismos autóctonos (Atlas, 1993b; Madsen, 1996). Por otra parte, se han desarrollado inclusive cultivos comerciales de microorganismos degradadores de algún sustrato, en especial a partir de mezclas de especies indefinidas que fueron obtenidas de cultivos de enriquecimiento primario, las cuales probablemente no difieran significativamente en sus capacidades metabólicas con respecto a los microorganismos nativos. Se ha observado por lo tanto, que el introducir cultivos microbianos a un ambiente contaminado no siempre resulta benéfico y/o adecuado para resolver un problema de contaminación (Atlas, 1993b).

#### **2.4. El papel del inóculo en las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida**

Todas las pruebas de biodegradabilidad contemplan una serie de parámetros establecidos, estandarizados para su realización (Nyholm, 1991). Estas pruebas se basan en técnicas de cultivo de enriquecimiento (Bartha, 1990) donde se favorece la multiplicación celular de microorganismos con características metabólicas específicas. El incremento celular se logra a través del control de factores como temperatura, pH, aireación y fuente de inóculo, entre otros. La población inicial está compuesta por diversos microorganismos tolerantes a un ambiente en

particular, lo que faculta la posibilidad de acceder por varias rutas metabólicas para la biodegradación del compuesto de interés.

El origen, edad, composición, tiempo y forma de adaptación, son determinantes para el desarrollo y funciones fisiológicas adecuadas de los microorganismos. Asimismo, el crecimiento de los microorganismos está influido por una serie de factores abióticos, como: temperatura, oxígeno, pH, presión osmótica, elementos traza y factores de crecimiento y presencia de sustancias tóxicas (Tórtora *et al.* 1992; Heritage *et al.* 1996; Madsen, 1996; Brock, 1998).

De acuerdo con la literatura, los datos obtenidos a partir de pruebas de biodegradabilidad dependen del método seleccionado para el seguimiento y cuantificación de los resultados, las condiciones de prueba y los periodos de exposición (Means y Anderson, 1981; Nyhlom *et al.* 1992; Zgajnar y Zagorc 1999b). No obstante su importancia, el inóculo es de los parámetros menos controlados en estas metodologías, lo que deriva en la obtención de resultados con variación entre pruebas y laboratorios, aún cuando se emplee la misma prueba de biodegradabilidad (Blok y Booy, 1984; Painter y King, 1985; Nyholm, 1991; Vik *et al.* 1996 Zgajnar y Zagorc 1999a).

La influencia del inóculo en los resultados de biodegradabilidad está dada en parte por su origen (Nyholm *et al.* 1984), la abundancia y diversidad de bacterias vivas (Simkins y Alexander, 1984; Thouand *et al.* 1995) y su capacidad de adaptación a la sustancia de prueba (Thouand y Block, 1993) y la presencia de protozoarios (Ramadan *et al.* 1990). En las siguientes secciones se presenta una descripción pormenorizada acerca de los factores que determinan la variabilidad del inóculo empleado en las pruebas de biodegradabilidad.

#### **2.4.1. Origen y/o composición del inóculo microbiano**

La calidad o estado fisiológico de un inóculo (incluyendo la naturaleza de los sistemas enzimáticos expresados) varía de acuerdo con su origen. Por ejemplo, la calidad de un inóculo

obtenido a partir de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas dependerá de factores como los que a continuación se citan:

- ❖ El tiempo de retención celular (TRC) del sistema de tratamiento determina la velocidad de crecimiento de los microorganismos. La selección de diferentes microorganismos de acuerdo con el TRC es un fenómeno muy conocido (Osswald *et al.* 1995; Van Ginkel *et al.* 1995). Los lodos activados están compuestos por diferentes especies bacterianas y predadores (protozoarios, rotíferos, etc), que difieren en sus velocidades de crecimiento. Este hecho establece la división de la comunidad en microorganismos de crecimiento rápido y lento, cuyas proporciones son determinadas por las condiciones del sitio donde se obtuvo el inóculo. En general, los microorganismos que compiten por un sustrato no pueden coexistir, por lo tanto, en las plantas de tratamiento con bajos TRC las especies de crecimiento lento tienen poca oportunidad de desarrollarse.
- ❖ El tipo de aguas que se están tratando y la estación del año.
- ❖ La presencia de sustancias tóxicas o inhibitorias, pudiéndose inclusive presentar aclimatación a la sustancia que será sometida a la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida, por lo que los resultados obtenidos no serían del todo representativos. La aclimatación del inóculo sólo afecta la duración del periodo de adaptación que requieren los microorganismos para comenzar a degradar el sustrato, pero en sí no altera las curvas de consumo de oxígeno (Lee y Soo, 1995). Durante la aclimatación los microorganismos se adaptan a las toxinas o sustancias que ejercen un efecto inhibitorio en ese ambiente (Wiggins *et al.* 1987). Adicionalmente, se ha observado que los microorganismos aclimatados disminuyen su capacidad de degradación cuando se elimina la alimentación del tóxico al que están habituados (Buitrón *et al.* 1994).

Como ya se anotó con anterioridad, las pruebas de biodegradabilidad establecen con claridad que se debe partir de un inóculo mixto. Las pruebas de biodegradabilidad con cultivos puros sólo tienen razón de ser en casos especiales, por ejemplo, cuando el objetivo se centra en la elucidación de aspectos bioquímicos y moleculares del metabolismo de contaminantes por microorganismos previamente aislados y con actividad degradadora comprobada (Madsen, 1996; Pagga, 1997). Adicionalmente, según Grady *et al.* (1996) los parámetros cinéticos para

crecimiento y remoción de sustrato, difieren aún cuando se empleen cultivos puros. En consecuencia, las ventajas de emplear inóculos mixtos provenientes de muestras ambientales son (Block *et al.* 1992):

- ❖ Mayor eficiencia en la utilización de mezclas de moléculas orgánicas que los cultivos puros.
- ❖ Facilidad para su obtención del ambiente (ríos, aguas) o en las plantas de tratamiento de aguas residuales. No requieren de procedimientos de preparación y almacenamiento específicos. Percherancier *et al.* (1996) puntualiza que el escoger un determinado tipo de inóculo también puede estar en relación con la facilidad de obtener las muestras y su preservación en el laboratorio. Los procedimientos tradicionales de conservación de cepas puras (por ejemplo, congelamiento en glicerol) no se adaptan a inóculos naturales ya que pueden afectar la estructura original de la comunidad bacteriana (biodiversidad, diferencias en su fisiología y capacidad para volver a crecer después del período de conservación, etc).
- ❖ Se eliminan los problemas de transporte y/o distribución de un inóculo estandarizado.

Finalmente, de acuerdo con lo reportado por Block *et al.* (1992), en algunas pruebas de biodegradabilidad se ha encontrado que el origen del inóculo no constituye la principal fuente de variación de los resultados experimentales, sino que presumiblemente son las variaciones interlaboratorios relacionadas con las técnicas analíticas empleadas, la capacitación y experiencia de los analistas, entre otras. Asimismo, Percherancier *et al.* (1996) encontró que el origen del inóculo no fue significativo para la cuantificación de degradación, pero que la cinética de degradación sí sufrió cambios dependiendo de las condiciones del sitio de donde se obtuvo el inóculo.

#### **2.4.2. Densidad celular del inóculo**

El número de células empleadas o densidad celular define la velocidad de degradación del compuesto (Simkins y Alexander, 1984; Zgajnar y Zagorc, 1996), la duración de la fase lag (Chudoba *et al.* 1992; Van Ginkel *et al.* 1995) e inclusive la probabilidad de éxito en una prueba de biodegradabilidad limitada a 28 días de duración (Thouand *et al.* 1995).

En el caso de pruebas de biodegradabilidad, el tamaño real del inóculo está en función del porcentaje de microorganismos competentes presentes y la cantidad de lodo activado empleado. La calidad de cualquier inóculo también puede entenderse como la cantidad de microorganismos que específicamente pueden degradar una sustancia en particular que ha sido introducida como fuente de carbono. Esa cantidad depende a su vez del tipo de sustancia a la que ha sido expuesto (Blok y Booy, 1984).

Una manera de incrementar el número de microorganismos biodegradadores es concentrar el inóculo ya sea por centrifugación (Vázquez-Rodríguez *et al.* 1999 a; b) o por filtración antes de emplearse; otra manera es controlar el número de microorganismos biodegradadores específicos (Blok y Booy, 1984; Nyholm, 1991; Van Ginkel *et al.* 1995) iniciando la adaptación del inóculo al cultivarlo con el xenobiótico de interés tal y como lo han sugerido Buitrón y Capdeville (1995); Osswald *et al.* (1995) y Thouand *et al.* (1996). Esta última alternativa está en contraposición con los requerimientos de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida existentes (OECD, 1992a; Pagga, 1997).

Es conveniente destacar que la estimación de la densidad celular presenta algunas limitantes desde el punto de vista experimental:

- ❖ Los sólidos suspendidos totales (SST) cuantifican partículas minerales (aproximadamente 30% de la masa total de lodos activados de acuerdo con Urbain *et al.* 1993) y elementos orgánicos (microorganismos vivos y muertos) retenidos en el filtro. Una alta concentración de biomasa coadyuva a la contaminación de la muestra con bacterias muertas y carbono orgánico disuelto. Por lo tanto, la biomasa del inóculo determinada a través de la fracción de sólidos suspendidos volátiles (SSV) da muy poca información acerca de microorganismos biodegradadores específicos.
- ❖ La cuenta de heterótrofos totales en agar nutritivo sólo estima una pequeña proporción de las células vivas. De acuerdo con lo señalado por Byrd *et al.* (1991) esta cantidad oscila entre el 0.1 y 10% dependiendo del tipo de microorganismos; observación confirmada por Thouand *et al.* (1995) en pruebas de biodegradabilidad con p-nitrofenol, donde las bacterias

cuantificadas como heterótrofos totales representaron el 1% y el 7% de la cuenta total de células en el caso de inóculos obtenidos a partir de agua de río y lodos activados, respectivamente.

### 2.4.3. Relación $S_0/X_0$

El parámetro concentración inicial de sustrato ( $S_0$ ) representa la fuente de carbono y energía para la biosíntesis mientras que el parámetro concentración inicial de biomasa ( $X_0$ ) representa la fuente de consumo de carbono y energía. La cantidad de sustrato suministrado a un inóculo para una prueba cinética en un cultivo en lote, determinará cuanto cambie su estado fisiológico durante el ensayo (Chudoba *et al.* 1992). Cuando la cantidad de sustrato es muy pequeña con respecto a la cantidad de biomasa presente, se limitan los cambios en la síntesis de enzimas antes de que disminuya la concentración de sustrato, por lo que el cambio en el estado fisiológico resultará ser mínimo (Atlas y Bartha, 1993).

La relación  $S_0/X_0$  ejerce un efecto significativo en los resultados de las pruebas de biodegradabilidad debido a que determina la distribución final del sustrato de tipo carbonoso, la duración de la fase lag y los niveles de biodegradación alcanzados. De acuerdo con el estudio de biodegradabilidad aerobia de DBS de Vázquez-Rodríguez *et al.* (1999a;b), los niveles de biodegradación más altos se obtuvieron cuando se emplearon relaciones  $S_0/X_0$  más bajas en términos de  $\text{mgCOD.UFC}^{-1}$ .

La duración de la fase lag (Van Ginkel *et al.* 1995; Zgajnar y Zagorc, 1996) y el tiempo para alcanzar el nivel de degradación requerido por las pruebas OECD (Zgajnar y Zagorc, 1996) tienden a disminuir cuando se incrementa la cantidad de biomasa inoculada. Se sabe que las concentraciones bacterianas altas incrementan la probabilidad de éxito pero originan contaminación de tipo carbonoso, que debe evitarse porque el compuesto xenobiótico debe ser la única fuente de carbono y energía para limitar el cometabolismo y la modificación de la velocidad de degradación (Schmidt y Alexander, 1985).

Recientemente se ha demostrado que la relación  $S_o/X_o$  determina el comportamiento metabólico de los microorganismos (por ejemplo, remoción de sustrato, rendimiento observado durante el crecimiento y desacoplamiento energético). Altas relaciones  $S_o/X_o$  favorecen preferencialmente las rutas anabólicas sobre las rutas catabólicas (Liu 1996; Liu 1998; Liu 2000). Esta observación indica que la relación  $S_o/X_o$  puede regular las rutas metabólicas, cuando en el medio existe suficiente sustrato.

Obviamente las rutas metabólicas también determinan la distribución final del carbono orgánico disuelto. De acuerdo con Chudoba *et al.* (1992), la cantidad de sustrato oxidado por unidad de biomasa sintetizada es mayor para una respuesta de crecimiento (entendido como el transporte de sustratos extracelulares y su oxidación dentro de la célula ya sea para obtener energía o para biosíntesis celular), es decir con una relación  $S_o/X_o$  baja. En contraste, en cultivos con una relación  $S_o/X_o$  alta, se verifica una respuesta de acumulación (transporte de sustratos y la oxidación de una pequeña porción para obtener energía y realizar la síntesis de polímeros de reserva).

#### **2.4.4. Estandarización del inóculo**

La estandarización del inóculo en las pruebas de biodegradabilidad (OECD, 1992a) está basada en criterios volumétricos, que permiten amplia variación en el tamaño real del inóculo y su composición. De acuerdo con la información expuesta en las secciones anteriores, la elección de un parámetro que permita la estandarización del inóculo es un punto que se debe evaluar cuidadosamente. Al no contar con un inóculo estandarizado los resultados de una prueba de biodegradabilidad pueden no ser representativos y/o reproducibles, por lo que es imprescindible uniformizar el procedimiento de su obtención (Thouand *et al.* 1996).

La estandarización del inóculo proporcionaría un parámetro de comparación entre los diversos métodos para evaluar la biodegradabilidad (Grady, 1985), pero a la vez representa una condición restrictiva a la biodegradación. Por ejemplo, al estandarizar el origen y/o composición del inóculo se reduce significativamente el número de especies presentes dentro del sistema y podría no

contarse con poblaciones diversas desde el punto de vista metabólico, por lo que es recomendable el uso de un inóculo mixto ya que el potencial genético de este último es mayor que el de un cultivo puro (Grady, 1985; OECD, 1992a).

El control de la relación  $S_o/X_o$  puede limitar la proporción de carbono que se acumula como biomasa, de esta manera, el escoger una relación  $S_o/X_o$  adecuada permite incrementar la cantidad de carbono mineralizado. Estas observaciones dan soporte a la noción de estandarizar las pruebas de biodegradabilidad empleando el control de la relación  $S_o/X_o$ , tomando en cuenta criterios de densidad celular (Vázquez.-Rodríguez *et al.* 1999b).

La biodegradación de contaminantes orgánicos es facilitada por enzimas durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos. El siguiente inciso proporciona información adicional sobre la estimación actividad enzimática aplicada al seguimiento de los procesos de biodegradación.

## **2.5. Actividad enzimática**

Se considera que la eficiencia de remoción de materia orgánica en sistemas de tratamiento biológico puede aumentar si se comprenden no sólo los principios físicos y/o mecánicos de su funcionamiento, sino también la ecología de los diversos microorganismos que integran la comunidad. Éstos a su vez, permitirían identificar los posibles factores que inhiben o aceleran el proceso de degradación biológica (Margulis *et al.* 1986; Atlas y Bartha, 1993). Asimismo, Lee y Soo (1995) acotan que como la descomposición de los contaminantes vía actividad microbiana es un mecanismo ampliamente difundido en el ambiente, sería muy positivo ahondar en la estimación de la actividad bioquímica desarrollada durante la degradación de contaminantes. Cabe recordar que las enzimas microbianas tienen la capacidad de actuar sobre análogos y compuestos relacionados estructuralmente de una manera más o menos eficiente además de poder procesar sus sustratos naturales.

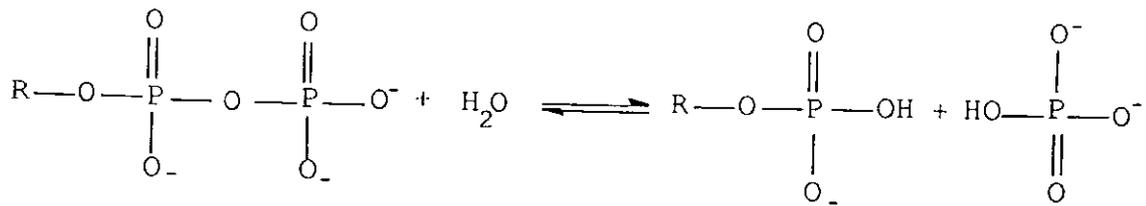
Los estudios microbiológicos en sistemas de tratamiento de aguas han tendido a enfatizar la comunidad heterotrófica cultivable, con base en métodos de aislamiento y técnicas de cultivo que pueden excluir a gran parte de los microorganismos autóctonos, debido a la intrínseca naturaleza selectiva de medios y condiciones de cultivo empleadas. Un enfoque de estudio basado en la comunidad total proveería datos más precisos, con sustento en la ecología y estructura de las bacterias heterótrofas y podría coadyuvar a eliminar los errores asociados con los métodos de cultivo tradicionales (Victorio *et al.* 1996). Entre los métodos en que se basa en esta estrategia, se encuentran los que cuantifican directamente las actividades enzimáticas, ya sea en muestras de aguas residuales y/o lodos activados (Boczar *et al.* 1992; Nybroe *et al.* 1992). Por ejemplo, los cambios en la composición de la comunidad microbiana y/o en su actividad debida a factores como la temperatura, la fuerza iónica y la composición del efluente en sistemas de tratamiento puede pasar inadvertida y alterar la operación normal de dichos sistemas, razón por la cual se ha estudiado la factibilidad de monitorearse mediante métodos enzimáticos (Victorio *et al.* 1996).

Uno de los sistemas que permiten la detección semi-cuantitativa de la actividad de enzimas hidrolíticas es el API Zym (BioMerieux). A continuación se presenta la descripción de las actividades enzimáticas permite detectar.

### **Fosfatasas y fosfohidrolasas**

Todas las formas de fosfatos poliméricos se hidrolizan a ortofosfatos en el agua. La velocidad de hidrólisis depende de varios factores incluyendo el pH (Manahan, 1998).

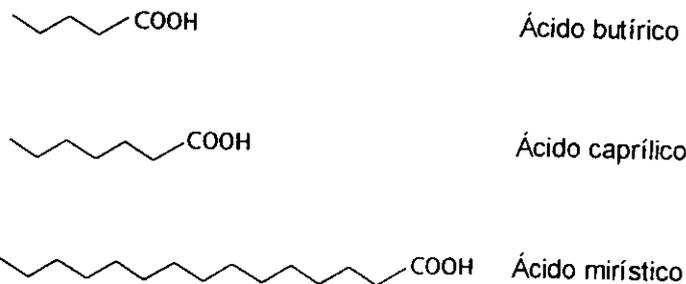
- ❖ **Fosfatasa ácida (PAC):** Es un grupo heterogéneo e inespecífico de fosfatasas que pertenecen a la clase de las hidrolasas, con pH óptimo de 4.5 a 7.0 y catalizan la hidrólisis de varios monoésteres fosfóricos para producir el alcohol correspondiente y un fosfato inorgánico.
- ❖ **Fosfatasa alcalina (PAL):** Catalizan la hidrólisis de varios monoésteres fosfóricos para producir el alcohol correspondiente y un fosfato inorgánico. Es un grupo heterogéneo e inespecífico de fosfatasas que pertenecen a la clase de las hidrolasas, con pH óptimo de 9.0 a 10.5.



- ❖ **Naftol AS-BI-fosfohidrolasa (NAFPH):** Las fosfohidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales fosfato al agua), formando los enlaces que conectan subunidades monoméricas a las macromoléculas.

### Esterasas y lipasas

- ❖ **Esterasa (EST):** Cataliza la hidrólisis enzimática del ácido butírico (C4)
- ❖ **Lipasa-esterasa (LEST):** Cataliza la hidrólisis enzimática del ácido caprílico (C6)
- ❖ **Lipasa (LIP):** Cataliza la hidrólisis enzimática del ácido mirístico (C14)

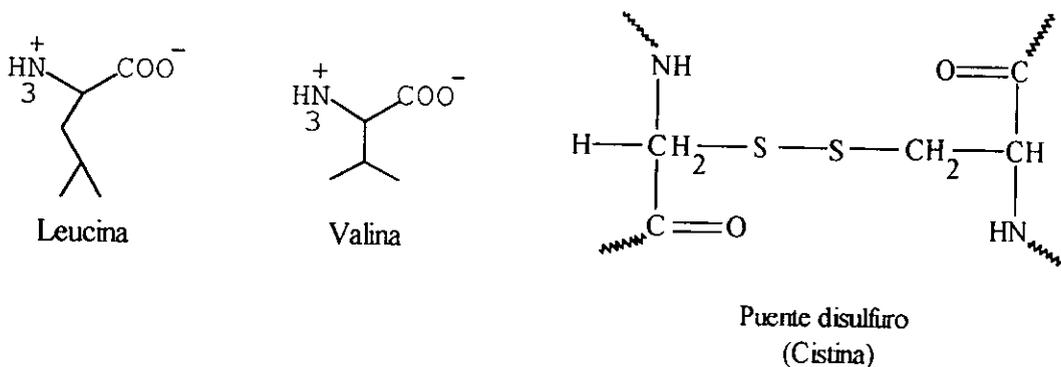


### Aminopeptidasas

Las arilamididasas catalizan la ruptura del enlace peptídico formado entre el grupo amino del sustituyente arilo del sustrato (naftilamina) y el grupo carboxilo del aminoácido correspondiente.

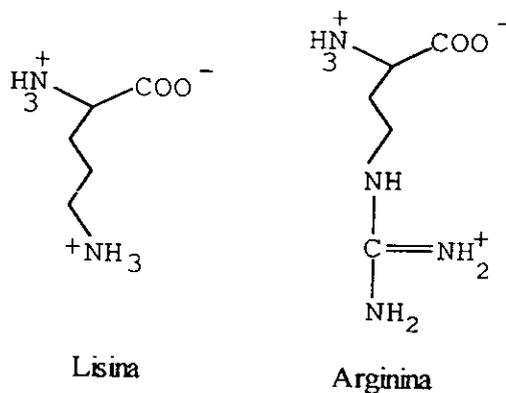
- ❖ **Leucina arilamidasa (LeuA):** El catabolismo de la leucina produce acetil-CoA y/o acetoacetil CoA; este último se convierte en acetil-CoA que entra al ciclo de Krebs. Algunos de los pasos finales de su ruta degradativa son semejantes a pasos del catabolismo de ácidos grasos.

- ❖ **Valina arilamidasa (ValA):** El catabolismo de la valina comienza por una reacción de transaminación y descarboxilación, le siguen una serie de reacciones de oxidación que convierten los cuatro carbonos restantes en metilmalonil-CoA, que se transforma en succinil-CoA, intermediario del ciclo de Krebs. Algunas partes de esta ruta de degradación, guardan estrecha relación con diversos pasos de la degradación de ácidos grasos.
- ❖ **Cistina arilamidasa (CysA):** La cistina es un aminoácido dimérico que une covalentemente mediante un puente disulfuro a dos moléculas de cisteína oxidadas. La cisteína es el principal aminoácido de la queratina. Varias bacterias del género *Bacillus*, *Streptomyces*, así como hongos saprófitos y dermatófilos poseen esta actividad hidrolítica (Böckle y Müller, 1997).

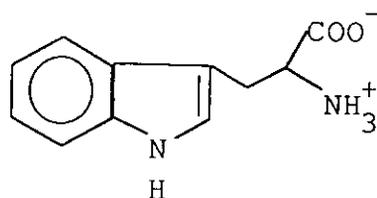


### Proteasas

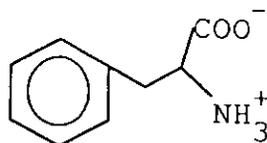
- ❖ **Tripsina (TRIP):** Cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es proporcionado por un residuo de lisina o arginina. Posteriormente, el esqueleto hidrocarbonado de arginina entra al ciclo de Krebs vía  $\alpha$ -cetoglutarato, mientras que el esqueleto hidrocarbonado de lisina produce acetil-CoA y/o acetoacetyl CoA; este último se convierte en acetyl-CoA que entra al ciclo de Krebs. Algunos de los pasos finales de su ruta degradativa son semejantes a los del catabolismo de ácidos grasos.



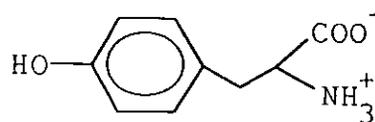
- ❖  **$\alpha$ Quimotripsina ( $\alpha$ Quim):** Cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es proporcionado por fenilalanina, triptofano o tirosina. Posteriormente, los esqueletos hidrocarbonados correspondientes producen acetyl-CoA y/o acetoacetyl CoA; este último se convierte en acetyl-CoA que entra al ciclo de Krebs.



Triptofano



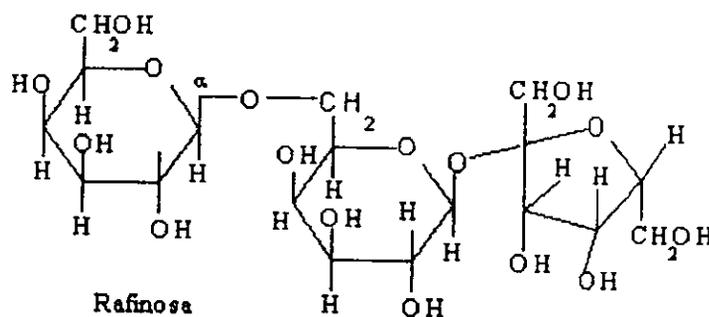
Fenilalanina



Tirosina

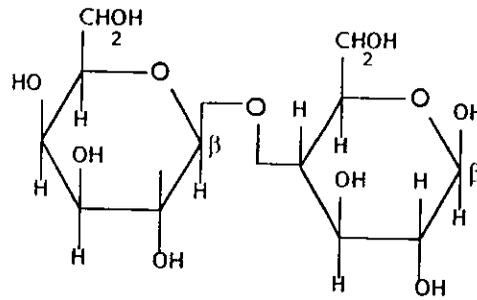
### Glucosil hidrolasas

- ❖  **$\alpha$ -galactosidasa ( $\alpha$ Gal):** Cataliza la hidrólisis los residuos de galactosa unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 en oligosacáridos como la melibiosa (galactosa- $\alpha$ -1,6-glucosa), rafinosa (galactosa- $\alpha$ -1,6-sucrosa) y algunas galactomananas poliméricas. Algunas  $\alpha$ -galactosidasas catalizan transgalactosidaciones, especialmente a altas concentraciones de sustrato. Esta enzima ha sido aislada de gran variedad de eucariotes y bacterias.



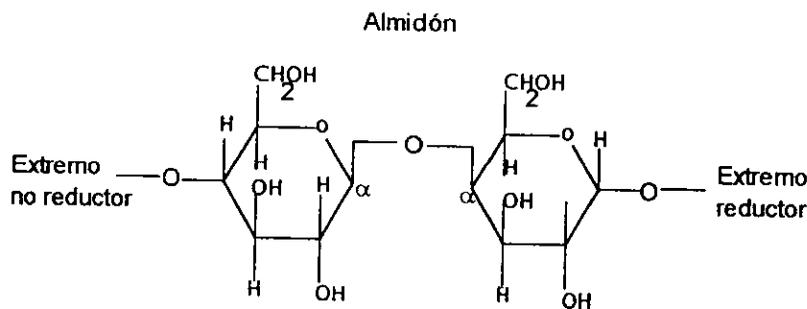
Rafinosa  
Gal- $\alpha$ -1,6-sucrosa

- ❖  **$\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ Gal):** Cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 de la lactosa en glucosa y galactosa. Ha sido encontrada en numerosos microorganismos, incluyendo bacterias gram negativas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Neisseriaceae*, varias bacterias gram positivas, hongos, levaduras y protozoarios. Existen varias técnicas para la detección de coliformes y *E.coli* como indicadores de contaminación de aguas basadas en la detección de la  $\beta$ -galactosidasa (Tryland y Fiksdal, 1998).



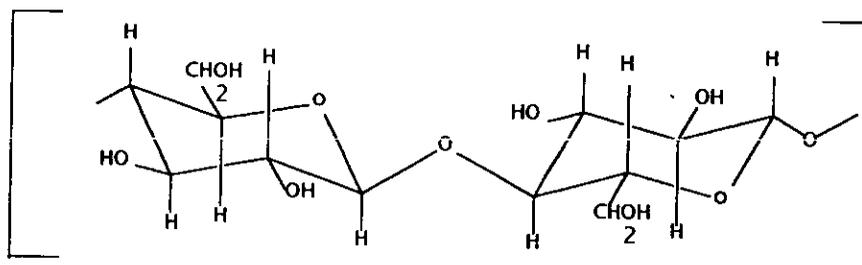
Lactosa Gal ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  4) Glc

- ❖  **$\alpha$ -glucosidasa ( $\alpha$ Glc):** Cataliza la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -glucosídicos (por ejemplo, en la amilosa para obtener unidades de D-glucosa). La amilosa es el componente no ramificado del almidón y consiste en una serie de residuos de glucosa unidos por un enlace  $\alpha$ -1,4. También puede actuar sobre los enlaces internos  $\alpha$ -1,6 del dextrano (polisacárido de reserva de las levaduras y bacterias que contiene únicamente residuos de glucosa).



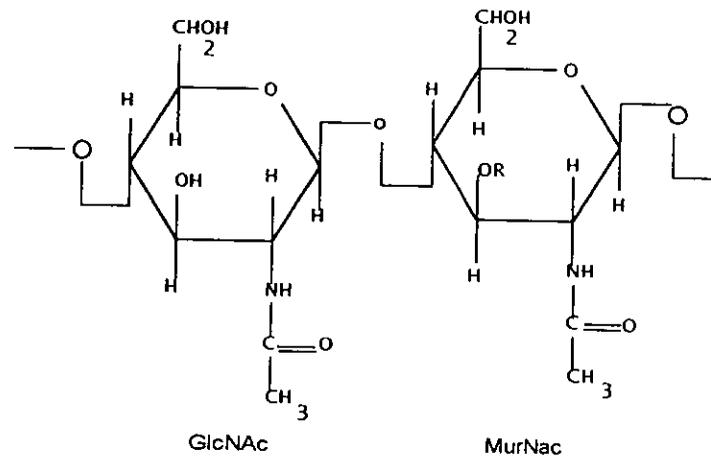
Amilosa Glc ( $\alpha$ 1  $\rightarrow$  4) Glc

- ❖  **$\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ Glc):** Es una enzima ampliamente difundida entre las bacterias, hongos y algunos protozoarios y cataliza la hidrólisis enzimática de enlaces  $\beta$ -glucosídicos (por ejemplo, en la celulosa para obtener unidades de D-glucosa). La celulosa es un polímero no ramificado de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, lo que permite la formación de cadenas muy largas.

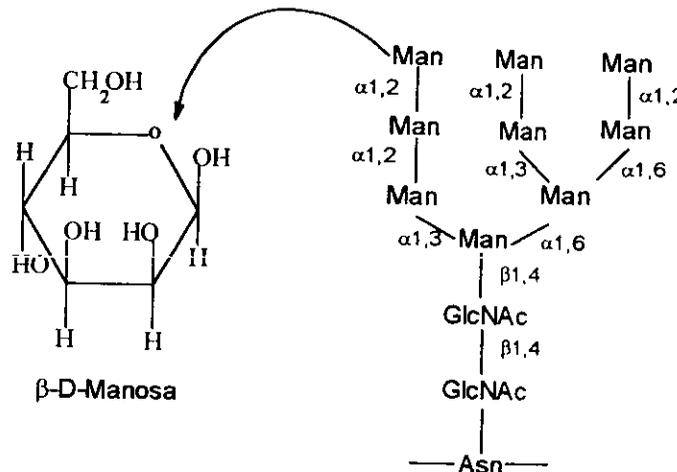


Celulosa Glc ( $\beta$ 1  $\rightarrow$  4) Glc

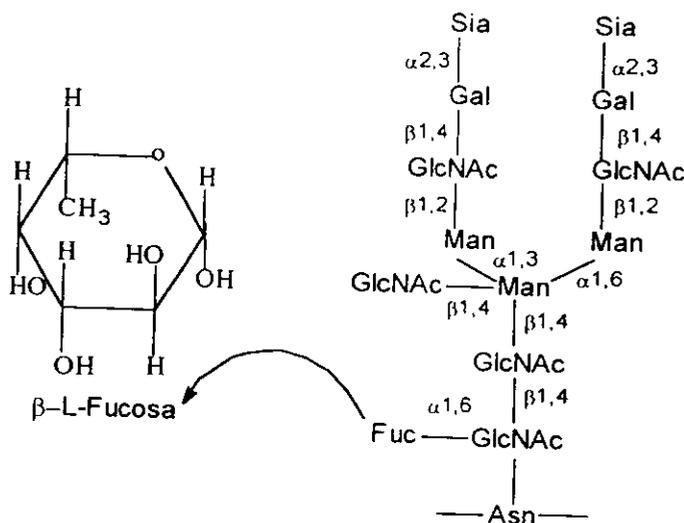
❖ **N-acetil-β-glucosaminasa (GlcNAc):** La N-acetil-β-glucosamina es un derivado de glucosamina, donde el grupo amino se encuentra condensado con ácido acético. Forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se incluyen los de la pared celular bacteriana, donde los azúcares N-acetil murámico y N-acetil glucosamina están unidos por enlaces β-1,4, formando polímeros adyacentes y entrecruzados mediante péptidos cortos, cuya estructura depende de la especie bacteriana. Por lo tanto, la N-acetil-β-glucosaminasa puede actuar para hidrolizar en enlace glucosídico.



❖ **α-manosidasa (αMan):** La manosa es una hexosa que constituye parte de la estructura de las glicoproteínas. Los oligosacáridos con uniones N-glicosídicas contienen un núcleo común, formado por tres manosas y dos N-acetilglucosaminas. Los azúcares restantes se unen a este núcleo común de maneras muy diferentes (a través de enlaces entre manosas α-1,2; 1,3 o 1,6, sobre los que podría actuar la α-manosidasa); lo que origina la amplia variedad estructural de las glicoproteínas.



- ❖  **$\alpha$ -fucosidasa ( $\alpha$ Fuc):** La fucosa es un desoxiazúcar derivado de la manosa y también constituye parte de la estructura de las glicoproteínas. En este modelo complejo se unen al núcleo de N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y L-fucosa, misma que se une a núcleo mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 y que hidroliza la  $\alpha$ -fucosidasa.



La respirometría es una técnica ampliamente difundida en el estudio de los procesos de biodegradación aerobia. Debido a su importancia para el entendimiento del presente trabajo, se hace necesaria su descripción.

## 2.6. Fundamento teórico de la respirometría

El oxígeno molecular consumido por los microorganismos aerobios, durante las pruebas de biodegradabilidad se define como demanda bioquímica de oxígeno (DBO). De acuerdo con ello, la velocidad máxima de consumo de oxígeno, es una medida directa de la actividad metabólica y constituye una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica biodegradada (APHA, 1998).

El método conocido como respirometría electrolítica consiste en determinar el consumo de oxígeno, mediante la cuantificación de la cantidad de oxígeno producido electroquímicamente

que se requiere para mantener el volumen de gas constante dentro del matraz del respirómetro o compensar las variaciones en el volumen y/o presión (o la combinación de ambos) lo cual es registrado por el respirómetro (Kilroy y Gray, 1995; Madsen, 1996). El dióxido de carbono, producto del metabolismo microbiano, es absorbido en hidróxido de potasio, cal sodada u otra sustancia similar. La cantidad de oxígeno consumida por la población microbiana, durante la biodegradación del compuesto debe ser corregida con el consumo de un blanco de inóculo corrido paralelamente. El resultado es expresado como mg de oxígeno requerido para oxidar la sustancia, mg de oxígeno requerido/mg de compuesto de prueba, o bien, mg oxígeno requerido/L de compuesto de prueba (OECD, 1992a).

El proceso que se registra en un respirómetro involucra una transferencia de oxígeno del aire a la fase líquida y por medio de reacciones bioquímicas se consume dicho oxígeno en la fase líquida. Cuando la resistencia a la transferencia de oxígeno es mayor que la reacción bioquímica, el consumo de oxígeno es función del proceso de transferencia de masa (Li y Zhang, 1996).

Young (1996) destaca las ventajas inherentes al uso de respirómetros:

- ❖ La muestra no requiere dilución, por lo que las características de consumo de oxígeno son medidas en su estado natural
- ❖ Permite el uso de grandes volúmenes de muestra
- ❖ Si la muestra se encuentra en agitación constante se promueve el contacto uniforme entre la materia orgánica, el sustrato y el oxígeno disuelto
- ❖ No se requiere el empleo de métodos titulométricos para la cuantificar la concentración del oxígeno disuelto
- ❖ Puede ser conectado a un graficador que permite la construcción de las curvas de consumo de oxígeno

Algunos autores han propuesto el uso de la respirometría como un método alternativo para la cuantificar la demanda bioquímica de oxígeno. De igual manera esta técnica ha encontrado

amplias aplicación en el estudio de los procesos de biodegradación aerobia, como los que a continuación se enumeran:

- ❖ Grady *et al.* (1989) y Ellis *et al.* (1996) determinaron parámetros cinéticos de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato con relación al tipo y concentración de sustrato, efecto de la dilución, temperatura y la presencia de sustancias tóxicas o inhibitorias.
- ❖ Bouchez *et al.* (1995 y 1997) estudiaron la cinética de degradación de 5 hidrocarburos policíclicos aromáticos por medio de la determinación continua de consumo de oxígeno empleando un respirómetro electrolítico.
- ❖ Lee y Soo (1995) emplearon técnicas respirométricas para caracterizar compuestos ampliamente utilizados en la industria química y farmacéutica, así como varios tipos de aguas residuales.

En el siguiente capítulo, se desglosarán los objetivos planteados y la estrategia de trabajo empleada para la consecución de los mismos.

## **CAPÍTULO 3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO**

### **3.1. Objetivo general**

Establecer la relevancia del uso de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para la comprensión de los resultados obtenidos de la aplicación de las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de hidratación de arcillas.

### **3.2. Objetivos específicos**

- ❖ Identificar el efecto del origen de la fuente de inóculo sobre los resultados de las pruebas de biodegradabilidad con dos tipos de inhibidores de hidratación de arcillas, empleando una relación  $S_0/X_0$  controlada.
- ❖ Determinar la relevancia del seguimiento de: carbono orgánico disuelto, pH, amoníaco, nitritos, nitratos, ortofosfatos, sólidos totales y la cuenta total de bacterias heterótrofas para el análisis del proceso de biodegradación de los dos inhibidores de hidratación de arcillas.
- ❖ Caracterizar la actividad enzimática de las tres fuentes de inóculo a lo largo de las pruebas de biodegradabilidad realizadas.

### **3.3. Estrategia de trabajo**

Con base en información bibliográfica, se seleccionaron cinco IHA para realizar una etapa experimental previa, la que permitió la selección final de dos de ellos: IHAG (base glicol) e IHAK (base amina), tomando como criterios generales la extensión de uso en México, el impacto ambiental y la disponibilidad de un sólo lote para todo el desarrollo experimental. Como criterios particulares se optó por considerar diferentes grados de toxicidad aparente y potencial de ser biodegradados.

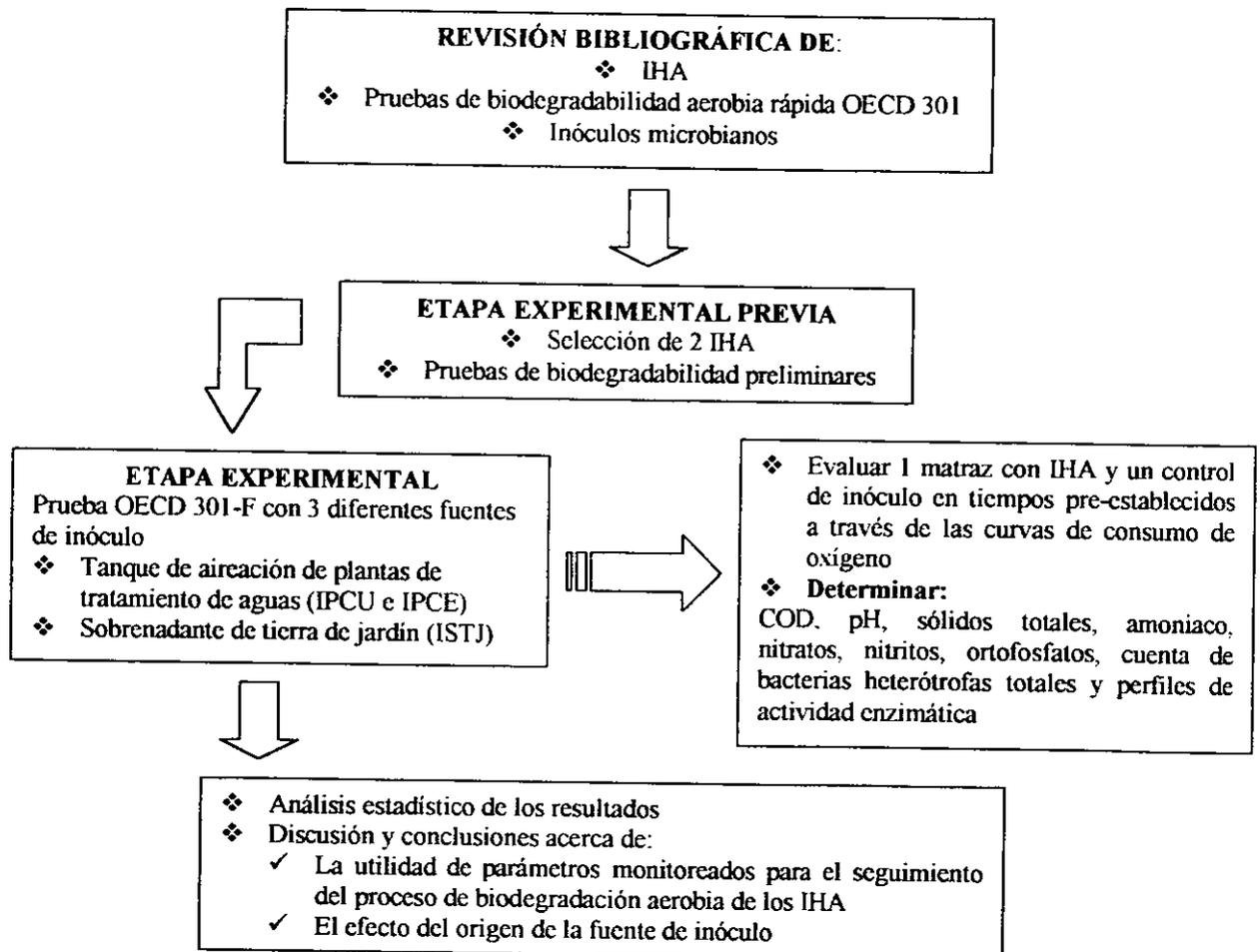
En cuanto a las PBAR se detectó que los factores difíciles de controlar son el origen, composición y densidad celular del inóculo, dependiendo de estas características, los porcentajes de biodegradación se modifican. Por este motivo, el trabajo estuvo enfocado a estudiar el efecto de tres diferentes fuentes de inóculo sobre la biodegradabilidad de IHA, ejerciendo control sobre la densidad celular inicial del inóculo y por ende, la relación  $S_0/X_0$ . La selección de dichas fuentes se realizó de conformidad con las recomendaciones de la OECD en cuanto a posibles orígenes, partiendo del supuesto de que no han estado en contacto con los IHA. Dos inóculos se obtuvieron de tanques de aireación de plantas de tratamiento de aguas tipo lodos activados, una ubicada en Ciudad Universitaria (IPCU) y otra en el Cerro de la Estrella (IPCE). El tercer inóculo fue preparado a partir del sobrenadante de tierra de jardín (ISTJ). En los tres casos es ampliamente reconocida la riqueza en cuanto a diversidad metabólica y composición de este tipo de inóculos.

Se llevaron a cabo ensayos comparativos preliminares entre las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida en la modalidad OECD 301-A (empleando botellas de flujo semiabierto) y OECD 301-F (utilizando un respirómetro automático), con uno de los IHA seleccionados. Estos ensayos se realizaron a efecto de encontrar si existía diferencia significativa entre los valores arrojados por ambas pruebas, para su posterior aplicación a lo largo de toda la etapa experimental en la evaluación de la biodegradabilidad de los 2 IHA seleccionados.

Para el montaje de las PBAR propiamente dichas se recurrió al método denominado "*Ready biodegradability. 301-F Manometric Respirometry Test*" (OECD, 1992c); debido fundamentalmente a la disponibilidad del equipo adecuado y su utilidad previamente demostrada para la realización de evaluaciones similares (Ambriz-Rivas, 1998 a y b; Armendáriz *et al.* 1998). En total, se realizaron dieciocho corridas experimentales empleando un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12; nueve corridas correspondieron al IHAK y nueve al IHAG, utilizando las 3 diferentes fuentes de inóculo. A fin de obtener resultados comparables, se determinó partir de una dilución del IHA en medio mineral con concentración cercana a 100 mg COD/L y una cuenta total de bacterias heterótrofas del orden de  $10^8$  UFC/L. El control de estas dos variables da como resultado una relación  $S_0/X_0$  del orden de  $10^{-7}$  mg COD·UFC<sup>-1</sup>. Las muestras fueron preparadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones ambientales, para reducir al máximo resultados erróneos por variables externas al proceso de biodegradación estudiado.

Se establecieron 5 tiempos de muestreo para las 6 series de PBAR. A este respecto, es importante destacar la utilidad de las curvas de consumo de oxígeno para reconocer los puntos de muestreo, ya que de acuerdo con su comportamiento (aumento en el consumo, comienzo de la estabilidad en el consumo y falta de consumo de oxígeno) se decidió en qué momento tomar las muestras. Las muestras con IHA y un control de inóculo fueron evaluadas con objeto de cuantificar el porcentaje de remoción de materia orgánica alcanzado, lo cual se realizó mediante el análisis de la concentración de carbono orgánico disuelto (COD). Adicionalmente, con objeto de obtener datos que permitieran profundizar en el análisis del proceso de biodegradación, fueron incluidas las determinaciones de pH; amoníaco; nitritos, nitratos; ortofosfatos; sólidos totales en sus tres modalidades, consumo de oxígeno, cuenta total de heterótrofos y perfiles de actividad enzimática. Los parámetros considerados estuvieron en función de los ciclos biogeoquímicos más importantes para el reciclaje de elementos esenciales para la vida y contaminantes: ciclo del carbono, del nitrógeno y del fósforo; cabe recordar que la mineralización de sustancias orgánicas a dióxido de carbono, agua, fosfatos y nitrógeno (de amoníaco) es uno de los principales requerimientos para mantener el equilibrio biológico en la naturaleza (Pitter, 1976).

Para realizar el análisis y discusión de resultados se consideraron tres corridas con duración de 7 días (IHAK) y 14 días (IHAG), como prueba triplicada para cada fuente de inóculo (IPCU, IPCE e ISTJ). Este trabajo de investigación correspondió a un diseño factorial con 2 factores: el IHA empleado como fuente de carbono y el origen de la fuente de inóculo, a 2 y 3 niveles respectivamente. Las variables respuesta fueron los valores de pH, los índices de actividad enzimática y las concentraciones de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos medidos en los diferentes tiempos.



**Figura 1. Esquema de la estrategia de trabajo**

En el siguiente capítulo se presenta la descripción pormenorizada de los materiales y métodos empleados para la evaluación de la biodegradabilidad aerobia rápida de los 2 IHA seleccionados como modelo de estudio.

## CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Estudios para la selección de los IHA y pruebas de biodegradabilidad preliminares

#### 4.1.1 Estudios para la selección de los IHA

La adquisición de muestras y la selección del tipo de IHA con los que se trabajó a lo largo del proyecto, se sujetó a la disponibilidad de información técnica básica sobre éstos (incluidos sus componentes y dosificaciones), así como a la corroboración de que dicho producto fuera de amplia utilización por parte de PEMEX Exploración y Producción. Se realizó la preselección de un grupo de IHA (tabla 5), de los cuales se seleccionaron dos para las evaluaciones de biodegradabilidad. La muestras del IHA se obtuvieron de un mismo lote de producción para realizar los diferentes estudios programados. Ello a efecto de minimizar variaciones por causa de la materia prima empleada y/o de posibles diferencias en el proceso de producción.

**Tabla 5. Relación de los IHA preseleccionados**

Producto	Tipo
IHAC	Polímero anfótero de bajo peso molecular (aldehído) soluble
IHAG	Glicol polialquénico.
IHAF	Salmuera
IHAI	Polipropilenglicol de peso molecular medio, características anfotéricas y baja densidad de carga
IHAK	Amina modificada

Para la determinación de DQO se partió de una dilución 1:250 en agua destilada para IHAK, IHAC e IHAF y 1:500 para IHAG e IHAI. Todos los análisis se realizaron por triplicado. La DBO<sub>5</sub> se realizó empleando un respirómetro automático VOITH-Sapromat B-12. El inóculo fue preparado a partir de una mezcla de agua residual doméstica proveniente de un sistema de tratamiento constituido por humedales artificiales que se encuentra en los Viveros de Coyoacán (Cauce del Río Magdalena, Ciudad de México) y del tanque de aireación de la planta de

tratamiento de Ciudad Universitaria, con el fin de garantizar una diversidad microbiana adecuada y agua de la llave para diluir. La mezcla anterior se mantuvo en un matraz sellado, a temperatura ambiente, con aireación proporcionada por una bomba y agitación a velocidad baja, durante 5 días. El inóculo fue filtrado a través papel Whatman No. 1 para eliminar partículas gruesas en suspensión. Cada matraz de reacción se conformó con 25 mL de inóculo microbiano, 15 mL del IHA (6% del volumen total, esta concentración se encuentra dentro del intervalo marcado en la literatura como el adecuado para el empleo de IHA en la formulación de los fluidos de perforación) y el volumen restante para 250 mL fue completado con MM. Las muestras se corrieron por duplicado.

Para determinar la tolerancia microbiana aparente a los IHA preseleccionados, se realizaron dos tipos de pruebas. Una prueba de contacto instantáneo empleando diluciones del IHA e inóculo similar al utilizado en las pruebas de DBO<sub>5</sub>. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (40X) y se anotó el efecto que tuvo el IHA sobre los microorganismos, fundamentalmente inhibir el movimiento de los ciliados. La segunda prueba, consistió en poner en contacto 3 mL del mismo inóculo con 1 mL de cada dilución del IHA y dejarlos a temperatura ambiente durante 24 horas. Estas soluciones se observaron al microscopio óptico (40X) para detectar la movilidad de los ciliados.

Para constatar la viabilidad de los agregados bacterianos observados en las soluciones procedentes de la prueba de contacto a 24 h, se sembraron muestras en agar nutritivo procedentes del IHA concentrado y de las diluciones 1:1000, 1:250 y 1:10 con los 5 IHA estudiados. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. A efecto de verificar que existen bacterias que pueden degradar los IHA, se preparó un medio para probar que lo utilizan como fuente de carbono, éste se compone de: agar bacteriológico: 10 g/L; NH<sub>4</sub>Cl: 1.0 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.5 g/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0.05 g/L; CaCl<sub>2</sub>: 0.5 mg/L; solución amortiguadora de fosfato de sodio/potasio 0.33 M, pH 6.8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 10 mL y 10 mL de una dilución 1:10 de la fuente de carbono elegida (Atlas, 1993a). Se inocularon cajas con algunas de las colonias que se desarrollaron en agar nutritivo y se incubaron a 35 °C hasta que fue posible observar el desarrollo de colonias a simple vista.

**4.1.2. Pruebas de biodegradabilidad aerobia preliminares**

Se realizaron PBAR siguiendo los procedimientos propuestos por la OECD 301-A y OECD 301-F (OECD, 1992b y c). Para las pruebas OECD 301-A, el MM se preparó de acuerdo a la composición descrita en la siguiente sección y se mantuvo en aireación durante un mínimo de 24 horas para asegurar que contara con la mayor concentración de oxígeno disuelto posible al momento de preparar las soluciones de prueba. La composición de las soluciones de prueba se describe en la tabla 6. La concentración final de materia orgánica medida como COD fue de 120 mg/L aproximadamente. El pH inicial de las soluciones fue de 7.2 unidades. El inóculo fue preparado a partir de una mezcla de agua residual proveniente del Río Magdalena, y tierra de jardín de casa habitación. La fase de aclimatación y su preparación fueron similares a los descritos para el inóculo empleado en las determinaciones de DBO<sub>5</sub>.

**Tabla 6. Composición de las soluciones preparadas para las PBAR OECD 301-A**

Número de botellas	Solución	Composición
4	Control de inóculo	inóculo + MM
4	Sustancia de prueba	inóculo + dilución IHAK + MM

Las PBAR OECD 301-A se realizaron empleando botellas Winkler y una incubadora orbital, bajo condiciones de temperatura (23°C) y agitación controladas (300 rpm) en ausencia de luz. En este caso, no existió un aporte de oxígeno continuo a lo largo del experimento. A cada botella Winkler se le adicionó 300 mL de la dilución pre-inoculada. Después de que fueron cerradas y colocadas en la incubadora, se proyectó sacar en tiempos pre-establecidos una botella con IHAK (0, 7, 14, 21 y 28 días) y una control de inóculo, con objeto de determinar la concentración de COD y calcular el porcentaje de remoción de materia orgánica disuelta. Para la aplicación de la prueba preliminar OECD 301-F se siguieron los procedimientos de preparación de soluciones y montaje de pruebas descritos en las siguientes secciones, empleando IPCU como fuente de inóculo. También se incluyó el monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, a efecto de implementar todas las metodologías propuestas para el seguimiento del proceso de biodegradación de los IHA seleccionados.

## 4.2. Pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-F

### 4.2.1. Preparación del medio mineral, soluciones de prueba e inóculo microbiano

El medio mineral (MM) se preparó con la siguiente composición:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  217.5 mg/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 33.40 mg/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mg/L,  $\text{CaCl}_2$  27.5 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22.5 mg/L y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.25 mg/L. Cada IHA se diluyó 1:10 con MM y a partir de éste se prepararon las soluciones de prueba. La composición de cada solución se describe en la tabla 7. Se utilizó una solución de acetato de sodio trihidratado (2000 mg COD/L) como sustancia de referencia para el control de procedimiento. Las muestras se prepararon simultáneamente y bajo las mismas condiciones ambientales, así como con el mismo inóculo, para tratar de reducir al máximo resultados erróneos por variables externas al proceso de biodegradación estudiado.

**Tabla 7. Composición de las soluciones preparadas para las PBAR**

Matraces	Solución	Pruebas con IHA	Composición
4	Control de inóculo	IHAK e IHAG	125 mL inóculo + 1125 mL MM
4	Sustancia de prueba	IHAK	125 mL inóculo + 7 mL IHAK 1:10 + 1118 mL MM
		IHAG	125 mL inóculo + 1.8 mL IHAG 1:10 + 1123.2 mL MM
1	Control de procedimiento	IHAK e IHAG	15 mL $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + 30 mL inóculo + 255 mL MM
1	Control de toxicidad	IHAK	15 mL $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + 30 mL inóculo + 1.7 mL IHAK 1:10 + 253.3 mL MM
		IHAG	15 mL $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + 30 mL inóculo + 0.4 mL IHAG 1:10 + 254.6 mL MM
1	Control de adsorción	IHAK	30 mL inóculo + 1.7 mL IHAK 1:10 + 268 mL MM + 0.3 mL $\text{HgCl}_2$
		IHAG	30 mL inóculo + 0.4 mL IHAG 1:10 + 269.3 mL MM + 0.3 mL $\text{HgCl}_2$
1	Control de degradación abiótica	IHAK	1.7 mL IHAK 1:10 + 298 mL MM + 0.3 mL $\text{HgCl}_2$
		IHAG	0.4 mL IHAG 1:10 + 299.3 mL MM + 0.3 mL $\text{HgCl}_2$

En la tabla 8 se presenta un resumen de las principales características de las tres fuentes de inóculo empleadas. El criterio tomado para su selección fue el siguiente:

- ❖ Los IPCU e IPCE se obtuvieron de tanques de aireación de plantas de tratamiento de aguas, lo que permite inferir que cuentan con alta actividad microbiana. Las aguas tratadas se pueden clasificar como mixtas, debido a que reciben descargas de tipo doméstico mezcladas con productos químicos. En este sentido, podría pensarse en cierta preaclimatación de los microorganismos a compuestos xenobióticos de características similares. Sin embargo, de acuerdo con los criterios establecidos por la OECD, el uso de este tipo de inóculos para las PBAR es el recomendado.
- ❖ A fin de contar con un inóculo adicional de valoración, se incluyó el ISTJ elaborado con tierra de jardín de una casa habitación, el cual se infiere no había estado en contacto con la cantidad de compuestos químicos con los que eventualmente si han estado en contacto los otros dos inóculos.

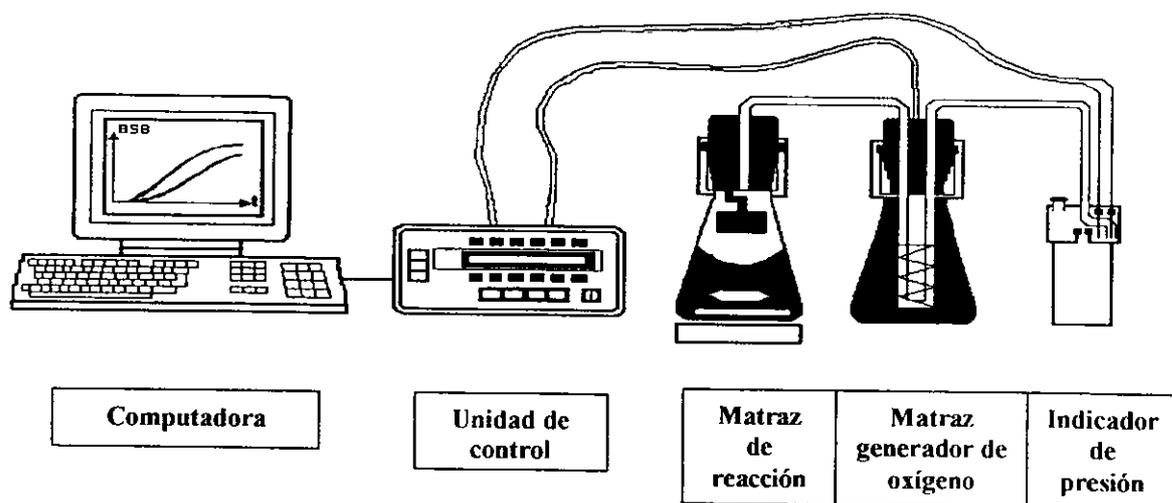
**Tabla 8. Relación de las tres fuentes de inóculo empleadas para los estudios de biodegradabilidad**

Clave	Origen	Tratamiento
IPCU	Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas de Ciudad Universitaria. Coyoacán. México D.F	Obtener la muestra 24 horas antes de su uso. 500 mL del agua residual en un matraz Erlenmeyer cerrado, a temperatura ambiente, aireación constante por medio de una bomba de acuario. Antes de ser empleado centrifugar a 500 rpm por 5 minutos
IPCE	Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas de Cerro de la Estrella. Iztapalapa. México D.F	Refrigeración a 4°C hasta 24 horas antes de su uso. 500 mL del agua residual en un matraz Erlenmeyer cerrado, a temperatura ambiente, aireación constante por medio de una bomba de acuario. Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado
ISTJ	Tierra de jardín de una casa habitación. Coyoacán, México D.F	Preparar 24 horas antes de su uso. 30 g de suelo + 600 mL de MM en un matraz Erlenmeyer cerrado, a temperatura ambiente, aireación constante por medio de una bomba de acuario. Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado

#### 4.2.2. Montaje de las pruebas empleando el respirómetro VOITH-Sapromat B-12

Los PBAR OECD 301-F se realizaron en un respirómetro electrolítico VOITH-Sapromat B-12 (figura 2), que consiste en un baño de agua con temperatura y agitación controlada (compuesto

por 12 unidades de reacción, cada una conectada a la unidad de registro), la unidad que controla la temperatura del baño de agua y la unidad de registro digital que transfiere los datos de consumo de oxígeno a una computadora para la construcción de las gráficas correspondientes. Cada unidad de reacción se compone de un matraz de reacción de 500 mL (donde se adicionan 250 mL de la muestra a evaluar) que incluye un contenedor donde se adiciona cal sodada para adsorber el dióxido de carbono producto de la actividad metabólica microbiana; la unidad de generación de oxígeno (un electrodo de platino y una solución ácida de  $\text{CuSO}_4$ ) y un indicador de presión. Los tres componentes anteriores están interconectados con mangueras formando un sistema cerrado por lo tanto, las fluctuaciones de presión barométrica no afectan los resultados. La agitación vigorosa que provee un agitador magnético en cada matraz de reacción, asegura que tanto el intercambio de gases ( $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ ) como el contacto microorganismos – sustrato sean los adecuados.



**Figura 2. Esquema de los componentes básicos del respirómetro VOITH-Sapromat B-12 (Manual del respirómetro, 1996)**

Tanto la generación electrolítica de oxígeno como su cuantificación y la recolección de los resultados es registrada por el indicador de presión. La relación de gases en los matraces de reacción se mantiene constante por medio de un circuito de retroalimentación. Cuando la actividad respiratoria microbiana consume el oxígeno del matraz de reacción la presión del

sistema baja levemente; en ese momento el nivel de  $H_2SO_4$  al 0.05% del indicador de presión se eleva y entra en contacto con el electrodo de platino, acción de cierra el circuito y permite que se genere oxígeno en la celda electrolítica. La cantidad de oxígeno suministrada a la muestra se registra directamente en mg/L. La unidad de registro está conectada a una computadora que guarda los datos de cada unidad de reacción cada 15 minutos o de acuerdo con el intervalo especificado (Kilroy y Gray, 1995; Madsen, 1996; Govind *et al.* 1997).

Para el uso de este equipo, se siguió el procedimiento descrito en el manual para la operación del equipo VOITH-Sapromat B-12. A cada matraz de reacción se le adicionan 250 mL de las soluciones descritas en la tabla 7. El consumo de oxígeno fue monitoreado diariamente, de acuerdo con las curvas de consumo generadas, se establecieron 4 tiempos de muestreo, tomándose un matraz de control de inóculo y un matraz con IHA para realizar la evaluación fisicoquímica y microbiológica correspondiente.

#### **4.2.3. Análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras**

Inmediatamente después de retirar los matraces del respirómetro, se procedió a eliminar la biomasa suspendida por medio de filtración a través de membranas de acetato de celulosa (Nalge, Co) de 0.45  $\mu m$ . Se reservó una cantidad sin filtrar para las pruebas de sólidos totales y la cuenta de bacterias heterótrofas totales mientras que con las muestras filtradas se realizaron las determinaciones de pH, N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Para determinar la concentración de COD, se acidificó la muestra previamente filtrada con una gota de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1:1 y se conservó en refrigeración hasta el momento del análisis en un analizador de carbono orgánico total Shimadzu T-5050. En la tabla 9 se encuentra la relación de los métodos empleados para realizar los análisis fisicoquímicos (APHA, 1998).

Para la cuenta de bacterias heterótrofas totales se utilizó el método APHA 9215 "Recuento de bacterias heterótrofas en placa". La siembra se realizó por duplicado con el método de extensión superficial (Schade y Lemmer, 1994; Armendáriz *et al.* 1998) en medio NWRI compuesto de:

peptona 3g/L, caseína soluble 0.5 g/L,  $K_2HPO_4$  0.2 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g/L,  $FeCl_3$  0.001 g/L y agar 15 g/L. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 y 48 horas.

**Tabla 9. Relación de los parámetros fisicoquímicos considerados (APHA, 1998)**

Método	Características
pH	Potenciometría (potenciómetro Orion 720 A)
Demanda química de oxígeno (DQO).	Método de reflujo cerrado y cuantificación de la oxidación del dicromato por espectrofotometría $\lambda = 600$ nm
Porcentaje de carbono; nitrógeno e hidrógeno	Analizador elemental EA 1110 CHNS-O Carlo Erba Instruments
2540 B y E Sólidos totales (STT**, STV y STF)	Gravimetría
4500-NH <sub>3</sub> -C Amoníaco (N-NH <sub>3</sub> )	Método de Nessler. $\lambda = 410$ nm Sensibilidad: 20 $\mu$ g N-NH <sub>3</sub> /L. Puede ser empleado en muestras hasta con 5 mg N-NH <sub>3</sub> /L
4500-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -B Nitrito (N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Método colorimétrico $\lambda = 543$ nm Sensibilidad: Adecuado para 5 a 1000 $\mu$ g N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L
4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -B Nitrato (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Método UV selectivo $\lambda = 220$ nm y 275 nm Sensibilidad: 100 $\mu$ g N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L
4500-P-C Ortofosfato (P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Método colorimétrico con ácido vanadomolibdofosfórico $\lambda = 470$ nm Sensibilidad: 200 $\mu$ gP/L

\*\* En el caso de la caracterización inicial de los IHA se obtuvieron después de 24 h a 105° C, ya que la consistencia de las muestras era oleosa

Finalmente, para obtener el perfil de la actividad enzimática del inóculo microbiano, se decidió utilizar galerías API Zym (BioMérieux) que permiten evaluar 19 actividades enzimáticas de manera semicuantitativa (tabla 10). Para ello la biomasa retenida al filtrar las muestras con IHA fue resuspendida y la densidad óptica fue ajustada al punto 5 de la escala de Mc Farland. Las galerías fueron incubadas a 37°C durante 4 horas y se siguió el procedimiento establecido por el fabricante para la obtención y cómputo de resultados.

Tabla 10. Relación de las actividades enzimáticas (Manual Api Zym, BioMerieux)

No.	Clave	Enzima	Sustrato	pH	Resultado	
					Positivo	Negativo
1		Control			Incoloro o del color de la muestra	Incoloro o amarillo muy pálido
2	PAL	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	8.5	Morado	
3	EST	Esterasa (C4)	2-naftil butirato	6.5	Morado	
4	LEST	Lipasa esterasa (C6)	2-naftil caprilato	7.5	Morado	
5	LIP	Lipasa (C14)	2-naftil miristato	7.5	Morado	
6	LeuA	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida	7.5	Naranja	
7	ValA	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	7.5	Naranja	
8	CisA	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	7.5	Naranja	
9	TRIP	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8.5	Naranja	
10	$\alpha$ QUIM	$\alpha$ -Quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7.5	Naranja	
11	PAC	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5.4	Morado	
12	NAFPH	Naftol AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	5.4	Azul	
13	$\alpha$ Gal	$\alpha$ -galactosidasa	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosido	5.4	Morado	
14	$\beta$ Gal	$\beta$ -galactosidasa	2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosido	5.4	Morado	
15	$\beta$ Gur	$\beta$ -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucurónido	5.4	Azul	
16	$\alpha$ Glc	$\alpha$ -glucosidasa	2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosido	5.4	Morado	
17	$\beta$ Glc	$\beta$ -glucosidasa	6-Br-2-naftil- $\beta$ D-glucopiranosido	5.4	Morado	
18	GlcNAc	N-acetil- $\beta$ -glucosaminasa	1-naftil-N-acetil- $\beta$ D-glucosamina	5.4	Café	
19	$\alpha$ Man	$\alpha$ -manosidasa	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-manopiranosido	5.4	Morado	
20	$\alpha$ Fuc	$\alpha$ -fucosidasa	2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosido	5.4	Morado	

### 4.3. Análisis estadístico

Se aplicó análisis de varianza multivariado (ANDEVAMU) para 2 factores: IHA (a dos niveles) y fuente de inóculo (a tres niveles) a las observaciones repetidas en el tiempo con las variables respuesta: pH, la concentración de COD,  $N-NH_3$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NO_3^-$ ,  $P-PO_4^{3-}$ , STT, STV, STF y la cuenta de bacterias heterótrofas totales medidos en 5 distintos tiempos. Este mismo análisis se aplicó a los perfiles de actividad enzimática medidos en tres diferentes tiempos. Los diseños en los cuales se quiere probar la existencia del efecto del tratamiento a través de la comparación de varias mediciones de la variable respuesta obtenidas en un grupo de sujetos, se llaman comúnmente diseños dentro de sujetos o bien diseños de mediciones repetidas (Maxwell y

Delaney, 1990). Finalmente, se realizaron comparaciones múltiples a partir de la interacción IHA-fuente de inóculo-tiempo a fin de destacar en que tiempo se registraron diferencias significativas en la concentración del parámetro en cuestión, con respecto al IHA y fuente de inóculo empleados.

Para el análisis de los resultados cinéticos de las pruebas y para los perfiles de actividad enzimática iniciales, se utilizó análisis de varianza (ANDEVA) para 2 factores: IHA (a dos niveles) y fuente de inóculo (a tres niveles) con  $\alpha=0.05\%$ . Se realizaron las comparaciones necesarias para estimar el efecto de cada uno de estos factores. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico JMP versión 3.1.2.

## CAPÍTULO 5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Estudios para la selección de los IHA

Las muestras procesadas fueron solubles en agua, lo cual es un requisito indispensable, para que una sustancia pueda ser evaluada con las pruebas de biodegradabilidad aerobia rápida. Al ser solubles los IHA se encuentran en fase acuosa, lo que facilitaría su eventual degradación por medio de los microorganismos presentes en el medio.

**Tabla 11. Resultados de los análisis fisicoquímicos efectuados a los IHA preseleccionados**

Muestra	IHAC	IHAF	IHAG	IHAI	IHAK
Aspecto y color *	Líquido ámbar	Líquido transparente	Líquido claro	Líquido ámbar espeso	Líquido azul
Solubilidad en agua *	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa
Gravedad específica *	1.12	1.1	1.01	1.1	1.1
pH (unidades)	7.7	10.1	5.5	7	6.5
STT (%)	19.0	76.4	95.3	97.1	70.7
Cenizas (%)	0.03	51.4	0.9	56.5	1.8
DQO (g/L)	435 + 24	423 + 9	1737 + 117	1676 + 298	451 + 22
DBO <sub>5</sub> (g/L)	176	117	235	221	201
DBO <sub>5</sub> /DQO	0.40	0.23	0.13	0.13	0.44
COD (g/L)	87	---	720	---	284
% C	55	92	76	88	44
% N	20	0.15	10	1	20
% H	17	4	8	5	17

\* Datos proporcionados por el fabricante

En la tabla 11 se observan valores de DQO muy altos, lo que significa que los IHA cuentan con una elevada concentración de materia orgánica y/o inorgánica que es susceptible de ser oxidada por el dicromato de potasio. Los resultados promedio presentaron coeficientes de variación (CV) del 2% para IHAF; 5% para IHAK e IHAC; 7% para IHAG y de 18% para IHAI. Este último producto era muy viscoso, difícil de medir y diluir, además de presentar muchos sólidos precipitados, llegándose incluso a formar 2 fases, lo cual dificultó la obtención de una muestra homogénea.

Los resultados de  $DBO_5$  presentaron valores que al emplearse para obtener la relación  $DBO_5/DQO$  y emplearla como una aproximación *a grosso modo* de la pertinencia o no de aplicar métodos de tratamiento de tipo biológico, derivaron en 3 tendencias. En primer término, para el caso de los IHAK e IHAC, la relación demostró que son productos biodegradables, mientras que el producto IHAF es medianamente biodegradable. Finalmente, para los productos IHAG e IHAI los valores de  $DBO_5$  fueron bajos en comparación con los de  $DQO$ , lo que ocasiona que se trate de valores indicativos de baja biodegradabilidad aerobia. De acuerdo con lo anterior, el orden decreciente de biodegradabilidad sería el siguiente:

$$IHAK > IHAC > IHAF > IHAG = IHAI$$

El pH no fue ajustado a valores neutros, sin embargo, en la mayoría de los IHA estuvo dentro del intervalo aceptable para el crecimiento de las bacterias degradadoras, con excepción del IHAF que fue alcalino y el de IHAG que fue ácido. Dichos valores de pH podrían tener efecto bacteriostático o bactericida sobre la comunidad microbiana, dificultando en consecuencia su biodegradación. A este respecto es necesario considerar que los IHA sólo son parte de la formulación de un fluido de perforación y que en sí, el mismo IHA es un sistema compuesto por varias sustancias. En el caso de la determinación del porcentaje de sólidos totales (STT %) no se observó la evaporación total de las muestras. Posiblemente los IHA estudiados contienen sustancias de tipo aceitoso. Los productos denominados IHAF e IHAI presentaron más de un 50% de STF, que podrían corresponder a sales, con base en los datos proporcionados por los fabricantes en las fichas técnicas correspondientes.

En la tabla 11 se indica que el carbono fue el principal componente de todos los IHA, seguido por el nitrógeno y el hidrógeno, el porcentaje restante para alcanzar el 100% podría corresponder a sales inorgánicas. Los IHA denominados IHAK e IHAC guardaron una relación similar en sus porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno. Los productos IHAF e IHAI tuvieron porcentajes de carbono alrededor del 90% y bajos porcentajes de nitrógeno.

En la tabla 12 se presentan la relación de los grupos funcionales que pudieron ser identificados mediante espectroscopia de infrarrojo. Se infiere que los productos denominados IHAG e IHAI son muy similares en cuanto a su composición. No se observaron patrones de semejanza entre los otros IHA estudiados. También es conveniente aclarar que en la región de  $600\text{ cm}^{-1}$  denominada como "zona de huellas digitales" no se registraron bandas, por lo que se requiere de más determinaciones para tener suficiente información sobre la composición de los IHA bajo estudio.

**Tabla 12. Grupos funcionales presentes en los IHA detectados a partir del análisis de espectros de infrarrojo**

Muestra	Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional
IHAC	3600-3000	Grupo -OH
	2950	-CH <sub>3</sub>
	2850	-CH <sub>2</sub> -, también puede ser indicativa del grupo -CHO
	1660 -1650	-C=O
	1450	-CH <sub>3</sub> , también puede ser indicativa de -CH <sub>2</sub> -
IHAF	3600-3000	Grupo -COOH
	1650-1550	Grupo carboxilato -COO-
	1390-1330	Grupos -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -, ligeramente recorridos
IHAG	3510-3400	Grupo -OH polimérico, también entre 3600-3500 es posible detectar grupos -OH polivalentes, por ejemplo 1,2 dioles (glicoles)
	2950 y 2880, 1480-1460, 1360	-CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -
	1250, 1100-1050	Grupo -OH secundario o terciario
IHAI	3500 -3400	Grupo -OH polimérico, también entre 3600-3500 es posible detectar grupos -OH polivalentes, por ejemplo 1,2 dioles (glicoles)
	2950 y 2880, 1450-1370, 1340	Grupos -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -
	1250, 1150-1050	Grupo -OH secundario o terciario
IHAK	3600-3000	Grupo R-NH <sub>2</sub>
	2950-2850	-CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> -
	1650-1630	Grupos aromáticos, grupo -NH <sub>2</sub>
	1480	-CH <sub>3</sub>
	1280-1050	Alquil aminas
	950-870	Grupo -NH <sub>2</sub>

El inóculo contenía ciliados y bacterias. Antes de ser puesto en contacto con las diluciones del IHA, los ciliados presentaban mucho movimiento en toda la preparación mientras que las bacterias se encontraban agrupadas en grandes grumos de cantidad apreciable. Los ciliados presentan una amplia distribución geográfica, ocupan diferentes niveles tróficos y pueden

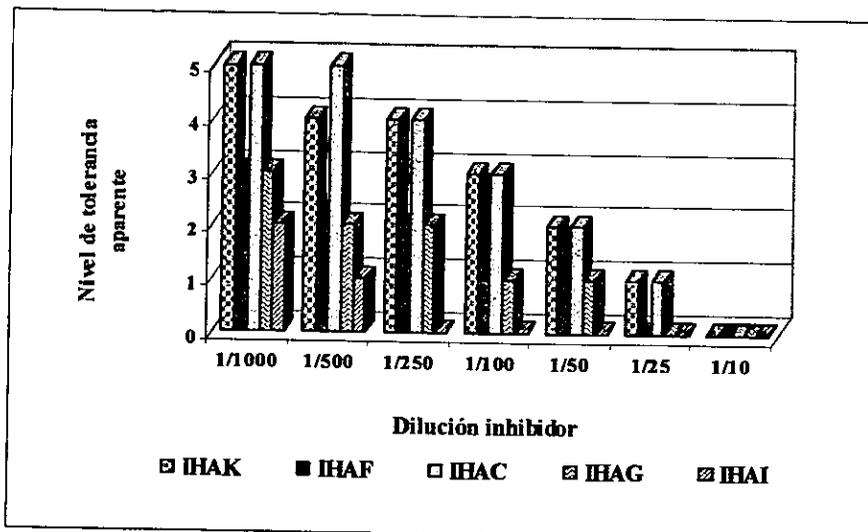
desarrollarse en muchos hábitats dada su gran tolerancia o adaptabilidad a diferentes condiciones fisicoquímicas del ambiente (Brock, 1998). Son susceptibles de ser empleados en la caracterización de ambientes contaminados. La presencia de elementos tóxicos como fenoles, detergentes y metales pesados es letal para ellos en determinadas concentraciones. Sin embargo, se ha observado que dicha toxicidad es relativa y que depende en gran medida de las condiciones bióticas y abióticas en las que se desarrollen (Luna-Pabello, 1994); por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de las pruebas de toxicidad aparente, es posible inferir que los IHA presentan efectos tóxicos sobre la población de ciliados, ya sea debido a la concentración o a la presencia de alguna sustancia tóxica.

En la tabla 13 se presenta la relación de las concentraciones obtenidas a partir de la dilución del respectivo IHA. Los resultados obtenidos de la prueba de tolerancia aparente por contacto inmediato se presentan en la figura 3. A modo de generalización se observó que cuando la dilución del IHA entró en contacto con el inóculo, se inhibió el movimiento de los ciliados y este efecto fue proporcional a la concentración del IHA, al mismo tiempo que difiere entre los diferentes tipos de IHA evaluados. Como una primera aproximación, los IHA estudiados ejercieron algún efecto tóxico sobre los ciliados a las concentraciones empleadas. Sin embargo, esta hipótesis debe ser corroborada a partir de pruebas de contacto más prolongadas. En la figura 3, también se presentan los resultados semicuantitativos correspondientes a las pruebas de tolerancia aparente después de 24 horas de contacto.

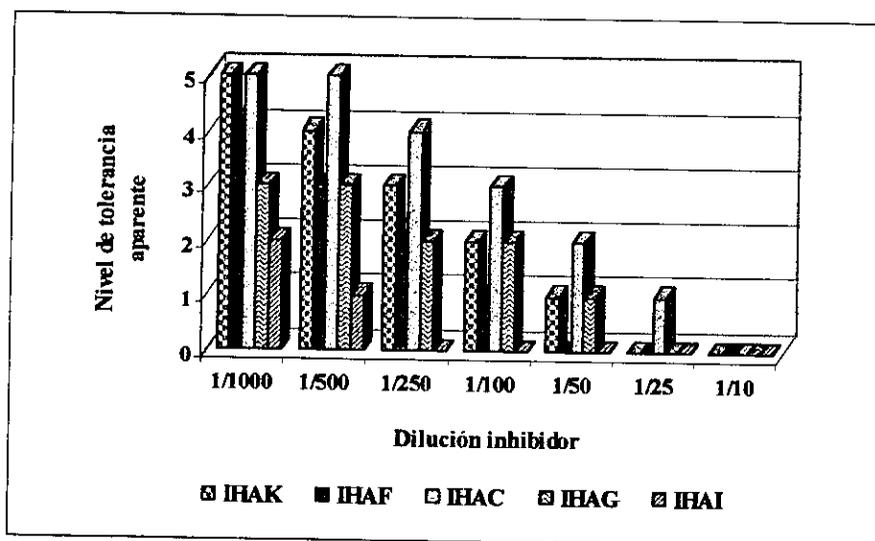
**Tabla 13. Relación de las concentraciones de IHA empleadas para las pruebas de tolerancia aparente**

IHA/Dilución	1/1000	1/500	1/250	1/100	1/50	1/25	1/10
IHAC	0.43	0.86	1.72	4.30	8.6	43	430
IHAF	0.42	0.84	1.68	4.20	8.4	42	420
IHAG	1.73	3.40	6.90	17.3	34.6	173	1730
IHAI	1.67	3.34	6.70	16.7	33.4	167	1670
IHAK	0.45	0.90	1.80	4.50	9	45	450

\*Concentración del IHA en términos de (gDQO/L)



**A) Al contacto inmediato: IHAC > IHAK > IHAG > IHAF > IHAI**



**B) Después de 24 h: IHAC > IHAK > IHAG > IHAF > IHAI**

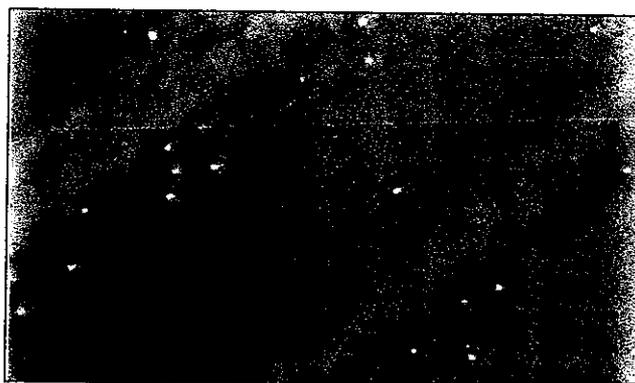
**Figura 3. Tolerancia aparente de un inóculo microbiano al contacto con diluciones de los IHA**

Las pruebas de tolerancia aparente por contacto inmediato y contacto de 24 h mostraron que el IHAG fue más tóxico para los inóculos que el IHAK. Las pruebas de tolerancia aparente se constituyeron como una aproximación al uso de un inóculo como tal durante las pruebas de biodegradabilidad. Estos resultados permitieron inferir que los IHA fueron tóxicos para las

comunidades microbianas, pero se requiere hacer estudios al respecto para el sustento más sólido de esta inferencia. Asimismo, los valores bajos de  $DBO_5$  y sus altos CV guardaron relación con los resultados de tolerancia aparente. De manera muy general los coeficientes de variación más altos y  $DBO_5$  menores correspondieron a los IHA que ejercieron mayores efectos negativos sobre el inóculo. La utilidad de los bioensayos para caracterizar la biodegradabilidad de contaminantes fue discutida por Nyhlom (1996), mientras que Zgajnar y Zagorc (1998), destacaron la importancia de evaluar la toxicidad, la biodegradabilidad y/o posible persistencia tanto de las sustancias puras como de las mezclas que las pudieran contener.

Los resultados de toxicidad aparente coincidieron con los reportados por Rodiles-López (2001), quien observó que la capacidad letal hacia las cepas de Ames empleadas en pruebas de genotoxicidad con el IHAG fue mayor que con el IHAK y Ruíz-Sánchez (2001), donde la supervivencia y actividad degradadora de los consorcios desarrollados en presencia de IHAK fue mayor que los desarrollados empleando IHAG.

Al término del periodo de incubación de 24 h a  $35^{\circ}\text{C}$ , se observó desarrollo de bacterias en todas las cajas sembradas. El agar nutritivo es un medio complejo que favorece el crecimiento de la mayoría de los microorganismos quimioheterótrofos (Brock, 1998). Finalmente, se realizó tinción de Gram del inóculo y se comprobó que contenía bacterias Gram positivas y negativas.



**Figura 4. Colonias bacterianas desarrolladas en medio mineral + IHAK después de 14 días de incubación**

Después de 14 días de incubación de los medios de cultivo preparados con IHA como fuente de carbono, se logró observar indicios de desarrollo de colonias muy pequeñas. En los controles incluidos no se observó ningún cambio. En la figura 4, se muestra un ejemplo de dichas colonias, que posteriormente fueron identificadas como *Micrococcus* sp, empleando galerías API STAPH (BioMérieux).

De acuerdo con los resultados, los IHA que se emplearon para las PBAR fueron los denominados IHAK e IHAG, ello debido a:

- ❖ Amplitud de uso por PEMEX Exploración y Producción, incluyendo bajo costo y buena inhibición de hidratación de arcillas en los fluidos de perforación.
- ❖ Disponibilidad de muestras.
- ❖ Facilidad de manipulación de las muestras para realizar los procedimientos experimentales.
- ❖ El IHAK (IHA base amina) presenta biodegradabilidad potencial ( $DBO_5/DQO= 0.44$ ) y aparente baja toxicidad mientras que IHAG (IHA base glicol) representa un producto que aparentemente es menos biodegradable ( $DBO_5/DQO= 0.13$ ) con alta toxicidad. Por lo tanto, al seleccionar estos dos IHA se contemplaron los extremos en cuanto a los productos evaluados.

### 5.1.2. Pruebas de biodegradabilidad preliminares

Las dos corridas realizadas con la metodología OECD 301-A arrojaron porcentajes de remoción de materia orgánica medida como COD de 96 y 91% respectivamente, después de 7 días de duración del experimento. Las muestras correspondientes a los tiempos 14 a 28 días fueron descartadas debido a que se registró la reincorporación de la materia orgánica al medio acuoso, debido a la probable lisis celular (Bouchez *et al.* 1995).

Los resultados de esta PBAR se encuentran en las tablas 22 y 23 del anexo A.1. De acuerdo con esos valores, después de 7 días se alcanzó un 95% de remoción de materia orgánica. La corrida se alargó hasta los 14 días, punto dónde se suspendió, debido a que el porcentaje de degradación no

sufrió cambios significativos (99%); además de que la condición establecida del 70% de remoción de COD en un plazo máximo de 28 días, ya se había alcanzado aún antes de los 7 días. A partir de estos resultados, se corroboró que el período de máxima actividad para la degradación del IHAK se verifica en las primeras horas de prueba. Por lo tanto, a efecto de poder realizar el seguimiento adecuado del proceso, se decidió tomar los perfiles de consumo de oxígeno para fijar los puntos de muestreo y limitar la duración de las pruebas a una o máximo dos semanas dependiendo de los resultados proporcionados por el respirómetro y del IHA empleado. Aunque no se realizaron pruebas preliminares con el IHAG, a partir de la caracterización básica se supuso que éste requeriría mayor tiempo para su degradación, por lo que la duración de las PBAR se extendería más allá de los 7 días.

Como aporte de esta etapa no se encontraron diferencias significativas entre los resultados empleando las 2 metodologías propuestas por la OECD. No obstante y a efecto de comprender a detalle el fenómeno de biodegradación aerobia de los IHA, se optó por emplear únicamente el método basado en respirometría. Sin embargo, en caso de requerir el montaje de una PBAR se podría emplear la OECD 301-A, debido a sus costos de adquisición menores, disponibilidad del equipo, accesorios y capacidad en el número de pruebas susceptibles a realizarse de manera simultánea.

## **5.2. Comportamiento de los controles propuestos por la prueba OECD 301-F**

En la tabla 14 se presentan los datos que permitieron constatar el cumplimiento de las condiciones marcadas por la prueba OECD 301-F para la interpretación de los resultados obtenidos. Por ejemplo, en todos los controles de procedimiento se alcanzó más del 50% de remoción de COD en 7 días. De esta manera, se pudo asegurar que el desarrollo de la etapa experimental y la calidad del inóculo, fueron adecuados para la realización de estas pruebas.

Los controles de toxicidad para IHAKIPCU e IHAKIPCE registraron porcentajes de remoción de COD superiores a los obtenidos en su respectivo control de procedimiento; lo que se interpretó como que no hubo efecto tóxico de la concentración empleada de IHAK sobre la comunidad

microbiana. En contraste, el resultado obtenido con IHAKISTJ puso de manifiesto que hubo un ligero efecto tóxico, ya sea de IHAK o de alguno de los productos de su biodegradación. Por otra parte, los controles de toxicidad para las pruebas que incluyeron IHAG registraron porcentajes de remoción de COD menores (88, 75 y 71% para IHAGIPCU, IHAGIPCE e IHAGISTJ, respectivamente) que los obtenidos en los controles de procedimiento; lo que se interpretó como que aparentemente de la concentración empleada de IHAG ejerció efecto tóxico sobre las poblaciones microbianas involucradas en el proceso y/o que los subproductos de degradación son tóxicos.

**Tabla 14. Resultados de COD, consumo de O<sub>2</sub> y % de remoción de COD, en los matraces control \* de las PBAR para las tres fuentes de inóculo**

Control	Muestra	Consumo O <sub>2</sub> (mg/L)	COD inicial (mg/L)	COD final (mg/L)	% remoción COD
Adsorción	IHAKIPCU	5	184	179	3
	IHAKIPCE	3	197	193	3
	IHAKISTJ	6	187	183	3
	IHAGIPCU	0	82	80	3
	IHAGIPCE	2	85	84	1
	IHAGISTJ	7	187	183	3
Degradación abiótica	IHAKIPCU	2	179	175	3
	IHAKIPCE	3	177	171	4
	IHAKISTJ	2	170	169	1
	IHAGIPCU	2	89	86	4
	IHAGIPCE	4	89	84	3
	IHAGISTJ	0	170	169	1
Procedimiento	IHAKIPCU	128	118	12	90
	IHAKIPCE	135	116	6	95
	IHAKISTJ	102	108	10	91
	IHAGIPCU	102	99	7	93
	IHAGIPCE	106	103	9	92
	IHAGISTJ	115	109	10	91
Toxicidad	IHAKIPCU	555	315	28	92
	IHAKIPCE	862	626	31	96
	IHAKISTJ	319	207	27	87
	IHAGIPCU	516	465	59	88
	IHAGIPCE	345	336	85	75
	IHAGISTJ	345	207	27	71

\*Datos puntuales. Debido a que no se recomienda desconectar y sacar los matraces del respirómetro para tomar muestras durante la prueba, los resultados corresponden únicamente al inicio y al final del período

Los controles de degradación abiótica y adsorción registraron bajos porcentajes de remoción de COD y consumo de oxígeno, con lo que se constató que la degradación de IHAK e IHAG bajo las condiciones experimentales impuestas, se debió fundamentalmente a la acción microbiana. Por otra parte, aún cuando los controles fueron corridos una sola vez, experimentos anteriores permiten afirmar que el procedimiento seguido proporciona valores representativos del proceso (Ambriz-Rivas, 1998a).

Finalmente, en los controles de inóculo la concentración de COD no presentó cambios significativos; en algunos casos se detectó un ligero incremento en su concentración lo que fue evidencia de que algunos compuestos orgánicos se incorporaron al medio acuoso como consecuencia de una probable lisis celular (Bouchez *et al.* 1995). Cabe recordar que la cuantificación de biodegradabilidad por métodos indirectos (como la remoción de COD y el consumo de oxígeno), requiere que el consumo de carbono contaminante sea bajo; es decir, que los controles no presenten altas variaciones en su concentración (Schmidt y Alexander, 1985).

### **5.3. Remoción de materia orgánica medida como COD**

En la figura 5 se observa que para las PBAR empleando IHAK como fuente de carbono, se partió de una concentración de 170 mgCOD/L aproximadamente (70% superior a lo sugerido por la OECD 301-F) mientras que para las PBAR empleando IHAG, se partió de una concentración aproximada a 83 mgCOD/L (17% menor a la sugerida). No hubo diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las concentraciones de cada IHA evaluado con las tres diferentes fuentes de inóculo durante el período total de experimentación (tablas 76, 79 y 81, anexo B).

Como se puede apreciar en las figuras 6 y 7, ambos IHA pudieron considerarse como rápidamente biodegradables, ya que se alcanzó más de un 70% de la remoción de materia orgánica medida como COD en un plazo menor de 28 días. La remoción de COD fue

estadísticamente significativa ( $\alpha= 0.05$ ) debido al factor tiempo en todo el intervalo estudiado (tablas 76, 79 y 81, anexo B).

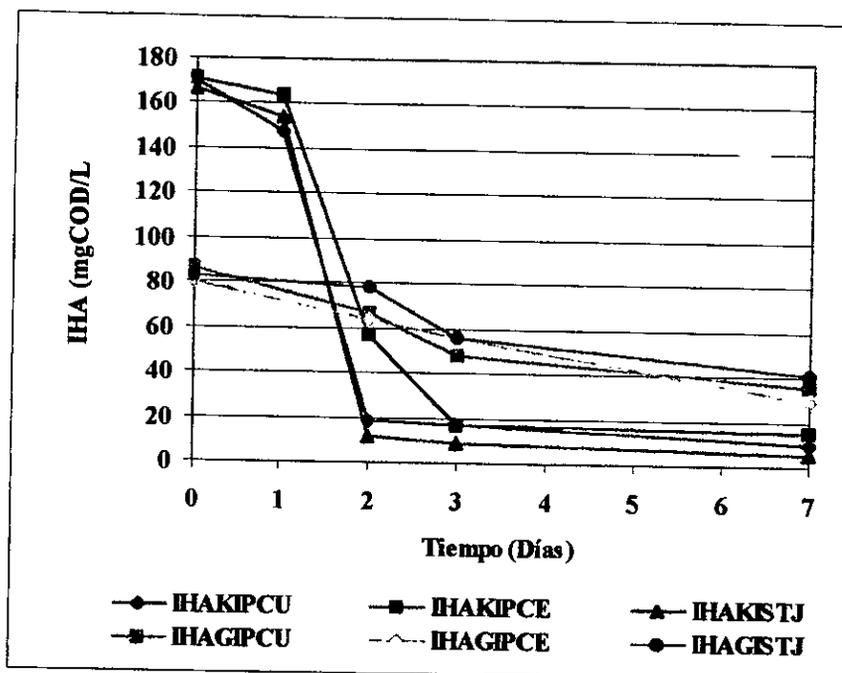


Figura 5. Perfil de remoción de la concentración de COD durante las PBAR de IHA

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta  $t=14$  días. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones. La variación máxima en los valores fue del 10%.

Los porcentajes de degradación logrados después de 7 días de etapa experimental, fueron de 94, 91 y 97% para IHAKIPCU, IHAKIPCE e IHAKISTJ respectivamente. Después de 14 días para IHAGIPCU e IHAGIPCE fue del 89% y de 72% para IHAGISTJ. El 70% de degradación se logró aproximadamente al segundo día de iniciada la prueba para IHAKIPCU; IHAKIPCE e IHAKISTJ, al noveno día de etapa experimental para IHAGIPCU e IHAGIPCE y al decimocuarto para IHAGISTJ (figuras 6 y 7). Cuando se fija una relación  $S_0/X_0$  baja, como la que se empleó en estos experimentos (tabla 17), las curvas de consumo de sustrato son sigmoidales, (figuras 6 y 7). En consecuencia las velocidades de crecimiento de biomasa y remoción de sustrato se incrementaron en la primer etapa del experimento y después de alcanzar un máximo, estas decayeron (Chudoba *et al.* 1992; Struijs y Van den Berg, 1995).

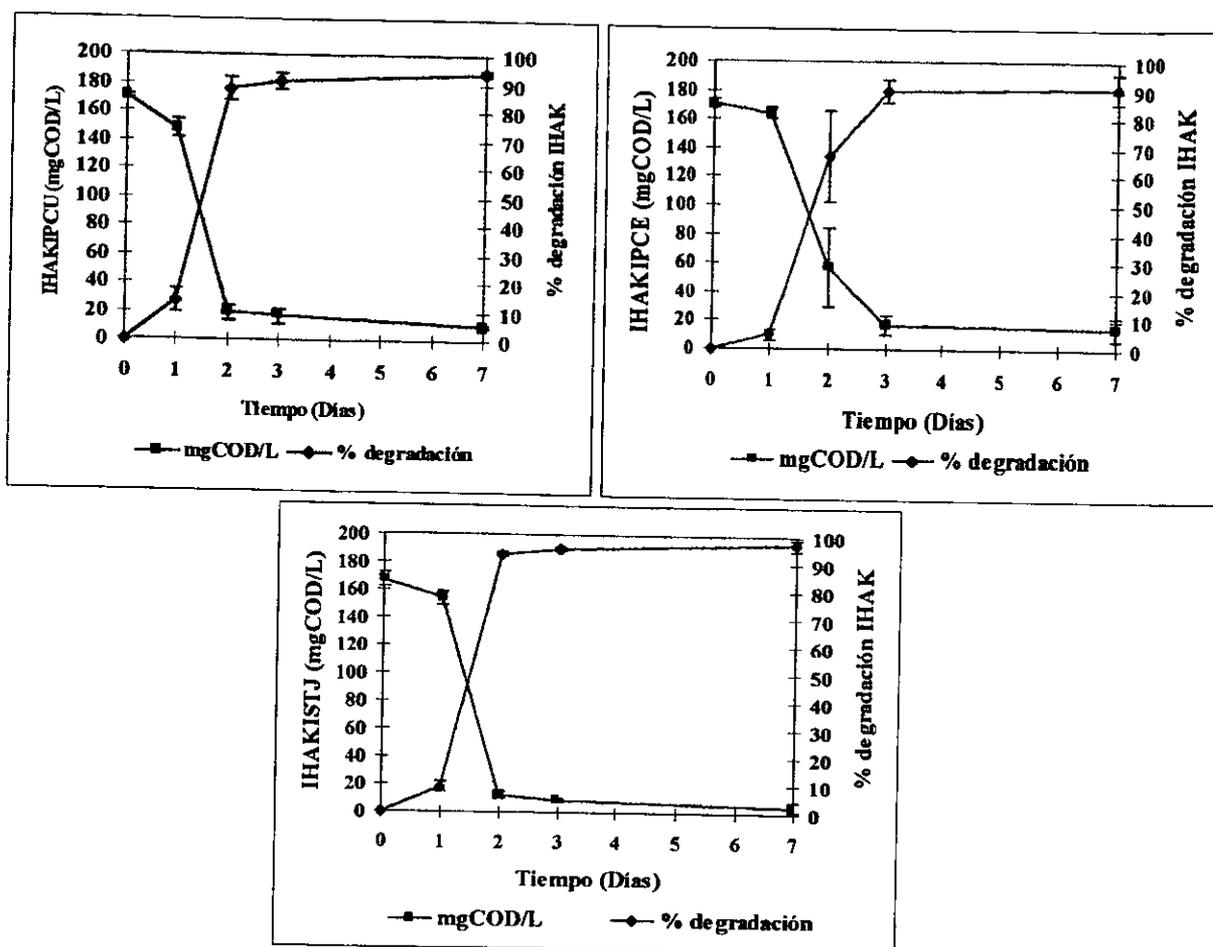


Figura 6. Perfil de concentración de COD y porcentaje de degradación durante PBAR para IHAK con las tres fuentes de inóculo

Cada punto es el promedio de 3 determinaciones

En las figuras 6 y 7 también se aprecia que las pruebas IHAKIPCU e IHAKISTJ mostraron un comportamiento muy similar mientras que las pruebas IHAKIPCE aparentemente resultaron más lentas pues se observó que entre  $t=1$  a 2 días sólo se alcanzó un 67% de degradación (88 y 93% para IHAKIPCU e IHAKISTJ, respectivamente). En contraste, las pruebas IHAGIPCU e IHAGIPCE mostraron un comportamiento similar mientras que las pruebas IHAGISTJ aparentemente resultaron más lentas pues entre  $t=0$  a 2 días sólo se alcanzó un 5% de degradación en comparación con el 22 y 20% para IHAGIPCU e IHAGIPCE.

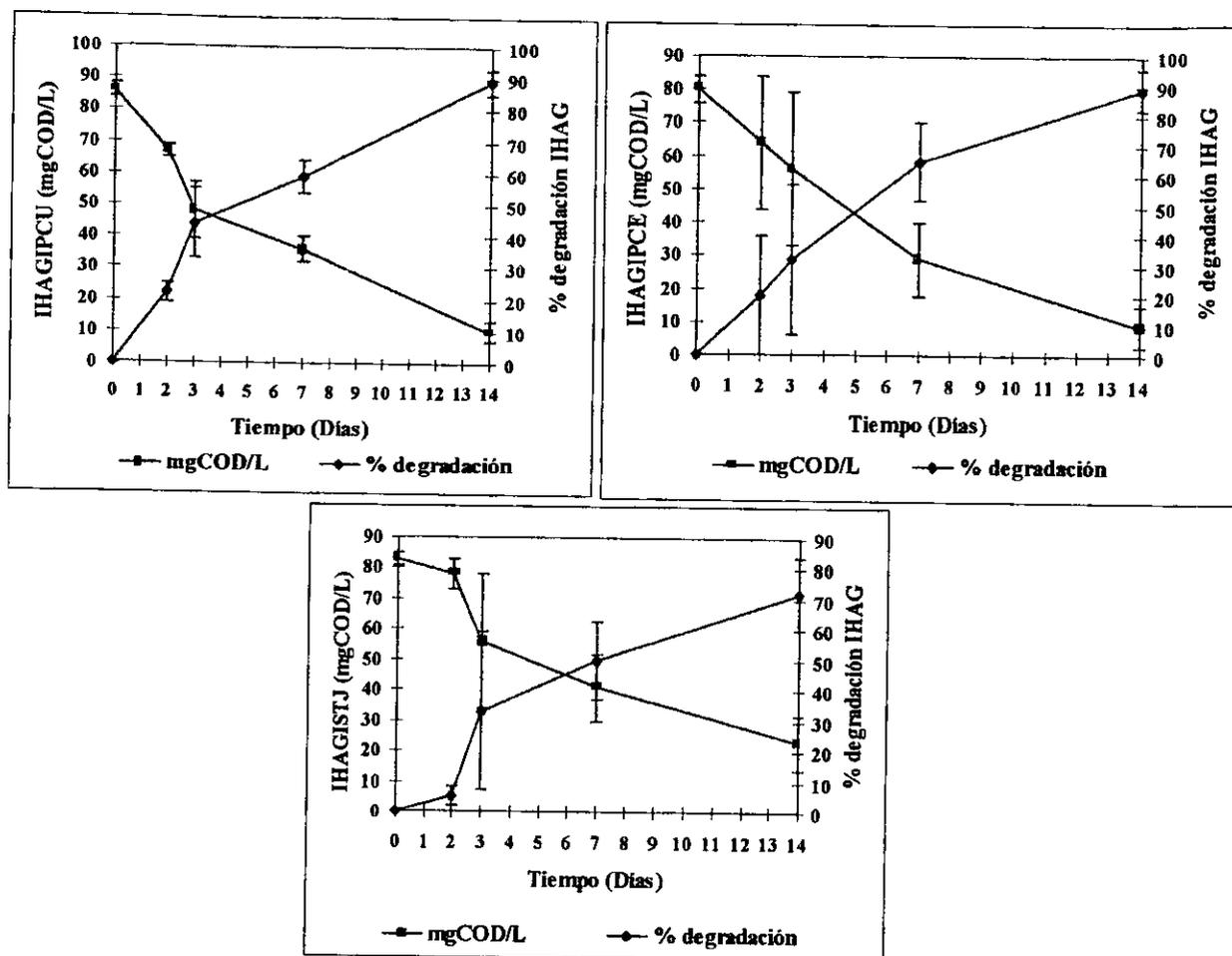


Figura 7. Perfil de concentración de COD y porcentaje de degradación durante las PBAR para IHAG con las tres fuentes de inóculo

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta  $t=14$  días. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Ruíz-Sánchez (2001), donde los consorcios degradadores desarrollados en presencia de IHAK arrojaron mayor porcentaje de remoción de materia orgánica vía DQO y en un menor lapso que los consorcios degradadores desarrollados en presencia de IHAG.

### 5.4. Perfiles de consumo de oxígeno

En la figura 8 se presentan los resultados de consumo de oxígeno durante la biodegradación de ambos IHA.

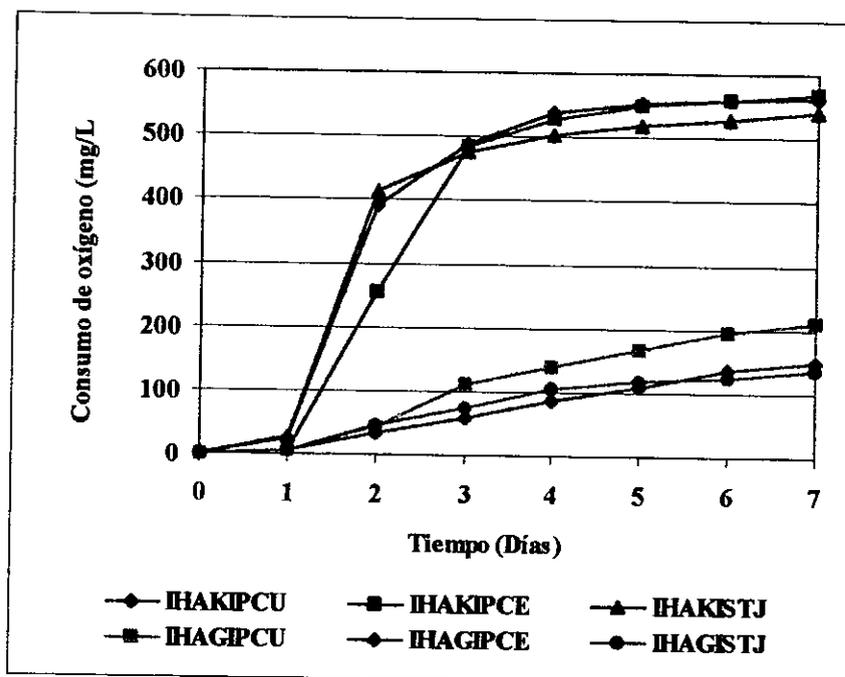


Figura 8. Perfil de consumo de oxígeno durante las PBAR de IHA

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta  $t=14$  días. Promedio de determinaciones IHAK:  $t=0$  a 1d: 12;  $t=1$  a 2 d: 9;  $t=2$  a 3d: 6 y  $t=3$  a 7d: 3. IHAG:  $t=0$  a 2d: 12;  $t=2$  a 3d: 9 y  $t=3$  a 7d: 6

El consumo de oxígeno está directamente relacionado con la actividad respiratoria microbiana y la biotransformación inicial de las sustancias, pero no con su mineralización (Zgajnar y Zagorc, 1999b). El aumento en la tasa de consumo de oxígeno resultó indicativo de un aumento de la actividad metabólica aerobia de los microorganismos. En este sentido, el consumo de oxígeno estuvo asociado con la degradación de la fuente de carbono disponible, tal como se presentó en la sección anterior. A este respecto, Zgajnar y Zagorc (1999b), destacaron que estimar la biodegradación con sólo un método indirecto puede derivar en resultados confusos, dado que todos presentan limitantes, por lo que se recomienda la medición de dos para contar con mayor certidumbre. Una vez que se ha sido conseguido un alto porcentaje de remoción de sustrato, la

velocidad de degradación y/o la tasa de consumo de oxígeno disminuyó gradualmente y llegó a ser asintótica, lo cual se asoció con la ausencia de sustrato biodegradable disponible.

En la figura 8 se observa una fase lag de 1 día para las pruebas IHAKIPCE, así como que la tasa promedio de consumo de oxígeno (TPCO) fue menor a la registrada en las pruebas IHAKIPCU e IHAKISTJ (tabla 15). Mientras que con IHAKIPCU e IHAKISTJ, no se observó que existiera la fase lag, ya que se registró consumo de oxígeno desde el primer día de prueba.

**Tabla 15. Datos relacionados con el consumo de oxígeno durante las PBAR de IHAK empleando las 3 diferentes fuentes de inóculo**

Tiempo (d)	IHAKIPCU			IHAKIPCE			IHAKISTJ		
	$O_2 \pm \sigma$	CV	TPCO	$O_2 \pm \sigma$	CV	TPCO	$O_2 \pm \sigma$	CV	TPCO
0-1	26 ± 24	92.3	26	5 ± 4	80	5	27 ± 11	40.7	27
1-2	393 ± 36	9.2	367	256 ± 53	20.7	251	413 ± 65	15.7	386
2-3	488 ± 42	8.6	95	484 ± 32	6.6	228	475 ± 49	10.3	62
3-4	537 ± 19	3.5	49	530 ± 9	1.7	46	505 ± 47	9.3	30
4-5	553 ± 5	0.9	16	550 ± 13	2.4	20	519 ± 48	9.2	14
5-6	559 ± 4	0.7	6	559 ± 17	3.0	9	528 ± 42	7.9	9
6-7	563 ± 3	0.6	4	569 ± 26	4.6	10	540 ± 41	7.6	12

$O_2$ : Consumo de oxígeno (mg/L); CV: Coeficiente de variación (%); TPCO: Tasa promedio de consumo de oxígeno ( $mgO_2L^{-1}d^{-1}$ )

Como se aprecia en las tablas 15 y 16, la desviación estándar ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación (CV) de los datos de consumo de oxígeno presentaron valores muy altos en la etapa de arranque del proceso, hecho que se atribuyó a que dicho consumo no fue uniforme en todos los matraces. Los CV presentaron tendencia a disminuir, después del intervalo  $t=0$  a 1 día para las pruebas con IHAKIPCU y en el intervalo  $t=0$  a 2 días para IHAKIPCE e IHAKISTJ. A partir de  $t=2$  días y  $t=3$  días las  $\sigma$  disminuyeron y los CV se estuvieron por debajo del 10%. Para IHAGIPCU este descenso se observó en el intervalo  $t=1$  a 3 días mientras que para IHAGIPCE e IHAGISTJ se registraron en los intervalos de  $t=1$  a 6 días y  $t=1$  a 7 días. A partir de  $t=4, 7$  y 8 días, respectivamente, las  $\sigma$  bajaron y los CV se situaron por debajo del 20% (tabla 16).

Tabla 16. Datos relacionados con el consumo de oxígeno durante las PBAR de IHAG empleando las 3 diferentes fuentes de inóculo

Tiempo (d)	IHAGIPCU			IHAGIPCE			IHAGISTJ		
	O <sub>2</sub> ± σ	CV	TPCO	O <sub>2</sub> ± σ	CV	TPCO	O <sub>2</sub> ± σ	CV	TPCO
0-1	5 ± 4	80	5	6 ± 14	233.3	6	6 ± 7	116.6	6
1-2	45 ± 24	53.3	40	33 ± 30	90.9	27	46 ± 36	78.3	40
2-3	113 ± 26	23.0	68	60 ± 46	76.7	27	76 ± 33	43.4	30
3-4	141 ± 28	19.8	28	87 ± 41	47.1	27	107 ± 34	31.8	31
4-5	169 ± 28	16.6	28	108 ± 40	37.0	21	117 ± 36	30.8	10
5-6	195 ± 33	16.9	26	138 ± 30	21.7	30	125 ± 40	32.0	8
6-7	212 ± 39	18.4	17	148 ± 30	20.3	10	138 ± 34	24.6	13
7-8	233 ± 42	18.0	21	174 ± 21	12.1	26	150 ± 31	20.7	12
8-9	248 ± 44	17.7	15	184 ± 25	13.6	10	158 ± 27	17.1	8
9-10	263 ± 47	17.9	15	194 ± 23	11.8	10	168 ± 24	14.3	10
10-11	275 ± 45	16.4	12	203 ± 23	11.3	9	177 ± 20	11.3	9
11-12	284 ± 45	15.8	9	214 ± 20	9.3	11	188 ± 17	9.0	11
12-13	299 ± 39	13.0	15	224 ± 17	7.6	10	198 ± 14	7.1	10
13-14	314 ± 34	10.8	15	233 ± 16	6.7	9	207 ± 12	5.8	9

O<sub>2</sub>: Consumo de oxígeno (mg/L); CV: Coeficiente de variación (%); TPCO: Tasa promedio de consumo de oxígeno (mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>)

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se constató que la máxima actividad de degradación microbiana de los IHA, se llevó a cabo durante los primeros días de etapa experimental.

### 5.5. Cinética de degradación de los IHA

Los resultados de remoción de COD y consumo de oxígeno destacaron que el IHAK fue degradado más rápidamente (7 días) que el IHAG (14 días), muy probablemente debido a su estructura química y a la tolerancia aparente que presentan los microorganismos a los IHA. Cabe recordar que los resultados para la selección de los IHA (tabla 11 y figura 3), apuntaron a que el IHAK presentaba mayor potencialidad de ser degradado que el IHAG, de acuerdo con las relaciones DBO<sub>5</sub>/DQO calculadas y los datos de tolerancia microbiana aparente. Para el IHAK se partió de una concentración superior a la recomendada (figura 5) en contraste con el IHAG, donde se empleó la mitad de la concentración inicial de COD con respecto al IHAK y le llevó 7 días más alcanzar porcentajes de remoción de materia orgánica similares éste.

De acuerdo con Alexander (1985), generalmente, la velocidad de biodegradación de una sustancia es directamente proporcional a su concentración. La actividad degradadora de los microorganismos depende de la concentración del contaminante en el ambiente. Algunos compuestos son degradados en concentraciones altas pero no en bajas, debido a la actividad concertada de varios microorganismos, mientras que otros sólo son biodegradados en concentraciones bajas pero no en altas, debido a que son tóxicos. A este mismo respecto, Schmidt y Alexander (1985), encontraron que tanto la velocidad como el porcentaje de biodegradación de compuestos orgánicos en el ambiente natural puede ser controlada por altas concentraciones de otras moléculas orgánicas. Este hecho sugiere que la estimulación o inhibición por segundos sustratos depende de los microorganismos presentes, la concentración del segundo sustrato y la sustancia en particular.

**Tabla 17. Relación So/Xo y datos cinéticos promedio obtenidos para las PBAR de IHA**

Prueba	So/Xo promedio $\pm \sigma$ (mgCOD/UFC <sup>-1</sup> )**	$\mu_{\text{máx}}$ promedio $\pm \sigma$ (h <sup>-1</sup> ) *	t <sub>50%</sub> promedio $\pm \sigma$ (h) *	t <sub>70%</sub> promedio $\pm \sigma$ (h) *
IHAKIPCU	3.26 E-07 $\pm$ 1.16 E-07	0.112 $\pm$ 0.019	6.3 $\pm$ 1.1	10.9 $\pm$ 1.9
IHAGIPCU	1.33 E-07 $\pm$ 1.60 E-08	0.045 $\pm$ 0.021	19.2 $\pm$ 11.5	33.3 $\pm$ 20.0
IHAKIPCE	2.62 E-07 $\pm$ 9.58 E-08	0.115 $\pm$ 0.011	6.7 $\pm$ 0.7	11.6 $\pm$ 1.3
IHAGIPCE	1.90 E-07 $\pm$ 1.65 E-07	0.042 $\pm$ 0.018	21.1 $\pm$ 8.5	37.2 $\pm$ 14.1
IHAKISTJ	9.14 E-07 $\pm$ 1.37 E-07	0.098 $\pm$ 0.023	7.4 $\pm$ 1.9	12.9 $\pm$ 3.2
IHAGISTJ	4.53 E-07 $\pm$ 2.14 E-07	0.024 $\pm$ 0.008	32.3 $\pm$ 13.5	56.1 $\pm$ 23.4

\* Promedio de 9 determinaciones, \*\* Promedio de las 3 corridas realizadas

La relación So/Xo inicial promedio se situó en el orden de 10<sup>-7</sup> mgCOD/UFC<sup>-1</sup>. Este es un valor bajo tomando como referencia a Vázquez-Rodríguez *et al.* (1999b), cuyos experimentos de biodegradabilidad de DBS partieron de relaciones So/Xo del orden de 10<sup>-6</sup> (bajo) a 10<sup>-3</sup> (alto) mgCOD/UFC<sup>-1</sup>, mediante la concentración o dilución de un sobrenadante de tanque de aireación de plantas de tratamiento de aguas de tipo municipal que fue empleado como inóculo. Los datos de la tabla 17 muestran desviaciones estándar altas, hecho atribuible a las condiciones intrínsecas del diseño experimental. Sin embargo, al considerar los resultados ya expuestos de remoción de materia orgánica y consumo de oxígeno, fue posible constatar que el haber fijado la relación So/Xo inicial a 10<sup>-7</sup> mgCOD/UFC<sup>-1</sup> permitió, como se muestra a continuación, obtener

reproducibilidad tanto en los parámetros cinéticos, fisicoquímicos y microbiológicos que pretenden describir el proceso de biodegradación de los IHA. Lo anterior finalmente deriva en la posibilidad de estandarizar las condiciones para alcanzar el nivel de degradación requerido para considerar una sustancia como rápidamente biodegradable.

En la tabla 17  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$  representan respectivamente, el tiempo en que se alcanzó el 50 y el 70% de remoción de la concentración inicial de IHA vía COD, de acuerdo con la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). El cálculo de los valores de  $\mu_{\text{máx}}$ , se basó en el reportado por Bouchez *et al.* (1997). Cada corrida de biodegradabilidad aportó 3 curvas de consumo de oxígeno para calcular  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$ , por lo que cada dato reportado en la tabla 17 es el promedio de 9 determinaciones. Para calcular  $\mu_{\text{máx}}$  fueron transformados a escala semilogarítmica los datos de consumo de oxígeno proporcionados por el respirómetro VOITH-Sapromat B-12 (períodos de 6 a 10 horas en el caso de IHAK y de 10 a 28 horas al emplear IHAG, diferencias debidas a los comportamientos observados en los perfiles de consumo de oxígeno y la tasa promedio de consumo de oxígeno para ambos IHA.). Los datos fueron graficados con respecto al tiempo y se tomó una porción de la recta con un coeficiente de correlación superior a 0.98, mismo que demuestra un buen ajuste al modelo de crecimiento exponencial.  $t_{50\%}$  se calculó a partir de  $0.6930/\mu_{\text{máx}}$  mientras que  $t_{70\%}$  se obtuvo mediante  $1.2037/\mu_{\text{máx}}$ .

De acuerdo con el análisis estadístico, hubo diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) en los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y  $t_{70\%}$ , debidas tanto al factor IHA como a la fuente de inóculo, mientras que no hubo diferencias significativas en los valores de  $t_{50\%}$  (tablas 87 y 88, anexo B). La variación en los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  se atribuyó a los cambios en la composición de la comunidad causados por los efectos de selección, que dependen entre otras cosas de la relación  $S_0/X_0$  empleada (Chudoba *et al.* 1992; Vázquez-Rodríguez *et al.* 1999a), el origen y/o composición del inóculo (Nyholm *et al.* 1984; Grady *et al.* 1996) y las condiciones de montaje y realización de los experimentos (Block *et al.* 1992; Percherancier *et al.* 1996). A este mismo respecto Bouchez *et al.* (1997), encontraron

que los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  obtenidos con el respirómetro Sapromat fueron reproducibles, pero dependientes de la cepa e hidrocarburo policíclico aromático utilizado como fuente de carbono.

Struijs y Van den Berg (1995) y Zgajnar y Zagorc (1999a), puntualizan que las curvas de remoción de sustrato para compuestos rápidamente biodegradables no están exclusivamente descritas por una constante de primer orden con respecto a la concentración del compuesto de prueba. De acuerdo con la condición descrita por los métodos OECD, la duración de la fase lag (entendida como el tiempo para alcanzar el 10% de degradación) no debe ser mayor de 10 días y el  $t_{50\%}$  no debe ser mayor de 5 días, lo que se traduce en un cálculo de constante de velocidad de degradación cuyo límite inferior es de  $0.14 \text{ d}^{-1}$ . Como se puede apreciar en la tabla 17, ambas condiciones se cumplieron durante todas las PBAR para los IHA. También se observó que la degradación de ambos IHA siguió una cinética de primer orden, tomando en cuenta lo sugerido por Marshe y Polkowsky (1972), donde una ecuación de primer orden describe de manera adecuada una curva de consumo de oxígeno para aguas residuales si el valor de K está por debajo de  $0.2 \text{ d}^{-1}$  mientras que si es un valor superior a éste la describe mejor una de segundo orden.

De acuerdo con los resultados de la tabla 17, así como de las tablas 66 y 67 del anexo A.1, se detectaron los siguientes comportamientos:

- ❖ La  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de IHAGIPCU fue significativamente menor (60%) que la de IHAKIPCU;  $t_{70\%}$  de IHAKIPCU también fue significativamente menor (aproximadamente un tercio del obtenido para IHAGIPCU). No hubo diferencias significativas en los valores de  $t_{50\%}$  entre ambas pruebas. La  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de IHAGIPCE fue un 63% menor que la de IHAKIPCE.  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$  para IHAKIPCE representaron aproximadamente un tercio de los valores obtenidos para IHAGIPCE. Todas las diferencias señaladas fueron estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ). Finalmente, la  $\mu_{\text{máx}}$  promedio de IHAGISTJ fue un 76% menor que la de IHAKISTJ.  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$  para IHAKISTJ representaron un cuarto de los respectivos valores para IHAGISTJ. Al igual que en el caso anterior, todas las diferencias señaladas fueron estadísticamente significativas (tabla 91, anexo B).

- ❖ La remoción del 50% de la concentración inicial del IHAK con las tres fuentes de inóculo se verificó en un lapso de 6 a 8 horas una vez alcanzada la  $\mu_{\text{máx}}$ , mientras que para el IHAG se verificó en un lapso de 10 y hasta 60 horas, lo que significa una variación importante con respecto al IHAK. Estos resultados reafirman que la máxima actividad degradadora del inóculo sobre el IHAK se llevó a cabo entre las 24 y las 48 horas del inicio de la etapa experimental y entre las 48 y 96 horas del inicio de las PBAR con el IHAG.
- ❖ La remoción del 70% de la concentración inicial del IHAK también se verificó dentro del intervalo de 24 a 48 horas del inicio de la etapa experimental, o cuando mucho en las primeras horas del periodo comprendido entre las 48 y 72 horas. En el caso de las pruebas con el IHAG como fuente de carbono, el  $t_{70\%}$  se logró de uno a tres días después de que se alcanzó el  $t_{50\%}$ .
- ❖ Se aprecian altos valores de  $\sigma$  y CV para los datos cinéticos de las pruebas IHAKISTJ (24%) e IHAGISTJ (33%). La variación observada podría atribuirse a que esta fuente de inóculo fue preparada a partir de suelo, lo cual dificulta la obtención de una muestra con pocas variaciones en la composición y/o viabilidad de las comunidades microbianas.

El análisis estadístico enfocado a la degradación del IHAK empleando las 3 fuentes de inóculo, no demostró diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en los valores de  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$  (tablas 87 y 88, anexo B). Por lo tanto, se infiere que para este IHA en particular, la velocidad de degradación fue independiente del origen de la fuente de inóculo empleada. Esto reafirmó que el IHAK es rápidamente biodegradable, posiblemente debido a que su estructura química resulta más biodisponible y/o menos tóxica para los microorganismos degradadores.

Al realizar el análisis estadístico para la degradación del IHAG, se detectaron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  de IHAGIPCU e IHAGISTJ (la  $\mu_{\text{máx}}$  de este último representó el 53% de la registrada para IHAGIPCU). No se encontraron diferencias significativas en los valores de  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$  (tablas 87 y 88, anexo B). Por lo tanto, se concluye

que para el IHAG en particular, la velocidad de degradación dependió, en cierta medida, de la fuente de inóculo empleada, en concordancia con lo señalado en los trabajos de Van Ginkel *et al.* (1995) y Percheranciet *et al.* (1996), pues deben requerirse microorganismos con cierto perfil de actividad y/o tolerancia aparente a sus componentes, para que pueda ser rápidamente biodegradado.

A efecto de corroborar si entre las tres corridas para cada PBAR con los dos IHA hubo variaciones estadísticamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ), se realizó un ANDEVA (factor: corridas experimentales), con los datos presentados en las tablas 66 y 67 del anexo A.2. A continuación se presenta la descripción de los resultados obtenidos:

- ❖ En el caso de las pruebas IHAKIPCU se presentaron diferencias significativas dadas por el incremento de los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  y el  $t_{70\%}$  entre la primera y la tercera corridas (tabla 89, anexo B), mientras que para las pruebas IHAGIPCU si hubo diferencias significativas entre las tres corridas, asociadas con el descenso en los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  (tabla 90, anexo B). Para la realización de estas pruebas se tomó inóculo de la planta de tratamiento para cada una de las corridas realizadas. Las pruebas se efectuaron durante un período de 2 meses, por lo que podrían esperarse cambios en la composición de la fuente de inóculo, lo que originaría la variación en los parámetros cinéticos.
- ❖ En el caso de las pruebas de biodegradabilidad empleando IPCE como fuente de inóculo, éste se conservó en refrigeración una vez que se obtuvo. El lapso entre la primera y la sexta corrida fue de aproximadamente mes y medio. Esta condición se estableció a fin de evaluar si la conservación del inóculo en refrigeración, en la que ocurre pérdida de actividad microbiana y/o muerte de algunas especies, lo que provoca que una sustancia que ha demostrado ser rápidamente biodegradable, no lo sea más como resultado del manejo y conservación del inóculo. Para las pruebas IHAKIPCE se observó que la  $\mu_{\text{máx}}$  presentó tendencia a disminuir entre la primera y la tercera corrida, aunque no se registraron diferencias significativas (tabla 89). Por otra parte, para las pruebas IHAGIPCE, si hubo diferencias significativas en los valores de  $\mu_{\text{máx}}$  (tabla 90, anexo B), ya que disminuyeron entre la primera y la tercera

corrida. También hubo diferencias significativas en los valores de  $t_{50\%}$  y  $t_{70\%}$ , debido a que aumentaron entre la primera y la tercera corrida. Es interesante destacar el contraste con las pruebas para el IHAK con esta misma fuente de inóculo, pues parece indicar que el estado metabólico del inóculo sí afectó los parámetros cinéticos de degradación del IHA. Estos resultados nuevamente apuntan a que la estructura química y/o la composición del IHAG incluye compuestos que son más difíciles de degradar que los empleados para la formulación del IHAK.

- ❖ Para las pruebas de biodegradabilidad aerobia IHAKISTJ e IHAGISTJ no se observaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos determinados (tablas 89 y 90, anexo B).

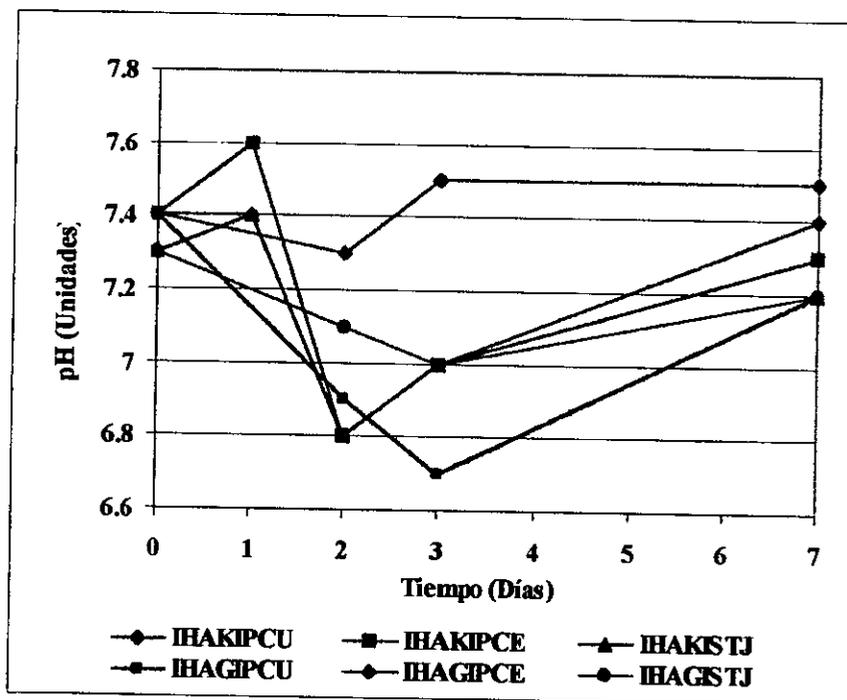
Las observaciones descritas en los párrafos anteriores pueden deberse según Grady *et al.* (1996), al desarrollo del cultivo (el tipo de condiciones ambientales impuestas y la duración de esas condiciones), que han sido sugeridas como el factor que contribuye de manera significativa a las diferencias en los parámetros cinéticos que describen el fenómeno de biodegradación. Este comportamiento se debe a que dentro de un cultivo continuo mixto se seleccionan algunas poblaciones de la comunidad sobre otras, lo cual es determinado en gran medida por su cinética de crecimiento. Como la comunidad sufre cambios, los parámetros cinéticos resultarán afectados. El desarrollo del cultivo también determina el estado fisiológico celular y la rapidez con la que las enzimas se sintetizan y reaccionan.

## 5.6. pH

Es ampliamente reconocido que el valor de acidez o alcalinidad permite monitorear las variaciones en el medio causadas por las reacciones químicas que se verifican durante la actividad biológica del inóculo sobre el sustrato (Guillén-Jiménez *et al.* 2000). Asimismo, también es importante monitorear este parámetro debido a que las enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo de pH en el que su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la

actividad enzimática disminuye (Lehninger *et al.* 1993), lo que trae como consecuencia que se afecte el crecimiento microbiano.

Los valores de pH presentaron variaciones significativas con respecto a los factores fuente de inóculo y al tiempo (tablas 76, 79 y 81, anexo B). Como se muestra en la figura 9, en todas las pruebas realizadas se registró descenso en los valores de pH en el intervalo de t=0 a 2 días para las pruebas con IHAK y de t=0 a 3 días para las pruebas con IHAG, excepto IHAGIPCE que fue significativamente distinta a las demás pues no presentó este descenso (tabla 78, anexo B). El análisis estadístico entre tiempos también permitió detectar diferencias significativas entre los valores de pH de IHAKISTJ con respecto a IHAKIPCU e IHAKIPCE, aunque el análisis de perfiles no demostró en qué intervalo en particular y entre IHAGIPCU e IHAGIPCE en el intervalo t=0 a 3 días (tabla 81, anexo B).



**Figura 9. Perfil de comportamiento del pH durante las PBAR de IHA**

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta t=14 días. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones. La variación máxima en los valores fue del 5%.

El descenso en los valores de pH, independientemente del IHA analizado, puede atribuirse a la formación de ácidos orgánicos como resultado de la actividad de los microorganismos que estaban degradando los componentes de los IHA. A pesar de que no se conoce su composición exacta puede inferirse que entre los componentes de los IHA existe alguno que al degradarse produzca ácidos orgánicos que produzcan la caída en los valores del pH. La producción de ácidos orgánicos durante los procesos de biodegradación es un hecho ampliamente documentado en la literatura internacional para gran variedad de contaminantes. Por ejemplo, Hur *et al.* (1994) reportaron la producción de ácido oxálico como uno de los productos finales de la degradación aerobia del 1,1,2,2-tetracloro-2,2-difluoroetano empleando una cepa de *Pseudomonas putida* recombinante. Gessel *et al.* (2001) identificaron ácidos mucónicos como productos de la biotransformación (ruptura del anillo aromático), del fungicida bifenilo llevada a cabo por el hongo imperfecto *Paecilomyces lilacinus*. Asimismo, Hammer *et al.* (1998) caracterizaron un ácido mucónico hidroxilado como componente de un producto de ruptura del anillo aromático del dibenzofurano, de cuya biotransformación bajo condiciones aerobias fue responsable la levadura *Trichosporon mucoides*. Finalmente Dutta, *et al.* (1998), reportaron que *Sphingomonas paucimobilis* oxidó metil naftalenos a través de varias rutas metabólicas produciendo ftalatos y salicilatos.

También debe considerarse qué, teóricamente, en este intervalo es donde también debió de existir la mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub>, como reflejo de una mayor velocidad de oxidación de los sustratos, por lo que momentáneamente podría ser rebasada la capacidad del sistema amortiguador H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (presente en el MM empleado, no sólo como fuente de fósforo, sino como solución amortiguadora). Posteriormente, al disminuir la disponibilidad de sustratos oxidables, la producción de CO<sub>2</sub> decrece y debido a la alta capacidad amortiguadora del medio mineral, el pH casi regresó al valor que tenía al principio del experimento. Los resultados descritos en el párrafo anterior se asemejan a los obtenidos por Zgajnar y Zagorc (1999a) para estudios de biodegradabilidad aerobia con fenol y dietilenglicol empleando un respirómetro, dónde el pH final de las muestras evaluadas registró valores neutros.

En los controles de inóculo se observó una leve tendencia hacia la alcalinización (pH 7.8 – 8 máximo) conforme aumentó el tiempo de degradación. Sin embargo, ninguno de estos cambios resultó estadísticamente significativo.

### **5.7. Sólidos totales (STT, STV y STF)**

Los procesos de biodegradación implican entre otros aspectos, la incorporación de materia en suspensión a la biomasa. A partir de la determinación de sólidos totales (STT) se puede estimar el total de la materia suspendida y disuelta en el sistema. La materia inorgánica o sólidos totales fijos (STF) es el residuo que queda después de la ignición de la muestra (550°C y 30 minutos), mientras que la pérdida de peso con respecto a los STT representa los sólidos totales volátiles (STV) que se relacionan con la cantidad de materia orgánica.

En las tablas 24, 31, 38, 45, 52 y 59 del anexo A.1 se encuentran los resultados promedio para las concentraciones de sólidos totales. Los STT y STV mostraron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) con respecto al IHA, fuente de inóculo y al tiempo (tablas 76, 79 y 81, anexo B). En contraste la concentración de STF no varió significativamente con respecto a ellos (tablas 77, 79 y 81, anexo B). De acuerdo con el análisis entre tiempos, se encontraron diferencias significativas en la concentración de STT entre IHAKIPCU e IHAKIPCE, específicamente en el intervalo de  $t=0$  a 1 día y entre IHAGIPCU e IHAGIPCE en  $t=0$  a 3 días, tiempos donde se comenzó a registrar la remoción de COD (tabla 83, anexo B). En el caso de los STV hubo diferencias significativas entre IHAKIPCU e IHKIPCE-IHAKISTJ en el intervalo  $t=0$  a 1 día y entre IHAGIPCU e IHAGIPCE en  $t=0$  a 3 días (tabla 84, anexo B). La mayoría de las diferencias significativas detectadas en el tiempo se atribuyeron a la fuente de inóculo IPCE y ello podría estar en relación con su aparente retardo en el inicio del consumo de oxígeno.

A lo largo de la etapa experimental, independientemente de la fuente de inóculo e IHA analizados, hubo una disminución paulatina en la concentración de STT y STV, lo cual probablemente se debió a la baja en la concentración de COD biodegradable, es decir menor

disponibilidad de sustrato oxidable biológicamente. Estos resultados estuvieron en contraposición con los esperados, pues la concentración de STT y STV debió incrementarse y mantenerse en los intervalos donde se verificó la mayor tasa de consumo de oxígeno y porcentaje de degradación de los IHA. Cabe recordar los IHA tienen altas concentraciones de STT y STV (tabla 11) por lo que su aumento pudo estar encubierto por misma la degradación del IHA. En consecuencia, esta baja en la concentración de STT y STV pudiera tomarse como una evidencia más de que los IHA estaban siendo mineralizados.

Como la degradación de los IHA se llevó a cabo en corto tiempo, los nutrientes se vuelven un factor limitante para el mantenimiento microbiano. La fase de crecimiento endógeno se caracteriza porque los microorganismos se ven obligados a metabolizar las reservas contenidas en su propio protoplasma sin que exista reemplazo alguno, derivando en la disminución neta de la biomasa microbiana. Durante esta fase, frecuentemente ocurre el fenómeno de lisis celular, en la cual los microorganismos se disgregan y los nutrientes contenidos en la célula se difunden para suministrar alimentos a los organismos sobrevivientes (Metcalf y Eddy, 1991). Para las tres fuentes de inóculo existe la posibilidad de suponer que las bacterias inoculadas entraron en fase de metabolismo endógeno y que por ello disminuyeron tanto la concentración de STT como la de STV. Lo anterior debido a un efecto combinado entre la lisis de los microorganismos y la mayor producción de CO<sub>2</sub> que quedó libre en solución resultado del proceso de respiración aerobia. El CO<sub>2</sub> puede solubilizarse en medio acuoso (Govind et al. 1997) y contribuye con el sistema amortiguador bicarbonato/ácido carbónico a mantener el pH de las soluciones en valores cercanos a la neutralidad. Esta idea se apoya al constatar que la concentración de STF permaneció relativamente constante a través de los experimentos.

En los controles de inóculo, los STT y STV presentaron tendencia a disminuir paulatinamente, (pero en mucho menor medida que en los matraces con IHA) mientras que los STF permanecieron constantes a lo largo del experimento. Ninguno de estos cambios resultó ser estadísticamente significativo.

La mineralización de la materia orgánica fue monitoreada a través de parámetros relacionados con diferentes etapas de los ciclos biogeoquímicos de retroalimentación que finalmente permiten la asimilación del contaminante. Cabe recordar que la biodegradación de compuestos orgánicos puede verse limitada debido a que los nutrimentos inorgánicos indispensables para el crecimiento microbiano, se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente (Swidoll *et al.* 1988; Steffensen y Alexander, 1995).

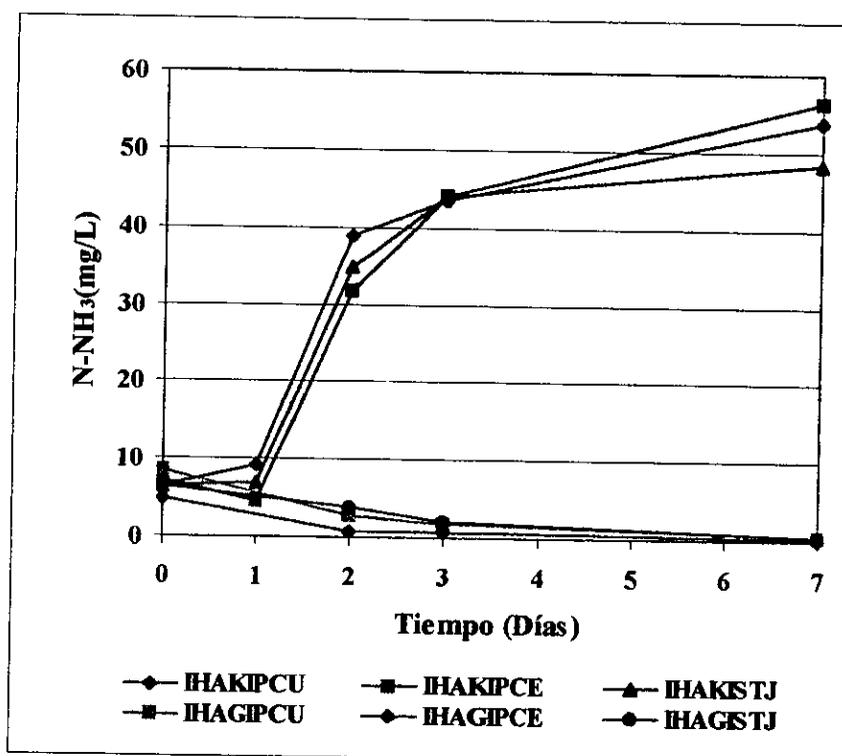
### **5.8. Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

El nitrógeno es un nutrimento indispensable para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas que contienen nitrógeno. La mayor parte del nitrógeno en medio acuoso se encuentra en forma de moléculas orgánicas como aminoácidos, aunque existe una pequeña fracción disuelta en forma de nitratos, nitritos y amonio (Guillén-Jiménez, *et al.* 2000). Los microorganismos heterótrofos degradan enzimáticamente las formas de nitrógeno orgánico a nitrógeno amoniacal en un proceso conocido como amonificación. El amoniaco es producto de la desaminación de compuestos nitrogenados y de la hidrólisis de la urea.

La figura 10 ilustra los resultados de la concentración de nitrógeno amoniacal, que presentó diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) determinadas por los factores IHA, fuente de inóculo y tiempo (tablas 77, 79 y 81, anexo B). Se observaron comportamientos similares para IHAKIPCU, IHAKIPCE e IHAKISTJ, excepto para la prueba IHAKIPCE, que fue significativamente diferente en el intervalo de  $t=0$  a 1 día, donde registró descenso de la concentración con respecto a la detectada inicialmente y en el intervalo  $t=0$  a 2 días entre la concentración producida por IHAKIPCU e IHAKIPCE (tabla 84, anexo B). Como se mencionó con anterioridad, en esta serie de pruebas la TPCO entre  $t=0$  a 1 día es baja ( $5\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) al igual que el porcentaje de degradación (menos del 10%) mientras que en el intervalo  $t=1$  a 2 días, la TPCO y el porcentaje de degradación de las pruebas IHAKIPCE, fue mayor que los registrados para IHAKIPCU e IHAKISTJ.

Con respecto a las pruebas IHAGIPCU, IHAGIPCE e IHAGISTJ (figura 10), la concentración de nitrógeno amoniacal descendió, a partir del inicio del proceso de degradación, alcanzando a  $t=3$  días, concentraciones que hacen difícil su detección. La concentración mínima detectable de acuerdo con las curvas patrón para este analito fue de  $122 \mu\text{g NH}_3\text{-N/L}$ . A pesar de que se detectó diferencia significativa entre las pruebas IHAGIPCU e IHAGIPCE, con respecto al tiempo, el análisis de perfiles no permitió precisarlo con exactitud (tabla 84, anexo B).

Las series de controles de inóculo no mostraron diferencias significativas en la concentración de nitrógeno amoniacal, sus valores permanecieron por debajo de los  $10 \text{ mg/L}$  a lo largo de todos los experimentos.



**Figura 10. Perfil de producción de  $\text{N-NH}_3$  durante las PBAR de IHA**

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta  $t=14$  días. Cada punto es el promedio de 6 determinaciones. La variación máxima en los valores fue del 20%

En el caso de las pruebas con IHAK no se observó consumo de amonio libre sino que su concentración aumentó de acuerdo con el incremento acumulado de oxígeno consumido. En las pruebas con IHAG si hubo consumo de amonio libre del MM hasta que su concentración cayó. Este comportamiento pudo deberse a que el IHAG, solamente cuenta con alrededor de 10% de nitrógeno en su composición elemental, en contraste con IHAK que tiene cerca del 20% y de hecho, contiene compuestos aminados; en consecuencia se produjo amoniaco (alrededor de 55 mg/L después de 7 días de etapa experimental), lo que constituye un indicio de la mineralización de IHAK. Por lo tanto, para el IHAG se sugiere que el nitrógeno existente en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  del MM y aquél que tiene el IHA constituyeron solamente una concentración suficiente para que se llevara a cabo la síntesis celular y las funciones metabólicas básicas de los microorganismos presentes, por lo que se registró su desaparición del medio.

### 5.9. Nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ )

La nitrificación permite que el amonio sea oxidado a nitritos (estado de oxidación intermedio, ya sea entre la oxidación de amoniaco a nitrato y en la reducción de los nitratos) por microorganismos autótrofos como *Nitrosomonas* y finalmente microorganismos como *Nitrobacter* llevan a cabo la oxidación de los nitritos a nitratos. Este proceso requiere de un consumo de oxígeno considerable y provoca el descenso en los valores del pH. Al mismo tiempo, se lleva a cabo un proceso de asimilación, en el cual se consume carbono inorgánico para la síntesis de biomasa.

En las tablas 24, 31, 38, 45, 52 y 59 del anexo A.1 se encuentran los resultados promedio para los nitritos. La concentración de éstos presentó variaciones significativas ( $\alpha= 0.05$ ) atribuibles al IHA, fuente de inóculo y al tiempo (tablas 77, 78, 80 y 82, anexo B).

En las pruebas con el IHAK los nitritos se detectaron en bajas concentraciones (no más de 200  $\mu\text{g/L}$ ) y se observó su incremento significativo en el intervalo  $t= 0$  a 7 días que comprende todo el

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

periodo de duración de las pruebas (tabla 85, anexo B). En  $t=7$  días la concentración de materia orgánica de tipo carbonoso es muy baja, por lo que seguramente de haber continuado con las pruebas, se hubiera observado el repunte en la TPCO, como consecuencia de la degradación de materia orgánica nitrogenada. Esta idea se apoya en los resultados de la prueba preliminar de biodegradabilidad del IHAK (tablas 22 y 23, anexo A.1).

En el caso de las pruebas para el IHAG, los nitritos inicialmente se detectaron en muy bajas concentraciones (menos de  $50 \mu\text{g/L}$ ) y conforme aumentó el tiempo de degradación éstos tendieron a desaparecer. De acuerdo con el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitritos con respecto al tiempo al comparar IHAGIPCE e IHAGISTJ con respecto a IHAGIPCU, aunque el análisis de los perfiles no permitió determinar en qué tiempo en particular ocurrió (tablas 82 y 85, anexo B).

Los controles de inóculo también presentaron bajas concentraciones de este analito y sin variaciones estadísticamente significativas en su concentración.

### **5.10. Nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ )**

En las tablas 24, 31, 38, 45, 52 y 59 del anexo A.1 se encuentran los resultados promedio para la concentración de nitratos que presentó variaciones significativas ( $\alpha = 0.05$ ) atribuibles al IHA y al tiempo (tablas 77, 80, 82 y 85, anexo B).

Las concentraciones detectadas corresponden a valores por debajo de  $5 \text{ mg/L}$  en todas las pruebas efectuadas, lo que demuestra la ausencia de nitrificación. No hubo diferencias significativas en su concentración entre tiempos, con respecto a las tres fuentes de inóculo. De acuerdo con experimentos de Van Ginkel *et al.* (1995), esta carencia puede ser atribuida a la ausencia de las bacterias nitrificantes las cuales son de lento crecimiento.

Los controles de inóculo presentaron bajas concentraciones de nitratos (por debajo de 5 mg/L) que no resultaron ser estadísticamente significativas.

Existe la posibilidad de que en los IHA estén presentes compuestos, o bien, que se hayan generado durante la degradación aerobia, subproductos a partir de algún componente que limiten o eviten la actividad nitrificante. A este respecto Keener y Arp (1994), reportaron que el benceno y varios bencenos sustituidos pueden inhibir actividad de la amoniaco monooxigenasa de *Nitrosomonas europaea* y que en la mayoría de los casos, esa inhibición estuvo acompañada por la transformación del compuesto aromático a productos más oxidados. Hyman *et al.* (1995) estudiaron la inhibición, inactivación y la recuperación de la actividad de amonio-oxidante durante el cometabolismo del tricloroetileno con *Nitrosomonas europaea* bajo condiciones aerobias. Finalmente Deni y Penninckx (1999), encontraron que los hidrocarburos del petróleo pueden inhibir la actividad nitrificante en suelos que no presentan historia previa de contaminación mientras que las bacterias amonio-oxidantes procedentes de suelos contaminados adquieren cierta resistencia a la inhibición, posiblemente por el incremento de la afinidad de las bacterias nitrificantes a la fuente de amonio contenida en el suelo.

Debido a la corta duración de los ensayos (7 días para IHAK y 14 días para IHAG) y a que no se conoce la formulación exacta de los IHA, puede sospecharse de ambas posibilidades como explicación a los resultados obtenidos. Sin embargo, de acuerdo con la prueba de biodegradabilidad preliminar empleando IHAK (tablas 22 y 23, anexo A.1), se observó incremento en la concentración de nitratos a los 14 días, con descenso en la concentración de amoniaco y nitritos. En este sentido para las PBAR empleando IHAK la falta de nitrificación fundamentalmente se debe a la corta duración de los ensayos, mientras que para IHAG hay evidencia de que los productos de degradación pueden ser tóxicos. Esta aseveración pudiera verse reforzada con los resultados obtenidos en los matraces control de toxicidad para las 3 fuentes de inóculo, que sugieren cierto grado de toxicidad del IHAG o de sus subproductos de degradación. Cabe recordar, que en la etapa experimental previa, se encontró que IHAG tenía menor posibilidad de ser biodegradado y una alta toxicidad aún a diluciones de 1:1000 o sea 1.73gDQO/L o 742 mgCOD/L.

### 5.11. Ortofosfatos ( $P-PO_4^{3-}$ )

El fósforo es otro nutrimento indispensable para las células, especialmente para la síntesis de moléculas como el ATP y ácidos nucleicos. La mayor reserva de fósforo en la biosfera se encuentra en rocas y sedimentos, también existe en el ambiente acuático como moléculas orgánicas y en formas inorgánicas insolubles como el fosfato. El fósforo en pequeñas concentraciones estimula el crecimiento microbiano y puede ser nutrimento limitante (por ejemplo, para el crecimiento de algas). En aguas residuales el fósforo principalmente se encuentra en sus formas inorgánicas (ortofosfatos y polifosfatos) y en sus formas orgánicas. Los polifosfatos son totalmente hidrolizados a ortofosfatos; aquellos que forman parte de la materia orgánica son biológicamente degradados a ortofosfatos (Manahan, 1997).

La cuantificación de ortofosfatos tuvo como objetivo verificar que la fuente de fósforo disponible no fuera una limitante para la degradación de los IHA. La concentración de ortofosfatos presentó variaciones significativas ( $\alpha= 0.05$ ) atribuibles al IHA, fuente de inóculo y al tiempo (tablas 77, 80 y 82, anexo B). La figura 11 muestra que la concentración de ortofosfatos disminuyó paulatinamente, en el intervalo de  $t= 0$  a 3 días, lo cual podría explicarse en función de la síntesis de ATP y acumulación de gránulos de polifosfato, útiles en los procesos metabólicos celulares, aunque esta aseveración resultó especulativa, dado que la concentración de fosfatos disminuyó alrededor de 10% como máximo. Por otra parte, en  $t= 3$  a 7 días de todas las pruebas, hubo incremento de la concentración de ortofosfatos misma que pudiera deberse a su liberación del metabolismo endógeno y la lisis celular. A través del análisis de perfiles, fue posible constatar que las pruebas con ambos IHA empleando como fuente de inóculo IPCU presentaron variaciones significativas con respecto a las pruebas con IPCE; específicamente en el intervalo  $t= 0$  a 7 días para IHAKIPCU con respecto a IHAKIPCE y en los intervalos  $t= 0$  a 3 y/o  $t=0$  a 7 días al comparar IHAGIPCE con IHAGIPCU (tabla 86, anexo B). Los controles de inóculo no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ortofosfatos.

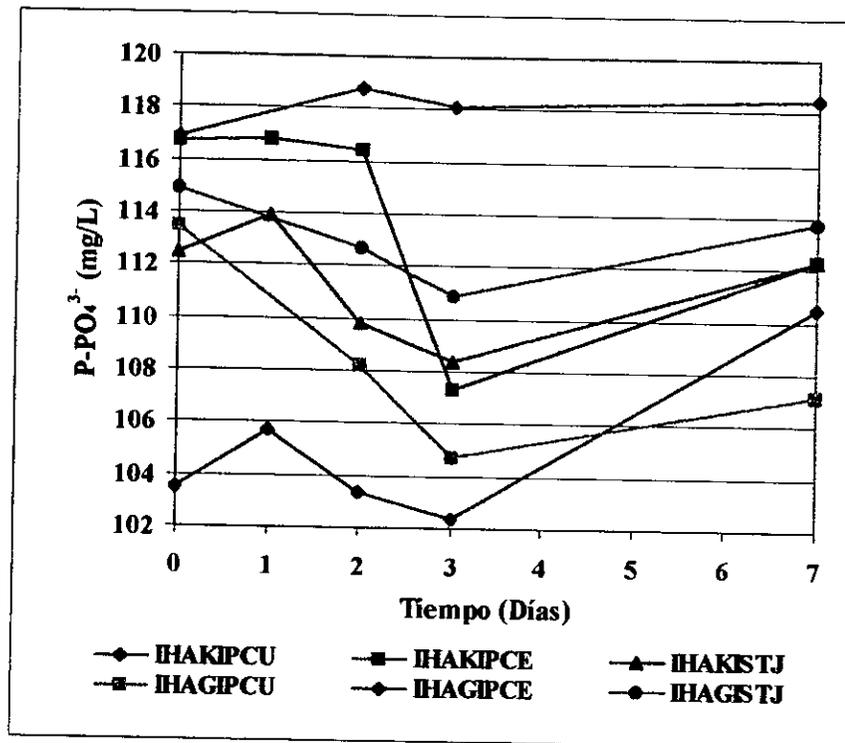


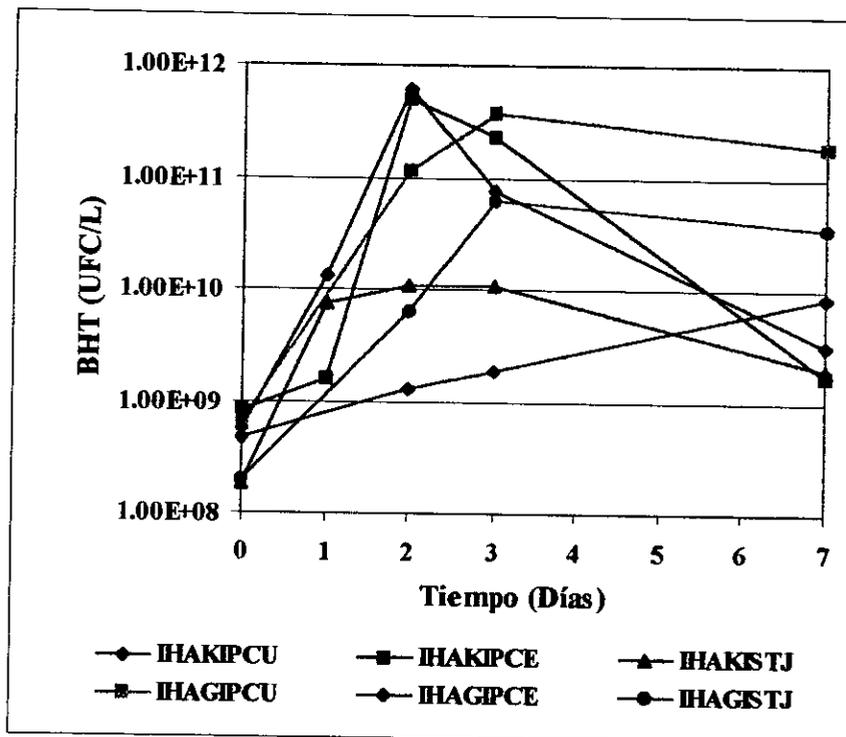
Figura 11. Perfil de la concentración de ortofosfatos durante las PBAR de IHA

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta  $t=14$  días. Cada punto es el promedio de 6 determinaciones. La variación máxima en los valores fue del 10%

En experimentos con aguas residuales Guillén-Jiménez *et al.* (2000) observaron que la concentración de ortofosfatos se reduce a cero en el intervalo de 2 a 3 días como resultado del consumo microbiano y posteriormente, ésta se eleva hasta casi llegar a un valor constante. En plantas de tratamiento de aguas, los microorganismos utilizan sólo el fósforo necesario para sus requerimientos metabólicos, resultando en la eliminación de un 20 a 40% de la concentración inicial detectada.

**5.12. Cuenta de bacterias heterótrofas totales (BHT)**

Durante los procesos de biodegradación, se libera de energía que permite elevar la capacidad biosintética de los organismos y la incorporación de carbono como constituyente celular, observándose un incremento en número y biomasa de la población (Atlas y Bartha, 1993).



**Figura 12. Perfil de la cuenta de BHT durante las PBAR de IHA**

Las PBAR con el IHAG se extendieron hasta t=14 días. Cada punto es el promedio de 6 determinaciones. La variación máxima en los valores fue del 50%

La cuenta de BHT presentó variaciones significativas ( $\alpha= 0.05$ ) atribuibles al IHA, fuente de inóculo y al tiempo (tabla 77, 80, 82 y 86, anexo B). Como lo muestra la figura 12, la cuenta de BHT tuvo su máxima abundancia a los 2 días para IHAKIPCU, IHAKIPCE e IHAKISTJ; así como a los 3 días para IHAGIPCU e IHAGISTJ. En el caso de IHAGIPCE no se obtuvo un máximo en este parámetro. La cuenta de BHT para IHAKIPCE presentó diferencias significativas (tabla 78, anexo B) con respecto a IHAKISTJ y las pruebas con las tres fuente de inóculo para

IHAG, hecho que se distingue en la figura 12. El número de microorganismos se incrementó durante la etapa donde aumenta la velocidad de remoción de sustrato (Chudoba *et al.* 1992).

En algunos casos las curvas de crecimiento microbiano no presentaron un perfil de comportamiento típico (fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte bien definidas); sin embargo, es importante destacar que los valores de las cuentas de BHT se ajustan al comportamiento de sus respectivos perfiles de consumo de oxígeno y en consecuencia con los de tasa de consumo de oxígeno de las tablas 15 y 16, es decir la cuenta de BHT aumenta cuando el consumo de oxígeno es mayor y disminuye cuando éste disminuye hasta tornarse asintótico.

A partir del análisis de perfiles para la interacción tiempo-fuente de inóculo, se encontraron diferencias significativas al comparar las pruebas realizadas con ambos IHA empleando IPCE con respecto a las pruebas utilizando los inóculos IPCU e ISTJ; específicamente en el intervalo de  $t=0$  a 3 días para las pruebas con IHAK y en el intervalo  $t=0$  a 14 días para las pruebas con IHAG. La disminución del número de BHT a partir de  $t=3$  días, en el caso de las PBAR con IHAK, puede atribuirse al agotamiento de los sustratos disponibles para biodegradación, lo cual se traduce en que la fuente de carbono y de energía se vuelven limitantes para la proliferación de esos microorganismos, mientras que en el caso de las pruebas con IHAG puede atribuirse al agotamiento de los sustratos disponibles o de "fácil" biodegradación con respecto a otros que puedan ser de más lenta y requieran por lo tanto de más tiempo (Chaineau *et al.* 1995), lo que podría inducir cambios importantes en la comunidad bacteriana participante.

En el caso de las pruebas con IHAKIPCE, se observó una fase de latencia de 1 día con respecto a las pruebas IHAKIPCU e IHAKISTJ. Como se discutió en el caso de los datos de consumo de oxígeno, aparentemente la velocidad de oxidación de los sustratos fue menor en la parte de arranque de las pruebas IHAKIPCE, aunque finalmente se llegó a resultados similares de porcentaje de degradación y consumo de oxígeno después de 7 días de etapa experimental. De acuerdo con la figura 15, en el intervalo de  $t=0$  a 1 día se obtuvo bajo incremento de la cuenta de BHT para IHAKIPCE con relación a IHAKIPCU e IHAKISTJ, pero para  $t=1$  a 2 días el mayor incremento de éstos correspondió a IHAKIPCE. A este mismo respecto, en todos los intervalos

de monitoreo se obtuvo un incremento bajo de BHT para IHAGIPCE con respecto a IHAGIPCU e IHAGISTJ, excepto en  $t= 3$  a 7 días donde el mayor incremento correspondió a IHAGIPCE, mientras que IHAGIPCU e IHAGISTJ vieron disminuida su población y esta tendencia continuó en hasta el final de las pruebas.

Estos datos reflejan únicamente las bacterias que pudieron crecer en el medio NWRI en un máximo de 48 horas y hay que considerar que muchos pudieron estar como agregados. Las bacterias normalmente se encuentran agrupadas en gran número, especialmente cuando se están reproduciendo activamente o cuando forman polisacáridos extracelulares, por lo tanto es muy raro que estén distribuidos de manera uniforme en una muestra y como por lo general se examinan muestras pequeñas, pueden introducirse grandes errores. El método de cuantificación por extensión superficial se basa en el supuesto de que cada célula bacteriana en la superficie del agar, da origen a un cúmulo de células que producen una colonia, la cual se manifiesta a simple vista. La agitación puede inducir la separación de los agregados, así como su formación; de tal manera que cada colonia puede proceder tanto de una sola célula como de un agregado. Al respecto, los métodos de recuento de células viables no ofrecen confiabilidad absoluta para efectuar la estimación de todos los grupos microbianos existentes en una muestra, debido a que no existe ningún medio de cultivo o grupo de condiciones de incubación que permita el desarrollo y diferenciación de todos los grupos tróficamente activos (Schade y Lemmer, 1995; Armendáriz *et al.* 1998). Los inconvenientes señalados con anterioridad se reflejan en los resultados obtenidos en todas las cuentas de BHT realizadas, por lo que constituyeron una variable no controlada constante.

### **5.13. Perfiles de actividad enzimática**

La biodegradación de contaminantes orgánicos es facilitada por enzimas, durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos; por medio de la asimilación del carbono orgánico del sustrato y su conversión a productos inorgánicos (Albert *et al.* 1995).

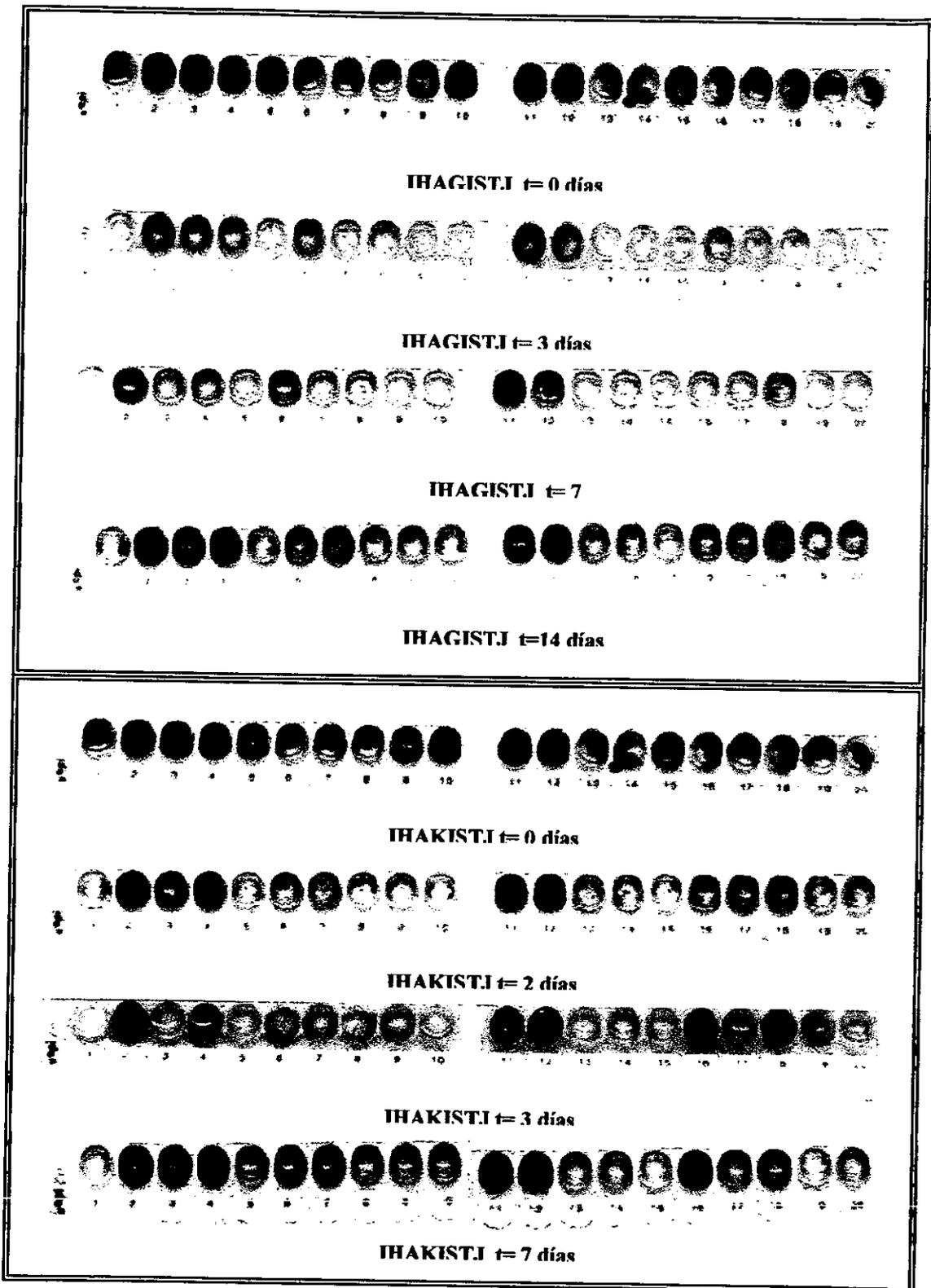


Figura 13. Perfil de actividad enzimática de las PBAR IHAGISTJ 3 e IHAKISTJ 3

El cálculo de los parámetros de diversidad enzimática se basó en las funciones empleadas para el estudio de la ecología de comunidades, donde es necesario conocer la diversidad o heterogeneidad de especies presentes en un sistema dado. De acuerdo con Krebs (en Luna Pabello *et al.* 1994), una forma ampliamente aceptada para medir la heterogeneidad de una comunidad (en el caso particular de este trabajo, medir la heterogeneidad de las actividades enzimáticas del inóculo mediante el sistema API Zym), es la función de Shannon y Wiener. El valor obtenido como resultado de la aplicación de esta función es directamente proporcional al grado de diversidad presente en la comunidad bajo estudio. La función de Shannon y Wiener combina dos componentes de la diversidad: el número de especies y la proporción relativa de los individuos en las diferentes especies.

$$H = -\sum_{i=1}^S (p_i)(\log_2 p_i)$$

Dónde (en el caso particular de este trabajo): H= índice de diversidad enzimática de la muestra; S= número actividades enzimáticas detectadas y  $p_i$  = proporción del total de la muestra (nivel de actividad enzimática de 0 a 5) que corresponde a la especie  $i$  (en este caso a la enzima  $i$ ).

La medición de la equidad de la comunidad (muestra), puede calcularse de acuerdo con la siguiente proporción:

$$E = H/H_{\text{máx}}$$

Dónde: E equidad (valores de 0 a 1), H= diversidad de actividad enzimática observada y  $H_{\text{máx}}$ = máxima diversidad de actividades enzimáticas

$$H_{\text{máx}} = \log_2 S$$

La representación gráfica de los índices de actividad enzimática para cada fuente de inóculo se encuentra en las tablas 18, 19 y 20. En la tabla 21 se presentan los resultados numéricos de H,  $H_{\text{máx}}$  y E mientras que en las tablas 71 a 86, anexo A.2, se presenta el manejo de resultados para calcular los índices de actividad enzimática de las respectivas PBAR con los dos IHA.

Tabla 18. Perfil de actividad enzimática desarrollado durante las PBAR empleando IPCU como fuente de inóculo

Enzima	IHAKIPCU 2 (03/07/00)				IHAKIPCU 3 (11/07/00)			
	0 días	2 días	3 días	7 días	0 días	2 días	3 días	7 días
PAL								
EST								
LEST								
LIP								
LeuA								
ValA								
CisA								
TRIP								
$\alpha$ QUIM								
PAC								
NAFPH								
$\alpha$ Gal								
$\beta$ gal								
$\alpha$ Glc								
$\beta$ Glc								
GlcNAc								
Enzima	IHAGIPCU 2 (18/07/00)				IHAGIPCU 3 (15/08/00)			
	0 días	3 días	7 días	14 días	0 días	3 días	7 días	14 días
PAL								
EST								
LEST								
LIP								
LeuA								
ValA								
CisA								
TRIP								
$\alpha$ QUIM								
PAC								
NAFPH								
$\beta$ gal								
$\alpha$ Glc								
$\beta$ Glc								
GlcNAc								

**Tabla 19. Perfil de actividad enzimática desarrollado durante las PBAR empleando IPCE como fuente de inóculo**

Enzimas	IHAGIPCE 1 (05/09/00)				IHAKIPCE 1 (12/09/00)				IHAGIPCE 2 (19/09/00)			
	0 d	3 d	7 d	14 d	0 d	2 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d	14 d
PAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EST	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LEST	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LIP	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LeuA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ValA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CisA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
TRIP	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
αQUIM	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PAC	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NAFPH	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
αGal	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
βGal	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
αGlc	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
βGlc	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GlcNAc	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Continuación tabla 19. Perfil de actividad enzimática desarrollado durante las PBAR empleando IPCE como fuente de inóculo

Enzimas	IHAKIPCE 2 (26/09/00)				IHAGIPCE 3 (19/09/00)				IHAKIPCE 3 (17/10/00)			
	0 d	2 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d	14 d	0 d	2 d	3 d	7 d
PAL												
EST												
LEST												
LIP												
LeuA												
ValA												
CisA												
TRIP												
$\alpha$ QUIM												
PAC												
NAFPH												
$\beta$ Gal												
$\alpha$ Glc												
$\beta$ Glc												
GlcNAc												

**Tabla 20. Perfil de actividad enzimática desarrollado durante las PBAR empleando ISTJ como fuente de inóculo**

Enzima	IHAGISTJ 1 (31/10/00)				IHAKISTJ 1 (7/11/00)				IHAGISTJ 2 (14/11/00)			
	0 d	3 d	7 d	14 d	0 d	2 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d	14 d
PAL	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EST		■	■	■		■	■	■		■	■	■
LEST	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LIP		■	■	■		■	■	■		■	■	■
LeuA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ValA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CisA		■	■	■		■	■	■		■	■	■
TRIP		■	■	■		■	■	■		■	■	■
αQuim		■	■	■		■	■	■		■	■	■
PAC	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NAFPE		■	■	■		■	■	■		■	■	■
βGal		■	■	■		■	■	■		■	■	■
αGlc		■	■	■		■	■	■		■	■	■
βGlc		■	■	■		■	■	■		■	■	■
GlcNAc		■	■	■		■	■	■		■	■	■

**Continuación tabla 20. Perfil de actividad enzimática desarrollado durante las PBAR empleando ISTJ como fuente de inóculo**

Enzima	IHAKISTJ 2 (21/11/00)				IHAGISTJ 3 (28/11/00)				IHAKISTJ 3 (05/12/00)			
	0 d	2 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d	14 d	0 d	2 d	3 d	7 d
PAL												
EST												
LEST												
LIP												
LeuA												
ValA												
CisA												
TRIP												
αQuim												
PAC												
NAFPH												
βGal												
αGlc												
βGlc												
GlcNAc												

### 5.13.1. Perfil de actividad enzimática inicial de las fuentes de inóculo

En la figura 15 se presenta la comparación esquemática de los perfiles de actividad enzimática inicial para las 3 fuentes de inóculo empleadas. Las actividades enzimáticas y sus respectivos niveles de actividad enzimática detectados para las fuentes de inóculo IPCU e IPCE guardaron relación con los reportados por Vázquez-Rodríguez *et al.* (1999b), para inóculos procedentes de tanques de aireación de plantas de tratamiento, donde además se encontraron diferencias en los niveles de actividad dependiendo del origen del inóculo. En dichos experimentos, se reportó la presencia de PAL; EST; LEST; LIP; LeuA; ValA, PAC; NAFPH; GlcNaC y  $\alpha$ - $\beta$ Glc.

El análisis estadístico efectuado mediante un ANDEVA para dos factores (IHA y fuente de inóculo), destacó que hubo diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) en los valores de índice de diversidad enzimática de la fuente de inóculo (H) que fueron atribuibles al factor fuente de inóculo al comparar ISTJ con IPCE e IPCU (tabla 92, anexo B).

Este mismo resultado se obtuvo para los datos de índice de diversidad enzimática máxima de la fuente de inóculo (H<sub>máx</sub>). Una probable explicación de las diferencias significativas de los valores de H y H<sub>máx</sub> encontradas para la fuente ISTJ con respecto a IPCU e IPCE, es que ISTJ se obtuvo a partir una preparación de sobrenadante de tierra de jardín de una casa habitación; en contraste con IPCU e IPCE que provienen de plantas de tratamiento de tipo mixto, por lo tanto, estos microorganismos habrían tenido más oportunidad de estar en contacto con una variedad de compuestos mucho más amplia que los de tierra de jardín, lo que determinaría sus más amplias capacidades metabólicas. Así, H<sub>máx</sub> para las fuentes de inóculo IPCU e IPCE fue de 14 a 15 enzimas detectadas en promedio, mientras que para ISTJ sólo se detectaron de 6 a 8 actividades, por lo que su diversidad enzimática fue menor (figura 14 y tablas 18, 19, 20 y 21). Este resultado da sustento a la recomendación de la OECD de emplear inóculos procedentes de plantas de tratamiento de agua, debido a que presentan amplia diversidad de bacterias capaces de llevar a cabo el proceso de biodegradación. Asimismo, refuerza la aseveración de que el origen de la fuente de inóculo determina su estado fisiológico y la naturaleza de los sistemas enzimáticos que expresa (Nyholm *et al.* 1984; Grady *et al.*, 1995; Osswald *et al.* 1995; Van Ginkel *et al.* 1995).

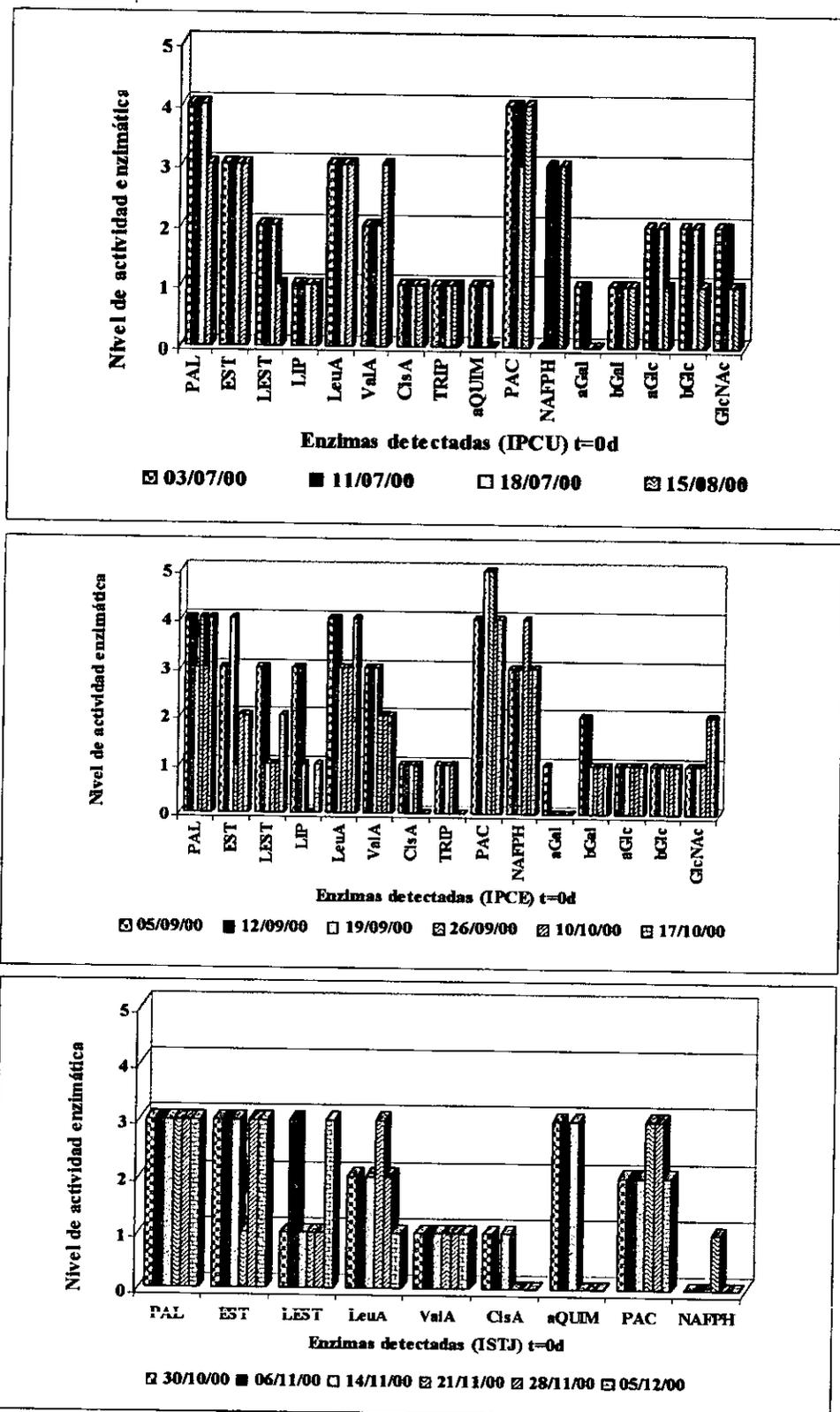


Figura 14. Perfiles de actividad enzimática a t= 0 días para las 3 fuentes de inóculo

Finalmente también concuerda con lo expresado por Thouand y Block (1993) y Thouand *et al.* (1996), acerca del efecto de la adaptación del inóculo a la sustancia de prueba en los resultados de pruebas de biodegradabilidad.

No se registraron diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) en los valores de E, lo que se interpretó como que en las tres fuentes los niveles de actividad enzimática se manifestaron de manera muy similar a los que potencialmente pueden desarrollar, por lo que pudo inferirse que las tres fuentes de inóculo poseían un potencial y/o características metabólicas similares al iniciar el proceso de biodegradación de los IHA (tabla 92, anexo B). Cabe destacar que de acuerdo con la figura 14 hubo actividades enzimáticas comunes entre las tres fuentes de inóculo a  $t=0$  días (por ejemplo: PAC, PAL y LeuA); además de que fueron las que demostraron mayores niveles de actividad, independientemente de la fuente. A su vez las glucosil hidrolasas sólo fueron comunes a IPCU e IPCE y tuvieron bajo nivel de actividad mientras que en ISTJ no fueron detectadas.

El análisis estadístico antes referido demostró que el factor IHA no tuvo efecto significativo en los resultados de actividad enzimática de la fuente de inóculo  $t= 0$  días, lo cual tiene cierto grado de lógica, pues las pruebas se corrieron inmediatamente después de preparar las soluciones para iniciar la corrida biodegradabilidad, por lo que hubo poca oportunidad de que el contacto con el IHA tenga un efecto significativo en estos resultados. Esta aseveración tiene sustento en el fundamento mismo de los métodos enzimáticos de detección de actividades, ya que el relativamente corto período de incubación (4 horas), permite la detección de los fenotipos que ya están presentes en vez de aquéllos que potencialmente pueden desarrollar (Victorio *et al.* 1996).

Debido a que se introdujeron otro tipo de variables al factor fuente de inóculo, como el conservar IPCE en refrigeración después de haberse obtenido y el hecho que las pruebas se realizaron a lo largo de varios meses, se comprobó que no hubiera diferencias significativas entre las fuentes de inóculo utilizadas. Por lo tanto, se realizó otro análisis estadístico por medio de un ANDEVA ( $\alpha= 0.05$ ) considerando solamente el factor fuente de inóculo (tabla 93, anexo B). La única diferencia estadísticamente significativa adicional a las ya descritas (o sea las diferencias al comparar ISTJ con IPCU e IPCE), fue H entre las PBAR donde se empleó IPCU e IPCE.

Esta observación puede explicarse en función de haber conservado al IPCE en refrigeración durante mes y medio después de su obtención. La refrigeración es el procedimiento más recomendable para la preservación de muestras debido a que retarda la velocidad a la cual las poblaciones microbianas cambian en respuesta a trastornos en el ambiente (Madsen, 1996). En este caso en específico, se observó la tendencia al descenso en los valores de H en IPCE con respecto al tiempo hasta aproximadamente 22 días de refrigeración. Posteriormente, como consecuencia atribuible a la lisis celular se incorporan al medio materiales diversos en composición, lo que podría permitir el desarrollo de otras especies de microorganismos y su sucesión; por lo tanto H remontó su valor, indicando mayor diversidad enzimática en la fuente de inóculo (tabla 21). El fenómeno de lisis celular se corroboró con el incremento en los niveles de actividad de la GlcNAc, relacionada con componentes estructurales de la pared bacteriana (tablas 19 y 21).

### **5.13.2. Perfiles de actividad enzimática desarrollados durante la biodegradación de los IHA**

En esta sección se presentan los resultados de los perfiles de actividad enzimática que desarrollaron las 3 fuentes de inóculo durante la degradación de IHAG e IHAK. Con estos resultados también se pretenden elucidar posibles relaciones de semejanza entre los sustratos presentes en el sistema de detección y la estructura de los IHA y/o sus productos de degradación. Se infiere que el aumento en la actividad alguna enzima, se debió a que los microorganismos que constituyen la fuente de inóculo, se encontraron con una estructura similar en el medio y requirieron desarrollar y/o incrementar esa actividad para poder metabolizar la estructura.

En el caso de las aminopeptidasas, se observó incremento en la actividad de LeuA desde  $t=2$  días para las pruebas con IHAK e IHAG y, por lo general se mantuvo en su máximo nivel hasta finalizar las corridas. La leucina es el aminoácido apolar alifático de cadena lateral hidrocarbonada más grande (4 carbonos), lo que permitiría correlacionar el incremento de su actividad con la degradación de estructuras semejantes en los IHA. ValA mostró tendencia a aumentar alrededor de  $t=3$  días para las pruebas con IHAK mientras que en algunas PBAR con IHAG, se observó el incremento en su nivel de actividad ya sea en  $t=3$  y/o 7 días.

Tabla 21. Análisis de la actividad enzimática desarrollada durante las PBAR con las tres fuentes de inóculo

Prueba	Tiempo (Días)	Enzimas detectadas	H	H <sub>máx</sub>	E	COD (mg/L)	Prueba	Tiempo (Días)	Enzimas detectadas	H	H <sub>máx</sub>	E	COD (mg/L)
IHAKIPCU 2 (3/07/00)	0	15	3.7202	3.9068	0.9522	169	IHAGIPCE 3 (35 días)* (10/10/00)	0	11	3.2910	3.4594	0.9513	80
	2	14	3.5707	3.8073	0.9378	14		3	12	3.2731	3.5849	0.9130	51
	7	13	3.4906	3.7004	0.9433	9		14	14	3.5189	3.8073	0.9242	10
IHAKIPCU 3 (11/07/00)	0	16	3.7796	4	0.9449	169	IHAKIPCE 3 (42 días)* (17/10/00)	0	12	3.2146	3.5849	0.8967	169
	2	14	3.5691	3.8073	0.9374	23		2	11	3.2392	3.4594	0.9363	75
	7	13	3.6642	3.7004	0.9902	10		7	13	3.4661	3.7004	0.9367	9
IHAGIPCU 2 (18/07/00)	0	14	3.6295	3.8073	0.9533	85	IHAGISTJ 1 (31/10/00)	0	8	2.8571	3	0.9523	85
	3	7	2.6037	2.8073	0.9275	58		3	11	3.1326	3.4594	0.9055	77
	14	12	3.3564	3.5849	0.9363	13		14	12	3.3120	3.5849	0.9239	18
IHAGIPCU 3 (15/08/00)	0	14	3.7597	3.8073	0.9874	84	IHAKISTJ 1 (06/11/00)	0	6	2.4479	2.5849	0.9469	170
	3	7	2.5243	2.8073	0.8992	46		2	10	3.0449	3.3219	0.9166	9
	14	12	3.3601	3.5849	0.9373	10		7	15	3.7508	3.9069	0.9600	4
IHAGIPCE 1 (Fresco)* (05/09/00)	0	15	3.7029	3.9068	0.9478	84	IHAGISTJ 2 (14/11/00)	0	6	2.8571	3	0.9523	80
	3	6	2.2822	2.5849	0.8829	82		3	13	3.4255	3.7004	0.9257	58
	14	10	3.0645	3.3219	0.9225	15		14	14	3.5707	3.8073	0.9378	34
IHAKIPCE 1 (7 días)* (12/09/00)	0	14	3.5567	3.8073	0.9342	175	IHAKISTJ 2 (21/11/00)	0	7	2.6014	2.8073	0.9266	162
	2	9	2.3522	3.1699	0.7420	26		2	15	3.7046	3.9069	0.9482	12
	7	12	2.8522	3.5849	0.7956	25		7	15	3.8389	3.3219	0.9826	9
IHAGIPCE 2 (14 días)* (19/09/00)	0	14	3.5205	3.8073	0.9246	76	IHAGISTJ 3 (28/11/00)	0	8	2.4479	2.5849	0.9469	83
	3	6	2.2509	2.5849	0.8829	36		3	8	2.8040	3.3219	0.8441	33
	14	12	3.3462	3.3219	0.9225	3		14	12	3.3359	3.5849	0.9305	18
IHAKIPCE 2 (21 días)* (26/09/00)	0	13	3.0133	3.7004	0.8143	170	IHAKISTJ 3 (05/12/00)	0	6	2.4479	2.5849	0.9469	170
	2	15	3.6720	3.9069	0.9399	69		2	10	3.1109	3.3219	0.9365	14
	7	14	3.5986	3.8073	0.9451	12		7	15	3.7428	3.9069	0.9580	2

\* En este caso el inóculo se mantuvo en refrigeración a 7°C de acuerdo con los tiempos señalados en la tabla a excepción del denominado como fresco

En general, la actividad de las lipasas siguió el siguiente orden: EST > LEST > LIP. Como se anotó con anterioridad, EST hidroliza cadenas de 4 átomos de carbono, mientras que LEST y LIP actúan sobre cadenas de 8 y 14 carbonos respectivamente. Es decir, EST es la enzima que tiene la capacidad de actuar sobre una estructura más sencilla. Los IHA son mezclas de polímeros con alto peso molecular, por lo que inicialmente sólo podría degradarse la parte más accesible de la molécula y conforme fuera degradado quedarían expuestas otras partes más recalcitrante; por lo tanto enzimas como LEST y LIP podrían contribuir a su degradación. Por ello se justifica el incremento de LEST a partir de  $t=3$  días mientras que la actividad de LIP desapareció o estuvo en su nivel mínimo a lo largo de toda la prueba y sólo ocasionalmente se incrementó en los intervalos comprendidos entre  $t=3$  a 7 días para las pruebas con IHAK y  $t=7$  a 14 días para las PBAR con IHAG.

La actividad de las fosfatasas se mantuvo en niveles elevados a lo largo de todas las pruebas como resultado de la degradación del ATP durante los procesos catabólicos que permiten la asimilación de los IHA.

La actividad de GlcNac se mantuvo en niveles bajos hasta  $t=2$  días en el caso de las PBAR con IHAK como fuente de carbono, punto donde se observó mayor TPCO, cuenta de BHT y porcentaje de remoción de COD. La actividad de GlcNac sufrió un incremento en  $t=3$  y/o 7 días, como consecuencia del paulatino descenso de la cuenta de BHT. Cabe destacar, que en el caso de las pruebas donde la actividad de GlcNac estaba presente al inicio del experimento (por ejemplo, en las pruebas empleando IPCE); la cuenta de BHT a  $t=0$  días mostró tendencia decreciente entre las corridas. En este caso, la actividad de GlcNac desapareció en  $t=2$  días, para volver a presentarse en  $t=3$  y/o  $t=7$  días.

La actividad de GlcNac durante la degradación de IHAG, presentó un comportamiento similar al observado para IHAK, pero en diferentes intervalos de tiempo. La enzima se mantuvo inactiva en el intervalo de  $t=0$  a 3 días debido a que la degradación de IHAG fue más lenta. La actividad de GlcNac comenzó a incrementarse en  $t=7$  días (pero en menor proporción que en las pruebas con IHAK), debido a que en el intervalo de  $t=3$  a 7 días todavía no se ha alcanzado un alto

porcentaje de remoción de COD y se mantuvo una TPCO relativamente constante, señal que la comunidad microbiana se encontraba aún activa. Finalmente, en el punto  $t= 14$  días, se observó que la actividad de GlcNAc se mantuvo en niveles similares a  $t= 7$  días o si acaso, subió un nivel. Este resultado puede relacionarse con los porcentajes de degradación obtenidos en las PBAR denominadas IHAGIPCE, que fueron de 89% en promedio; lo que significa que todavía existe sustrato oxidable y por lo ende, que las BHT continúen viables aunque con bajos niveles de actividad. Adicionalmente, fue posible constatar que si la actividad de GlcNAc estaba presente en  $t= 0$  días, ésta no se detectó hasta  $t= 7$  y/o  $t= 14$  días; una vez que se ha rebasado el período actividad microbiana máxima.

Las glucosil hidrolasas que se detectaron al inicio de las pruebas sólo se expresaron en niveles bajos, o inclusive su actividad desapareció durante parte de la etapa experimental. Con estos resultados es posible inferir que este tipo de enzimas no se requieren durante la degradación de los IHA y que se detectaron porque el inóculo las tenía desde el inicio. También se pudo apreciar que la actividad de  $\beta$ Gal fue inhibida en presencia de  $\alpha$ Glc y  $\beta$ Glc.

El análisis estadístico efectuado mediante un ANDEVAMU para dos factores (IHA y fuente de inóculo), destacó que hubo diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en los valores H atribuibles al IHA y al tiempo (tablas 94 y 95, anexo B). Este resultado indica que para degradar diferentes tipos de IHA se requirió desarrollar diferentes niveles de actividad enzimática a partir del potencial de actividades que poseía cada fuente de inóculo, pero que para la degradación de un mismo IHA por cualquiera de las tres fuentes de inóculo, se desarrollaron niveles de actividad enzimática similares, ya que la fuente de inóculo no resultó ser estadísticamente significativa. Adicionalmente, el valor de H registró cambios con respecto al tiempo (tabla 96, anexo B) como se aprecia en las tablas 18 a 21, en el caso de los inóculos procedentes de plantas de tratamiento de aguas éste descendió en  $t= 2$  y 3 días (puntos de máxima actividad degradadora para IHAK e IHAG, respectivamente) y posteriormente, a  $t= 7$  y/o  $t= 14$  días volvió a incrementarse, sin llegar a su valor inicial mientras que para la fuente ISTJ los valores de H se incrementaron a lo largo de todo el período. Ello significa que de la diversidad enzimática inicial que presentaron IPCU e IPCE, sólo se requirieron algunas actividades para llevar a cabo la degradación de los IHA, por lo

que muchas otras descendieron o desaparecieron, mientras que ISTJ que presentó menor número de actividades al inicio, necesitó expresarlas con mayor magnitud para llevar a cabo el proceso de degradación. Este comportamiento se observó mejor en el caso de IHAKISTJ con respecto a IHAKIPCU siendo una diferencia significativa (tabla 96, anexo B).

Con respecto a los datos de  $H_{m\acute{a}x}$ , se encontraron diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) atribuibles a los factores IHA, fuente de inóculo y tiempo (tablas 94 y 95, anexo B). Las pruebas IHAKISTJ presentaron diferencias con respecto a IHAKIPCU e IHAKIPCE, específicamente entre los valores de  $H_{m\acute{a}x}$  del intervalo de  $t=0$  a 2 días al comparar IHAKISTJ con IHAKIPCE y en todo el período experimental para IHAKISTJ con respecto a IHAKIPCU e IHAKIPCE (tabla 96, anexo B). Así,  $H_{m\acute{a}x}$  para las fuentes de inóculo IPCU e IPCE descendió o se mantuvo similar a su valor inicial, mientras que para ISTJ se detectaron mayor número de actividades conforme aumentó el tiempo.

Los valores de E presentaron diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) atribuibles a los factores fuente de inóculo y tiempo. Este resultado de los valores de E se interpretó como que los niveles de actividad enzimática para cada fuente de inóculo, se manifestaron de manera muy similar a los que potencialmente podían desarrollar en cada punto donde se realizó el análisis, pero que E cambia de un punto a otro, como consecuencia de las variaciones en H y  $H_{m\acute{a}x}$  (tablas 94, 95 y 96, anexoB).

#### **5.14. Análisis integral**

El IHAK (base amina) presentó porcentajes de remoción de COD superiores al 90% en 7 días mientras que IHAG (base glicol) sólo alcanzó porcentajes de remoción por encima del 70% después de 14 días de etapa experimental. De manera general se observó que el descenso en los valores de pH se registró en el período donde también se registró la mayor tasa de consumo de oxígeno y velocidad de oxidación de los sustratos ( $t= 0$  a 2 días con el IHAK y  $t= 0$  a 3 días con el IHAG), reflejado en el porcentaje de degradación de los IHA e incremento en la cuenta de

BHT. En general, no se observaron fases de latencia en el crecimiento de las bacterias heterótrofas totales ni en la remoción de los IHA. Wiggins *et al.* (1987) reportaron que el período de aclimatación es el reflejo del tiempo que tarda una pequeña población de microorganismos capaces de degradar un compuesto en alcanzar una densidad celular alta para obtener un porcentaje de degradación detectable. En este mismo lapso se registró la producción de amoníaco y nitritos, producto de la degradación de los compuestos aminados presentes en IHAK mientras que en las pruebas con IHAG las concentraciones de amoníaco y nitritos descendieron hasta hacer poco confiable su detección. Para ambos IHA se detectó el descenso en la concentración de ortofosfatos entre  $t = 0$  a 3 días, como consecuencia de la síntesis de ATP. Los nitratos no se presentaron debido a la corta duración de los ensayos.

En este punto, es conveniente señalar que el descenso en los valores de pH en el período de máxima degradación, podría ser un parámetro de cuantificación sencilla que permita detectar el intervalo de máxima actividad degradadora de este tipo de compuestos cuando no se cuenta con equipos automáticos como el respirómetro que en este caso en particular proporcionó las curvas de oxígeno que permitieron hacer el seguimiento de la prueba si necesidad de tomar muestras diariamente. Evidentemente, tendría que demostrarse la utilidad del pH como parámetro de monitoreo acoplado a las metodologías para evaluar biodegradabilidad.

La diversidad microbiana (en términos de abundancia y riqueza de actividad enzimática) de las tres fuentes de inóculo, demostró que los requerimientos para el correcto desarrollo de las PBAR (desde el punto de vista microbiológico), fueron satisfechos.

Las tres fuentes de inóculo presentaron potencialidades similares a través del análisis de las muestras a  $t = 0$  días. IPCE (conservado en refrigeración durante mes y medio después de haberse obtenido), demostró que la diversidad enzimática (en términos de H y H<sub>máx</sub>) no representó una condición restrictiva para lograr un resultado positivo en las PBAR, aunque el porcentaje de degradación para ambos IHA disminuyó ligeramente entre la primer y la tercer corrida, pero aumentó entre la primera y la segunda (tablas, anexo B.1). Adicionalmente, la velocidad específica de crecimiento máxima presentó un comportamiento ambiguo, pues no se modificó en

el caso de las PBAR para IHAK pero disminuyó significativamente para las PBAR con IHAG. También se observó que cantidad de biomasa (medida como cuenta de BHT, UFC/L) se incrementó entre la primer y la tercer corrida para ambos IHA. El descenso de la velocidad de degradación con incremento en la cantidad de biomasa puede explicarse con base en las variaciones de la composición y actividad del inóculo (Zgajnar y Zagorc, 1996). El mismo fenómeno fue interpretado por Ingerslev *et al.* (1995) como influencia de la liberación de materia orgánica a partir del lodo.

Kuenemann *et al.* (1992) señalaron que el pre-acondicionamiento del inóculo (por ejemplo, aireación durante varios días) obliga a las bacterias a consumir sus propias reservas o sus constituyentes celulares para sobrevivir y que por lo tanto, para reconstituirse, presentan la tendencia a asimilar más carbono que las bacterias recién colectadas. De acuerdo con los estudios de obtención y caracterización de consorcios degradadores específicos bacterias como *Micrococcus* sp; *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp (Ruíz-Sánchez, 2001) tienen la capacidad de degradar los IHA; por su parte, Chaineau *et al.* (1995), reportó géneros similares para la degradación de fluidos base aceite en recortes de perforación impregnados.

En el caso de IHAKIPCU e IHAGIPCU hubo altos incrementos de en la cuenta de BHT y altas TPCO; sin embargo, se observan comportamientos abruptos tanto en el aumento como en la disminución de la cuenta de BHT en un lapso de tan sólo 24 horas, datos que apuntan a la posibilidad de que la cantidad de BHT esté subestimada debido a la presencia de agregados y/o que proporcionalmente existan más microorganismos que no pueden crecer en el medio NWRI pero que si se encuentren tróficamente activos. De acuerdo con los análisis de perfiles de actividad enzimática, se demostró que IPCU, presentó la mayor equidad entre las actividades enzimáticas detectadas y la actividad enzimática máxima. Estos resultados permiten inferir que IPCU presenta, o bien, una diversidad microbiana diferente (en términos de riqueza de especies y/o abundancia específica de las mismas), o que los microorganismos existentes han tenido ya un proceso de adecuación por pre-exposición a compuestos similares (aminas y glicoles) contenidos en los IHA

Por otra parte para las pruebas IHAKIPCE hay alta producción de BHT, muy similar a IHAKIPCU, aunque menor TPCO. Estos datos indican que los microorganismos presentes en este inóculo se multiplican más que los IPCU pero presentan igual capacidad para degradar el IHA base amina (es posible inferir esta posibilidad como consecuencia de la similitud entre la H y H<sub>máx</sub> encontradas en IPCE a t= 0 días con respecto a IPCU) y/o que existen muchas BHT que no pueden crecer en NWRI pero que están tróficamente activos y/o que proporcionalmente hay más agregados que en las PBAR con IHAKIPCU. En contraste, para las corridas denominadas IHAGIPCE hubo baja producción de BHT (UFC/L) a lo largo de todo el experimento, mientras que las TPCO y los porcentajes de degradación fueron similares a los obtenidos con IHAGIPCU. Estos datos indican que las BHT presentes en este inóculo se multiplican menos que las de IPCU pero son más activas para degradar el IHA base glicol.

Para IHAKISTJ, la cuenta de BHT en el período de máxima actividad degradadora, es un orden de magnitud logaritmico menor en contraste con los obtenidos para IHAKIPCU e IHAKIPCE, pero registró altas TPCO desde la etapa de arranque de las corridas, por lo tanto es posible que la interacción IHAK - ISTJ como fuente de inóculo, represente la prueba con mayor cantidad de BHT tróficamente activas no cultivables en el medio NWRI y/o el que presente mayor cantidad de agregados a lo largo de toda la prueba, aunque sea la curva que mejor responde a un modelo típico de crecimiento microbiano. La relación entre la diversidad enzimática del inóculo encontrada y la diversidad enzimática máxima reveló alta equidad, que evidencia su capacidad para llevar a cabo la degradación de IHAK. En el caso de IHAGISTJ se detectó un comportamiento similar al descrito, pero únicamente con respecto a IHAGIPCU. Por lo tanto, para esta fuente de inóculo se observa un comportamiento ambiguo ya que para la prueba IHAKISTJ se obtuvieron resultados muy similares a los de IHAKIPCU (y por ende, a los resultados de IHAKIPCE). En contraste los resultados de la prueba IHAGISTJ indican que el inóculo tuvo que pasar por un período de adaptación para poder comenzar a degradar el IHAG.

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

- ❖ La selección de los IHA se realizó a partir de la relación  $DBO_5/DQO$  que fue directamente proporcional a su porcentaje de remoción y al tiempo de duración de las pruebas de biodegradabilidad correspondientes y las pruebas de tolerancia aparente a los IHA, no importando el no conocer su composición y/o toxicidad.
- ❖ El estandarizar la relación  $S_0/X_0$  inicial mediante la cuenta de bacterias heterótrofas totales permitió minimizar el efecto de los factores origen y/o composición de la fuente de inóculo.
- ❖ Los IHA evaluados resultaron rápidamente biodegradables. El IHA base amina presentó porcentajes de remoción de COD superiores al 90%, con cualquiera de las tres fuentes de inóculo empleadas, en un plazo de 7 días. En el caso del IHA base glicol se obtuvieron porcentajes superiores al 70% después de 14 días, con las mismas tres fuentes de inóculo.
- ❖ Los resultados de velocidad específica de crecimiento máxima, porcentaje de remoción registrado en los controles de toxicidad y la duración misma de los experimentos demostraron que el IHA base amina es más biodegradable que el IHA base glicol.
- ❖ El origen de la fuente de inóculo influyó en el comportamiento cinético de degradación del IHA base glicol, el cual fue más difícil de degradar. No obstante, para el IHA base amina no resultó significativo.
- ❖ El seguimiento de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos aportó datos relevantes para comprender:

- ✓ El proceso de biodegradación aerobia de los dos IHA: pH, oxígeno consumido, cuenta de BHT y los perfiles de actividad enzimática.
- ✓ La mineralización del IHA base amina: la cuantificación de amoníaco y nitritos.
  
- ❖ Los nitratos, ortofosfatos y los sólidos totales no proporcionaron información relevante sobre el proceso de biodegradación de los dos IHA estudiados.
  
- ❖ Las curvas de BHT están estrechamente asociadas con las curvas de consumo de oxígeno, porcentaje de remoción de COD y los perfiles de actividad enzimática, para las tres fuentes de inóculo.
  
- ❖ Las tres fuentes de inóculo presentaron la misma potencialidad enzimática para realizar el proceso de biodegradación en términos de equidad de actividades. Ello derivó en la obtención de porcentajes de degradación similares para ambos IHA, aunque la diversidad enzimática máxima para ISTJ fue menor con respecto a los inóculos obtenidos de plantas de tratamiento
  
- ❖ Los perfiles de actividad enzimática durante la degradación de los IHA fueron diferentes dependiendo del tipo de IHA. Se observó el incremento de las siguientes actividades enzimáticas:
  - ✓ Para el inhibidor base amina: la tripsina y la quimotripsina, misma que no se detectó para el inhibidor base glicol.
  - ✓ Para ambos IHA: la actividad de la leucina y valina arilamidasa (que hidrolizan enlaces peptídicos constituidos por cadenas hidrocarbonadas), así como la esterasa y la lipasa-esterasa (que hidrolizan cadenas hidrocarbonadas).
  - ✓ Para ambos IHA el incremento de la actividad de la N-acétilglucosaminidasa, corrobora que el descenso en la cuenta de bacterias heterótrofas totales, hacia el final de los periodos de prueba, se debió al agotamiento de los sustratos disponibles para oxidación y la muerte de las bacterias.

## **6.2. Recomendaciones**

Como sugerencia para continuar con el desarrollo de estudios de biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas y otras sustancias empleadas en la industria, así como profundizar en el conocimiento, comprensión y optimización del proceso de biodegradación en general, se propone:

- ❖ Realizar pruebas de biodegradabilidad para estos IHA a diferentes relaciones  $S_o/X_o$ , a efecto de profundizar en el efecto del control de esta variable sobre los porcentajes de remoción de materia orgánica disuelta y/o la clasificación de éstas como rápidamente biodegradables.
- ❖ Evaluar la producción de metabolitos o productos cuya toxicidad se sospecha durante la degradación de los IHA. En este sentido, la atención debe centrarse en aquellos IHA que después de presentar biodegradación, generen subproductos que resulten más tóxicos o genotóxicos que el IHA como tal.
- ❖ Caracterizar los consorcios microbianos desarrollados a lo largo de los estudios realizados para conocer de manera más precisa los cambios poblacionales ocurridos y las especies con mayor actividad degradadora a fin de diseñar inóculos.

## CÁPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211: 132-138.
2. Alexander, M. 1985. Biodegradation of organics chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 18: 106-111.
3. Albert, L. A., López, S. M. y Flores, J. 1995. *Diccionario de la contaminación*. Centro de Ecología y Desarrollo. México D.F. México. 85 pp.
4. Ambriz-Rivas, K. T. 1998a. *Estudio y aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301 A*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 206 pp.
5. Ambriz-Rivas, K. T., Armendáriz, J. F., Durán de Bazúa, C. y Luna-Pabello, V. M. 1998b. Estudio de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301-A para aguas residuales. Caso tipo: efluentes del proceso de cempasúchil (*Tagetes erecta*) pretratados anaerobiamente. *Anuario Latinoamericano de Educación Química 1998-1999*. Año 11: 127-132.
6. APHA, AWWA, WEF. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewaters*. 20 th edition. American Public Health Association. 915 pp.
7. Armendáriz, F., Ambriz-Rivas, K. y Luna-Pabello, V. M. 1998. Algunos comentarios y recomendaciones técnicas sobre los principales procedimientos para la cuantificación de bacterias. *Anuario Latinoamericano de Educación Química 1998-1999*. Año 11: 254-258.
8. Atlas, R.M. 1993a. *Handbook of microbiological media*. Lawrence C. Parks Ed. CRC Press. Florida, E.E.U.U.A.
9. Atlas, R. M. 1993b. Management of the environment through biotechnology. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 9 (5): 493-494.
10. Atlas, R.M. y Bartha, R. 1993. *Microbial Ecology. Fundamentals and applications*. Third edition. Benjamin Cummings. 435 pp.
11. Bartha, R. 1990. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. En: *Isolation of biotechnological organisms from nature*. Labeda, D. P. Ed. Environmental Biotechnology Series. Mac Graw Hill. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 283-307.
12. Böckle, B. y Müller, R. 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2): 790-792.

13. Bland, R. G., Clapper, D. K., Fleming, N. M. y Hood, C. A. 1993. Biodegradation and drilling fluid chemicals. *SPE/IADC 25754. SPE/IADC Drilling Conference*. Amsterdam, Holanda. 23-25 febrero. pp. 727-736.
14. Bland, R. G. 1994. Quality criteria in selecting glycols as alternatives to oil-based drilling fluid systems. *SPE 27141. Second International Conference of Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production*. Jakarta, Indonesia. 25-28 enero. pp. 399-411.
15. Bleir, R., Leuterman, A. J. J. y Strark, C. L. 1992. Drilling fluids: Making peace with the environment. *SPE 24553. 67th Annual Technical Conference and Exhibition of the Society of Petroleum Engineers*. Washington, DC. 4-7 octubre. pp 35-42.
16. Block, J. C., Mathieu, L., Servais, P., Fontvieille, D. y Werner, P. 1992. Indigenous bacterial inocula for measuring the biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in waters. *Wat. Res.* 26 (4): 481-486.
17. Blok, J. y Booy, M.. 1984. Biodegradability test results related to quality and quantity of the inoculum. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 8: 410-422.
18. Blok, J. 1994a. Classification of biodegradability by growth kinetic parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27: 294-305.
19. Blok, J. 1994b. Extrapolation of biodegradability test data by use of growth kinetic parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27: 306-315.
20. Boczar, B., Begley, W y Larson, R. 1992. Characterization of enzyme activity in activated sludges using rapid analyses for specific hydrolases. *Wat. Environ. Res.* 64: 792-797.
21. Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, J. P. 1995. Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 952-960.
22. Bouchez, M., Blanchet, D., Besnainou, B., Leveau, J. Y. y Vandecasteele, J. P. 1997. Kinetic studies of biodegradation of insoluble compound by continuous determination of oxygen consumption. *J. Appl. Microbiol.* 82: 310-316.
23. Bouwer, E. J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En *Environmental Microbiology*. Mitchell R. Wiley-Liss, Inc. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 287-289.

24. Bouwer, E. J. y Zehnder, A. B. J. 1993. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *TIBTECH*. 11: 360-367.
25. Brady, M. E., Craster, B. Getliff, J. M. y Reid, P. I. 1998. Highly inhibitive, low salinity glycol water-base drilling fluid for shale drilling in environmentally sensitive locations. *1998 SPE International Conference of Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production*. Caracas, Venezuela. 7-10 junio. pp. 1-10.
26. Brock, M. 1998. Microbiology of organisms. Eight edition. Ed. Prentice Hall. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 110-114.
27. Buitrón, G. y Capdeville, B. 1995. Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculum. *Environ. Technol.* 16: 1175-1184.
28. Byrd, J. J., Xu, H. S. y Colwell, R. R. 1991. Viable but non culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 875-878.
29. Chaineau, C. H., Morel, J. L. y Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* 29 (6): 1615-1621.
30. Chudoba, P., Capdeville, B. y Chudoba, J. 1992. Explanation of biological meaning of the So/Xo ratio in batch cultivation. *Wat. Sci. Tech.* 26 (3-4): 743-751.
31. Crews, B., Malachosky, E., y Hinman, L. D. 1993. The effect of pH on microbial biodegradation of oil-based drilling mud in a slurry-phase bioreactor. *SPE*. 25992: 540-555.
32. Demian, A. L. y Solomon, N. A. 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society of Microbiology. Washington, DC. E.E.U.U.A. 466 pp.
33. Deni, J. y Penninckx, M. J. 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 4008-4013.
34. Dutta, T. K., Selifonov, S. A. y Gunsalus, I. C. 1998. Oxidation of methyl-substituted naphthalenes: pathways in a versatile *Sphingomonas paucimobilis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5): 1884-1889.
35. Eckenfelder, W. W. y Grau, P. 1992. Water Quality Management Library Vol.I Activated sludge process design and control theory and practice. Technomic. Pennsylvania, E.E.U.U.A. pp 170-172.

36. Ellis, T. G., Barbeau, D. S., Smets, B. F. y Grady Jr, C. P. L. 1996. Respirometric technique for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation. *Wat. Environ. Res.* 68 (5): 917-926.
37. Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A., Rohrhirsch, T. y Mattes, R. Cloning of the gene encoding a novel thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 3955-3963.
38. Garland, E.M., Tozzolino, P. y Dutrieux, E. 1998. Biodegradation of chemicals in the marine environment: towards harmonised protocols. *SPE 46595. 1998 SPE International Conference of Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production.* Caracas, Venezuela. 7-10 junio. pp. 1-6.
39. Gesell, M., Hammer, E., Specht, M., Francke, W. y Shauer, F. 2001. Biotransformation of byphenyl by *Paelomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4): 1551-1557.
40. Govind, R., Gao, C., Lai, L. y Tabak, H. H. 1997. Continuous, automated and simultaneous measurement of oxygen uptake and carbon dioxide evolution in biological systems. *Wat. Environ. Res.* 69 (1): 73-80.
41. Grady Jr, C. P. L. 1985. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 660-674.
42. Grady Jr, C. P. L., Dang, J. S., Harvey, D. M, Jobbagy, A. y Wang, X. L. 1989. Determination of biodegradation kinetics through use of electrolytic respirometry. *Wat. Sci. Tech.* 21 (8/9), 957-968.
43. Grady Jr, C. P. L., Smets, B. F. y Barbeau, D. S. 1996. Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.* 30 (3): 742-748.
44. Guillén-Jiménez, E., Álvarez-Mateos, P., Romero-Gúzman, F. y Pereda-Marín, J. 2000. Bio-mineralization of organic matter in dairy wastewater, as affected by pH. The evolution of ammonium and phosphates. *Wat. Res.* 34 (4): 1215-1224.
45. Gutiérrez-Rojas, M. 1997. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de la industria petrolera. En: *Memorias del VII Congreso Nacional de*

- Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos.* Mazatlán, Sinaloa. México, septiembre 8-12, 1997 pp 21.
46. Hammer, E., Krovas, D., Schäfer, A., Specht, M., Francke, W. y Schauer, F. 1998. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: Identification of oxidation and ring cleavage products. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6): 2215-2219.
  47. Hur, H. G, Sadowsky, M. J. y Wackett, L. P. 1994. Metabolism of chlorofluorocarbons and polybrominated compounds by *Pseudomonas putida* G786 (pHG-) via and engineered metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (11): 4148-4154.
  48. Hyman, M. R., Sterling, R., Ely, R. L. Williamson, K. J. y Arp, D. J. 1995. Inhibition, inactivation and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4): 1480-1487.
  49. Ingerslev, F., Nyholm, N., Berg, U., y Baun, A. 1995. Comparative evaluation of biodegradation rates for chemicals in sewage treatment plants, surface water and standardized test-influence of microbial biomass and chemical concentration. *Book of abstracts of 2<sup>nd</sup> IAWQ Conference of hazard assessment and control of environmental contaminants in water.* Copenhagen, Holanda. pp 85-86.
  50. ISO 7827:1994 (E). *Water quality. Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds. Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC).* International Standardization Organization. Ginebra, Suiza. pp 1-7.
  51. Jachnik, E. P. 1994. Variance in environmental legislation. Cause and effect on drilling fluid research and use. SPE 28740. *SPE International Petroleum Conference and Exhibition of Mexico.* Veracruz, México. 10-13 octubre pp 6-692.
  52. Jarrett, M.A. 1995. A new polymer/glycol based system for stabilizing troublesome water-sensitive shales. SPE 29545. *Production Operations Symposium.* Oklahoma, E.E.U.U.A. 2-4 de abril. pp. 1-10.
  53. Jones, F. V. y Leuterman, A. J. J. 1990. Alternate environmental testing of drilling fluids: An international perspective. SPE 20889. Europcc 90. The Hague, Netherlands, 22-24 octubre. pp 69-78.
  54. Keener, W. K. y Arp, D. J. 1994. Transformation of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (6): 1914-1920.

55. Kilroy, A. y Gray, N. F. 1995. Treatability, toxicity and biodegradability test methods. 70: 243-275.
56. Kuenemann, P., De Morsier, A. y Vasseur, P. 1992. Interest of carbon-balance in ready biodegradability testing. *Chemosphere*. 24 (1): 63-69.
57. León-Fajardo, R. M., Yáñez-Mondragón, A. y Jiménez-Domínguez, A. 1993. Los fluidos de perforación y el medio ambiente. *Ingeniería Petrolera*. 1:17-31.
58. León, N., Infante, C., Arias, M., Marquez, M., Gorrín, A., McMillen, S. J. y Smart, D. R. 1998. Biodegradability of venezuelan crude oils. SPE 48921. *1998 SPE International Conference of Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production*. Caracas, Venezuela. 7-10 junio. pp. 1-6.
59. Lehninger, A. L. Nelson, D. L. y Cox, M. M. 1993. *Principios de Bioquímica*. Editorial Omega. Madrid, España. 1011 pp.
60. Li, K. Y. y Zhang, Y. B. 1996. Oxygen transfer limitation in a respirometer. *Wat. Environ. Res.* 36 (1): 36-41.
61. Liu, Y. 1996. Bioenergetic interpretation on the So/Xo ratio in substrate-sufficient batch culture. *Wat. Res.* 30. 2766-2770.
62. Liu, Y., Chen, G. H. y Etienne, P. 1998. Effect of the So/Xo ratio on energy uncoupling in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Wat. Res.* 32 (10): 2883-2888.
63. Liu, Y. 2000. The So/Xo dependent dissolved organic carbon distribution in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. *Wat. Res.* 34 (5): 1645-1651.
64. Luna-Pabello, V. M., Aladro-Lubel, M. A. y Durán de Bazúa, C. 1994. *Efecto del sustrato sobre poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos. Casos tipo: Nejayote, vinazas u aguas blancas del papel*. Serie: Química ambiental del agua. Volumen 2. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México. 227 pp.
65. Luna-Pabello, V. M. y Domínguez-Cuéllar, L. E. 2001. "Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de hidratación de arcillas empleados en los fluidos de perforación de pozos petroleros". Informe final integral del proyecto FIES 97-03-I.
66. Madsen, E. L. 1996. Methods for determining biodegradability. En:

67. Manahan, S. E. 1998. Introduction to Environmental Chemistry. Lewis Publishers Inc. Nueva York, E.E.U.U.A. 701 pp.
68. Manual de VOITH-Sapromat B-12. 1996. VOITH-SULZER. Stoffaufbereitung GmbH. Alemania. 20 pp.
69. Mao, H y Smith, D. W. 1995. A mechanistic model for assessing biodegradability of complex wastewates. *Wat. Res.* 29 (8): 1957-1975.
70. Margulis, L., Chase, D. y Guerrero, R. 1986. Microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 578-586.
71. Marshe, O. M. y Polkowski, L. B. 1972. Evaluation of methods for estimating biochemical oxygen demand parameters. *JWPCF.* 44 (10): 1987
72. Mathieu, S. y Etienne, P. 2000. Estimation of wastewater biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various So/Xo ratios. *Wat. Res.* 34 (4): 1233-1246.
73. Maxwell, S. E. y Delaney, H. D. 1990. Design experiments and analysis data. A model comparison perspective. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California. E. E. U. U. A.
74. Means, J. L. y Anderson, S. J. 1981. Comparison of five different methods for measuring biodegradability in aqueous environments. *Wat. Air. Soil Pollut* 16: 301-315
75. Metcalf y Eddy. 1991. Wastewater engineering. Treatment, disposal, reuse. Mc Graw Hill Book Co. Nueva York, E.E.U.U.A. pp 89-90, 367-369, 430-433.
76. Murakami, Y. y Alexander, M. 1989. Destruction and formation of toxins by one bacterial species affect biodegradation by a second species. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 832-838.
77. Nybroe, O., Jorgensen, P. y Henze, M. 1992. Enzyme activities in wastewater and activated and activated sludge. *Wat. Res.* 26: 579-584.
78. Nyholm, N., Lindgaard-Jorgensen, P. y Hansen, N. 1984. Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 8: 451-470.
79. Nyholm, N. 1991. The european system of standardized` legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1237-1246.
80. Nyholm, N., Damborg, A. y Lindgaard-Jorgensen, P. 1992. A comparative study for assessment of the biodegradability of chemicals in seawater — screening tests and simulation tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 173-190.

81. Nyholm, N. 1996. Biodegradability characterization of mixtures of chemical contaminants in wastewater - The utility of biotests. *Wat. Sci. Tech.* 33 (6): 221-229
82. OECD. 1992a. *Guidelines for testing of chemicals. Section 3. Degradation and bioaccumulation.* Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
83. OECD. 1992b. *Guidelines for testing of chemicals. Ready biodegradability. 301 A. "DOC Die-away test"*. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
84. OECD. 1992c. *Guidelines for testing of chemicals. Ready biodegradability. 301 F. "Manometric respirometric test"*. Organization for Economic Cooperation and Development. París, Francia.
85. Osswald, P., Courtes, R., Bauda, P., Block, J. C., Bryers, J. D. y Sunde, E. 1995. Xenobiotic biodegradation test using attached bacteria in syntetic seawater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31: 211-217.
86. Pagga, U. 1997. Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere.* 12: 2953-2972.
87. Painter, H. A. y King, E. F. 1985. A respirometric method for the assessment of ready biodegradability: Results of a ring test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9: 6-16.
88. Pitter, P. 1976. Determination of biological degradability of organic substances. *Wat. Res.* 10: 231-235.
89. Percherancier, H., Volat, B. y Montuelle, B. 1996. Testing the biodegradability of wastewater treatment plant outfalls: Role of bacterial inocula. *Wat. Sci. Tech.* 33 (6): 221-229.
90. Ramadan, M. A., El Tayeb, O. M. y Alexander, M. 1990. Inoculum size as a factor limiting sucess of inoculation for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1392-1396.
91. Reid, P. I., Elliott, G. P., Minton, R. C., Chambers, B. D. y Burt, D. A. 1993. Reduced environmental impact and improved drilling performance with water-based muds containing glycols. *SPE 25989. SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference.* San Antonio, Texas, E.E.U.U.A. marzo 7-10. pp 450-463.
92. Reid, P. I., Dolan, B. y Cliffe, S. 1995. Mechanism of shale inhibition by polyols in water based drilling fluids SPE 28960. *SPE International Symposium on Oilfield Chemistry.* San Antonio, Texas, E.E.U.U.A. marzo 7-10. pp 155-179.

93. Rodiles-López, J. O. 2001. *Determinación de la capacidad genotóxica de algunos inhibidores de hidratación de arcillas empleados en fluidos de perforación petrolera usando sistemas microbianos*. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-Biológicas, ENCB, IPN. México, D.F. México. En prensa.
94. Ruiz-Sánchez, A. 2001. *Obtención de un consorcio microbiano degradador de un inhibidor de hidratación de arcillas de fluidos de perforación*. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-Biológicas, ENCB, IPN. México, D.F. México. En prensa.
95. Sang, E. L. y Yoon, S. S. 1995. Biochemical characterization of wastewater by electrolytic respirometer, *Wat. Sci. Technol.* 31 (9): 91-100.
96. Schade, M. y Lemmer, H. 1994. Counting bacteria of selected metabolic groups in activated sludge - an assessment of methods. *Wat. Sci. Technol.* 29 (7): 75-79.
97. Schmidt, S. K. y Alexander, M. 1985. Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compound at low concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (4): 822-827.
98. Simkins, S. y Alexander, M. 1984. Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (6): 1299-1306
99. Slater, M., Hille, M. H. y Molversmyr, R. F. 1995. Commonly used biodegradation techniques for drilling fluid chemicals, are they appropriate? *SPE/IADC 29376. SPE/IADC Drilling Conference*. Amsterdam, Holanda. febrero 28 - marzo 2, 1995. pp. 387-396.
100. Stamatakis, E., Thaemlitz, C. J., Coffin, G. y Reid, W. 1995 A new generation of shale inhibitors for water-based muds. *SPE/IADC 29406. SPE/IADC Drilling Conference*. Amsterdam, Holanda. febrero 28 - marzo 2, 1995. pp. 623-631.
101. Steffensen, W. S. y Alexander, M. 1995. Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (8): 2859-2862.
102. Strayer, L. 1995. *Bioquímica*. Volumen I. Cuarta edición. Editorial Reverté. Madrid, España. 549 pp.
103. Struijs, J. y Van den Berg, R. 1995. Standardized biodegradability tests: Extrapolation to aerobic environments. *Wat. Res.* 29 (1): 255-262.

104. Swindoll, C. M., Aelion, C. M. y Pfaender, F. K. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 212-217.
105. Tabak, H. H., Gao, C., Desai, S. y Govind, R. 1992. Development of predictive structure-biodegradation relationship models with the use of respirometrically generated biokinetic data. *Wat Sci. Tech.* 26 (3-4): 763-772.
106. Thouand, G. y Block, J. C. 1993. The use of precultured inocula for biodegradability tests. *Environ Technol.* 14: 601-614.
107. Thouand, G., Friant, P., Bois, F., Cartier, A., Maul, A. y Block, J. C. 1995. Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30: 274-282.
108. Thouand, G., Capdeville, B. y Block, J. C. 1996. Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33: 261-267.
109. Tryland, I. y Fiksdal, L. 1998. Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3): 1018-1023.
110. Urbain, V., Block, J. C. y Manem, J. 1993. Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach. *Wat. Res.* 27: 829-838.
111. Van Ginkel, G., Haan, A., Luitjen, G. C. y Stroo, C. A. 1995. Influence of the size and source of inoculum on biodegradation curves in closed-bottle test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31: 218-223.
112. Vázquez-Rodríguez, G., Palluy, F., Goma, G. y Rols, J. L. 1999a. Procedures in ready biodegradability testing: Effects of the inoculation and the monitored parameter. *Environ. Technol.* 20: 301-308.
113. Vázquez-Rodríguez, G., Goma, G. y Rols, J. L. 1999b. Toward a standardization of the microbial inoculum for ready biodegradability testing of chemicals. En: *Proceedings of "Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries" IAWQ International specialised conference of the chemical industry group*. Mérida, Yucatán, México. 14-18 de noviembre 565-568.

114. Victorio, L., Gilbride, K. A., Drant Allen, D. y Liss, S. N. 1996. Phenotypic fingerprinting of microbial communities in wastewater treatment systems. *Wat. Res.* 30 (5): 1077-1086.
115. Vik, E. A., Nesgard, B. S., Dempsey, S. M., Johnson, D. R. y Gawel, L. 1996. Factors affecting methods for biodegradation testing of drilling fluids for marine discharge. *SPE 35981. International Conference on Health, Safety and Environment*. Nueva Orleans, Louisiana, E.E.U.U.A. junio 9-12. pp.697-711.
116. Wiggins, B. A., Jones, S. H. y Alexander, M. 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (4): 791-796.
117. Wiggins, B. A. y Alexander, M. 1988. Role of chemical concentration and second sources in acclimation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2803-2807.
118. Young, J. 1996. Fundamentals of respirometry: instrument types and basis of operation. *Proceedings of the 51st Purdue Industrial Waste Conference*. 441-451.
119. Zitomer, D. H. y Speece, R. E. 1993. Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 27 (2): 227-244.
120. Zgajnar Gotvajn, A. y Zagorc Koncan, J. 1996. Comparison of biodegradability assessment tests for chemical substances in water. *Wat. Sci. Tech.* 33 (6): 207-212.
121. Zgajnar Gotvajn, A. y Zagorc Koncan, J. 1998. Whole effluent and single substances approach: A tool for hazardous wastewater management. *Wat. Sci. Tech.* 37 (8): 219-227.
122. Zgajnar Gotvajn, A. y Zagorc Koncan, J. 1999a. Biodegradation studies as an important way to estimate the environmental fate of chemicals. *Wat. Sci. Tech.* 39 (10-11): 375-382.
123. Zgajnar Gotvajn, A. y Zagorc Koncan, J. 1999b. Simultaneous measurement of oxygen consumption and carbon dioxide production: an estimation of mechanism of biodegradation in aquatic systems. En: *Proceedings of "Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries" IAWQ International specialised conference of the chemical industry group*. Mérida, Yucatán, México. 14-18 de noviembre 565-568.
124. <http://www.epa.gov/epahomc/research.htm>.
125. <http://www.inegi.mx>

1. Laboratorio: PIQAYQA

2. Fecha de inicio de la prueba: 16 de mayo del 2000.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L

Concentración inicial en el medio (C<sub>0</sub>): 196 mgCOD/L

Volumen en el matraz: 250 mL

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos

Pretratamiento: Aireación

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 5.29 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12

**Tabla 22. Resultados de consumo de oxígeno**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	14	479	547	581	605	619	630	640	648	654	660	668	674	674
	a2	0	13	385	544	582	607	624	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	9	470	539	576	604	618	630	639	647	655	665	675	679	679
	a4	0	14	386	539	571	599	617	632	643	654	661	666	671	675	675
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	b2	0	6	7	11	14	14	15	16	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	3	3	3	5	5	7	7	7	7	7	9
	b4	0	1	1	1	2	4	5	7	8	10	11	12	13	14	14
Promedio	bm	0	2	2	3	5	5	8	9	7	8	9	9	9	10	10
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	12	477	544	576	600	611	621	633	640	645	651	659	664	664
	a2	0	11	383	541	577	602	616	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	7	468	536	571	599	610	621	632	639	644	654	664	669	669
	a4	0	12	284	536	566	594	609	623	636	646	652	657	662	665	665

Tabla 23. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F  
Relación  $S_0/X_0 = 3.70 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días	7 días	14 días
IHAK	COD $\pm \sigma$	213 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	20 $\pm$ 0.7
	% degradación $\pm \sigma$	0	95	99
	pH (unidades) $\pm \sigma$	7.4	7.2	7.2
	STT $\pm \sigma$	1270 $\pm$ 14	920 $\pm$ 28	910 $\pm$ 39
	STV $\pm \sigma$	640 $\pm$ 0	380 $\pm$ 28	327 $\pm$ 57
	STF $\pm \sigma$	630 $\pm$ 14	540 $\pm$ 0	583 $\pm$ 29
	N-NH <sub>3</sub> $\pm \sigma$	2.43 $\pm$ 0.10	47.59 $\pm$ 1.14	27.06 $\pm$ 2.52
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/L}$ ) $\pm \sigma$	20 $\pm$ 3	101 $\pm$ 4	116 $\pm$ 18
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $\pm \sigma$	3.1 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.3	20.9 $\pm$ 0.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> $\pm \sigma$	110.3 $\pm$ 0.6	126.5 $\pm$ 1.4	89.9 $\pm$ 7.8
	BHT (UFC/L) $\pm \sigma$	5.29 E+08	8.1 E+09	6.42 E+07
Control de inóculo	COD $\pm \sigma$	17 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 0.5	17 $\pm$ 0.5
	pH (unidades) $\pm \sigma$	7.4	7.4	7.5
	STT $\pm \sigma$	780 $\pm$ 0	740 $\pm$ 0	660 $\pm$ 36
	STV $\pm \sigma$	230 $\pm$ 14	180 $\pm$ 0	106 $\pm$ 21
	STF $\pm \sigma$	550 $\pm$ 14	560 $\pm$ 0	553 $\pm$ 16
	N-NH <sub>3</sub> $\pm \sigma$	2.12 $\pm$ 0.07	1.48 $\pm$ 0.07	5.64 $\pm$ 0.84
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g/L}$ ) $\pm \sigma$	22 $\pm$ 3	27 $\pm$ 1	41 $\pm$ 5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $\pm \sigma$	3.2 $\pm$ 1	3.4 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> $\pm \sigma$	110.8 $\pm$ 0.8	95.8 $\pm$ 2.1	87.1 $\pm$ 5.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

\* Datos por triplicado: COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 24. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCU

Relación So/Xo promedio=  $3.26 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 1.16 \text{ E-07}$

Muestra	Parámetro	0 días	1 día	2 días	3 días	7 días
IHAK	COD * + $\sigma$	170 $\pm$ 2	148 $\pm$ 6	19 $\pm$ 5	17 $\pm$ 5	10 $\pm$ 1
	% degradación + $\sigma$	0	14 $\pm$ 4	88 $\pm$ 4	91 $\pm$ 3	94 $\pm$ 0.6
	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 $\pm$ 0	7.4 $\pm$ 0	6.8 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0	7.4 $\pm$ 0
	STT + $\sigma$	1237 $\pm$ 222	1332 $\pm$ 181	1017 $\pm$ 122	927 $\pm$ 138	753 $\pm$ 66
	STV + $\sigma$	650 $\pm$ 170	790 $\pm$ 166	457 $\pm$ 93	377 $\pm$ 145	202 $\pm$ 68
	STF + $\sigma$	587 $\pm$ 64	547 $\pm$ 39	543 $\pm$ 32	547 $\pm$ 16	550 $\pm$ 30
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	6.40 $\pm$ 1.14	9.36 $\pm$ 1.82	39.00 $\pm$ 3.46	42.62 $\pm$ 5.32	53.84 $\pm$ 7.94
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	20 $\pm$ 2	40 $\pm$ 12	30 $\pm$ 6	30 $\pm$ 10	35 $\pm$ 6
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.6 $\pm$ 0.8	2 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 1.6	2.8 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	103.4 $\pm$ 4.0	105.6 $\pm$ 1.0	106.4 $\pm$ 3.2	102.4 $\pm$ 6.4	110.4 $\pm$ 9.6
	BHT (UFC/L) + $\sigma$	5.79E+08 $\pm$ 2.52E+08	1.31E+10 $\pm$ 6.22E+09	6.06E+11 $\pm$ 3.32E+11	7.58E+10 $\pm$ 3.79E+10	3.18E+09 $\pm$ 2.69E+09
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 $\pm$ 0	7.5 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.06	7.6 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 0.1
	STT + $\sigma$	757 $\pm$ 83	740 $\pm$ 89	697 $\pm$ 46	670 $\pm$ 59	645 $\pm$ 63
	STV + $\sigma$	213 $\pm$ 86	197 $\pm$ 87	163 $\pm$ 58	133 $\pm$ 47	87 $\pm$ 52
	STF + $\sigma$	547 $\pm$ 30	547 $\pm$ 30	533 $\pm$ 32	535 $\pm$ 18	553 $\pm$ 24
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	9.36 $\pm$ 1.86	7.86 $\pm$ 1.04	8.32 $\pm$ 1.64	9.22 $\pm$ 1.48	8.10 $\pm$ 2.54
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	30 $\pm$ 9	45 $\pm$ 4	70 $\pm$ 5	50 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.8 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	101.4 $\pm$ 6.0	103.0 $\pm$ 2.8	103.2 $\pm$ 3.4	105.8 $\pm$ 3.6	112.2 $\pm$ 2.2

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\* = Carbono orgánico disuelto de los matraces con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 13 de junio del 2000. IHAKIPCU 1.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK.

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 172 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F.

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 8.66 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12

**Tabla 25. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCU 1**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	34	419	533	---	---	---	---
	a2	0	83	410	---	---	---	---	---
	a3	0	7	---	---	---	---	---	---
	a4	0	67	443	516	560	560	564	567
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	1	1	1	1	1	1	1
	b2	0	0	---	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	---	---	---	---
	b4	0	0	3	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	0	1	0	1	1	1	1
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)  (ax-bm)	a1	0	34	418	533	---	---	---	---
	a2	0	83	409	---	---	---	---	---
	a3	0	7	---	---	---	---	---	---
	a4	0	67	442	516	559	559	563	566

Tabla 26. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F  
IHAKIPCU 1

Relación  $S_0/X_0 = 1.98 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.4		6.6		7.0		7.4	
	COD	178		160		27		6		14	
	STT	1420	1600	1500	1620	1100	1220	1100	1080	780	780
	STV	820	900	980	1020	560	540	580	520	280	240
	STF	600	700	520	600	540	580	540	560	500	540
	N-NH <sub>3</sub>	4.66	5.60	7.90	6.50	32.68	42.30	40.12	37.42	62.48	65.02
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	45	40	45	35	35	35	35	45	170	165
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.6	2.8	3.8	3.6	4.8	5.0	3.6	4.0	2.4	2.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	107.8	102.0	106.6	104.2	100.8	105.8	106.6	101.2	105.4	111.2
BHT (UFC/L)	9.00 E+08	8.0 E+08	1.86 E+10	1.72 E+10	3.10 E+11	2.30 E+11	3.36 E+10	3.12 E+10	1.20 E+09	1.34 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.6		7.7		7.7		7.8	
	COD	6		6		6		6		6	
	STT	840	860	800	880	760	740	740	700	740	680
	STV	320	300	280	300	220	200	200	140	160	140
	STF	520	560	520	580	540	540	540	560	580	540
	N-NH <sub>3</sub>	11.24	11.24	9.18	7.56	9.70	9.10	11.10	11.10	10.20	10.05
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	45	40	40	50	70	75	50	50	80	80
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.0	2.8	3.4	3.2	2.2	2.8	2.6	2.2	2.4	2.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	100.6	108.6	103.2	102.0	102.4	100.6	103.6	102.2	110.6	110.4

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 3 de julio del 2000. IHAKIPCU 2.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 169 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 9.40 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12

**Tabla 27. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCU 2**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	6	---	---	---	---	---	---
	a2	0	22	405	---	---	---	---	---
	a3	0	16	327	498	---	---	---	---
	a4	0	18	370	507	534	552	563	569
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	---	---	---	---	---	---
	b2	0	5	7	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	---	---	---	---
	b4	0	0	0	0	2	2	3	5
Promedio	bm	0	1	2	0	2	2	3	5
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	5	---	---	---	---	---	---
	a2	0	21	403	---	---	---	---	---
	a3	0	15	325	498	---	---	---	---
	a4	0	17	368	507	532	550	560	564

Tabla 28. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCU 2

Relación  $S_0/X_0 = 3.57 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.4		6.9		7.0		7.4	
	COD	175		155		20		16		15	
	STT	1140	1120	1200	1220	960	880	760	820	660	680
	STV	620	560	660	640	420	300	200	280	100	140
	STF	520	560	540	580	540	580	560	540	560	540
	N-NH <sub>3</sub>	7.74	7.06	10.54	9.48	41.64	40.28	49.98	50.14	48.8	52.20
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	20	20	55	60	25	20	20	25	140	140
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.8	1.0	1.0	2.2	3.2	3.6	2.6	2.8	1.6	1.8
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	107.8	106.2	104.8	106.4	104.8	107.8	94.8	95.2	112.2	114.8
BHT (UFC/L)	4.80 E+08	4.60 E+08	1.67 E+10	1.41 E+10	8.00 E+11	1.06 E+12	1.12 E+11	9.30 E+10	5.60 E+09	6.90 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.4		7.6		7.4		7.6	
	COD	6		6		6		6		6	
	STT	660	680	660	660	640	660	620	580	600	560
	STV	100	140	120	80	80	100	80	80	40	40
	STF	560	540	540	580	560	560	540	500	560	520
	N-NH <sub>3</sub>	6.88	7.36	7.18	9.18	8.92	9.68	8.12	8.82	9.48	9.18
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	35	30	40	45	60	65	45	50	50	50
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.4	1.0	1.4	1.2	1.4	1.2	1.0	1.2	0.8	1.0
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	105.8	104.8	106.4	104.8	108.2	106.8	109.8	110.6	114.4	115.8	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQyQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 11 de julio del 2000. IHAKIPCU 3.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 169 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F.

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción:  $3.97 \times 10^8$  UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12

Tabla 29. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCU 3

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	22	406	434	521	550	556	562
	a2	0	16	411	---	---	---	---	---
	a3	0	14	---	---	---	---	---	---
	a4	0	12	357	438	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	0	0	---	---	---	---
	b2	0	3	4	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	0	1	2	2
	b4	0	0	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	1	1	0	0	1	2	2
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)  (ax-bm)	a1	0	21	405	434	521	549	554	560
	a2	0	15	410	--	---	---	---	---
	a3	0	13	---	---	---	---	---	---
	a4	0	11	356	438	---	---	---	---

Tabla 30. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCU 3

Relación  $S_0/X_0 = 4.25 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.4		6.9		7		7.4	
	COD	175		148		19		15		16	
	STT	1040	1100	1240	1200	960	980	880	880	800	820
	STV	500	500	680	680	460	460	360	320	220	240
	STF	540	600	560	520	500	520	520	560	580	580
	N-NH <sub>3</sub>	6.22	7.12	10.54	11.22	38.58	38.60	40.72	43.42	48.72	46.0
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	15	20	30	30	35	35	25	20	130	130
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.2	1.0	1.2	1.0	1.4	1.2	2.0	1.8	2.2	2.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	97.8	100.4	106.8	106.0	101.4	99.6	106.8	110.2	110.0	109.6
	BHT (UFC/L)	3.86 E+08	4.08 E+08	5.50 E+09	6.90 E+09	7.20 E+11	5.12 E+11	8.33 E+10	1.03 E+11	1.99 E+09	2.02 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.6		7.6		7.6		7.7	
	COD	6		6		6		6		6	
	STT	780	720	680	760	680	700	680	700	640	660
	STV	200	220	180	220	180	200	140	160	120	80
	STF	580	500	500	540	500	500	540	540	520	580
	N-NH <sub>3</sub>	9.58	9.86	6.98	7.08	6.70	5.82	8.04	8.14	4.40	5.34
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	25	20	45	45	70	70	25	25	45	45
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6	1.4	0.8	1.0	1.4	1.8	1.0	1.0	1.4	1.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	92.4	96.8	103.8	98.4	99.4	102.4	106.2	102.4	110.8	111.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 31. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F a IHAKIPCE

Relación So/Xo promedio=  $2.62 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 9.58 \text{ E-}08$

Muestra	Parámetro	0 días	1 día	2 días	3 días	7 días
IHAK	COD * + $\sigma$	171 ± 3	164 ± 4	57 ± 27	17 ± 7	15 ± 8
	% degradación + $\sigma$	0	5 ± 2	67 ± 16	90 ± 4	91 ± 5
	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0	7.6 ± 0.1	6.8 ± 0.2	7 ± 0.1	7.3 ± 0.1
	STT + $\sigma$	1277 ± 135	1220 ± 176	1007 ± 30	827 ± 39	767 ± 128
	STV + $\sigma$	783 ± 107	700 ± 149	467 ± 33	317 ± 41	193 ± 82
	STF + $\sigma$	493 ± 45	520 ± 33	557 ± 29	533 ± 27	553 ± 43
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	7.18 ± 1.48	4.72 ± 2.18	31.78 ± 3.24	44 ± 2.72	56.34 ± 13.12
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 5	15 ± 10	5 ± 2	5 ± 3	20 ± 3
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.4	2.4 ± 0.4	2.8 ± 1.4	2.0 ± 0.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	116.6 ± 2.4	116.8 ± 2.0	116.4 ± 1.0	107.2 ± 6.6	112.2 ± 6.4
BHT (UFC/L) + $\sigma$	7.08E+08 ± 2.35E+08	2.32E+09 ± 1.29E+09	4.35E+11 ± 2.60E+11	3.14E+11 ± 1.75E+11	1.76E+09 ± 1.06E+09	
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.2
	STT + $\sigma$	687 ± 59	663 ± 39	647 ± 48	643 ± 29	680 ± 62
	STV + $\sigma$	167 ± 33	113 ± 43	97 ± 46	103 ± 37	133 ± 16
	STF + $\sigma$	530 ± 27	550 ± 11	550 ± 17	540 ± 55	547 ± 52
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	5.52 ± 1.54	4.88 ± 1.70	5.12 ± 0.50	4.96 ± 1.60	4.9 ± 1.98
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	15 ± 5	35 ± 7	10 ± 5	10 ± 2	5 ± 2
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.6 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.6	1.6 ± 0.4
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	117.6 ± 1.6	116.6 ± 3.0	118.2 ± 2.6	114.6 ± 4.2	115.2 ± 3.0	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\*= Carbono orgánico disuelto de los matraces con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 12 de septiembre del 2000. IHAKIPCE 1.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 175 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella. Iztapalapa, México D.F

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Refrigeración a 7°C durante 7 días. Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 9.20 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 32. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCE 1

Tiempo (Días)		0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	0	223	434	---	---	---	---
	a2	0	8	234	497	534	567	586	610
	a3	0	0	200	---	---	---	---	---
	a4	0	9	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	1	2	2	8	9	14	17
	b2	0	3	7	---	---	---	---	---
	b3	0	8	---	---	---	---	---	---
	b4	0	6	1	17	---	---	---	---
Promedio	bm	0	4	3	9	8	9	14	17
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	0	220	425	---	---	---	---
	a2	0	4	231	488	526	558	572	593
	a3	0	0	197	---	---	---	---	---
	(ax-bm)	a4	0	5	---	---	---	---	---

Tabla 33. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCE 1

Relación  $S_0/X_0 = 1.90 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.4		6.6		6.9		7.3	
	COD	186		177		36		36		36	
	STT	1360	1480	1400	1480	1000	1060	840	800	680	680
	STV	800	940	860	920	440	480	260	280	160	180
	STF	560	540	540	560	560	580	580	520	520	500
	N-NH <sub>3</sub>	8.36	8.52	5.34	6.02	34.80	33.40	46.0	47.6	69.92	74.98
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	5	5	10	10	5	0	80	80	20	20
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6	1.6	1.8	1.4	2.8	2.6	4.8	4.0	1.4	1.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	118.2	118.6	115.6	117.2	116.4	117.8	109.6	108.4	117.4	115.2
BHT (UFC/L)	8.80 E+08	9.60 E+08	1.34 E+09	1.46 E+09	3.20 E+11	2.40 E+11	2.76 E+11	3.50 E+11	2.83 E+09	3.15 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.8		7.8		7.8		7.6	
	COD	11		11		10		11		11	
	STT	780	720	720	700	680	720	640	620	660	720
	STV	200	180	180	140	140	160	140	160	120	160
	STF	580	540	540	560	540	560	500	460	540	560
	N-NH <sub>3</sub>	4.42	4.50	4.56	4.34	4.98	4.64	5.02	4.88	4.98	5.32
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	20	20	5	5	5	10	10	5	10	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.0	2.0	1.8	1.6	2.0	2.0	3.0	2.6	2.0	1.6
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	119.8	119.4	116.4	118.6	117.4	120.2	117.8	120.2	112.8	110.6	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 26 de septiembre del 2000. IHAKIPCE 2.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 170 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella. Iztapalapa, México D.F

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Refrigeración a 7°C durante 21 días. Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 7.5E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 34. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCE 2**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	14	---	---	---	---	---	---
	a2	0	4	240	506	542	558	568	576
	a3	0	11	303	---	---	---	---	---
	a4	0	10	225	501	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	8	---	---	---	---	---	---
	b2	0	6	9	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	---	---	---	---
	b4	0	8	13	15	18	24	29	35
Promedio	bm	0	13	7	7	18	24	29	35
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)  (ax-bm)	a1	0	1	---	---	---	---	---	---
	a2	0	0	234	499	---	---	---	---
	a3	0	0	296	---	---	---	---	---
	a4	0	0	218	494	524	534	539	541

Tabla 35. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCE 2

Relación  $S_0/X_0 = 2.26 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.6		6.9		7.1		7.4	
	COD	174		163		73		17		15	
	STT	1320	1220	1140	1040	1020	1000	900	840	680	700
	STV	860	760	620	580	520	480	360	320	100	140
	STF	460	460	520	460	500	520	540	520	580	560
	N-NH <sub>3</sub>	7.60	8.06	7.04	5.98	33.16	34.0	43.56	44.88	52.54	51.52
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	20	15	30	30	40	40	5	5	25	25
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.4	1.1	1.1	1.2	2.6	3.0	2.8	3.0	2.8	2.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	115.8	119.4	118.8	119.4	117.2	115.6	114.2	113.4	116.4	116.8
	BHT (UFC/L)	8.00 E+08	7.00 E+08	1.99 E+10	1.56 E+10	8.30 E+12	6.40 E+12	1.20 E+11	1.60 E+11	1.12 E+09	1.28 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.7		7.7		7.9		8	
	COD	4		4		4		4		2	
	STT	680	700	660	640	600	660	600	680	620	620
	STV	160	200	120	80	80	100	80	80	120	120
	STF	520	500	540	560	520	560	520	600	500	500
	N-NH <sub>3</sub>	7.28	7.74	7.04	6.90	5.92	5.52	6.74	6.84	6.74	7.20
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	20	20	30	30	40	40	60	60	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6	2.0	1.0	1.0	2.0	1.8	1.4	1.4	1.2	1.4
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	118.2	117.4	118.8	119.8	120.2	120.4	116.8	113.4	118.2	117.8	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 17 de octubre del 2000. IHAKIPCE 3.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 169 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella. Iztapalapa, México D.F.

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Refrigeración a 7°C durante 42 días. Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 3.95 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 36. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKIPCE 3**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	12	331	481	---	---	---	---
	a2	0	37	352	527	552	573	587	598
	a3	0	4	---	---	---	---	---	---
	a4	0	8	238	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	2	5	---	---	---	---	---
	b2	0	0	3	6	11	16	21	25
	b3	0	1	---	---	---	---	---	---
	b4	0	1	4	6	---	---	---	---
Promedio	bm	0	1	4	6	11	16	21	25
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	11	327	475	---	---	---	---
	a2	0	36	348	521	541	557	566	573
	a3	0	3	---	---	---	---	---	---
	(ax-bm)	a4	0	7	234	---	---	---	---

Tabla 37. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKIPCE 3

Relación  $S_0/X_0 = 3.71 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.4		7.7		6.9		7		7.3	
	COD	172		166		75		12		9	
	STT	1160	1120	1140	1120	980	980	860	880	860	880
	STV	680	660	620	600	440	440	320	360	320	260
	STF	480	460	520	520	540	540	540	520	540	620
	N-NH <sub>3</sub>	5.36	5.28	1.82	2.20	27.18	28.20	41.78	40.24	47.32	41.82
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	5	5	10	10	20	20
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	0.8	0.6	0.6	2.0	1.8	1.0	1.0	2.2	2.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.8	113.8	114.2	115.8	115.2	1164	98.6	99.8	103.2	105.2
	BHT (UFC/L)	4.50 E+08	3.40 E+08	3.90 E+09	3.70 E+09	2.95 E+11	2.85 E+11	5.60 E+11	4.20 E+11	8.0 E+11	1.40 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.7		7.7		7.7		7.8	
	COD	3		0		0		0		0	
	STT	660	620	640	620	620	600	660	660	680	780
	STV	140	120	100	60	60	40	80	80	140	140
	STF	520	500	540	560	560	560	580	580	540	640
	N-NH <sub>3</sub>	4.58	4.66	3.28	3.20	5.12	4.66	3.04	3.36	2.46	2.80
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	40	45	15	15	10	10	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.0	0.8	0.6	1.2	0.8	1.3	1.4	2.2	1.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	115.8	115.6	111.4	115.6	113.8	117.4	110.6	109.6	116.6	115.2

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 38. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F a IHAKISTJ

Relación So/Xo promedio=  $9.14 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 1.37 \text{ E-}07$

Muestra	Parámetro	0 días	1 día	2 días	3 días	7 días
IHAK	COD * + $\sigma$	167 ± 5	154 ± 5	12 ± 2	9 ± 1	5 ± 4
	% degradación + $\sigma$	0	9 ± 2	93 ± 1	95 ± 0.6	97 ± 2
	pH (unidades) + $\sigma$	7.3 ± 0	7.4 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7 ± 0.1	7.2 ± 0.1
	STT + $\sigma$	1143 ± 135	1103 ± 117	920 ± 89	847 ± 55	843 ± 71
	STV + $\sigma$	630 ± 118	550 ± 85	337 ± 61	307 ± 37	267 ± 35
	STF + $\sigma$	513 ± 21	553 ± 43	583 ± 46	540 ± 28	577 ± 39
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	6.34 ± 1.00	6.94 ± 1.34	34.64 ± 2.74	44.00 ± 2.22	48.40 ± 2.32
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	5 ± 2	10 ± 0	20 ± 0	25 ± 7	110 ± 13
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.4
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	112.4 ± 3.6	113.8 ± 2.8	109.8 ± 4.4	108.4 ± 2.6	112.4 ± 2.6
	BHT (UFC/L) + $\sigma$	1.86E+08 ± 3.21E+07	7.43E+09 ± 7.51E+09	1.11E+10 ± 6.28E+09	1.08E+10 ± 7.87E+09	1.94E+09 ± 1.32E+09
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.3 ± 0	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.2	7.6 ± 0.1
	STT + $\sigma$	687 ± 50	660 ± 40	693 ± 84	637 ± 73	623 ± 65
	STV + $\sigma$	167 ± 68	127 ± 45	117 ± 64	107 ± 65	87 ± 32
	STF + $\sigma$	520 ± 31	533 ± 27	577 ± 37	530 ± 53	537 ± 39
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	5.50 ± 0.28	5.54 ± 0.32	5.48 ± 0.22	5.38 ± 0.34	5.88 ± 0.42
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 0	10 ± 2	10 ± 0	10 ± 4	10 ± 2
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.4
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	113.0 ± 3.2	113.8 ± 1.6	113.8 ± 2.8	110.4 ± 3.0	114.6 ± 1.9

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoniaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\* = Carbono orgánico disuelto de los matraces con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 6 de noviembre del 2000. IHAKISTJ 1.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK.

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 176 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.

Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.

Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y aireación a temperatura ambiente.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 1.65 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 39. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKISTJ 1

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	19	328	446	---	---	---	---
	a2	0	23	348	443	---	---	---	---
	a3	0	18	456	443	455	471	489	503
	a4	0	14	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	1	2	---	---	---	---	---
	b2	0	1	3	3	---	---	---	---
	b3	0	2	---	---	---	---	---	---
	b4	0	0	0	1	4	5	7	7
Promedio	bm	0	1	2	2	4	5	7	7
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	18	326	---	---	---	---	---
	a2	0	22	346	444	---	---	---	---
	a3	0	17	354	441	451	466	482	496
	a4	0	13	---	---	---	---	---	---

Tabla 40. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKISTJ 1

Relación  $S_0/X_0 = 1.03 \text{ E-}06 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.3		7.4		6.7		7		7.2	
	COD	176		164		12		11			
	STT	980	960	960	980	940	960	760	820	820	740
	STV	500	460	480	440	360	320	240	320	240	220
	STF	480	500	480	540	580	640	520	500	580	520
	N-NH <sub>3</sub>	7.82	7.40	6.72	6.90	31.58	31.30	41.82	42.14	45.80	47.94
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	20	20	30	30	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.2	1.4	2	2	2.6	2.8	3.6	3.2	1.6	1.8
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.8	114.4	114.8	113.2	116.4	114.8	113.2	112.8	112.2	111.8
BHT (UFC/L)	1.50 E+08	1.80 E+08	2.59 E+09	2.91 E+09	8.40 E+09	6.30 E+09	1.93 E+10	2.04 E+10	3.10 E+09	3.80 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.4		7.5		7.6		7.5	
	COD	6		5		3		3			
	STT	660	600	640	620	620	600	560	540	560	620
	STV	80	80	80	80	60	40	60	80	40	80
	STF	580	520	560	540	560	560	500	460	520	540
	N-NH <sub>3</sub>	5.26	5.44	5.32	5.98	5.08	5.64	5.32	5.52	6.06	5.70
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6	1.6	2	1.8	2	2	2.4	2.2	1.2	0.8
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.6	113.2	114.8	113.2	113.2	108.4	109.4	109.2	115.4	116.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA
2. Fecha de inicio de la prueba: 21 de noviembre del 2000. IHAKISTJ 2.
3. Sustancia de prueba:
  - Nombre: IHAK
  - Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L.
  - Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 162 mgCOD/L.
  - Volumen en el matraz: 250 mL.
4. Inóculo:
  - Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.
  - Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.
  - Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y aireación a temperatura ambiente.
  - Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 1.70 E+08 UFC/L.
5. Consumo de oxígeno:
  - Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 41. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKISTJ 2

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	55	---	---	---	---	---	---
	a2	0	33	412	---	---	---	---	---
	a3	0	5	487	527	---	---	---	---
	a4	0	5	471	507	535	544	556	564
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	3	7	---	---	---	---	---
	b2	0	4	10	12	---	---	---	---
	b3	0	2	5	8	11	13	17	17
	b4	0	8	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	4	7	10	11	13	17	17
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	1	---	---	---	---	---	---
	a2	0	1	405	---	---	---	---	---
	a3	0	29	480	517	524	531	539	547
	(ax-bm)	a4	0	51	464	497	---	---	---

Tabla 42. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKISTJ 2

Relación  $S_0/X_0 = 9.52 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.3		7.4		6.9		7.1		7.3	
	COD	169		156		17		16		13	
	STT	1220	1260	1240	1220	820	800	860	840	860	840
	STV	700	740	660	620	280	260	300	300	280	260
	STF	520	520	580	600	540	540	560	540	580	580
	N-NH <sub>3</sub>	5.94	5.46	5.70	5.38	34.94	36.74	43.66	43.04	46.42	48.26
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	5	5	10	10	10	10	20	20	120	120
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.8	1.6	2.2	2	3.8	4	2.2	2.2	3	3.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	106.8	109.2	109.4	112.6	106.2	103.8	104.2	106.6	110.8	108.8
	BHT (UFC/L)	1.70 E+08	1.70 E+08	3.40 E+09	3.50 E+09	6.00 E+09	9.00 E+09	7.60 E+09	7.40 E+09	9.70 E+11	1.08 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.6		7.6		7.7		7.7	
	COD	7		6		5		6		4	
	STT	720	700	640	640	660	700	640	660	560	600
	STV	220	200	160	100	120	100	60	60	80	80
	STF	500	500	480	540	540	600	580	600	480	520
	N-NH <sub>3</sub>	5.44	5.94	5.70	5.38	5.52	5.32	5.02	4.96	5.64	5.46
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	5	5	5	5	25	25	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.2	2	2	2.2	1.8	1.8	1.4	1.8	1.8	1.4
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	109.4	109.4	110.8	114.4	110.8	109.8	105.6	107.6	112.6	112.2	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA

2. Fecha de inicio de la prueba: 5 de diciembre del 2000. IHAKISTJ 3

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAK

Concentración en la solución stock: 28,400 mgCOD/L.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 170 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.

Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.

Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y aireación a temperatura ambiente.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 2.23 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 43. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAKISTJ 3**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7
Consumo de O <sub>2</sub> IHAK (mg)	a1	0	10	---	---	---	---	---	---
	a2	0	37	479	---	---	---	---	---
	a3	0	29	394	540	544	564	571	586
	a4	0	29	380	416	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	1	---	---	---	---	---
	b2	0	1	3	3	4	5	7	9
	b3	0	0	---	---	---	---	---	---
	b4	0	3	2	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	1	3	3	4	5	7	9
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	9	---	---	---	---	---	---
	a2	0	36	476	---	---	---	---	---
	a3	0	28	491	537	540	559	564	577
	(ax-bm)	a4	0	28	377	413	---	---	---

Tabla 44. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAKISTJ 3

Relación  $S_0/X_0 = 7.62 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		1 día		2 días		3 días		7 días	
IHAK	pH (unidades)	7.3		7.3		6.7		7		7.2	
	COD	170		158		20		15		9	
	STT	1220	1220	1100	1120	1020	980	920	880	960	840
	STV	680	700	520	580	380	420	340	340	320	280
	STF	540	520	580	540	640	560	580	540	640	560
	N-NH <sub>3</sub>	5.88	5.58	8.38	8.68	38.12	35.24	47.34	46.20	52.18	49.78
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	5	5	10	10	20	20	15	15	95	100
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.8	1.8	1.4	1.6	2	1.8	2.6	2.8	3	3
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	115.0	116.2	116.8	116.8	113.0	114.4	111.2	110.4	114.8	115.8
	BHT (UFC/L)	2.22 E+08	2.25 E+08	1.55 E+10	1.67 E+10	1.74 E+10	1.93 E+10	4.70 E+09	5.50 E+09	1.20 E+09	1.50 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.3		7.3		7.3		7.5	
	COD	0		6		6		6		7	
	STT	740	700	700	720	760	820	720	700	680	720
	STV	220	200	160	180	200	180	180	200	100	140
	STF	520	500	540	540	560	640	540	500	580	580
	N-NH <sub>3</sub>	5.20	5.70	5.76	5.14	5.68	5.64	5.70	5.82	5.76	6.66
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	10	10	15	15	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2	1.8	1.6	1.6	1.4	1.2	2	2	1.8	1.6
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	117.2	116.2	115.8	114.8	115.8	115.8	111.2	111.8	116.2	115.4	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 45. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F a IHAGIPCU

Relación  $S_0/X_0$  promedio =  $1.33 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 1.60 \text{ E-}08$

Muestra	Parámetro	0 días	2 días	3 días	7 días	14 días
IHAG	COD * + $\sigma$	86 ± 2	67 ± 2	48 ± 9	36 ± 4	10 ± 3
	% degradación + $\sigma$	0	22 ± 3	44 ± 11	59 ± 5	89 ± 4
	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0	6.9 ± 0.1	6.7 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1
	STT + $\sigma$	747 ± 30	1010 ± 189	967 ± 75	843 ± 96	717 ± 32
	STV + $\sigma$	217 ± 39	460 ± 206	410 ± 69	290 ± 88	190 ± 43
	STF + $\sigma$	530 ± 33	550 ± 21	557 ± 20	553 ± 37	527 ± 30
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	8.48 ± 3.40	2.92 ± 0.70	2.40 ± 0.26	0.46 ± 0.22	0.84 ± 0.48
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	35 ± 10	25 ± 4	20 ± 4	15 ± 4	15 ± 4
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	2 ± 0.8	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.8 ± 1.0	1.4 ± 0.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	113.6 ± 0.8	108.2 ± 4.8	104.8 ± 4.2	107.2 ± 5.4	108.6 ± 5.6
	BHT (UFC/L) + $\sigma$	6.47E+08 ± 7.45E+07	1.14E+11 ± 9.68E+10	3.78E+11 ± 1.70E+11	1.91E+11 ± 1.32E+10	3.46E+09 ± 6.65E+08
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.2	7.6 ± 0.3	7.5 ± 0.3	7.6 ± 0.3
	STT + $\sigma$	693 ± 27	670 ± 27	667 ± 30	653 ± 10	650 ± 27
	STV + $\sigma$	163 ± 50	120 ± 28	110 ± 37	110 ± 24	107 ± 30
	STF + $\sigma$	530 ± 30	550 ± 17	557 ± 20	547 ± 21	543 ± 23
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	7.94 ± 3.44	7.64 ± 2.32	8.70 ± 2.72	9.42 ± 3.40	7.88 ± 2.90
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	50 ± 4	45 ± 3	45 ± 7	45 ± 5	40 ± 12
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	2 ± 1.4	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.8	1.8 ± 1.0	1.4 ± 0.3
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	112.8 ± 1.8	112.2 ± 4.2	114.6 ± 4.2	116.4 ± 5.8	118.2 ± 5.2

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\* = Carbono orgánico disuelto de los matraces con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 20 de junio del 2000. IHAGIPCU 1.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 88 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria, México D.F

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 6.70 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 46. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCU 1

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	0	56	136	174	198	222	235	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	0	40	128	172	201	233	259	281	299	317	327	336	344	352
	a3	0	0	27	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	6	57	152	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	4	4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	2	2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	bm	0	0.5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	0	55	135	174	198	222	235	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	0	39	127	172	201	233	259	281	299	317	327	336	344	352
	a3	0	0	26	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	5.5	56	151	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 47. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F  
IHAGIPCU 1

Relación  $S_0/X_0 = 1.31 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.4		7		6.6		7.2		7.2	
	COD	95		77		48		42		10	
	STT	780	760	1260	1220	1080	1040	960	940	740	740
	STV	280	240	740	540	500	480	380	340	200	220
	STF	500	520	520	680	580	560	580	600	540	520
	N-NH <sub>3</sub>	13.08	12.58	2.24	1.82	0.24	0.34	0.52	0.34	0.34	0.42
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	45	35	80	70	25	25	10	10	20	20
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.4	2.8	1.8	2.0	1.6	1.6	2.0	1.6	1.4	1.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	114.4	113.8	103.8	100.8	101.4	100.8	102.0	99.2	102.0	101.4
BHT (UFC/L)	6.10 E+08	7.30 E+08	9.60 E+10	8.70 E+10	1.77 E+11	1.91 E+11	1.67 E+11	1.85 E+11	3.40 E+09	4.50 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.3		7.2		7.2		7.3	
	COD	7		10		8		7		3	
	STT	700	660	680	660	700	640	640	660	600	660
	STV	160	140	140	120	120	100	80	120	80	100
	STF	540	520	540	540	580	540	560	540	520	560
	N-NH <sub>3</sub>	12.58	12.08	8.02	7.64	10.08	10.60	12.74	11.70	11.34	11.22
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	50	55	50	45	40	40	50	50	35	30
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.8	4.2	1.8	2.0	1.8	1.6	2.8	3.0	1.0	1.4
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	112.2	113.8	102.8	103.6	101.4	99.2	107.0	99.0	102.8	104.2	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 18 de julio del 2000. IHAGIPCU 2.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 85 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 5.65 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 48. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCU 2

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	11	58	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	8	14	77	118	145	167	184	210	225	238	250	260	271	287
	a3	0	6	14	98	149	185	213	237	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	1	11	110	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	0	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	2	2	4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	0	0	0	1	2	2	2	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	bm	0	0.5	0.5	1	0.5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)	a1	0	11	58	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	8	14	76	118	144	166	183	210	225	238	250	260	271	287
	a3	0	6	14	97	149	184	212	236	---	---	---	---	---	---	---
	(ax-bm)	a4	0	1	11	109	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 49. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGIPCU 2

Relación  $S_0/X_0 = 1.51 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.4		7		6.8		7.1		7.1	
	COD	89		69		62		44		16	
	STT	700	760	980	940	900	940	860	820	720	740
	STV	180	200	420	380	320	400	340	320	200	240
	STF	520	560	560	560	580	540	520	500	520	500
	N-NH <sub>3</sub>	6.5	6.58	3.34	3.52	2.06	2.46	0.74	0.66	10.82	10.98
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	45	45	20	20	20	15	15	15	20	20
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.4	1.3	1.6	1.0	2.0	2.0	0.8	0.6	1.0	1.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.6	113.8	111.2	113.2	109.2	110.0	109.8	111.2	112.2	110.4
BHT (UFC/L)	5.00 E+08	6.30 E+08	2.17 E+11	2.23 E+11	5.90 E+11	4.60 E+11	1.89 E+11	2.03 E+11	2.73 E+09	2.87 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.3		7.7		7.6		7.7	
	COD	4		4		4		2		3	
	STT	680	680	640	660	640	640	660	640	660	640
	STV	140	100	100	80	80	60	120	80	80	100
	STF	540	580	540	580	560	580	540	560	580	540
	N-NH <sub>3</sub>	5.34	5.14	10.54	9.68	10.64	10.44	1.58	1.26	7.50	7.58
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	45	50	50	45	50	55	40	45	55	50
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.1	1.4	1.0	1.0	1.4	1.4	0.6	0.6	1.6	2.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	115.4	112.8	111.4	112.8	104.0	110.8	110.8	111.8	112.4	112.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQyQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 15 de agosto del 2000. IHAGIPCU 3.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio (C<sub>0</sub>): 84 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Ciudad Universitaria. México D.F.

Tratamiento: Centrifugación a 500 g por 5 minutos.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 7.1 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 50. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCU 3

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	6	79	138	120	146	149	160	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	9	69	95	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	1	66	90	113	144	188	195	209	223	236	252	260	286	307
	a4	0	9	63	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	3	4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	4	4	4	4
	b3	0	1	1	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	0	0	1	1	2	2	3	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	3	4	4	4	4
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	6	78	137	119	145	148	158	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	9	68	94	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	1	65	89	112	143	187	194	207	221	233	248	256	282	303
	a4	0	9	62	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 51. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGIPCU 3

Relación  $S_0/X_0 = 1.19 \text{ E-07 mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.3		6.9		6.7		7.3		7.3	
	COD	90		72		51		37		14	
	STT	760	720	800	860	940	900	720	760	700	660
	STV	180	220	220	320	400	360	160	200	120	160
	STF	580	500	580	540	540	540	560	560	580	500
	N-NH <sub>3</sub>	5.90	6.20	3.42	3.12	2.40	2.82	0.18	0.28	0.78	0.64
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	25	25	5	5	0	5	0	5	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.4	1.4	1.6	2.0	1.0	1.0	3.0	2.8	2.4	2.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	112.1	113.2	111.4	108.8	105.6	100.8	111.6	109.8	112.2	113.8
	BHT (UFC/L)	6.90 E+08	7.30 E+08	3.26 E+10	2.80 E+10	4.20 E+11	4.90 E+11	1.98 E+11	2.04 E+11	3.90 E+09	3.40 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.7		7.8		7.8		7.8	
	COD	6		3		5		5		4	
	STT	700	740	720	660	700	680	660	660	680	660
	STV	200	240	160	120	160	140	120	140	160	120
	STF	500	500	560	540	540	540	540	520	520	540
	N-NH <sub>3</sub>	5.82	6.66	5.02	4.96	5.64	4.82	5.50	4.74	4.64	4.96
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	20	20	5	5	10	10	5	10	15	20
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.0	1.2	1.6	1.0	1.4	1.8	2.4	1.4	1.6
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	112.8	109.8	108.4	110.2	107.4	104.8	111.8	112.1	114.6	113.8	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

d = días, COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 52. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F a IHAGIPCE

Relación So/Xo promedio=  $1.90 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 1.65 \text{ E-}07$

Muestra	Parámetro	0 días	2 días	3 días	7 días	14 días
IHAG	COD * + $\sigma$	80 ± 4	64 ± 20	56 ± 24	29 ± 11	9 ± 6
	% degradación + $\sigma$	0	20 ± 20	32 ± 25	65 ± 13	89 ± 7
	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0	7.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.6 ± 0.2
	STT + $\sigma$	767 ± 87	680 ± 58	703 ± 41	733 ± 47	730 ± 82
	STV + $\sigma$	240 ± 75	150 ± 45	177 ± 44	187 ± 37	180 ± 92
	STF + $\sigma$	523 ± 23	530 ± 21	533 ± 33	563 ± 15	550 ± 21
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	4.80 ± 1.68	0.66 ± 0.10	0.80 ± 0.12	0.34 ± 0.36	0.28 ± 0.12
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 2	0	0	0	5 ± 1
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.8	1.4 ± 0.4	0.8 ± 0.2	2.0 ± 0.8
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	116.8 ± 3.2	118.8 ± 2.4	118.2 ± 3.4	118.6 ± 3.6	120.0 ± 2.4
BHT (UFC/L) + $\sigma$	6.28E+08 ± 3.68E+08	1.91E+09 ± 1.04E+09	1.90E+09 ± 2.65E+08	7.03E+09 ± 2.53E+09	1.22E+10 ± 4.83E+09	
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.4 ± 0	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.9 ± 0.2
	STT + $\sigma$	723 ± 83	647 ± 68	620 ± 50	633 ± 41	633 ± 57
	STV + $\sigma$	197 ± 81	103 ± 29	90 ± 41	90 ± 27	117 ± 46
	STF + $\sigma$	527 ± 30	553 ± 45	530 ± 27	543 ± 48	517 ± 44
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	4.64 ± 1.32	5.08 ± 0.40	4.54 ± 1.16	6.50 ± 1.58	5.24 ± 1.54
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 3	15 ± 3	15 ± 3	30 ± 9	40 ± 10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.6
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	117.4 ± 1.4	120.2 ± 4.4	119.4 ± 1.4	118.4 ± 0.6	120.6 ± 2.4	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\*= Carbono orgánico disuelto de los matraces con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 5 de septiembre del 2000. IHAGIPCE 1.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 84 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella, Iztapalapa. México D.F

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 2.20 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 53. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCE 1

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	0	8	20	81	117	146	167	185	197	204	211	225	236	246
	a2	0	3	16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	11	17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	6	24	56	118	150	166	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	1	1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	6	6	9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	3	4	5	6	9	12	12	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	3	6	7	9	10	12	12	12	14	14	14	14	14	14
Promedio	bm	0	3	4	7	7	9	12	12	12	14	14	14	14	14	14
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	0	4	13	74	108	134	155	173	183	190	197	211	222	232
	a2	0	0	12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	7	10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	2	14	49	109	138	154	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 54. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F  
IHAGIPCE 1

Relación  $S_0/X_0 = 3.81 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.4		7.4		7.5		7.4		7.4	
	COD	88		86		86		34		21	
	STT	660	660	620	600	700	780	780	780	680	720
	STV	140	160	120	80	140	260	220	220	120	180
	STF	520	500	500	520	560	520	560	560	560	540
	N-NH <sub>3</sub>	4.20	4.84	0.66	0.68	0.70	0.68	0	0	0.34	0.40
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	15	35	35	10	10	0	0	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.6	0.6	2.6	3.4	1.6	1.6	1.0	0.8	3.0	3.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	112.8	116.6	117.2	118.6	118.6	114.2	113.8	114.4	119.4	119.0
BHT (UFC/L)	2.07 E+08	2.33 E+08	1.08 E+09	1.12 E+09	1.79 E+09	1.41 E+09	9.70 E+09	8.90 E+09	1.16 E+10	9.80 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.7		7.6		7.8		7.7	
	COD	4		4		4		6		6	
	STT	640	620	560	580	580	540	580	620	560	580
	STV	140	80	80	40	60	40	80	80	80	120
	STF	500	540	480	540	520	500	500	540	480	460
	N-NH <sub>3</sub>	3.58	4.60	4.88	4.34	4.12	4.98	4.42	4.50	3.34	3.90
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	15	15	20	20	20	20	35	35	55	45
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.6	0.6	1.2	1.2	1.4	1.6	1.6	1.6	3.0	2.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	114.8	117.4	125.8	122.8	119.0	116.8	118.2	117.8	119.4	118.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA.

2. Fecha de inicio de la prueba: 19 de septiembre del 2000. IHAGIPCE 2.

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 76 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella, Iztapalapa. México D.F.

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Refrigeración a 7°C durante 14 días. Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 7.30 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 55. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCE 2**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	0	87	140	168	188	204	212	226	240	250	260	268	274	282
	a2	0	0	61	120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	49	80	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	38	96	128	148	167	181	188	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	7	12	14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	5	15	18	24	30	30	30	31	31	31	32	32	32	32
	b3	0	13	13	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	10	10	10	16	22	26	30	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	9	12	14	20	26	28	30	31	31	31	32	32	32	32
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)  (ax-bm)	a1	0	0	75	126	148	162	176	182	195	209	219	228	236	242	250
	a2	0	0	49	106	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	40	68	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	29	84	114	128	141	155	158	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 56. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGIPCE 2

Relación  $S_0/X_0 = 1.04 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.4		7.3		7.5		7.5		7.6	
	COD	80		48		39		22		7	
	STT	800	780	720	740	680	700	660	740	680	640
	STV	240	280	200	180	160	140	180	200	100	100
	STF	560	500	520	560	520	560	580	540	580	540
	N-NH <sub>3</sub>	6.98	6.58	0.64	0.80	0.68	0.86	0.24	0.32	0.18	0.12
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.4	1.4	1.8	1.8	2.0	2.0	0.6	0.6	1.0	1.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	114.2	117.2	115.6	117.8	115.6	117.4	119.4	120.2	120.8	123.2
BHT (UFC/L)	6.80 E+08	7.8 E+08	2.00 E+09	1.10 E+09	2.22 E+09	1.98 E+09	8.00 E+09	7.00 E+09	1.34 E+10	1.70 E+10	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.9		7.9		7.9		7.9	
	COD	4		5		3		4		4	
	STT	780	720	720	640	640	640	680	680	640	640
	STV	200	220	100	80	80	80	100	60	60	100
	STF	580	500	620	560	560	560	580	620	580	540
	N-NH <sub>3</sub>	5.90	6.50	5.42	5.06	5.64	5.94	7.82	7.52	6.88	7.20
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	15	15	15	15	20	20	40	30
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.6	1.8	1.4	1.6	1.2	1.2	1.4	1.8	2.0	1.8
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	117.4	117.4	117.2	112.8	120.1	120.4	118.2	119.8	118.8	121.6	

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos; N-NH<sub>3</sub>= Amoniaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA

2. Fecha de inicio de la prueba: 10 de octubre del 2000. IHAGIPCE 3

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 80 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL

4. Inóculo:

Fuente: Tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas, Cerro de la Estrella, Iztapalapa. México D.F

Tratamiento: Dejar sedimentar de 10 a 15 minutos antes de ser empleado.

Pretratamiento: Refrigeración a 7°C durante 35 días. Aireación a temperatura ambiente 24 horas antes de su uso.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 9.50 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 57. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGIPCE 3

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	0	6	40	68	70	153	160	160	167	181	192	204	216	225
	a2	0	0	24	67	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	36	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	42	73	78	81	98	105	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	0	0	1	2	5	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	b3	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	6	14	20	20	20	20	20	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	1	3	7	11	12	14	14	8	8	8	8	8	8	8
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg)  (ax-bm)	a1	0	0	3	34	57	58	139	146	152	159	173	184	196	208	217
	a2	0	0	21	60	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	33	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	39	66	67	69	84	91	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 58. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGIPCE 3

Relación  $S_0/X_0 = 8.55 \text{ E-}08 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.4		7.2		7.4		7.6		7.8	
	COD	84		71		55		44		13	
	STT	840	860	680	720	660	700	700	740	840	820
	STV	300	320	140	180	180	180	120	180	320	260
	STF	540	540	540	540	480	520	580	560	520	560
	N-NH <sub>3</sub>	2.98	3.20	0.48	0.70	0.98	0.90	0.60	0.90	0.28	0.36
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	55	50	0	0	0	0	0	0	5	5
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.4	0.4	1.0	1.2	1.0	0.6	1.2	2.2	1.8	1.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	120.2	121.2	121.8	121.6	123.6	119.8	121.8	122.0	116.4	121.8
BHT (UFC/L)	8.60 E+08	1.01 E+09	3.02 E+09	3.15 E+09	1.90 E+09	2.10 E+09	3.30 E+09	5.30 E+09	8.00 E+09	8.60 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.8		7.8		7.8		8.1	
	COD	4		3		4		4		3	
	STT	840	740	660	720	640	680	640	600	660	720
	STV	320	220	100	160	140	140	140	80	160	180
	STF	520	520	560	560	500	540	500	520	500	540
	N-NH <sub>3</sub>	3.12	4.20	5.44	5.28	3.20	3.34	7.28	7.42	5.14	4.94
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	70	65	70	70	80	80	5	5	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.4	0.4	0.4	1.0	0.4	1.2	0.4	2.2	1.4	1.4
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	117.8	119.4	121.2	121.6	120.2	120.4	118.2	118.6	125.2	119.6

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Tabla 59. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F a IHAGISTJ

Relación So/Xo promedio=  $4.53 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1} \pm 2.14 \text{ E-}07$

Muestra	Parámetro	0 días	2 días	3 días	7 días	14 días
IHAG	COD * + $\sigma$	83 ± 2	78 ± 5	56 ± 22	41 ± 1	23 ± 9
	% degradación + $\sigma$	0	5 ± 3	33 ± 29	50 ± 13	72 ± 12
	pH (unidades) + $\sigma$	7.3 ± 0	7.1 ± 0.1	7 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.1
	STT + $\sigma$	670 ± 65	730 ± 63	737 ± 34	733 ± 55	687 ± 111
	STV + $\sigma$	143 ± 50	180 ± 52	200 ± 22	217 ± 53	160 ± 52
	STF + $\sigma$	527 ± 27	550 ± 24	537 ± 34	533 ± 53	527 ± 91
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	6.52 ± 0.56	3.98 ± 2.72	2.02 ± 2.84	0.44 ± 0.12	0.34 ± 0.04
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 2	10 ± 0	0	0	0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	114.8 ± 2.4	112.8 ± 1.6	110.8 ± 2.6	113.8 ± 3.8	116.6 ± 3.0
	BHT (UFC/L) + $\sigma$	2.00E+08 ± 7.71E+07	6.33E+09 ± 4.79E+09	6.36E+10 ± 7.13E+09	3.60E+09 ± 3.97E+08	2.84E+09 ± 7.03E+08
Control de inóculo	pH (unidades) + $\sigma$	7.3 ± 0.1	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0	7.5 ± 0	7.5 ± 0.1
	STT + $\sigma$	660 ± 87	706 ± 52	730 ± 24	700 ± 38	700 ± 38
	STV + $\sigma$	133 ± 53	133 ± 57	137 ± 43	177 ± 20	137 ± 46
	STF + $\sigma$	527 ± 47	547 ± 43	570 ± 63	553 ± 39	547 ± 35
	N-NH <sub>3</sub> + $\sigma$	5.76 ± 0.66	5.16 ± 0.74	4.78 ± 0.64	4.84 ± 0.76	5.8 ± 0.56
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L) + $\sigma$	10 ± 2	10 ± 2	15 ± 2	10 ± 2	10 ± 0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + $\sigma$	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.6	1.8 ± 0.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + $\sigma$	113.4 ± 1.4	112.8 ± 1.0	114.8 ± 2.2	112.4 ± 2.2	112.6 ± 2.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

STT = Sólidos totales, STV = Sólidos volátiles, STF = Sólidos fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

COD\* = Carbono orgánico disuelto de los matracas con IHA (después de haber restado los valores de COD del control de inóculo)

1. Laboratorio: PIQAYQA.
2. Fecha de inicio de la prueba: 31 de octubre del 2000. IHAGISTJ 1.
3. Sustancia de prueba:
  - Nombre: IHAG
  - Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.
  - Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 85 mgCOD/L.
  - Volumen en el matraz: 250 mL
4. Inóculo:
  - Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.
  - Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.
  - Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y aireación a temperatura ambiente.
  - Cuenta de BHT en la mezcla de reacción:  $2.05 \times 10^8$  UFC/L.
5. Consumo de oxígeno:
  - Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 60. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGISTJ 1**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	2	8	19	85	122	152	163	181	191	198	205	219	230	240
	a2	0	0	16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	11	16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	6	20	60	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	3	5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	3	7	11	16	22	28	28	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	2	2	4	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	b4	0	0	2	2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	2	4	6	11	14	18	8	8	8	8	8	8	8	8
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	0	4	13	74	108	134	155	173	183	190	197	211	222	232
	a2	0	0	12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	7	10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	2	14	49	109	138	154	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 61. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGISTJ 1

Relación  $S_0/X_0 = 4.14 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.3		7.2		6.9		7.1		7.2	
	COD	85		81		85		57		20	
	STT	680	720	720	740	780	680	800	760	500	600
	STV	140	560	180	160	200	180	280	260	120	100
	STF	540	160	540	580	580	500	520	500	380	500
	N-NH <sub>3</sub>	6.18	6.08	5.94	6.22	5.92	5.46	0.58	0.56	0.30	0.38
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	10	10	0	0	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	0.8	1.0	0.8	1.2	1.0	0.8	0.8	1.2	1.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	118.8	115.8	111.8	113.0	110.8	110.8	118.8	117.6	120.0	120.4
	BHT (UFC/L)	1.70 E+08	2.40 E+08	2.36 E+09	2.14 E+09	5.50 E+09	4.40 E+09	7.00 E+08	1.00 E+09	2.51 E+09	2.36 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.3		7.5		7.5		7.5	
	COD	0		0		8		5		2	
	STT	620	700	700	640	660	700	740	740	640	760
	STV	160	140	180	160	160	180	160	200	80	120
	STF	460	560	520	480	500	520	580	540	560	540
	N-NH <sub>3</sub>	6.12	5.04	4.90	4.78	4.50	4.84	4.22	3.74	6.12	5.76
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.2	0.8	0.8	1.0	1.0
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	114.8	114.8	113.8	111.4	112.2	118.4	109.8	109.4	111.6	112.6

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

1. Laboratorio: PIQAYQA

2. Fecha de inicio de la prueba: 14 de noviembre del 2000. IHAGISTJ 2

3. Sustancia de prueba:

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 80 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

4. Inóculo:

Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.

Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.

Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y Aireación a temperatura ambiente.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 2.75 E+08 UFC/L.

5. Consumo de oxígeno:

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

Tabla 62. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGISTJ 2

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	2	80	134	156	170	185	193	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	2	54	114	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	42	73	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	31	89	122	136	149	164	169	211	225	235	244	252	259	267
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	2	4	8	12	12	14	16	16	16	16	16	17	17	17
	b2	0	0	0	5	5	5	5	6	---	---	---	---	---	---	---
	b3	0	6	10	10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b4	0	0	4	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	2	5	8	8	8	9	11	16	16	16	16	17	17	17
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	0	75	126	148	162	176	182	---	---	---	---	---	---	---
	a2	0	0	49	106	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	40	68	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	29	84	114	128	141	155	158	195	209	219	228	236	242	250

Tabla 63. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F  
IHAGISTJ 2

Relación  $S_0/X_0 = 2.61 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.3		7.1		7.2		7.3		7.3	
	COD	83		82		61		48		41	
	STT	580	600	660	660	720	740	660	700	740	740
	STV	60	120	120	140	200	240	240	200	200	240
	STF	520	480	540	520	520	500	520	500	540	500
	N-NH <sub>3</sub>	6.18	6.54	5.64	5.02	0	0	0.40	0.38	0.38	0.30
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	0	0	0	0	0	0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.8	0.8	1.4	1.0	0.6	0.6	0.8	0.8	1.4	1.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	114.8	113.2	111.2	111.6	109.4	107.2	113.6	110.2	116.8	116.2
BHT (UFC/L)	3.00 E+08	2.50 E+08	1.39 E+11	1.43 E+11	5.90 E+09	4.40 E+09	1.50 E+09	2.10 E+09	3.40 E+09	3.90 E+09	
Control de inóculo	pH (unidades)	7.3		7.5		7.5		7.5		7.6	
	COD	3		10		3		6		7	
	STT	580	560	600	620	660	680	700	700	700	700
	STV	80	60	60	60	80	120	180	200	180	200
	STF	500	500	540	560	580	560	520	500	520	500
	N-NH <sub>3</sub>	5.70	5.44	6.06	6.12	4.10	4.28	5.26	4.64	5.14	5.82
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	10	10	10	10	15	15	10	10	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.4	1.4	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.2
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.0	113.6	113.2	111.6	112.8	115.4	114.0	114.4	115.8	115.0

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub>= Amoniac, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

**1. Laboratorio:** PIQAYQA

**2. Fecha de inicio de la prueba:** 28 de noviembre del 2000. IHAGISTJ 3

**3. Sustancia de prueba:**

Nombre: IHAG

Concentración en la solución stock: 72,000 mgCOD/L aproximadamente.

Concentración inicial en el medio ( $C_0$ ): 83 mgCOD/L.

Volumen en el matraz: 250 mL.

**4. Inóculo:**

Fuente: Sobrenadante de tierra de jardín. Casa habitación. Coyoacán, México D.F.

Tratamiento: Filtración a través de papel Whatman No. 1 antes de ser empleado.

Pretratamiento: Preparación 24 horas antes de su uso y Aireación a temperatura ambiente.

Cuenta de BHT en la mezcla de reacción: 1.21 E+08 UFC/L.

**5. Consumo de oxígeno:**

Tipo de respirómetro: VOITH-Sapromat B-12.

**Tabla 64. Resultados de consumo de oxígeno PBAR IHAGISTJ 3**

Tiempo (Días)	#	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Consumo de O <sub>2</sub> IHAG (mg)	a1	0	0	15	45	66	67	148	155	161	174	188	199	211	223	232
	a2	0	0	33	71	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	45	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	2	51	75	76	78	93	100	---	---	---	---	---	---	---
Consumo de O <sub>2</sub> Inóculo (mg)	b1	0	2	6	12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	b2	0	0	4	8	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	b3	0	0	0	13	13	13	13	13	13	---	---	---	---	---	---
	b4	0	8	14	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Promedio	bm	0	2	12	11	9	9	9	9	9	15	15	15	15	15	15
Consumo de O <sub>2</sub> corregido (mg) (ax-bm)	a1	0	0	3	34	57	58	139	146	152	159	173	184	196	208	217
	a2	0	0	21	60	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a3	0	0	33	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	a4	0	0	39	64	67	69	84	91	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 65. Valores de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos de la aplicación de la PBAR OECD 301-F IHAGISTJ 3

Relación  $S_0/X_0 = 6.85 \text{ E-}07 \text{ mgCOD} \cdot \text{UFC}^{-1}$

Muestra	Parámetro	0 días		2 días		3 días		7 días		14 días	
IHAG	pH (unidades)	7.3		6.9		7		7.1		7.2	
	COD	91		89		39		37		24	
	STT	700	740	800	800	740	760	700	780	760	780
	STV	180	200	260	220	180	200	180	140	160	140
	STF	520	540	540	580	560	560	520	640	600	640
	N-NH <sub>3</sub>	6.60	7.58	0.50	0.48	0.36	0.4	0.38	0.28	0.30	0.32
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.0	1.0	1.0	1.2	1.4	1.4	1.2	1.4	1.6	1.6
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	112.2	114.6	115.0	113.8	112.2	115.0	109.8	112.8	113.8	112.8
	BHT (UFC/L)	1.18 E+08	1.25 E+08	9.70 E+09	1.36 E+10	4.10 E+08	4.60 E+08	9.00 E+08	7.30 E+08	2.32 E+09	2.54 E+09
Control de inóculo	pH (unidades)	7.4		7.4		7.5		7.5		7.5	
	COD	8		7		6		7		6	
	STT	780	720	760	760	780	760	740	760	700	700
	STV	200	160	160	180	100	180	160	160	140	100
	STF	580	560	600	580	680	580	580	600	560	600
	N-NH <sub>3</sub>	6.70	5.38	4.60	4.48	5.82	5.14	5.52	5.64	5.02	4.66
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg/L)	15	15	15	15	15	15	15	15	10	10
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.0	2.2	2.4	2.2	2.2	2.4	2.2	2.2	2.2	2.4
	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	113.6	110.8	113.6	113.2	114.8	114.4	113.2	113.2	108.0	112.8

Unidades: mg/L a menos que se especifique otra

COD = Carbono orgánico disuelto, STT = Sólidos totales totales, STV = Sólidos totales volátiles, STF = Sólidos totales fijos, N-NH<sub>3</sub> = Amoníaco, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> = Nitrito, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = Ortofosfato y BHT = Cuenta de bacterias heterótrofas totales

Anexo A.2. Tablas de parámetros cinéticos y cálculos de índices de actividad microbiana

Tabla 66. Datos cinéticos para las PBAR con IHAK

Prueba y fecha	Tiempo (h)	t 50% (h)	t 70% (h)	a	b	r	r <sup>2</sup>
IHAKIPCU 1 (13/06/00)	30-38	7.8	13.5	2.185	0.089	0.9935	0.9870
	28-34	7.4	12.9	2.259	0.093	0.9970	0.9940
	28-36	7.3	12.7	2.107	0.095	0.9951	0.9903
	Promedio	7.5 ± 0.3	13.0 ± 0.4		0.092 ± 0.003		
IHAKIPCU 2 (03/07/00)	32-40	5.5	9.5	0.333	0.126	0.9940	0.9880
	36-42	6.5	11.3	0.884	0.106	0.9945	0.9892
	34-46	6.7	11.7	1.081	0.103	0.9942	0.9884
	Promedio	6.2 ± 0.6	10.9 ± 1.1		0.112 ± 0.012		
IHAKIPCU 3 (11/07/00)	20-26	4.7	8.2	1.299	0.147	0.9923	0.9846
	20-26	5.3	9.2	2.166	0.131	0.9930	0.9861
	20-26	5.7	9.9	2.262	0.122	0.9969	0.9938
	Promedio	5.2 ± 0.5	9.07 ± 0.8		0.133 ± 0.013		
Promedio IHAKIPCU		6.3 ± 1.1	10.9 ± 1.9		0.112 ± 0.019		
IHAKIPCE 1 (12/09/00)	38-44	6.5	11.2	0.846	0.107	0.9958	0.9917
	36-44	6.3	10.9	0.177	0.110	0.9897	0.9795
	38-44	5.7	9.9	0.042	0.122	0.9980	0.9960
	Promedio	6.2 ± 0.4	10.7 ± 0.7		0.113 ± 0.007		
IHAKIPCE 2 (26/09/00)	40-46	6.8	11.8	0.607	0.102	0.9975	0.9950
	36-42	7.1	12.4	1.290	0.097	0.9942	0.9885
	40-48	6.7	11.6	0.469	0.104	0.9982	0.9965
	Promedio	6.9 ± 0.2	11.9 ± 0.4		0.101 ± 0.003		
IHAKIPCE 3 (17/09/00)	34-46	6.9	12.0	1.055	0.100	0.9956	0.9912
	34-42	8.3	14.5	2.066	0.083	0.9907	0.9815
	38-46	6.0	10.5	0.118	0.115	0.9949	0.9898
	Promedio	7.1 ± 1.1	12.3 ± 2.0		0.099 ± 0.016		
Promedio IHAKIPCE		6.7 ± 0.7	11.6 ± 1.3		0.115 ± 0.011		
IHAKISTJ 1 (06/11/00)	36-44	8.1	14.2	1.744	0.085	0.9932	0.9865
	36-44	7.4	12.8	1.393	0.094	0.9941	0.9883
	36-44	6.7	11.6	0.981	0.104	0.9907	0.9815
	Promedio	7.4 ± 0.7	12.9 ± 3.2		0.094 ± 0.009		
IHAKISTJ 2 (21/11/00)	28-40	5.8	10.0	0.812	0.120	0.9944	0.9888
	28-40	5.0	8.6	0.419	0.139	0.9941	0.9882
	26-38	8.7	15.0	2.855	0.080	0.9943	0.9886
	Promedio	6.5 ± 1.9	11.2 ± 3.4		0.113 ± 0.030		
IHAKISTJ 3 (05/12/00)	22-32	8.0	13.9	2.844	0.086	0.9942	0.9885
	28-38	5.9	10.3	1.359	0.117	0.9905	0.9810
	28-38	11.2	19.4	3.392	0.062	0.9956	0.9912
	Promedio	8.4 ± 2.7	14.6 ± 4.6		0.088 ± 0.027		
Promedio IHAKISTJ		7.4 ± 1.9	12.9 ± 3.2		0.098 ± 0.023		

Tabla 67. Datos cinéticos para las PBAR con IHAG

Prueba y fecha	Tiempo (h)	t <sub>50%</sub> (h)	t <sub>70%</sub> (h)	a	b	r	r <sup>2</sup>
IHAGIPCU 1 (20/06/00)	48-60	9.8	16.9	0.681	0.071	0.9999	0.9999
	48-60	10.5	18.2	0.614	0.066	0.9851	0.9706
	48-60	10.7	18.5	0.747	0.065	0.9894	0.9790
	Promedio	10.3 ± 0.5	17.9 ± 0.8		0.067 ± 0.003		
IHAGIPCU 2 (18/07/00)	64-76	16.5	28.6	1.428	0.042	0.9913	0.9827
	56-68	12.6	21.9	0.727	0.055	0.9932	0.9865
	56-68	12.6	21.9	0.744	0.055	0.9927	0.9855
	Promedio	13.9 ± 2.2	24.1 ± 3.9		0.051 ± 0.007		
IHAGIPCU 3 (15/08/009)	16-24	24.7	42.9	3.482	0.028	0.9970	0.9941
	36-60	40.8	70.8	3.303	0.017	0.9945	0.9890
	44-60	34.6	60.1	2.986	0.020	0.9933	0.9866
	Promedio	33.4 ± 8	57.9 ± 14.0		0.022 ± 0.006		
Promedio IHAGIPCU		19.2 ± 11.5	33.3 ± 20.0		0.045 ± 0.021		
IHAGIPCE 1 (05/09/00)	84-96	12.8	22.3	3.609	0.054	0.9932	0.9865
	82-96	12.4	21.5	2.783	0.056	0.9885	0.9771
	82-94	11.4	19.7	1.974	0.061	0.9983	0.9967
	Promedio	12.2 ± 0.7	21.2 ± 1.3		0.057 ± 0.004		
IHAGIPCE 2 (19/09/00)	36-64	25.7	44.6	3.146	0.027	0.9936	0.9873
	28-56	26.6	46.3	3.208	0.026	0.9933	0.9867
	36-52	15.7	27.3	1.974	0.044	0.9983	0.9967
	Promedio	22.7 ± 6.0	39.4 ± 10.5		0.032 ± 0.010		
IHAGIPCE 3 (10/10/00)	56-72	27.7	48.1	2.329	0.025	0.9940	0.9881
	52-68	31.5	54.7	2.699	0.022	0.9956	0.9913
	52-64	28.9	50.1	2.516	0.024	0.9942	0.9884
	Promedio	29.4 ± 1.9	52 ± 5		0.024 ± 0.001		
Promedio IHAGIPCE		21.1 ± 8.5	37.2 ± 14.1		0.042 ± 0.018		
IHAGISTJ 1 (31/10/00)	64-72	23.9	41.5	1.522	0.029	0.9848	0.9700
	64-80	46.2	80.2	3.025	0.015	0.9946	0.9843
	48-68	57.7	100.3	3.481	0.012	0.9929	0.9858
	Promedio	42.6 ± 17.2	56.1 ± 23.4		0.019 ± 0.009		
IHAGISTJ 2 (14/11/00)	52-76	21.0	36.5	2.974	0.033	0.9938	0.9876
	56-76	31.5	54.7	2.274	0.022	0.9927	0.9854
	56-68	23.1	40.1	2.054	0.030	0.9952	0.9904
	Promedio	25.2 ± 5.5	43.8 ± 9.6		0.028 ± 0.006		
IHAGISTJ 3 (28/11/00)	44-56	43.3	75.2	3.609	0.016	0.9965	0.9930
	40-48	23.1	40.1	2.695	0.030	0.9894	0.9790
	44-56	21.0	36.5	2.706	0.033	0.9954	0.9909
	Promedio	29.1 ± 12.3	50.6 ± 21.4		0.026 ± 0.009		
Promedio IHAGISTJ		32.3 ± 13.5	56.1 ± 23.4		0.024 ± 0.008		

Tabla 68. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAKIPCU 2 (03/07/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1333	0.1166	PAL	5	0.1388	0.1190	PAL	5	0.1219	0.1114
EST	3	0.1000	0.1000	EST	3	0.0833	0.0899	EST	4	0.0975	0.0985
LEST	2	0.0666	0.0783	LEST	2	0.0555	0.0696	LEST	4	0.0975	0.0985
LIP	1	0.0333	0.0492	LIP	2	0.0555	0.0696	LIP	2	0.0487	0.0639
LeuA	3	0.1000	0.1000	LeuA	4	0.1111	0.1060	LeuA	5	0.1219	0.1114
ValA	2	0.0666	0.0783	ValA	3	0.0833	0.0899	ValA	4	0.0975	0.0985
CisA	1	0.0333	0.0492	CisA	1	0.0277	0.0431	CisA	1	0.0243	0.0392
TRIP	1	0.0333	0.0492	TRIP	1	0.0277	0.0431	TRIP	1	0.0243	0.0392
αQUIM	1	0.0333	0.0492	αQUIM	1	0.0277	0.0431	αQUIM	1	0.0243	0.0392
PAC	4	0.1333	0.1166	PAC	5	0.1388	0.1190	PAC	5	0.1219	0.1114
αGal	1	0.0333	0.0492	NAFPH	4	0.1111	0.1060	NAFPH	5	0.1219	0.1114
βGal	1	0.0333	0.0492	αGlc	3	0.0833	0.0899	βGal	2	0.0487	0.0639
αGlc	2	0.0666	0.0783	βGlc	1	0.0277	0.0431	GlcNAc	2	0.0487	0.0639
βGlc	2	0.0666	0.0783	GlcNAc	1	0.0277	0.0431				
GlcNAc	2	0.0666	0.0783								
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>0.9999</b>	<b>1.1199</b>	<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0.9992</b>	<b>1.0749</b>	<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>0.9991</b>	<b>1.0508</b>
IHAKIPCU 3 (11/07/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1290	0.1147	PAL	5	0.1388	0.1190	PAL	5	0.0909	0.0947
EST	3	0.0967	0.0981	EST	3	0.0833	0.0899	EST	4	0.0727	0.0828
LEST	2	0.0645	0.0767	LEST	2	0.0555	0.0696	LEST	4	0.0727	0.0828
LIP	1	0.0322	0.0480	LIP	2	0.0555	0.0696	LIP	4	0.0727	0.0828
LeuA	3	0.0967	0.0981	LeuA	4	0.1111	0.1060	LeuA	5	0.0909	0.0947
ValA	2	0.0645	0.0767	ValA	3	0.0833	0.0899	ValA	5	0.0909	0.0947
CisA	1	0.0322	0.0480	CisA	1	0.0277	0.0431	CisA	3	0.0545	0.0689
TRIP	1	0.0322	0.0480	TRIP	1	0.0277	0.0431	TRIP	4	0.0727	0.0828
αQUIM	1	0.0322	0.0480	αQUIM	1	0.0277	0.0431	αQUIM	5	0.0909	0.0947
PAC	4	0.1290	0.1147	PAC	5	0.1388	0.1190	PAC	5	0.0909	0.0947
NAFPH	3	0.0967	0.0981	NAFPH	4	0.1111	0.1060	NAFPH	5	0.0909	0.0947
αGal	1	0.0322	0.0480	αGlc	3	0.0833	0.0899	βGal	2	0.0363	0.0523
βGal	1	0.0322	0.0480	βGlc	1	0.0277	0.0431	GlcNAc	4	0.0727	0.0828
αGlc	1	0.0322	0.0480	GlcNAc	1	0.0277	0.0431				
βGlc	1	0.0322	0.0480								
GlcNAc	2	0.0645	0.0767								
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.1378</b>	<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0.9992</b>	<b>1.0744</b>	<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>0.9997</b>	<b>1.1030</b>

Tabla 69. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAKIPCE 1 (12/09/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1142	0.1076	PAL	1	0.0625	0.0752	PAL	5	0.1162	0.1086
EST	3	0.1142	0.0914	EST	2	0.125	0.1128	EST	4	0.093	0.0959
LEST	3	0.0857	0.0914	LEST	1	0.0625	0.0752	LEST	4	0.093	0.0959
LIP	3	0.0857	0.0914	LIP	1	0.0625	0.0752	LIP	1	0.0232	0.0379
LeuA	4	0.1142	0.01076	LeuA	5	0.3125	0.1578	LeuA	5	0.1162	0.1086
ValA	3	0.0857	0.0914	ValA	1	0.0625	0.0752	ValA	4	0.093	0.0959
CisA	1	0.0285	0.044	PAC	3	0.1875	0.1363	CisA	1	0.0232	0.0379
TRIP	1	0.0285	0.044	NAFPH	1	0.0625	0.0752	TRIP	3	0.069	0.0801
PAC	4	0.1142	0.1076	βGlc	1	0.0625	0.0752	αQUIM	3	0.069	0.0801
NAFPH	3	0.0857	0.0914					PAC	5	0.1162	0.1086
βGal	2	0.0571	0.0709					NAFPH	4	0.093	0.0959
βGlc	1	0.0285	0.044					αGlc	1	0.0232	0.0379
αGlc	1	0.0285	0.044					βGlc	1	0.0232	0.0379
GlcNAc	1	0.0285	0.044					GlcNAc	2	0.0465	0.0619
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.0869</b>	<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>0.8586</b>	<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>0.9979</b>	<b>1.0835</b>
IHAKIPCE 2 (26/09/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1538	0.1250	PAL	5	0.119	0.1100	PAL	5	0.1162	0.1086
EST	1	0.0384	0.0543	EST	3	0.0714	0.0818	EST	4	0.093	0.0959
LEST	1	0.0384	0.0543	LEST	3	0.0714	0.0818	LEST	4	0.093	0.0959
LeuA	3	0.1153	0.1081	LIP	1	0.0238	0.0386	LIP	1	0.0232	0.0379
ValA	2	0.0769	0.0856	LeuA	5	0.119	0.1100	LeuA	5	0.1162	0.1086
CisA	1	0.0384	0.0543	ValA	3	0.0714	0.0818	ValA	4	0.093	0.0959
TRIP	1	0.0384	0.0543	CisA	1	0.0238	0.0386	CisA	1	0.0232	0.0379
PAC	5	0.1923	0.1376	TRIP	3	0.0714	0.0818	TRIP	3	0.069	0.0801
NAFPH	4	0.1538	0.1250	αQUIM	3	0.0714	0.0818	αQUIM	3	0.069	0.0801
βGal	1	0.0384	0.0543	PAC	5	0.119	0.1100	PAC	5	0.1162	0.1086
αGlc	1	0.0384	0.0543	NAFPH	5	0.119	0.1100	NAFPH	4	0.093	0.0959
βGlc	1	0.0384	0.0543	βGal	1	0.0238	0.0386	αGlc	1	0.0232	0.0379
GlcNAc	1	0.0384	0.0543	αGlc	1	0.0238	0.0386	βGlc	1	0.0232	0.0379
				βGlc	2	0.0476	0.0629	GlcNAc	2	0.0465	0.0619
				GlcNAc	1	0.0238	0.0386				
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>0.9979</b>	<b>0.9071</b>	<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.1054</b>	<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>0.9979</b>	<b>1.0833</b>

Tabla 70. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAKIPCE 3 (17/10/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1428	0.1207	PAL	3	0.12	0.1105	PAL	5	0.147	0.1224
EST	2	0.0714	0.0818	EST	2	0.08	0.0878	EST	3	0.0882	0.0930
LEST	2	0.0714	0.0818	LEST	2	0.08	0.0878	LEST	3	0.0882	0.0930
LIP	1	0.0357	0.0516	LIP	1	0.04	0.0559	LeuA	5	0.147	0.1224
LeuA	4	0.1428	0.1207	LeuA	4	0.16	0.1273	ValA	3	0.0882	0.0930
ValA	3	0.1071	0.1039	ValA	2	0.08	0.0878	CisA	1	0.0294	0.0450
PAC	4	0.1428	0.1207	CisA	1	0.04	0.0559	TRIP	2	0.0588	0.0724
NAFPH	3	0.1071	0.1039	PAC	5	0.2	0.1398	αQUIM	1	0.0294	0.0450
βGal	1	0.0357	0.0516	NAFPH	3	0.12	0.1105	PAC	5	0.147	0.1224
αGlc	1	0.0357	0.0516	βGal	1	0.04	0.0559	NAFPH	2	0.0588	0.0724
βGlc	1	0.0357	0.0516	βGlc	1	0.04	0.0559	αGlc	1	0.0294	0.0450
GlcNAc	2	0.0714	0.0818					βGlc	1	0.0294	0.0450
								GlcNAc	2	0.0588	0.0724
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>0.9996</b>	<b>0.0818</b>	<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>0.9751</b>	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.0434</b>
IHAKISTJ 1 (06/11/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.2307	0.1469	PAL	5	0.2	0.1398	PAL	5	0.1136	0.1073
EST	3	0.2307	0.1469	EST	3	0.12	0.1105	EST	5	0.1136	0.1073
LEST	3	0.2307	0.1469	LEST	2	0.08	0.0878	LEST	2	0.0454	0.0610
LeuA	1	0.0769	0.0856	LeuA	5	0.2	0.1398	LIP	2	0.0454	0.0610
ValA	1	0.0769	0.0856	ValA	2	0.08	0.0878	LeuA	4	0.0909	0.0947
PAC	2	0.1538	0.1250	CisA	1	0.04	0.0559	ValA	3	0.0681	0.0795
				PAC	4	0.16	0.1273	CisA	2	0.0454	0.0610
				NAFPH	1	0.04	0.0559	TRIP	3	0.0681	0.0795
				αGlc	1	0.04	0.0559	αQUIM	2	0.0454	0.0610
				βGlc	1	0.04	0.0559	PAC	5	0.1136	0.1073
								NAFPH	4	0.0909	0.0947
								βGal	1	0.0227	0.0373
								αGlc	3	0.0681	0.0795
								βGlc	1	0.0227	0.0373
								GlcNAc	2	0.0454	0.0610
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.7369</b>	<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>0.9166</b>	<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>0.9993</b>	<b>1.1291</b>

Tabla 71. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAKISTJ 2 (21/11/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.2307	0.1469	PAL	5	0.102	0.1011	PAL	5	0.1111	0.1060
EST	1	0.0769	0.0856	EST	4	0.0816	0.0888	EST	5	0.1111	0.1060
LEST	1	0.0769	0.0856	LEST	4	0.0816	0.0888	LEST	2	0.0444	0.0601
LeuA	3	0.2307	0.1469	LIP	1	0.0204	0.0345	LIP	3	0.0666	0.0784
ValA	1	0.0769	0.0856	LeuA	5	0.102	0.1011	LeuA	1	0.0222	0.0367
PAC	3	0.2307	0.1469	ValA	5	0.102	0.1011	ValA	5	0.1111	0.1060
NAFPH	1	0.0769	0.0856	CisA	2	0.0408	0.0567	CisA	2	0.0444	0.0601
				TRIP	3	0.0612	0.0743	TRIP	3	0.0666	0.0784
				αQUIM	3	0.0612	0.0743	αQUIM	2	0.0444	0.0601
				PAC	5	0.102	0.1011	PAC	5	0.1111	0.1060
				NAFPH	5	0.102	0.1011	NAFPH	5	0.1111	0.1060
				βGal	1	0.0204	0.0345	βGal	1	0.0222	0.0367
				αGlc	4	0.0816	0.0888	αGlc	3	0.0666	0.0784
				βGlc	1	0.0204	0.0345	βGlc	1	0.0222	0.0367
				GlcNAc	1	0.0204	0.0345	GlcNAc	2	0.0444	0.0601
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.7831</b>	<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.1152</b>	<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>0.9995</b>	<b>1.1155</b>
IHAKISTJ 3 (05/12/00)											
t= 0d				t= 2d				t= 7d			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.2307	0.1469	PAL	5	0.1785	0.1336	PAL	5	0.102	0.1011
EST	3	0.2307	0.1469	EST	3	0.1071	0.1039	EST	4	0.0816	0.0888
LEST	3	0.2307	0.1469	LEST	3	0.1071	0.1039	LEST	4	0.0816	0.0888
LeuA	1	0.0769	0.0856	LeuA	5	0.1785	0.1336	LIP	2	0.0408	0.0566
ValA	1	0.0769	0.0856	ValA	2	0.0714	0.0818	LeuA	5	0.102	0.1011
PAC	2	0.1538	0.1250	CisA	1	0.0357	0.0517	ValA	4	0.0816	0.0888
				PAC	4	0.1428	0.1207	CisA	1	0.0204	0.0344
				NAFPH	3	0.1071	0.1039	TRIP	4	0.0816	0.0888
				αGlc	1	0.0357	0.0517	αQUIM	1	0.0204	0.0344
				βGlc	1	0.0357	0.0517	PAC	5	0.102	0.1011
								NAFPH	4	0.0816	0.0888
								βGal	3	0.0612	0.0742
								αGlc	4	0.0816	0.0888
								βGlc	1	0.0204	0.0344
								GlcNAc	2	0.0408	0.0566
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.7369</b>	<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>0.9996</b>	<b>0.9365</b>	<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.1267</b>

Tabla 72. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAGIPCU 2 (18/07/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1481	0.1228	PAL	4	0.2	0.1398	PAL	4	0.1290	0.1147
EST	3	0.1111	0.106	EST	3	0.15	0.1236	EST	3	0.0967	0.0981
LEST	2	0.074	0.0836	LEST	1	0.05	0.0651	LEST	2	0.0645	0.0768
LIP	1	0.037	0.0529	LeuA	4	0.2	0.1398	LIP	1	0.0322	0.0480
LeuA	3	0.1111	0.106	ValA	2	0.1	0.1000	LeuA	5	0.1612	0.1278
ValA	2	0.074	0.0836	PAC	5	0.25	0.1505	ValA	3	0.0967	0.0981
CisA	1	0.037	0.0529	NAFPH	1	0.05	0.0651	CisA	1	0.0322	0.0480
TRIP	1	0.037	0.0529					TRIP	1	0.0322	0.0480
αQUIM	1	0.037	0.0529					αQUIM	1	0.0322	0.0480
PAC	3	0.1111	0.106					PAC	5	0.1612	0.1278
βGal	1	0.037	0.0529					NAFPH	3	0.0967	0.0981
αGlc	2	0.074	0.0836					GlcNAc	2	0.0645	0.0768
βGlc	2	0.074	0.0836								
GlcNAc	1	0.037	0.0529								
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.0926</b>	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>0.7838</b>	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>0.9993</b>	<b>1.0104</b>
IHAGIPCU 3 (15/08/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.1111	0.106	PAL	4	0.2222	0.1452	PAL	4	0.1111	0.1060
EST	3	0.1111	0.106	EST	1	0.0555	0.0697	EST	3	0.0833	0.0899
LEST	1	0.037	0.0529	LEST	1	0.0555	0.0697	LEST	4	0.1111	0.1060
LIP	1	0.037	0.0529	LeuA	4	0.2222	0.1452	LIP	1	0.0277	0.0431
LeuA	3	0.1111	0.106	ValA	1	0.0555	0.0697	LeuA	5	0.1388	0.1190
ValA	3	0.1111	0.106	PAC	5	0.2777	0.1545	ValA	3	0.0833	0.0899
CisA	1	0.037	0.0529	NAFPH	2	0.1111	0.1060	CisA	1	0.0277	0.0431
TRIP	1	0.037	0.0529					TRIP	1	0.0277	0.0431
PAC	4	0.1481	0.1228					αQUIM	1	0.0277	0.0431
NAFPH	3	0.1111	0.106					PAC	5	0.1388	0.1190
βGal	1	0.037	0.0529					NAFPH	5	0.1388	0.1190
αGlc	1	0.037	0.0529					GlcNAc	3	0.0833	0.0899
βGlc	1	0.037	0.0529								
GlcNAc	1	0.037	0.0529								
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.076</b>	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.7599</b>	<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0.9993</b>	<b>1.0115</b>

Tabla 73. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAGIPCE 1 (05/09/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	4	0.1142	0.1076	PAL	4	0.2666	0.1531	PAL	3	0.1428	0.1207
EST	3	0.0857	0.0914	EST	1	0.0666	0.0784	EST	3	0.1428	0.1207
LEST	3	0.0857	0.0914	LEST	1	0.0666	0.0784	LEST	2	0.0952	0.0972
LIP	3	0.0857	0.0914	LeuA	3	0.2	0.1398	LeuA	5	0.238	0.1484
LeuA	4	0.1142	0.1076	ValA	1	0.0666	0.0784	ValA	1	0.0476	0.0629
ValA	3	0.0857	0.0914	PAC	5	0.3333	0.1590	TRIP	1	0.0476	0.0629
CisA	1	0.0285	0.044					PAC	3	0.1428	0.1207
TRIP	1	0.0285	0.044					NAFPH	1	0.0476	0.0629
PAC	4	0.1142	0.1076					αGlc	1	0.0476	0.0629
NAFPH	3	0.0857	0.0914					GlcNAc	1	0.0476	0.0629
αGal	1	0.0285	0.044								
βGal	2	0.0571	0.0709								
αGlc	1	0.0285	0.044								
βGlc	1	0.0285	0.044								
GlcNAc	1	0.0285	0.044								
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>0.9992</b>	<b>1.1147</b>	<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.6870</b>	<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>0.9996</b>	<b>0.9225</b>
IHAGIPCE 2 (19/09/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.1034	0.1018	PAL	4	0.2352	0.1478	PAL	4	0.1111	0.1060
EST	4	0.1379	0.1186	EST	1	0.0588	0.0724	EST	4	0.1111	0.1060
LEST	1	0.0344	0.0503	LEST	1	0.0588	0.0724	LEST	4	0.1111	0.1060
LIP	1	0.0344	0.0503	LeuA	5	0.2941	0.1563	LIP	1	0.0277	0.0431
LeuA	3	0.1034	0.1018	ValA	1	0.0588	0.0724	LeuA	5	0.1388	0.1190
ValA	3	0.1034	0.1018	PAC	5	0.2941	0.1563	ValA	3	0.0833	0.0899
CisA	1	0.0344	0.0503					CisA	1	0.0277	0.0431
TRIP	1	0.0344	0.0503					TRIP	1	0.0277	0.0431
PAC	5	0.1724	0.1316					αQUIM	1	0.0277	0.0431
NAFPH	3	0.1034	0.1018					PAC	5	0.1388	0.1190
βGal	1	0.0344	0.0503					NAFPH	5	0.1388	0.1190
αGlc	1	0.0344	0.0503					GlcNAc	2	0.0555	0.0697
βGlc	1	0.0344	0.0503								
GlcNAc	1	0.0344	0.0503								
<b>Total</b>	<b>291</b>	<b>0.9996</b>	<b>1.0598</b>	<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>0.9998</b>	<b>0.6776</b>	<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0.9993</b>	<b>1.0073</b>

Tabla 74. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAGIPCE 3 (10/10/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.1304	0.1153	PAL	3	0.1111	0.1060	PAL	5	0.1515	0.1242
EST	2	0.0869	0.1153	EST	2	0.074	0.0837	EST	3	0.0909	0.0947
LEST	1	0.0434	0.0921	LEST	2	0.074	0.0837	LEST	2	0.0606	0.0738
LeuA	3	0.1304	0.0591	LIP	1	0.037	0.0530	LIP	1	0.0303	0.0460
ValA	2	0.0869	0.1153	LeuA	5	0.1851	0.1356	LeuA	5	0.1515	0.1242
PAC	4	0.1739	0.0921	ValA	1	0.037	0.0530	ValA	1	0.0303	0.0460
NAFPH	3	0.1304	0.1321	PAC	5	0.1851	0.1356	CisA	1	0.0303	0.0460
βGal	1	0.0434	0.1153	NAFPH	4	0.1481	0.1228	TRIP	3	0.0909	0.0947
αGlc	1	0.0434	0.0591	βGal	1	0.037	0.0530	αQUIM	1	0.0303	0.0460
βGlc	1	0.0434	0.0591	αGlc	1	0.037	0.0530	PAC	5	0.1515	0.1242
GlcNAc	2	0.0869	0.0921	βGlc	1	0.037	0.0530	NAFPH	2	0.0606	0.0738
				GlcNAc	1	0.037	0.0530	βGal	1	0.0303	0.0460
								αGlc	2	0.0606	0.0738
								GlcNAc	1	0.0303	0.0460
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>0.9999</b>	<b>0.9907</b>	<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>0.9994</b>	<b>0.9853</b>	<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>0.9999</b>	<b>1.0593</b>
IHAGISTJ 1 (31/10/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.1875	0.1363	PAL	5	0.1666	0.1297	PAL	5	0.147	0.1224
EST	3	0.1875	0.1363	EST	3	0.1	0.1000	EST	4	0.1176	0.1093
LEST	1	0.0625	0.0752	LEST	2	0.0666	0.0784	LEST	4	0.1176	0.1093
LeuA	2	0.125	0.1128	LeuA	5	0.1666	0.1297	LIP	1	0.0294	0.0450
ValA	1	0.0625	0.0752	ValA	1	0.0333	0.0492	LeuA	5	0.147	0.1224
CisA	1	0.0625	0.0752	TRIP	1	0.0333	0.0492	ValA	3	0.0882	0.0930
αQUIM	3	0.1875	0.1363	PAC	5	0.1666	0.1297	PAC	5	0.147	0.1224
PAC	2	0.125	0.1128	NAFPH	5	0.1666	0.1297	NAFPH	3	0.0882	0.0930
				βGal	1	0.0333	0.0492	βGal	1	0.0294	0.0450
				αGlc	1	0.0333	0.0492	αGlc	1	0.0294	0.0450
				βGlc	1	0.0333	0.0492	βGlc	1	0.0294	0.0450
								GlcNAc	1	0.0294	0.0450
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>0.8601</b>	<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>0.9995</b>	<b>0.9430</b>	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>0.9996</b>	<b>0.9970</b>

Tabla 75. Datos requeridos para analizar la actividad enzimática

IHAGISTJ 2 (14/11/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.2307	0.1469	PAL	5	0.1562	0.1259	PAL	4	0.1111	0.1060
EST	3	0.2307	0.1469	EST	2	0.0625	0.0753	EST	3	0.0833	0.0899
LEST	1	0.0769	0.0856	LEST	2	0.0625	0.0753	LEST	3	0.0833	0.0899
LeuA	2	0.1538	0.1250	LIP	1	0.0312	0.0470	LIP	1	0.0277	0.0431
ValA	1	0.0769	0.0856	LeuA	5	0.1562	0.1259	LeuA	5	0.1388	0.1190
PAC	3	0.2307	0.1469	ValA	3	0.0937	0.0963	ValA	3	0.0833	0.0899
				TRIP	1	0.0312	0.0470	CisA	1	0.0277	0.0431
				PAC	5	0.1562	0.1259	TRIP	2	0.0555	0.0697
				NAFPH	3	0.0937	0.0963	αQUIM	1	0.0277	0.0431
				βGal	1	0.0312	0.0470	PAC	5	0.1388	0.1190
				αGlc	1	0.0312	0.0470	NAFPH	4	0.1111	0.1060
				βGlc	1	0.0312	0.0470	αGlc	2	0.0555	0.0697
				GlcNAc	2	0.0625	0.0753	βGlc	1	0.0277	0.0431
								GlcNAc	1	0.0277	0.0431
<b>Total: 6</b>	<b>13</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.7369</b>	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>0.9995</b>	<b>1.0312</b>	<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>0.9992</b>	<b>1.0749</b>
IHAGISTJ 3 (28/11/00)											
t= 0 días				t= 3 días				t= 14 días			
Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)	Enzima	Nivel	pi	-pi (log <sub>10</sub> pi)
PAL	3	0.1875	0.1363	PAL	4	0.1666	0.1297	PAL	5	0.1470	0.1224
EST	3	0.1875	0.1363	EST	3	0.1250	0.1129	EST	4	0.1176	0.1093
LEST	1	0.0625	0.0752	LEST	3	0.1250	0.1129	LEST	3	0.0882	0.0930
LeuA	2	0.125	0.1128	LeuA	5	0.2083	0.1419	LIP	1	0.0294	0.0450
ValA	1	0.0625	0.0752	ValA	1	0.0416	0.0574	LeuA	5	0.1470	0.1224
CisA	1	0.0625	0.0752	PAC	5	0.2083	0.1419	ValA	3	0.0882	0.0930
αQUIM	3	0.1875	0.1363	NAFPH	2	0.0833	0.0899	PAC	5	0.1470	0.1224
PAC	2	0.125	0.1128	αGlc	1	0.0416	0.0574	NAFPH	3	0.0822	0.0892
								βGal	1	0.0294	0.0450
								αGlc	1	0.0294	0.0450
								βGlc	1	0.0294	0.0450
								GlcNAc	2	0.0588	0.0724
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>0.8601</b>	<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.8441</b>	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>0.9936</b>	<b>1.0042</b>

ANEXO B. TABLAS DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

B.1. Análisis multivariado de parámetros

Tabla 76. Análisis de los factores entre PBAR para los valores promedio de los parámetros monitoreados ( $\alpha = 0.05$ )

Parámetro	Fuente de variación	g.l.	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F	Parámetro	Fuente de variación	g.l.	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F
COD	Modelo	5	0.1087	19.6865	0.0000	STT	Modelo	5	0.3031	25.5353	0.0000
	Constante	1	0.0054	2199.7457	0.0000		Constante	1	0.0059	5018.4884	0.0000
	IHA	1	0.1268	82.6455	0.0000		IHA	1	0.2300	100.3810	0.0000
	Fuente de inóculo	2	0.8263	1.2613	0.1792		Fuente de inóculo	2	0.6771	7.1527	0.0029
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.4749	6.6321	0.1100		IHA * Fuente de inóculo	2	0.9094	1.4950	0.2405
	Error	1					Error	19			
pH	Modelo	5	0.1268	15.5269	0.0001	STV	Modelo	5	0.1684	26.6289	0.0000
	Constante	1	0.0000	314232.25	0.0000		Constante	1	0.0277	1051.1423	0.0000
	IHA	1	0.7847	3.2910	0.0947		IHA	1	0.1918	126.4080	0.0000
	Fuente de inóculo	2	0.1982	24.2687	0.0001		Fuente de inóculo	2	0.6536	7.9463	0.0017
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.2803	15.4030	0.0005		IHA * Fuente de inóculo	2	0.8369	2.9219	0.0693
	Error	1					Error	19			

Tabla 77. Análisis de los factores entre PBAR para los valores promedio de los parámetros monitoreados ( $\alpha = 0.05$ )

Parámetro	Fuente de variación	g.l.	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F	Parámetro	Fuente de variación	g.l.	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F
STF	Modelo	5	0.9155	0.5536	0.7344	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Modelo	5	0.4606	7.0275	0.0002
	Constante	1	0.0015	18781.015	0.0000		Constante	1	0.0556	509.3973	0.0000
	IHA	1	0.9502	1.5705	0.2198		IHA	1	0.5296	26.6503	0.0000
	Fuente de inóculo	2	0.9910	0.1357	0.8736		Fuente de inóculo	2	0.8893	1.8661	0.1792
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.9700	0.4630	0.6338		IHA * Fuente de inóculo	2	0.8632	2.3775	0.1100
	Error	19					Error	19			
N-NH <sub>3</sub>	Modelo	5	0.0172	330.7134	0.0000	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Modelo	5	0.2409	18.8983	0.0000
	Constante	1	0.0128	228.1714	0.0000		Constante	1	0.0004	65137.113	0.0000
	IHA	1	0.0174	1639.3494	0.0000		IHA	1	0.6601	15.4416	0.0005
	Fuente de inóculo	2	0.8620	2.3208	0.1162		Fuente de inóculo	2	0.2779	38.9716	0.0000
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.9443	0.8547	0.4358		IHA * Fuente de inóculo	2	0.9644	0.5333	0.5808
	Error	18					Error	19			
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Modelo	5	0.0572	98.8328	0.0000	BHT	Modelo	5	0.6146	3.7629	0.0092
	Constante	1	0.0341	848.7044	0.0000		Constante	1	0.8069	7.1788	0.0119
	IHA	1	0.1118	238.2586	0.0000		IHA	1	0.8428	5.5921	0.0247
	Fuente de inóculo	2	0.1179	112.2652	0.0000		Fuente de inóculo	2	0.8265	3.1475	0.0574
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.4888	15.6875	0.0000		IHA * Fuente de inóculo	2	0.8124	3.4636	0.0443
	Error	19					Error	19			

Tabla 78. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los valores promedio de los parámetros monitoreados (interacción IHA-fuente de inóculo)

Muestras	pH					N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>					BHT				
	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
00-01	0.9834	1	12	0.6615	0.2015	0.1315	1	30	198.0899	0.0000	0.8069	1	30	7.1753	0.0119
00-02	0.8687	1	12	1.8134	0.2030	0.3197	1	30	63.8378	0.0000	0.9797	1	30	0.6186	0.4378
00-10	0.6496	1	12	6.4701	0.0258	0.1742	1	30	142.1657	0.0000	0.9859	1	30	0.4284	0.5177
00-01	0.2707	1	12	32.3284	0.0001	0.0805	1	30	342.2350	0.0000	0.9791	1	30	0.6373	0.4310
00-12	0.9370	1	12	0.8060	0.3870	0.0815	1	30	337.7021	0.0000	0.9815	1	30	0.5637	0.4586
01-02	0.7882	1	12	3.2239	0.0978	0.4476	1	30	37.0222	0.0000	0.7141	1	30	12.0074	0.0016
01-10	0.5726	1	12	8.9552	0.0112	0.8663	1	30	4.6273	0.0396	0.7297	1	30	11.1104	0.0023
01-11	0.3043	1	12	27.4254	0.0002	0.6050	1	30	19.5820	0.0001	0.7127	1	30	12.0896	0.0016
01-12	0.8687	1	12	1.8134	0.2030	0.6184	1	30	18.5092	0.0002	0.7183	1	30	11.7613	0.0018
02-10	0.8933	1	12	1.4328	0.2544	0.6597	1	30	15.4722	0.0005	0.9994	1	30	0.0174	0.8959
02-11	0.1952	1	12	49.4552	0.0000	0.2135	1	30	110.4545	0.0000	0.9999	1	30	0.0001	0.9906
02-12	0.9834	1	12	0.2015	0.6615	0.2175	1	30	107.8859	0.0000	0.9999	1	30	0.0013	0.9718
10-11	0.1505	1	12	67.7239	0.0000	0.4095	1	30	43.2473	0.0000	0.9993	1	30	0.0207	0.8866
10-12	0.8158	1	12	2.7090	0.1257	0.4187	1	30	41.6757	0.0000	0.9996	1	30	0.0093	0.9240
11-12	0.2168	1	12	43.3433	0.0000	0.9994	1	30	0.0151	0.9030	0.9999	1	30	0.0023	0.9624

$\alpha = 0.0033$

00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ

Tabla 79. Efecto dentro de las PBAR para los valores promedio de los parámetros monitoreados ( $\alpha = 0.05$ )

COD						STV					
Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
Tiempo	0.0017	4	9	1285.3443	0.0000	Tiempo	0.1103	4	27	54.4300	0.0000
Tiempo * IHA	0.0081	4	9	276.4008	0.0000	Tiempo * IHA	0.1640	4	27	3404170	0.0000
Tiempo * Fuente de inóculo	0.3009	8	18	1.8514	0.1324	Tiempo * Fuente de inóculo	0.1581	8	54	10.2261	0.0000
Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.4327	8	18	1.1705	0.3681	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.4466	8	54	3.3501	0.0035
pH						STF					
Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
Tiempo	0.0324	4	9	67.0098	0.0000	Tiempo	0.7550	4	27	2.1903	0.0970
Tiempo * IHA	0.0249	4	9	87.7640	0.0000	Tiempo * IHA	0.8460	4	27	1.2285	0.3221
Tiempo * Fuente de inóculo	0.0867	8	18	5.3877	0.0015	Tiempo * Fuente de inóculo	0.4161	8	54	3.7135	0.0016
Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.0502	8	18	7.7909	0.0002	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.6122	8	54	1.8766	0.0829
STT						N-NH <sub>3</sub>					
Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
Tiempo	0.1303	4	27	45.0414	0.0000	Tiempo	0.0118	4	26	543.7862	0.0000
Tiempo * IHA	0.1772	4	27	31.3274	0.0000	Tiempo * IHA	0.0084	4	26	759.0484	0.0000
Tiempo * Fuente de inóculo	0.2370	8	54	7.1156	0.0000	Tiempo * Fuente de inóculo	0.4890	8	52	2.7944	0.0119
Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.4246	8	54	3.6093	0.0020	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.4951	8	52	2.7369	0.0134

Tabla 80. Efecto dentro de las PBAR para los valores promedio de los parámetros monitoreados ( $\alpha = 0.05$ )

N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>						P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>					
Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
Tiempo	0.0314	4	27	207.8503	0.0000	Tiempo	0.0033	4	27	23.4820	0.0000
Tiempo * IHA	0.0209	4	27	316.6058	0.0000	Tiempo * IHA	0.4942	4	27	6.9074	0.0006
Tiempo * Fuente de inóculo	0.0604	8	54	31.9075	0.0000	Tiempo * Fuente de inóculo	0.5802	8	54	2.1112	0.0504
Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.0414	8	54	26.4141	0.0000	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.3967	8	54	3.9669	0.0009
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>						BHT					
Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
Tiempo	0.3109	4	27	14.9616	0.0000	Tiempo	0.1117	4	27	53.6502	0.0000
Tiempo * IHA	0.2695	4	27	18.2970	0.0000	Tiempo * IHA	0.1543	4	27	36.9844	0.0000
Tiempo * Fuente de inóculo	0.7281	8	54	1.1605	0.3398	Tiempo * Fuente de inóculo	0.1037	8	54	14.2117	0.0000
Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.5162	8	54	2.6447	0.0160	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.0946	8	54	15.1894	0.0000

Tabla 81. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los valores promedio de los parámetros monitoreados (interacción tiempo-fuente)

COD							STV						
IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
IHAK	0-1	0.2049	4	3	2.9087	0.2035	IHAK	0-1	0.3033	4	12	6.8897	0.0040
	0-2	0.4580	4	3	0.8874	0.5620		0-2	0.2012	4	12	11.9089	0.0004
	1-2	0.2646	4	3	2.0841	0.2363		1-2	0.3576	4	12	5.3872	0.0102
IHAG	0-1	0.6034	4	3	1.9716	0.1632	IHAG	0-1	0.1637	4	12	15.3203	0.0001
	0-2	0.6244	4	3	1.8043	0.1929		0-2	0.2619	4	12	8.4507	0.0018
	1-2	0.5876	4	3	2.1048	0.1431		1-2	0.5884	4	12	2.0983	0.1440
pH							STF						
IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
IHAK	0-1	0.2905	4	3	1.8317	0.3232	IHAK	0-1	0.6440	4	12	1.7965	0.1897
	0-2	0.0243	4	3	30.0000	0.0094		0-2	0.3523	4	12	5.9743	0.0059
	1-2	0.0318	4	3	22.8317	0.0139		1-2	0.3086	4	12	7.2784	0.0026
IHAG	0-1	0.0224	4	3	32.6870	0.0083	IHAG	0-1	0.8045	4	12	0.7287	0.5894
	0-2	0.0559	4	3	11.7628	0.0354		0-2	0.8870	4	12	0.3814	0.8177
	1-2	0.1182	4	3	5.5936	0.0944		1-2	0.7478	4	12	1.0117	0.4395
STT							N-NH <sub>3</sub>						
IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
IHAK	0-1	0.4010	4	12	4.4800	0.0191	IHAK	0-1	0.1728	4	12	14.3559	0.0002
	0-2	0.3676	4	12	5.1606	0.0118		0-2	0.4607	4	12	3.5110	0.0405
	1-2	0.5888	4	12	2.0951	0.1445		1-2	0.4078	4	12	4.3563	0.0209
IHAG	0-1	0.1623	4	12	15.4757	0.0001	IHAG	0-1	0.3087	4	12	6.7152	0.0045
	0-2	0.2806	4	12	7.6896	0.0026		0-2	0.4509	4	12	3.6521	0.0361
	1-2	0.6212	4	12	1.8273	0.1881		1-2	0.4808	4	12	3.2389	0.0509

$\alpha = 0.0166$ ; 0= IPCU, 1=IPCE y 2= ISTJ

Tabla 82. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los valores promedio de los parámetros monitoreados (interacción tiempo-fuente)

N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>							P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>						
IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
IHAK	0-1	0.0259	4	12	112.8146	0.0000	IHAK	0-1	0.3493	4	12	5.5871	0.0089
	0-2	0.2327	4	12	9.8913	0.0009		0-2	0.5961	4	12	2.0323	0.1537
	1-2	0.0380	4	12	75.7605	0.0000		1-2	0.5783	4	12	2.1875	0.1321
IHAG	0-1	0.3384	4	12	5.8644	0.0075	IHAG	0-1	0.3261	4	12	6.1982	0.0061
	0-2	0.3615	4	12	5.2986	0.0108		0-2	0.4983	4	12	3.0197	0.0614
	1-2	0.9022	4	12	0.3250	0.8559		1-2	0.7115	4	12	1.2162	0.3544
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>							BHT						
IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	IHA	Fuente	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
IHAK	0-1	0.4789	4	12	3.2641	0.0498	IHAK	0-1	0.1376	4	12	18.7986	0.0000
	0-2	0.7503	4	12	0.9984	0.4457		0-2	0.6291	4	12	1.7681	0.2001
	1-2	0.5242	4	12	2.7220	0.0801		1-2	0.0957	4	12	28.3447	0.0000
IHAG	0-1	0.4487	4	12	3.6851	0.0352	IHAG	0-1	0.1168	4	12	22.6666	0.0000
	0-2	0.6309	4	12	1.7545	0.2028		0-2	0.5059	4	12	2.9291	0.0665
	1-2	0.6113	4	12	1.9074	0.1739		1-2	0.2215	4	12	10.5399	0.0007

$\alpha = 0.0166$ ; 0= IPCU, 1=IPCE y 2= ISTJ

Tabla 83. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los valores promedio entre tiempos

Tiempo	Muestras	pH					STT						
		Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
0-1	00-01	0.5614	1	6	4.7865	0.0736	0-1	00-01	0.5522	1	15	12.1597	0.0033
	00-02	0.8888	1	6	0.7500	0.4198		00-02	0.9900	1	15	0.1501	0.7039
	01-02	0.7804	1	6	1.6875	0.2416		01-02	0.9900	1	15	0.1501	0.7039
1-2	00-01	1.0000	1	6	0	1.0000	1-2	00-01	0.9754	1	15	0.3779	0.5480
	00-02	0.9565	1	6	0.2727	0.6202		00-02	0.9998	1	15	0.0017	0.9679
	01-02	0.9565	1	6	0.2727	0.6202		01-02	0.9785	1	15	0.3292	0.5747
2-3	00-01	1.0000	1	6	0	1.0000	2-3	00-01	0.8451	1	15	2.7491	0.1181
	00-02	0.5000	1	6	6.0000	0.0498		00-02	0.9946	1	15	0.0808	0.7801
	01-02	0.5000	1	6	6.0000	0.0498		01-02	0.7990	1	15	3.7724	0.0711
3-4	00-01	0.6666	1	6	3.0000	0.1340	3-4	00-01	0.9964	1	15	0.0527	0.8215
	00-02	0.6666	1	6	3.0000	0.1340		00-02	0.8576	1	15	2.4904	0.1354
	01-02	1.0000	1	6	0	1.0000		01-02	0.8211	1	15	3.2676	0.0908
0-1	10-11	0.3305	1	6	12.1500	0.0131	0-1	10-11	0.3229	1	15	31.4521	0.0000
	10-12	0.6153	1	6	3.7500	0.1009		10-12	0.5855	1	15	10.6153	0.0530
	11-12	0.7142	1	6	2.4000	0.1723		11-12	0.7308	1	15	5.5230	0.0329
1-2	10-11	0.0902	1	6	60.5000	0.0002	1-2	10-11	0.3206	1	15	31.7815	0.0000
	10-12	0.2500	1	6	18.0000	0.0054		10-12	0.6170	1	15	9.3079	0.0081
	11-12	0.3243	1	6	12.5000	0.0123		11-12	0.6915	1	15	6.6906	0.0206
2-3	10-11	0.4666	1	6	6.5871	0.0397	2-3	10-11	0.7117	1	15	6.0743	0.0263
	10-12	0.9824	1	6	0.1071	0.7545		10-12	0.9740	1	15	0.3994	0.5369
	11-12	0.5333	1	6	5.2500	0.0618		11-12	0.8170	1	15	3.3586	0.0868
3-4	10-11	0.3980	1	6	9.0750	0.0236	3-4	10-11	0.9989	1	15	0.0152	0.9035
	10-12	0.8988	1	6	0.6750	0.4427		10-12	0.9527	1	15	0.7443	0.4019
	11-12	0.5555	1	6	4.8000	0.0710		11-12	0.9391	1	15	0.9722	0.3398

$\alpha = 0.0041$ . 00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ

Tabla 84. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para las concentraciones promedio entre tiempos

STV							N-NH <sub>3</sub>						
Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
0-1	00-01	0.4165	1	15	21.0074	0.0004	0-1	00-01	0.2448	1	15	46.2677	0.0000
	00-02	0.4243	1	15	20.3458	0.0004		00-02	0.6336	1	15	8.6733	0.0100
	01-02	0.9996	1	15	0.0053	0.9430		01-02	0.5020	1	15	14.8764	0.0016
1-2	00-01	0.8378	1	15	2.9029	0.1090	1-2	00-01	0.3935	1	15	23.1100	0.0002
	00-02	0.9931	1	15	1.9084	0.1874		00-02	0.6925	1	15	6.6000	0.0209
	01-02	0.6398	1	15	0.1039	0.7516		01-02	0.7515	1	15	4.9577	0.0417
2-3	00-01	0.9671	1	15	8.4433	0.0109	2-3	00-01	0.9966	1	15	0.0501	0.8258
	00-02	0.7573	1	15	0.5094	0.4864		00-02	0.9962	1	15	0.0559	0.8162
	01-02	0.9387	1	15	4.8051	0.0446		01-02	0.9860	1	15	0.2120	0.6518
3-4	00-01	0.8381	1	15	2.8975	0.1093	3-4	00-01	0.9924	1	15	0.1136	0.7407
	00-02	0.9387	1	15	0.9794	0.3380		00-02	0.9296	1	15	1.1355	0.3035
	01-02	0.6742	1	15	7.2461	0.0167		01-02	0.8840	1	15	1.9676	0.1811
0-1	10-11	0.3367	1	15	29.5392	0.0001	0-1	10-11	0.9599	1	15	0.6252	0.4414
	10-12	0.5691	1	15	11.3549	0.0042		10-12	0.8437	1	15	2.7769	0.1164
	11-12	0.7785	1	15	4.2655	0.0506		11-12	0.9513	1	15	0.7669	0.3950
1-2	10-11	0.2724	1	15	40.0608	0.0000	1-2	10-11	0.8804	1	15	2.0371	0.1740
	10-12	0.5690	1	15	11.3581	0.0042		10-12	0.9165	1	15	1.3665	0.2607
	11-12	0.6313	1	15	8.7568	0.0097		11-12	0.9955	1	15	0.0667	0.7997
2-3	10-11	0.7579	1	15	5.6056	0.0318	2-3	10-11	0.6695	1	15	7.4039	0.0158
	10-12	1	1	15	0	1		10-12	0.8737	1	15	2.1676	0.1616
	11-12	0.7279	1	15	5.6056	0.0318		11-12	0.9058	1	15	1.5573	0.2309
3-4	10-11	0.9632	1	15	0.9632	0.4608	3-4	10-11	0.9330	1	15	1.0771	0.3158
	10-12	0.9393	1	15	0.9393	0.3407		10-12	0.9330	1	15	1.0771	0.3158
	11-12	0.8319	1	15	0.8319	0.1022		11-12	0.9120	1	15	1.4473	0.2476

$\alpha = 0.0041$ . 00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ

Tabla 85. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para las concentraciones promedio entre tiempos

N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>							N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>						
Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
0-1	00-01	0.8620	1	15	2.4000	0.1422	0-1	00-01	0.6652	1	15	7.5490	0.0150
	00-02	0.8000	1	15	3.7500	0.0719		00-02	0.9189	1	15	1.3228	0.2681
	01-02	0.9900	1	15	0.1500	0.7040		01-02	0.8546	1	15	2.5517	0.1310
1-2	00-01	0.9972	1	15	0.0414	0.8414	1-2	00-01	0.9537	1	15	0.7280	0.4069
	00-02	0.7494	1	15	5.0138	0.0407		00-02	0.9602	1	15	0.6203	0.4432
	01-02	0.7835	1	15	4.1436	0.0599		01-02	0.9997	1	15	0.0043	0.9485
2-3	00-01	0.8554	1	15	2.5345	0.1322	2-3	00-01	0.9829	1	15	0.2609	0.6170
	00-02	0.4723	1	15	16.7586	0.0010		00-02	0.9989	1	15	0.0163	0.9001
	01-02	0.7055	1	15	6.2586	0.0244		01-02	0.9735	1	15	0.4076	0.5328
3-4	00-01	0.0279	1	15	521.6049	0.0000	3-4	00-01	0.9804	1	15	0.2990	0.5926
	00-02	0.4576	1	15	17.7778	0.0007		00-02	0.8037	1	15	3.6628	0.0749
	01-02	0.0414	1	15	346.7901	0.0000		01-02	0.8892	1	15	1.8688	0.1918
0-1	10-11	0.9985	1	15	0.0212	0.8861	0-1	10-11	0.5698	1	15	11.3241	0.0043
	10-12	0.8970	1	15	1.7210	0.2093		10-12	0.9322	1	15	1.0907	0.3129
	11-12	0.9168	1	15	1.3598	0.2618		11-12	0.7357	1	15	5.3860	0.0348
1-2	10-11	0.9677	1	15	0.5000	0.4903	1-2	10-11	0.5762	1	15	11.031	0.0047
	10-12	0.8275	1	15	3.1250	0.0974		10-12	0.8560	1	15	2.5232	0.1330
	11-12	0.9302	1	15	1.1250	0.3056		11-12	0.8330	1	15	3.0028	0.1036
2-3	10-11	0.8512	1	15	2.6073	0.1272	2-3	10-11	0.9840	1	15	0.2435	0.6288
	10-12	0.7383	1	15	5.4399	0.0340		10-12	0.9879	1	15	0.1829	0.6749
	11-12	0.9668	1	15	0.5150	0.4840		11-12	0.9997	1	15	0.0043	0.0503
3-4	10-11	0.7768	1	15	4.3085	0.0555	3-4	10-11	0.6741	1	15	7.2494	0.0167
	10-12	0.6252	1	15	8.9894	0.0090		10-12	0.8517	1	15	2.6098	0.1270
	11-12	0.9463	1	15	0.8511	0.3709		11-12	0.9282	1	15	1.1599	0.2985

$\alpha = 0.0041$ . 00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ

Tabla 86. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para las concentraciones promedio entre tiempos

P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>							BHT						
Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F	Tiempo	Muestras	Lambda de Wilks	g.l. num	g.l. dem	F exacta	Prob > F
0-1	00-01	0.9217	1	15	1.2733	0.2769	0-1	00-01	0.8792	1	15	2.0595	0.1718
	00-02	0.9844	1	15	0.2366	0.6337		00-02	0.8898	1	15	1.8560	0.1932
	01-02	0.9732	1	15	0.4122	0.5306		01-02	0.9996	1	15	0.0053	0.9430
1-2	00-01	0.9999	1	15	0.0014	0.9703	1-2	00-01	0.8472	1	15	2.7053	0.1208
	00-02	0.8815	1	15	2.0156	0.1761		00-02	0.9848	1	15	0.2307	0.6379
	01-02	0.8759	1	15	2.1245	0.1656		01-02	0.7686	1	15	4.5160	0.0506
2-3	00-01	0.7507	1	15	4.9811	0.0413	2-3	00-01	0.4557	1	15	17.9096	<b>0.0007</b>
	00-02	0.9593	1	15	0.6364	0.4375		00-02	0.9193	1	15	1.3194	0.2692
	01-02	0.8794	1	15	2.0566	0.1721		01-02	0.3413	1	15	28.9373	<b>0.0001</b>
3-4	00-01	0.4065	1	15	21.8994	<b>0.0003</b>	3-4	00-01	0.9279	1	15	1.1645	0.2976
	00-02	0.6282	1	15	8.8760	0.0094		00-02	0.9878	1	15	0.1844	0.6738
	01-02	0.8383	1	15	2.8914	0.1097		01-02	0.8682	1	15	2.2755	0.1522
0-1	10-11	0.5685	1	15	11.3807	0.0042	0-1	10-11	0.6199	1	15	9.1949	0.0084
	10-12	0.8712	1	15	2.2165	0.1573		10-12	0.8422	1	15	2.8091	0.1144
	11-12	0.8085	1	15	3.5522	0.0790		11-12	0.8907	1	15	1.8395	0.1951
1-2	10-11	0.4054	1	15	21.9972	<b>0.0003</b>	1-2	10-11	0.9165	1	15	1.3651	0.2609
	10-12	0.7441	1	15	5.1560	0.0383		10-12	0.9340	1	15	1.0591	0.3197
	11-12	0.7192	1	15	5.8537	0.0287		11-12	0.9987	1	15	0.0194	0.8911
2-3	10-11	0.5392	1	15	12.8182	<b>0.0027</b>	2-3	10-11	0.4298	1	15	19.8969	<b>0.0005</b>
	10-12	0.7281	1	15	5.6008	0.0318		10-12	0.7105	1	15	6.1096	0.0259
	11-12	0.9105	1	15	1.4729	0.2436		11-12	0.7913	1	15	3.9555	0.0653
3-4	10-11	0.6073	1	15	9.6957	0.0071	3-4	10-11	0.1371	1	15	94.3775	<b>0.0000</b>
	10-12	0.6889	1	15	6.7729	0.0200		10-12	0.6698	1	15	7.3925	0.0158
	11-12	0.9828	1	15	0.2614	0.6166		11-12	0.2345	1	15	48.9427	<b>0.0000</b>

$\alpha = 0.0041$ . 00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ

Anexo B.2. Análisis para los comportamientos cinéticos de degradación

Tabla 87. ANDEVA y análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los datos cinéticos

Parámetro	ANDEVA ( $\alpha = 0,05$ )					Contrastes del factor fuente de inóculo ( $\alpha = 0,0166$ )				
	Origen de las variaciones	gl	SC	F	p	Fuente de inóculo	gl	SC	F	p
$\mu_{m\acute{a}x}$	Fuente de inóculo	2	0.0029	4.9159	0.0112	0-1	1	0.0006	2.1611	0.1478
	IHA	1	0.0641	215.9684	0.0000	0-2	1	0.0029	9.8192	0.0028
	Error	50	0.0148			1-2	1	0.0008	2.7672	0.1024
	Total	53	0.0819							
t 70%	Fuente de inóculo	2	1555.029	3.7089	0.0315	0-1	1	46.0136	0.2194	0.6441
	IHA	1	12451.852	59.3986	0.0000	0-2	1	1371.4677	6.5422	0.0136
	Error	50	10481.6			1-2	1	915.0625	4.365	0.0417
	Total	53	24488.481							
t 50%	Fuente de inóculo	2	6880.88	0.6763	0.5131	0-1	1	6880.88	0.6343	0.5811
	IHA	1	17615.002	3.4628	0.0680	0-2	1	17100.2	4.3628	0.6480
	Error	50	25.4343.18	1.6052		1-2	1	434.38	1.6052	
	Total	53	278839.06							

0= IPCU; 1= IPCE y 2= ISTJ

Tabla 88. ANDEVA y análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para el factor fuente de inóculo

Parámetro	IHA	ANDEVA ( $\alpha=0.05$ )					Contrastes del factor fuente de inóculo ( $\alpha=0.0166$ )				
		Origen de las variaciones	SC	gl	F	p	Fuente de inóculo	SC	gl	F	p
$\mu_{\text{máx}}$	IHAK	Fuente de inóculo	0.0008	2	1.2089	0.3161	0-1	0.0002	1	0.7960	0.3811
		Error	0.0086	24			0-2	0.0008	1	2.3994	0.1344
		Total	0.0095	26			1-2	0.0001	1	0.4313	0.5175
	IHAG	Fuente de inóculo	0.0022	2	4.4695	<b>0.0224</b>	0-1	0.0003	1	1.4263	0.2440
		Error	0.0059	24			0-2	0.0022	1	8.8260	<b>0.0066</b>
		Total	0.0081	26			1-2	0.0007	1	3.1561	0.0883
t 70 %	IHAK	Fuente de inóculo	16.3488	2	1.5503	0.2307	0-1	16.3488	2	1.5503	0.2307
		Error	126.551	24			0-2	126.551	24	3.9948	0.1445
		Total	149.9	26			1-2	149.9	26	0.3163	0.5175
	IHAG	Fuente de inóculo	2682.57	2	3.4948	<b>0.0466</b>	0-1	6728	1	0.1735	0.6791
		Error	9211.16	24			0-2	2341.56	1	6.1010	0.0210
		Total	11893.73	26			1-2	1615.01	1	4.2079	0.0513

0= IPCU; 1= IPCE y 2= ISTJ

Tabla 89. ANDEVA ( $\alpha = 0.05$ ) para los datos cinéticos de las tres corridas con cada fuente de inóculo

Prueba	$\mu_{\text{máx}}$					t 70%					t 50%				
	Fuente de variación	gl	SC	F	p	Fuente de variación	gl	SC	F	p	Fuente de variación	gl	SC	F	p
IHAGIPCU	Corridas	2	0.0032	45.5488	0.0002	Corridas	2	2787.04	19.5527	0.0024	Corridas	2	2787.04	27.5519	0.0456
	Error	6	0.0002			Error	6	427.82			Error	6	427.82		
	Total	8	0.0034			Total	8	3214.66			Total	8	3214.66		
IHAGIPCE	Corridas	2	0.0017	22.8782	0.0016	Corridas	2	1354.28	16.4147	0.0037	Corridas	2	449.135	16.4733	0.0037
	Error	6	0.0002			Error	6	247.51			Error	6	81.7933		
	Total	8	0.0020			Total	8	1601.79			Total	8	530.928		
IHAGISTJ	Corridas	2	0.0001	11.895	0.3679	Corridas	2	1508.30	1.5677	0.2833	Corridas	2	1508.30	1.5677	0.2833
	Error	6	0.0004			Error	6	2886.38			Error	6	2886.38		
	Total	8	0.0005			Total	8	4394.69			Total	8	4394.69		
IHAKIPCU	Corridas	2	0.0025	11.6145	0.0086	Corridas	2	23.3155	15.3616	0.0044	Corridas	2	23.3155	15.3616	0.2952
	Error	6	0.0006			Error	6	4.5533			Error	6	4.5533		
	Total	8	0.0031			Total	8	27.8688			Total	8	27.8688		
IHAKIPCE	Corridas	2	0.0003	1.5055	0.2952	Corridas	2	1508.30	1.5677	0.2833	Corridas	2	1508.30	1.5677	0.2833
	Error	6	0.0006			Error	6	2886.38			Error	6	2886.38		
	Total	8	0.0009			Total	8	4394.69			Total	8	4394.69		
IHAKISTJ	Corridas	2	0.0009	0.8473	0.4741	Corridas	2	16.666	0.7349	0.5189	Corridas	2	16.666	0.7349	0.5189
	Error	6	0.0035			Error	6	68.0333			Error	6	68.0333		
	Total	8	0.0045			Total	8	87.7			Total	8	87.7		

Tabla 90. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para los datos cinéticos de las tres corridas con cada fuente de inóculo empleando IHAK e IHAG

Parámetro	IHAKIPCU					IHAGIPCU					IHAGIPCE				
	Corridas	gl	SC	F	p	Corridas	gl	SC	F	p	Corridas	gl	SC	F	p
$\mu_{\text{máx}}$	0-1	1	0.0005	5.1595	0.0635	0-1	1	0.0004	12.6262	<b>0.0120</b>	0-1	1	0.0009	23.2691	<b>0.0029</b>
	0-2	1	0.0025	23.2039	<b>0.0029</b>	0-2	1	0.0031	94.7929	<b>0.0000</b>	0-2	1	0.0016	42.4929	<b>0.0006</b>
	1-2	1	0.0007	6.4800	0.0437	1-2	1	0.0012	38.2272	<b>0.0008</b>	1-2	1	0.0001	2.8725	0.1410
t 70 %	0-1	1	7.26	9.5666	<b>0.0021</b>	0-1	1	58.9066	0.8265	0.3983	0-1	1	498.6816	12.0886	<b>0.0131</b>
	0-2	1	23.2066	30.5797	<b>0.0014</b>	0-2	1	2408.00	33.7871	<b>0.0011</b>	0-2	1	1332.06	32.2906	<b>0.0012</b>
	1-2	1	4.5066	5.9385	0.0506	1-2	1	1713.66	24.0446	<b>0.0027</b>	1-2	1	200.6816	4.8647	0.0695
t 50 %	0-1	1	268.189	48.647	0.0864	0-1	1	2006.81	48.647	0.0695	0-1	1	164.3266	12.0542	<b>0.0132</b>
	0-2	1	7534.9	64.800	0.0939	0-2	1	7534.9	64.800	0.0437	0-2	1	442.0416	32.4262	<b>0.0012</b>
	1-2	1	2834.3	51.595	0.0745	1-2	1	5234.3	51.595	0.0635	1-2	1	67.335	4.9394	0.0679

$\alpha = 0.0166$  0= Primer corrida; 1= Segunda corrida y 2= Tercer corrida

Tabla 91. ANDEVA ( $\alpha = 0.05$ ) para los datos cinéticos comparando IHAK con IHAG con cada fuente de inóculo

Parámetro	Origen de las variaciones	IPCU				IPCE				ISTJ			
		gl	SC	F	p	gl	SC	F	p	gl	SC	F	p
$\mu_{\text{máx}}$	IHAK-IHAG	1	0.0195	47.5153	<b>0.0000</b>	1	0.02006	106.0251	<b>0.0000</b>	1	0.0247	78.1776	<b>0.0000</b>
	Error	16	0.0065			16	0.0030			16	0.0050		
	Total	17	0.0261			17	0.0230			17	0.0297		
t 70 %	IHAK-IHAG	1	2242.2672	11.0643	<b>0.0043</b>	1	2933.78	29.0513	<b>0.0001</b>	1	2787.5556	30.0694	<b>0.0001</b>
	Error	16	3242.5378			16	1615.7778			16	1483.2644		
	Total	17	5484.8050			17	4549.5578			17	4280.82		
t 50 %	IHAK-IHAG	1	212779.845	1.3903	0.2526	1	973.8755	29.1041	<b>0.0001</b>	1	8419.6939	30.0744	<b>0.0000</b>
	Error	16	244898.25			16	535.3889			16	4479.396		
	Total	17	266178.1			17	1509.2614			17	12899.08		

B.3. Análisis de los perfiles de actividad enzimática de las fuentes de inóculo

Tabla 92. ANDEVA y análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para la actividad enzimática del inóculo a t= 0 días

Parámetro	ANDEVA ( $\alpha=0.05$ )				Contrastes del factor fuente de inóculo ( $\alpha=0.0166$ )					
	Origen de las variaciones	gl	SC	F	p	Fuente de inóculo	gl	SC	F	p
H	Fuente de inóculo	2	3.3739	46.4116	0.0000	0-1	1	0.2759	7.5917	0.0174
	IHA	1	0.1030	2.8553	0.1180	0-2	1	2.9696	81.7009	0.0000
	Error	12	0.4361	0.0363		1-2	1	1.7939	49.3535	0.0000
	Total	15	3.9131							
H <sub>máx</sub>	Fuente de inóculo	2	3.9582	0.3262	0.5785	0-1	1	0.0688	2.2845	0.1565
	IHA	1	0.0098	65.7001	0.0000	0-2	1	3.0103	99.944	0.0000
	Error	12				1-2	1	2.7113	90.0097	0.0000
	Total	15								
E	Fuente de inóculo	2	0.0063	3.5188	0.0627	0-1	1	0.0055	6.1427	0.0290
	IHA	1	0.0040	4.4574	0.0564	0-2	1	0.0004	0.5332	0.4792
	Error	12	0.0107			1-2	1	0.0034	3.8201	0.0743
	Total	15	0.0211							

0= IPCU; 1= IPCE y 2= ISTJ

Tabla 93. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para la actividad enzimática del inóculo a t= 0 días ( $\alpha= 0.0166$ )

Parámetro	IHAK					IHAG				
	Fuente de inóculo	SC	gl	F	p	Fuente de inóculo	SC	gl	F	p
H	0-1	0.2862	1	8.4967	0.0332	0-1	0.0432	1	1.0527	0.3519
	0-2	1.8775	1	55.7392	<b>0.0006</b>	0-2	1.1381	1	27.7190	<b>0.0032</b>
	1-2	0.8720	1	25.8889	<b>0.0038</b>	1-2	0.9222	1	22.4595	<b>0.0051</b>
Hmáx	0-1	0.0785	1	6.3293	0.0534	0-1	0.0082	1	0.1826	0.6869
	0-2	2.0104	1	161.9751	<b>0.0000</b>	0-2	1.0731	1	23.8222	<b>0.0045</b>
	1-2	1.6177	1	130.3336	<b>0.0000</b>	1-2	1.1168	1	24.7916	<b>0.0041</b>
E	0-1	0.0053	1	3.4230	0.1235	0-1	0.0010	1	4.9773	0.0760
	0-2	0.0000	1	0.0543	0.8249	0-2	0.0004	1	2.3133	0.1887
	1-2	0.0051	1	3.2687	0.1304	1-2	0.0001	1	0.6301	0.4632

Tabla 94. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni ( $\alpha= 0.0166$ ), para la actividad enzimática del inóculo durante la biodegradación de los IHA (interacción tiempo-fuente de inóculo)

Parámetro	IHAK						IHAG					
	Fuente de inóculo	Lambda de Wilks	g.l num	g.l dem	F exacta	Prob > F	Fuente de inóculo	Lambda de Wilks	g.l num	g.l dem	F exacta	Prob > F
H	0-1	0.6811	2	4	0.9362	0.4640	0-1	0.9640	2	4	0.0747	0.9293
	0-2	0.1137	2	4	15.5891	<b>0.0129</b>	0-2	0.3483	2	4	3.7421	0.1213
	1-2	0.1487	2	4	11.4476	0.0221	1-2	0.3658	2	4	3.4668	0.1338
Hmáx	0-1	0.5203	2	4	1.8437	0.2707	0-1	0.9398	2	4	0.1279	0.8834
	0-2	0.0390	2	4	49.2302	<b>0.0015</b>	0-2	0.3423	2	4	3.8424	0.1172
	1-2	0.0455	2	4	41.9249	<b>0.0021</b>	1-2	0.3401	2	4	3.8793	0.1157

0= IPCU, 1=IPCE y 2= ISTJ

Tabla 95. Análisis de los factores entre las PBAR para la actividad enzimática del inóculo durante la biodegradación de los IHA ( $\alpha=0.05$ )

Parámetro	Fuente de variación	g.l	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F	Factor	Lambda de Wilks	g.l num	g.l dem	F exacta	Prob > F
H	Modelo	5	0.4051	2.9366	0.0692	Tiempo	0.1190	2	9	33.3033	0.0001
	Constante	1	0.0017	5676.9033	0.0000	Tiempo * IHA	0.6255	2	9	2.6939	0.1211
	IHA	1	0.6409	5.6014	0.0395	Tiempo * Fuente de inóculo	0.1869	4	18	5.9067	0.0032
	Fuente de inóculo	2	0.5745	3.7019	0.0626	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.3629	4	18	2.9698	0.0478
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.7721	1.4751	0.2745						
	Error	19									
Hmáx	Modelo	5	0.2738	5.3040	0.0123	Tiempo	0.1438	2	9	276.7789	0.0002
	Constante	1	0.0008	11422.541	0.0000	Tiempo * IHA	0.5584	2	9	3.5574	0.0727
	IHA	1	0.4582	11.8222	0.0063	Tiempo * Fuente de inóculo	0.1217	4	18	8.3964	0.0005
	Fuente de inóculo	2	0.4787	5.4436	0.0252	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.3316	4	18	3.3144	0.0335
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.6290	2.9485	0.0085						
	Error	19									
E	Modelo	5	0.4101	2.8761	0.0729	Tiempo	0.3473	2	9	8.455	0.0086
	Constante	1	0.0004	21608.401	0.0000	Tiempo * IHA	0.8649	2	9	0.7028	0.5205
	IHA	1	0.9992	0.0073	0.9334	Tiempo * Fuente de inóculo	0.9483	4	18	0.1209	0.9732
	Fuente de inóculo	2	0.5085	4.8325	0.0340	Tiempo * IHA * Fuente de inóculo	0.9297	4	18	0.1669	0.9525
	IHA * Fuente de inóculo	2	0.6815	2.3363	0.1470						
	Error	19									

Tabla 96. Análisis de perfiles con ajuste de Bonferroni para la actividad enzimática del inóculo durante la biodegradación de los IHA

Parámetro	IHAK							IHAG						
	Tiempo	Muestras	g.l num	g.l dem	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F	Tiempo	Muestras	g.l num	g.l dem	Lambda de Wilks	F exacta	Prob > F
H	0-1	00-01	1	5	0.9999	0.0001	0.9917	0-1	00-01	1	5	0.9658	0.1768	0.6916
		00-02	1	5	0.6341	2.8844	0.1502		00-02	1	5	0.3853	7.9766	0.0369
		01-02	1	5	0.5841	3.559	0.1179		01-02	1	5	0.409	7.223	0.0434
	1-2	00-01	1	5	0.9414	0.3109	0.6012	1-2	00-01	1	5	0.9054	0.1788	0.6900
		00-02	1	5	0.2638	13.9513	0.0135		00-02	1	5	0.3487	9.3368	0.0282
		01-02	1	5	0.3837	12.6210	0.0163		01-02	1	5	0.3659	8.6644	0.0321
H <sub>máx</sub>	0-1	00-01	1	5	0.9959	0.0205	0.8917	0-1	00-01	1	5	0.9736	0.1351	0.7283
		00-02	1	5	0.2726	13.3364	0.0147		00-02	1	5	0.3427	9.5898	0.0270
		01-02	1	5	0.2173	18.0035	0.0081		01-02	1	5	0.3493	9.3106	0.0284
	1-2	00-01	1	5	0.5922	3.4430	0.1227	1-2	00-01	1	5	0.9919	0.0404	0.8487
		00-02	1	5	0.0396	121.1648	0.0001		00-02	1	5	0.3636	8.7493	0.0316
		01-02	1	5	0.0455	104.6981	0.0002		01-02	1	5	0.3447	9.5014	0.0274
E	0-1	00-01	1	5	0.9999	0.0004	0.9846	0-1	00-01	1	5	0.9958	0.0207	0.8911
		00-02	1	5	0.9995	0.0023	0.9638		00-02	1	5	0.9994	0.0029	0.9594
		01-02	1	5	0.9998	0.0009	0.9768		01-02	1	5	0.9903	0.0487	0.8340
	1-2	00-01	1	5	0.9983	0.0083	0.9310	1-2	00-01	1	5	0.7822	1.3922	0.2911
		00-02	1	5	0.9978	0.108	0.9211		00-02	1	5	0.8723	0.7314	0.4315
		01-02	1	5	0.9905	0.0476	0.8359		01-02	1	5	0.9743	0.1318	0.7314

$\alpha = 0.0083$ . 00= IHAKIPCU; 01= IHAKIPCE; 02= IHAKISTJ; 10= IHAGIPCU; 11= IHAGIPCE y 12= IHAGISTJ