

TESINA DE GRADO DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

# Degradación de efluentes líquidos provenientes del maquinado de aceitunas mediante oxidación biológica llevada a cabo con la utilización de microorganismos nativos del efluente

Julián, Valsecchi Punzi

2020

Degradación de efluentes líquidos provenientes del maquinado de aceitunas mediante oxidación biológica llevada a cabo con la utilización de microorganismos nativos del efluente

Julián Valsecchi

TESINA DE GRADO DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de Ciencias Agraria 2019. Almirante Brown 52, Lujan de Cuyo, Mendoza

Degradación de efluentes líquidos provenientes del maquinado de aceitunas mediante oxidación biológica llevada a cabo con la utilización de microorganismos nativos del efluente

Julián Valsecchi.

[Valse08@gmail.com](mailto:Valse08@gmail.com)

0261-6208363

1. Directora: Dra. Maldonado, Mariela Beatriz

Comité evaluador:

1. Dr. Funes Pinter, Mariano Iván
2. Ing. Affranchino, Graciela
3. Ing. Brusadini, Nidia Viviana

## RESUMEN

Según la Organización de las Naciones Unidas alrededor del 65% de la población mundial sufre de falta de agua grave, por lo menos un mes al año y son los servicios inadecuados de agua potable y saneamientos los que aportan un mayor número de personas afectadas o que perdieron la vida a causa de incidentes ocasionados por el agua. Actualmente, el 80% de las aguas residuales se vuelcan directamente a cauces sin ser tratadas, ocasionando problemas ambientales y sobre la salud.

En Mendoza, la Industria olivícola consume 207 mil m<sup>3</sup> de agua por año, de los cuales 180 mil m<sup>3</sup> son volcados como efluentes y debido a sus características físico-químicas y biológicas está regulado su vuelco directamente a cuerpos receptores y para el reúso agrícola, por el Departamento General de Irrigación a través de las ordenanzas respectivas. En la elaboración de las aceitunas de mesa, el elevado caudal de agua que ingresa a la fábrica se transforma en efluentes con alta carga orgánica, sales con pH alcalinos o ácidos y alta concentración de cloruros y polifenoles.

En este trabajo se explican 5 tratamientos de biorremediación en el efluente de aceitunas maquinadas, a los cuales se les hizo un seguimiento de diversos parámetros físico-químicos y biológicos. Se usaron microorganismos aeróbicos directamente en el foco de contaminación de forma ex-situ, mediante el trabajo en el laboratorio. En cuatro tratamientos se practicó, previa eliminación de las poblaciones nativas del efluente, la bioaumentación con organismos aislados por Lugones (2018). Esta técnica implica la adición de cepas adaptadas selectivamente que aumentan la eficiencia de degradación o sean capaces de degradar compuestos difíciles (Di Paola & Vicién, 2010). También se realizó un tratamiento paralelo en el cual solamente coexistieron los organismos ya presentes en el efluente y, en todos los casos, se practicó la bioestimulación, mediante la adición de nutrientes y aireación para que la actividad microbiana se desarrolle en condiciones óptimas (Di Paola & Vicién, 2010).

Mediante la oxidación biológica se logró disminuir los valores de polifenoles hasta valores permitidos para la legislación, señalando que estos no resultan una limitante para la supervivencia de los microorganismos como consecuencia de sus características tóxicas. También se observó disminución en las concentraciones de la DQO y DBO<sub>5</sub> y al analizar su relación, pudo caracterizarse al efluente como biodegradable, al obtener un índice de biodegradabilidad de 0.31.

Al analizar el seguimiento de los parámetros estudiados, se observó que los diferentes grupos nutricionales generan cambios en el rendimiento de la biodegradación del efluente en los valores centrales, ya que los valores iniciales y finales de estos parámetros se encuentran próximos para los distintos grupos microbianos.

## PALABRAS CLAVES

Oxidación biológica, bioestimulación, bioaumentación, remediación, industria olivícola, efluentes de aceitunas de mesa.

## AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de la Universidad Tecnológica que gracias a su gran esfuerzo y dedicación pudo desarrollarse el ensayo que dio pie a esta tesina de grado.

A mi directora, que con su apoyo y tutela me acompañó a lo largo de este proceso arduo pero gratificante.

A mi familia y amigos que acompañaron cada paso de mi carrera, sin más que palabras de aliento y dicha.

A Nadya por su compañía incondicional, consejos y palabras de aliento que me confortaron a lo largo de este desafiante proceso.

# ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| RESUMEN.....   | ii   |
| PALABRAS CLAVES.....   | iii  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | iv   |
| ÍNDICE.....  | v    |
| ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....   | vii  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | viii |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1    Fundamentación.....   | 1    |
| 2    Hipótesis.....  | 2    |
| 3    Objetivos.....  | 2    |
| 4    Marco Teórico.....  | 3    |
| 4.1    Industria olivícola.....  | 3    |
| 4.1.1    Producción mundial oleícola.....  | 3    |
| 4.1.2    Producción regional.....  | 3    |
| 4.1.3    Aceitunas maquinadas.....   | 4    |
| 4.1.3.1    Efluentes provenientes del maquinado de aceitunas.....                            | 5    |
| 4.2    Aguas residuales.....   | 8    |
| 4.2.1    Tratamiento primario.....   | 10   |
| 4.2.2    Tratamiento secundario.....   | 10   |
| 4.3    Legislación.....  | 12   |
| 4.3.1    Ley 5961-Prevención del medio ambiente.....   | 12   |
| 4.3.2    Ley de aguas.....   | 13   |
| 4.3.3    Resolución 778/96- Reglamento general para el control de contaminación hídrica..... | 13   |
| 5    Materiales y métodos.....   | 13   |
| 5.1    Área de estudio:.....   | 13   |
| 5.2    Desarrollo del experimento:.....  | 14   |
| 5.3    Caracterización físico-química.....   | 16   |
| 5.3.1    pH.....   | 16   |
| 5.3.2    Conductividad eléctrica.....  | 16   |
| 5.3.3    Sólidos Totales (APHA, AWWA, WPCF. ,1992).....                                      | 16   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.3.4  | Nitrógeno amoniacal por el método titulométrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....  | 19 |
| 5.3.5  | Nitrito por el método colorimétrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992).....   | 20 |
| 5.3.6  | Sulfatos por el método gravimétrico con combustión de residuos (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....                         | 21 |
| 5.3.7  | Cloruros por el método potenciométrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....   | 22 |
| 5.3.8  | Sodio y potasio por el método directo de llama de aire-acetileno (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....                       | 24 |
| 5.3.9  | Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (García, Fernández, Fuentes 2015) .....                           | 25 |
| 5.3.10 | Dureza por el método titulométrico EDTA (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....  | 26 |
| 5.3.11 | Alcalinidad por el método de titulación (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) .....  | 27 |
| 5.3.12 | Azúcares reductores totales por el método del ácido dinitrosalicílico (Avila, Rivas, Hernández, & Chirinos, 2012)..... | 28 |
| 5.3.13 | Demanda química de oxígeno (IMPEC).....  | 28 |
| 5.3.14 | Demanda bioquímica de oxígeno (APHA, AWWA, WPCF. ,1992) ..   | 29 |
| 5.3.15 | Índice de Biodegradabilidad.....   | 30 |
| 5.4    | Análisis microbiológico .....  | 31 |
| 5.4.1  | Recuento en placa de unidades formadoras de colonias por el método de vertido en placa .....                           | 31 |
| 5.4.2  | Aislamiento- obtención de cepas puras .....  | 33 |
| 5.4.3  | Preservación mediante congelamiento .....  | 33 |
| 6      | Resultados y discusiones .....   | 34 |
| 6.1    | Caracterización inicial del efluente .....   | 34 |
| 6.2    | Ensayo de biorremediación de los diferentes tratamientos .....   | 36 |
| 6.3    | Análisis microbiológicos .....   | 41 |
| 6.3.1  | Crecimiento microbiano.....  | 41 |
| 7      | Conclusiones.....  | 45 |
|        | BIBLIOGRAFÍA.....  | 47 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Producción Argentina en 1.000 toneladas de aceite de oliva y aceitunas de mesa desde la campaña 1990/91 hasta 2019/20. Elaboración propia. Fuente Consejo Oleícola Internacional .....   | 4  |
| Figura 2: Esquema del procedimiento seguido para el armado de los 10 Erlenmeyers inoculados con caldos enriquecidos Plate count (PC), agar EMB (EMB) y agar diferencial WL (WL). Elaboración propia. ....  | 15 |
| Figura 3: Evolución de pH para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia .....                                     | 37 |
| Figura 4: Evolución de la conductividad eléctrica para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia.....             | 38 |
| Figura 5: Evolución de la concentración de polifenoles para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia .....       | 39 |
| Figura 6: Evolución de la concentración de azúcares reductores para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia..... | 40 |
| Figura 7: Evolución de la demanda química de oxígeno para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.....           | 41 |
| Figura 8: Curvas de crecimiento de bacterias aerobias mesófilas obtenidas de los tratamientos Nativo, PC y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.....          | 43 |
| Figura 9: Curva de crecimiento microbiano para hongos y levaduras obtenidas de los tratamientos Nativo, WL y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.....        | 43 |
| Figura 10: Curva de crecimiento microbiano para enterobacterias y demás bacilos negativos obtenidas de los tratamientos Nativo, EMB y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del   |    |

maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia. .... 44

Figura 11: Curvas de crecimiento microbiano para los tratamientos PC, EMB, WL y Nativo desarrollados en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia..... 45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de la caracterización del efluente analizado por Lugones (2018) con los valores de vuelco y reúso agrícola impuestos por la resolución 778 de 1996 y sus posteriores modificaciones. .... 6

Tabla 2: Identificación de los tratamientos realizados en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria elaboradora de aceitunas maquinadas en el departamento de Maipú, Mendoza. .... 15

Tabla 3: Agar utilizados para sembrar las diluciones obtenidas de los distintos erlenmeyers y realizar el recuento de UFC ..... 32

Tabla 4: Caracterización de la parte líquida de un efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. .... 34

Tabla 5: Valores de Sólidos Suspendidos Totales, Fijos y Volátiles obtenidos de los tratamientos al finalizar el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. .... 38

Tabla 6: Periodo de latencia en horas de los tratamientos del experimento realizados en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. .... 42

# INTRODUCCIÓN

## 1 Fundamentación

Actualmente la disponibilidad de agua ha dejado de ser un tema del futuro para transformarse en uno de los más importantes para la sociedad. Aproximadamente 55 países se encuentran por debajo del umbral mínimo de estrés hídrico (Organización de las Naciones Unidas, ONU, 2018) y el 65% de la población mundial, 4.000 millones de personas aproximadamente, sufre de falta de agua grave en como mínimo un mes al año (Mekonnen & Hoekstra, 2016). Según el informe mundial de Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los recursos Hídricos (2019), el mayor aporte al número de personas afectadas y que perdieron la vida a causa de incidentes ocasionados por el agua son causados por servicios inadecuados de agua potable y saneamiento, superando a los valores ocasionados por inundaciones, sequías y conflictos.

En la actualidad, el 80 % de las aguas residuales son volcadas directamente a cauces sin sufrir ningún tipo de tratamiento, generando un mayor volumen contaminado, lo que trae aparejado problemas de deterioro ambiental y sobre la salud y bienestar de comunidades (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos, 2017). Esto resulta preocupante debido al aumento en el consumo de agua que se experimenta desde la década del 80', el cual, crece a una velocidad del 1% anual; generado en su mayoría por la creciente demanda en países en desarrollo y economías emergentes (AQUASTAT, 2010). Estas preocupaciones no han pasado desapercibidas, ya que los 193 países reconocidos por la ONU (ONU, 2018). firmaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuesto en el 2015, donde la meta 6.3 establece que:

“De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial.”

Consecuentemente, la biorremediación es un proceso que utiliza organismos para neutralizar sustancias tóxicas mediante la transformación de las mismas en compuestos menos nocivos o en sustancias inocuas para el medio (Rodríguez, 2003). Esto se logra utilizando las características catalíticas de los microorganismos para degradar y transformar los contaminantes presentes en distintos ecosistemas. La biorremediación puede llevarse a cabo tanto de manera ex-situ (fuera del lugar donde se encuentra el contaminante) como in-situ (en el lugar donde se encuentra el contaminante) mediante diferentes organismos, como plantas, hongos y bacterias que utilizan los contaminantes como sustratos de crecimiento o simplemente los transforman en sustancias menos tóxicas (Garbisu, Amézaga y Alkorta; 2002). La importancia de esta técnica recae en la amplia forma de aplicación que posee y de la diversidad genética y versatilidad metabólica característica de las bacterias.

Por otro lado, las aceitunas maquinadas están constituidas por aquellas aceitunas de mesa a las cuales se les ha dado un valor agregado mediante la implementación de procesos industriales. Actualmente, el consumo y mercado de este producto se ha incrementado debido a su utilización en la cocina gourmet, ensaladas y a la concepción del carozo, por los consumidores, como antiestético (Diario de Cuyo, 2011). Diversos son los productos encontrados dentro de esta clasificación; como son las deshuesadas, rellenas, en mitades, cuartos, gajos, lonjas, pastas, entre otras.

La producción argentina de aceitunas de mesa en el periodo 2017-2018 alcanzó las 106.000 toneladas, posicionando al país como el mayor productor de América. (Consejo Oleícola Internacional, COI 2018). Para el año 2019 se proyectó una disminución en la producción, que podría alcanzar valores de 80.000 toneladas, debido a cuestiones climáticas, fenológicas y de rentabilidad (Saieg, 2019).

En Mendoza el consumo de agua para industrias alimenticias se estima en 19,65 hm<sup>3</sup>, el cual podría disminuirse en un 63% hasta valores de 7,11 hm<sup>3</sup> mediante un uso racional del recurso. Actualmente, estas industrias vuelcan cerca del 83% del volumen ingresado. Para el caso de la Industria olivícola, anualmente consume 207 dam<sup>3</sup> de agua, el cual podría disminuirse en un 91% mediante un uso racional. El efluente generado es de 180 dam<sup>3</sup> y debido a sus características de conductividad eléctrica y sodio no está permitido su reúso agrícola, realizándose, en la mayoría de los casos, una dilución para cumplir los parámetros de vuelco (Duek, 2016). En la actualidad, los efluentes líquidos derivados de la elaboración de aceitunas de mesa son llevados a balsas de evaporación, las cuales no suelen presentar un diseño adecuado y terminan trabajando como piletas de acumulación, donde se mezclan los diferentes efluentes de la industria, complicando así su correcto tratamiento (Cabezas, 2011).

Puesto que la cantidad de conocimientos generados acerca de la degradación de estos efluentes es baja, sumada la inadecuada implementación de los tratamientos actualmente utilizados y la gran importancia del agua como recurso; resulta importante generar conocimientos que ayuden a definir la viabilidad y eficiente utilización de microorganismos en el saneamiento de estos líquidos. Con este fin se llevaron a cabo 5 tratamientos de biorremediación en el efluente de aceitunas maquinadas, con microorganismos previamente seleccionados y otros nativos, a los cuales se hizo un seguimiento de diversos parámetros físico-químicos en el transcurso del experimento.

## 2 Hipótesis

Los diferentes grupos nutricionales de microorganismos nativos aislados, generan cambios diferentes en el rendimiento de la biodegradación del efluente de aceitunas maquinadas bajo las condiciones del ensayo.

## 3 Objetivos

### Objetivos generales

Analizar la degradación del efluente líquido generado en la industria del maquinado de aceitunas, mediante la oxidación biológica con microorganismos previamente aislados del efluente.

### Objetivos particulares

- Determinar la eficiencia de los microorganismos de diferentes grupos nutricionales inoculados, en la degradación de los contaminantes físicos-químicos y biológicos del efluente del maquinado de aceituna, mediante la comparación de sus concentraciones iniciales y residuales.
- Establecer relaciones entre las concentraciones de parámetros físico-químicos y biológicos del efluente- como la conductividad eléctrica, demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), pH- respecto a los microorganismos expuestos a lo largo del proceso de degradación.

## 4 Marco Teórico

### 4.1 Industria olivícola

#### 4.1.1 Producción mundial oleícola

El COI (2019) en su campaña de aceitunas de mesa, septiembre 2017 a agosto 2018, señaló que la producción mundial fue de 3.284 mil toneladas, donde la Unión Europea se colocó a la cabeza con una producción de 912,5 mil toneladas, seguido de Egipto, Turquía y Argelia con 750, 450 y 303,5 mil toneladas respectivamente. Argentina se encontró en el sexto puesto con una producción de 106 mil toneladas. Los datos provisionales de la campaña 2018-2019 no fueron alentadores, se estimó una caída del 22% en la producción mundial de aceitunas de mesa y una del 25% para la Argentina. No obstante, para la campaña 2019-2020 se proyectó, respecto a la campaña anterior, un aumento en la producción mundial del 14% y del 25 % para Argentina (Ilustración 1).

#### 4.1.2 Producción regional

En Argentina, para el año 2017, se relevaron 90 mil ha implantadas de olivo con una producción de 400 mil toneladas, de la cual el 33 % se destinó a la obtención de aceitunas de mesa (Agroindustria de la Nación, 2018). Para la campaña de aceitunas de mesa 2018-2019 se estimó una baja en su elaboración del 25,5% (COI, 2019), debido a factores climáticos y económicos; como el aumento en los costos, el tipo de cambio y las elevadas tarifas eléctricas. En el año 2017, las principales provincias productoras fueron La Rioja, representando el 28,9% de la superficie implantada con olivos del país, Mendoza con el 23%, San Juan con un 21,1% y Catamarca con el 17,6% (Secretaría de Agroindustrias, 2017).

En Catamarca hubo una gran disminución de productores olivícolas y para el año 2019 solo quedó el 20 % respecto del 2014. Al igual que en la Rioja, el aumento de la tarifa eléctrica golpeó abruptamente al sector, no tanto así en las provincias de San Juan y Mendoza donde el abastecimiento hídrico de estos cultivos suele ser superficial mediante río (Infoabe, 2019). Así mismo el panorama en Mendoza no fue distinto, las 19 mil hectáreas cultivadas se vieron amenazadas por la imposibilidad de mantener al olivo en óptimas condiciones de productividad, debido a los altos costos que implica, los problemas climáticos como fuertes vientos, granizo y la variabilidad constante entre frío-calor y a la venta de hectáreas cultivadas con olivo para desarrollos inmobiliarios (Murgo, 2019).

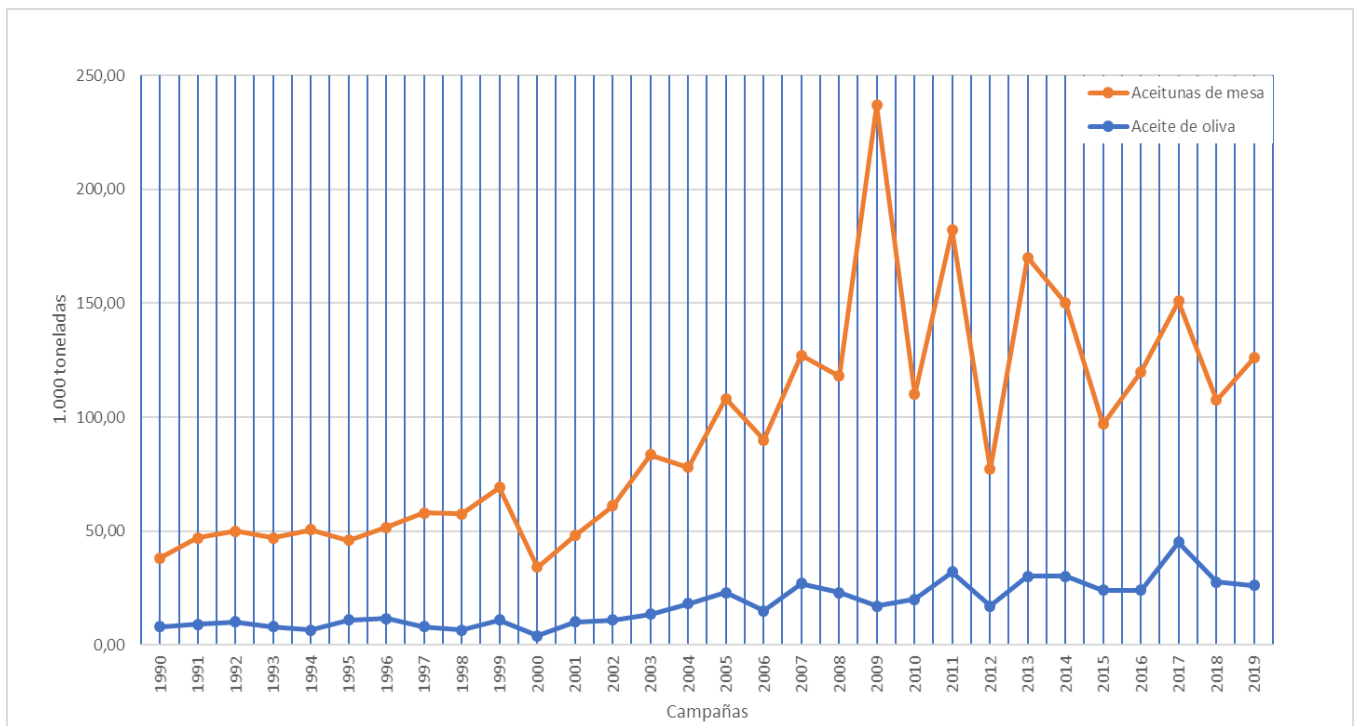


Ilustración 1: Producción Argentina en 1.000 toneladas de aceite de oliva y aceitunas de mesa desde la campaña 1990/91 hasta 2019/20. Elaboración propia. Fuente Consejo Oleícola Internacional

#### 4.1.3 Aceitunas maquinadas

El COI define a las aceitunas como un tipo de drupa, que debido a sus características – contenido de compuestos fenólicos, baja cantidad de azúcares y un elevado contenido de aceites- resulta necesario someterlas a diferentes procesos para poder ser consumidas (COI, s/f). Estos no solo dependen de la variedad sino también de la región. (COI, 2019). Dentro de los procesos más utilizados encontramos:

- Aderezo o cocido,
- Curado en salmuera,
- Oxidación,
- Deshidratación y
- Otros procesos de elaboración.

Todos buscan eliminar el amargor natural de este fruto, causado en su mayoría a la presencia de oleuropeína (Álvarez, et al., 2018).

Las aceitunas una vez ingresadas a la fábrica, luego de su lavado y selección, sufren un tratamiento con lejía -cocido- luego del cual se lavan una o más veces a fin de eliminar la mayor cantidad de hidróxido de sodio remanente de la etapa anterior. A continuación, se favorece la fermentación láctica mediante un tratamiento en salmuera (disolución de sal comestible en agua apta para el consumo humano) que dura 5 o más meses. Una vez realizado el almacenamiento se lleva a cabo la selección y separado por tamaño con el posterior deshuesado, rodajeado o demás tratamiento para ser envasadas y comercializadas (Fernández Llano et al., 2001).

#### 4.1.3.1 Efluentes provenientes del maquinado de aceitunas

Durante la elaboración, el elevado caudal de agua utilizado se transforma en efluentes con alta carga orgánica, sales con pH alcalino y alta concentración de cloruros y polifenoles, resultando tóxico para diferentes organismos y transformándose en un problema ecológico (Álvarez et al., 2018). Kopsidas (1992) realizó una caracterización de los efluentes generados en 4 industrias de Grecia, donde determinó las características físico- químicas y los diferentes volúmenes de agua utilizados en cada proceso. Esto, permitió visualizar la cantidad de agua ingresada y generada en cada una de las etapas productivas y sus características físico-químicas. Los valores de pH, sólidos suspendidos, sólidos disueltos, DBO<sub>5</sub>, DQO y cloruros obtenidos en las diferentes etapas sobrepasaron a los permitidos por la resolución 778/96 del Departamento General de Irrigación (DGI), Mendoza, Argentina. Así mismo, determinó que el tipo y concentración de contaminantes en el efluente estaba relacionado al proceso donde se generaba; las aguas utilizadas en el lavado inicial presentaron baja carga de contaminantes, las utilizadas en la fermentación tuvieron alta concentración de cloruros, como consecuencia de la adición de cloruro de sodio, y los valores elevados de DQO fueron ocasionados por polifenoles y sacáridos no biodegradables de las etapas de cocido y fermentación.

En un experimento realizado en la Universidad Tecnológica Nacional se obtuvieron los primeros datos de las propiedades físico-químicas del efluente resultante de una temporada de elaboración de aceitunas maquinadas en una industria olivícola de la localidad de Maipú, Mendoza, Argentina (Lugones, 2018). La Tabla 1 compara los resultados obtenidos por Lugones con la resolución 778/96 del DGI, que establece las normas de vuelco y reúso agrícola para regular la calidad del agua en la Provincia de Mendoza. Parámetros iniciales del efluente encontrados, como conductividad eléctrica, DBO<sub>5</sub>, DQO, concentración de cloruros, sodio y polifenoles, sobrepasaron ampliamente a los permitidos por la legislación y, a pesar de que se llevó a cabo una oxidación biológica mediante bioestimulación, muchos de estos parámetros no lograron posicionarse por debajo de los máximos permitido, aunque algunos presentaron notables disminuciones. La conductividad eléctrica se redujo en un 35%, la DQO y DBO<sub>5</sub> en un 91% y 80% respectivamente. Con estos resultados Lugones caracterizó al efluente como biodegradable al obtener un índice de biodegradabilidad de 0.89 y sugirió un continuo proceso de investigación y profundización a fin de implementar un sistema de tratamiento mediante biorreactores .

Tabla 1: Comparación de la caracterización del efluente analizado por Lugones (2018) con los valores de vuelco y reúso agrícola impuestos por la resolución 778 de 1996 y sus posteriores modificaciones.

| Caracterización físico- química del efluente |                   |             | Resolución 778 anexo IA modificado por resolución 627/00 |                  | Reúso agrícola anexo I B |
|--|-------------------|-------------|--|------------------|--------------------------|
| Variable                                     | Unidad de medida  | Valor medio | Máximo permitido   | Máximo tolerable | Valor                    |
| pH   | -                 | 6,2         | 6.5 a 8.5  | 5.5 a 9.0        | 6,5-8,5                  |
| Temperatura                                  | °C                | 27          | 30   | 45               | 40                       |
| Conductividad eléctrica                      | µS/cm             | 37200       | 1400   | 2000             | 2250                     |
| Oxígeno disuelto                             | mg/l              | 0,29        |  |                  |                          |
| DQO  | mg/l              | 17410       | 75   | 250              | Res. por caso            |
| DBO5   | mg/l              | 15500       | 30   | 120              | Res. por caso            |
| Nitratos                                     | mg/l              | 0,3789      | 10   | 45               | Res. por caso            |
| Nitrógeno amoniacal                          | mg/l              | 6,19        | 3  | 6                | Res. por caso            |
| Fosfatos                                     | mg/l              | 7,74        | 0,4  | 0,7              | Res. por caso            |
| Sólidos sedimentables 10 min                 | mg/l              | 2,875       | 0,5  | 1                |                          |
| Sólidos sedimentables 2h                     | mg/l              | 4,375       | Menos de 1   | 10               | 10                       |
| SST  | mg/l              | 9.878,86    |  |                  |                          |
| SSF  | mg/l              | 162,14      |  |                  |                          |
| SSV  | mg/l              | 9.716,72    |  |                  |                          |
| Cloruros                                     | mg/l              | 5575        | 300  | 500              | 600                      |
| Sulfatos                                     | mg/l              | 137         | 250  | 600              | 600                      |
| Sodio  | mg/l              | 3.098,2     | 250  | 400              | 400                      |
| Potasio                                      | mg/l              | 1.271,8     |  |                  |                          |
| Alcalinidad total                            | mg/l              | 510,46      |  |                  |                          |
| Dureza total                                 | mg/l CaCO3        | 1.117,07    |  |                  | Res. por caso            |
| Polifenoles totales                          | mg ácido gálico/l | 1,55        | 0,05   | 0,1              | Fenoles mg/l             |

Elaboración propia, adaptado de Lugones (2018). Biorremediación de efluentes provenientes de la industria de aceitunas maquinadas (Tesis de grado).

En otra experiencia realizada sobre el residuo resultante de la elaboración de aceite de oliva, se monitoreó la concentración de DQO, compuestos aromáticos y fenólicos totales a lo largo del mismo -cabe destacar que la naturaleza del efluente de la industria del aceite es similar a la de las aceitunas de mesa (Aggelis, Gavala, y Lyberatos, 2001)-. En el mismo,



se llevó a cabo una degradación aeróbica en un reactor Batch con corriente de aire y como el efluente no poseía la flora microbiana necesaria para la degradación fue necesario inocular el reactor con lodos activados provenientes de una planta de tratamientos municipal. Una vez puesto en marcha, se observó que los valores de la DQO final variaban en base al valor inicial de DQO que presentaba el efluente, el cual se modificó entre un rango de 20g O<sub>2</sub>/l a 98g O<sub>2</sub>/l mediante diluciones. Así, se obtuvo porcentajes de reducción entre 54% y 84% y aquellos experimentos que presentaron un valor inicial de DQO mayor se correspondieron con menores reducciones. Así mismo, los compuestos aromáticos y fenólicos decrecieron continuamente sin importar la concentración de DQO inicial del efluente, hasta obtener reducciones del 90% en el contenido de fenoles (Benitez, Beltran-Heredia, Torregrosa, Acero & Cercas, 1997).

Uno de los problemas al que se enfrenta la biorremediación del conjunto de líquidos derivados de la elaboración de aceitunas maquinadas es el proceso de desamarizado y su subsiguiente lavado, donde se genera el mayor volumen de efluente y el que presenta características más adversas para el medio ambiente (Kopsidas, 1992). Este efluente se caracteriza por la presencia de compuestos polifenólicos, aromáticos y fenólicos que, en altas concentraciones, resultan tóxicos para los microorganismos. Por ello, a pesar de que en los últimos años se ha dado reconocimiento al tratamiento biológico de estos efluentes, numerosos investigadores han propuesto métodos mixtos mediante el uso de tratamientos químicos y biológicos a fin de evitar la muerte de microorganismos degradantes (Kotsou, Kyriacou, Lasaridi & Pilidis, 2004).

Como resaltó Aggelis et al. (2002), muchos experimentos han logrado disminuir, mediante métodos físico-químicos, la carga orgánica y toxicidad del efluente generado en el desamarizado de aceitunas de mesa verdes, pero llevar estos experimentos a escalas mayores pueden presentarse dificultades técnicas y de insostenibilidad económica. Es por esto que, basados en el gran éxito de los hongos de la podredumbre blanca en degradar contaminantes orgánicos (Bumpus, Tien, Wright y Aust, 1985), compararon 8 especies de este tipo de hongos en función de sus aptitudes para degradar compuestos fenólicos. Encontraron que todos crecieron bien en cultivos por lotes con estos efluentes y que 4 especies mostraron degradaciones significativas de fenoles totales durante la incubación: *Abortiporus biennis* 54.5%; *Pleurotus ostreatus* 51.5%; *Panellus stipticus* 42.2% y *Dichomitus squalens* 36.4% (Aggelis et al., 2002).

A pesar de que muchos autores resaltaron la inhibición de los microorganismos debido a la alta toxicidad ocasionada por compuesto fenólicos, polifenólicos y aromáticos en estos efluentes (Gonzalez, Moreno, Quevedo-Sarmiento y Ramos-Cormenzana, 1990; Benitez, Acero, Gonzalez, Garcia, 2001; Aggelis et al., 2001) y proponen tratamientos mixtos, mediante la utilización de procesos químico-físicos y biológicos (Gonzalez et al., 1990; Benitez et al., 2001; Aggelis et al., 2001; Rivas, Beltrán y Gimeno, 2000- Rivas, Beltrán, Gimeno y Alvarez, 2000), existen evidencias que sustentan la sobrevivencia de microorganismos bajo estos efluentes a la vez que los degradan. Como se visualiza en los experimentos realizados por Aggelis et al (2001), a medida que se aumentó la cantidad de DQO -representada en parte por polifenoles (Kopsidas, 1992)- de los efluentes sometidos a oxidación biológica, la eficiencia en la degradación disminuyó de forma no significativa. Otros resultados interesantes, fueron encontrados por Lugones (2018) al someter estos efluentes a degradación aeróbica mediante organismos nativos. La misma, observó una notable disminución de diferentes parámetros contaminantes y determinó que el índice de biodegradabilidad se corresponde con el de un efluente susceptible a ser biodegradado. En estos experimentos se promovió la bioestimulación de los organismos mediante el agregado de nutrientes a fin de lograr una relación 100:5:1 de carbono, nitrógeno y fósforo.

Benitez et al. (2001) también agregaron una serie de nutrientes a fin de mantener esta relación y lograron, mediante oxidación biológica, una gran reducción en el contenido de fenoles y compuestos aromáticos de este tipo de efluentes. En resumen, a pesar de la presencia de estos compuestos tóxicos en efluentes de la industria olivícola, existen estudios que sustentan la utilización de microorganismos para su remediación, sin ser excluyente la utilización de procesos físico-químicos complejos y costosos.

## 4.2 Aguas residuales

Las aguas residuales son aquellas que no podrán ser utilizadas con el fin al cual estaban destinadas como consecuencia del vertido de diversos compuestos orgánicos o inorgánicos, los cuales, al dispersarse, disolverse o quedar suspendidos en los cuerpos de agua receptores, alcanzan concentraciones que exceden a las tolerables para el uso al cual estaba destinada (Orozco Jaramillo, 2014).

“La contaminación consiste en una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca y las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural”.

Los diferentes cuerpos receptores de aguas contaminadas, como lagos, ríos y demás, presentan la capacidad de dilución y autodepuración. Pero, como consecuencia de la creciente demanda de agua y su devolución en condiciones que exceden en gran medida su capacidad de autodepuración, existe un deterioro gradual de su calidad. Debido a esto, resulta importante generar una adecuación de parámetros físico-químicos y biológicos de las aguas residuales, a fin de posibilitar su reutilización posterior. El tratamiento de aguas residuales debe apuntar a reducir la concentración de aquellos elementos contaminantes que imposibiliten el uso para aquella actividad a la que estaba destinada. Dentro de los parámetros importantes a analizar, para determinar el grado de contaminación de un agua, encontramos la materia orgánica; oxígeno disuelto; DQO; DBO<sub>5</sub>; sólidos suspendidos; pH; nitrógeno; azufre y fosforo (Orozco Jaramillo, 2014).

La demanda de oxígeno hace referencia a la cantidad de oxígeno susceptible de ser consumido en la degradación de sustancias contaminantes, por lo que DQO; DBO<sub>5</sub> son técnicas para medir el contenido de materia orgánica de muestras de agua de forma indirecta, mediante el consumo de oxígeno. La diferencia radica en que la DQO utiliza oxidantes químicos, mientras que la DBO<sub>5</sub> microorganismos (APHA, AWWA, WPCF, ,1992). Como consecuencia, los valores obtenidos de DQO son mayores que los de DBO<sub>5</sub> para un mismo efluente, al ser la descomposición química más completa. La importancia de ambas es conocer la cantidad de oxígeno necesario para reducir los compuestos orgánicos antes de descargar los efluentes a cuerpos receptores. Ya que, si se descargan efluentes con abundante materia orgánica, el oxígeno disuelto del líquido receptor se vería muy disminuido debido a la degradación biológica de estos contaminantes y la concentración de nutrientes disponibles aumentaría notablemente, ocasionando eutrofización (Delgado, Barrenetxea, Serrano, Blanco & Vidal, 2004).

El pH es un parámetro que indica el comportamiento de bases y ácidos presentes en el efluente, es una propiedad determinante en el desarrollo o no de la vida acuática. Las aguas naturales, aquellas que no han sido modificadas como consecuencia de actividades humanas, generalmente presentan valores de pH con un cierto carácter básico, encontrándose entre valores de 6,5 y 8,5 (Delgado et al., 2004). Muchos microorganismos se encuentran adaptados para vivir en ambientes notablemente ácidos o básicos, pero la

gran mayoría, se desarrolla entre pH 5 y 9, fuera de este rango la vida acuática se complica debido a la desnaturalización de componentes esenciales de las células y se altera el intercambio de nutrientes y solutos necesarios para los organismos (Apella y Araujo, 2005). Además, aguas con pH menores a 6 generan graves problemas de corrosión en cañerías y demás estructuras, se imposibilita su uso en cultivos al generar condiciones de toxicidad para las plantas y/o la inmovilización de oligoelementos, que ocasionan deficiencias nutricionales. (Delgado et al., 2004)

La conductividad eléctrica mide la capacidad que tiene el agua para conducir la corriente eléctrica y depende de la cantidad de sales disueltas. Estas sales, al disociarse, generan iones positivos y negativos que confieren la capacidad para conducir la corriente. La salinidad, dureza y sólidos disueltos totales son parámetros ligados directamente con la conductividad eléctrica del agua (Delgado et al., 2004). Aguas con alta concentración de sales disueltas no pueden ser destinadas al reusó agrícola, ya que la salinidad afecta el crecimiento de las plantas y así a la productividad de cultivos.

El total de residuo presente en un efluente se corresponde con los sólidos totales, los cuales se separan en suspendidos y disueltos según la capacidad de ser separados mediante filtro. Los sólidos disueltos, que debido a su pequeño tamaño no son susceptibles de ser separado mediante filtro, están compuesto, en su mayoría por sales inorgánicas. En cambio, los sólidos suspendidos totales (SST), resultan del secado del residuo retenido en filtro a 550 °C en horno de mufla durante 15 minutos y se separan en sólidos suspendidos fijos (SSF) y volátiles (SSV). Estos presentan una naturaleza variable y se relacionan directamente con la turbidez de las aguas. La pérdida de masa resultante, al llevar a horno los SST, se explica en su mayoría por la combustión de compuestos orgánicos al entrar en contacto con el oxígeno. Por lo que se asocia a los SSV con compuestos orgánicos y los SSF con sales inorgánicas (APHA, AWWA, WPCF. ,1992).

La presencia de compuestos nitrogenados en el agua se debe a causas naturales y antrópicas, como es la disolución atmosférica, la descomposición de la materia orgánica, aguas derivadas del uso doméstico e industrial, entre otros. Estos compuestos dan lugar a diversos problemas ambientales como la acidez, eutrofización y pueden llegar a concentraciones tóxicas que hacen del agua un medio inviable para la supervivencia de organismos acuáticos y pone en riesgo la salud de las personas. (Calvachi y Ortiz, 2013).

La alcalinidad y la dureza también son parámetros importantes en la determinación de la calidad de las aguas; la alcalinidad se relaciona con la presencia de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos y se determina mediante la concentración de los mismos en las aguas. En sí, se trata de la capacidad que tiene un agua de neutralizar ácidos, actuando como un buffer (APHA, AWWA, WPCF. ,1992). Este parámetro es útil para conocer la agresividad o tendencia a la incrustación que presenta un agua, según la disponibilidad de CO<sub>2</sub> (Delgado et al, 2004). Cuando el contenido es elevado, el calcio de los minerales que lo presentan es susceptible a disolverse, generando problemas en estructuras de hormigón, caso contrario, cuando el contenido es bajo, se produce la precipitación de CaCO<sub>3</sub> ocasionando obstrucciones en tuberías y demás estructuras. En cambio, la dureza depende de la concentración de calcio y, en menor medida, de magnesio disuelto. Generalmente aguas con un valor de dureza de 200mg CaCO<sub>3</sub>/l son consideradas como duras y pueden provocar incrustaciones, ocasionando daños en calderas y tuberías, así como un mayor uso de detergentes y jabones. Las aguas blandas, aquellas que presentan una dureza menor a 100mg/l, presentan una capacidad amortiguadora reducida, ocasionando la corrosión de tuberías (Water and World Health Organization, 2006).

Por lo que el agua, al ser un recurso crucial para la vida, resulta una importante vía de transmisión de enfermedades y como un medio potencial de intoxicación química. Esto se amplifica al notar que de un cuerpo de agua se abastecen gran cantidad de personas, lo que provoca infecciones e intoxicaciones masivas en periodos cortos de tiempo. Es por esto que el tratamiento adecuado de aguas residuales, debe tomarse como meta primordial a fin de asegurar el bienestar de poblaciones y del medio ambiente (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, Stahl, 2015). Dentro de los diferentes tratamientos de aguas residuales podemos diferenciarlos en primarios, secundarios y terciarios según los contaminantes susceptibles de ser eliminados y los procesos utilizados (Delgado et al., 2004).

#### **4.2.1 Tratamiento primario.**

Es un tratamiento de tipo físico-químico con el objeto de eliminar sólidos en suspensión, ácidos, coloides, aceites, grasas, metales pesados y demás (Delgado et al, 2004). No se elimina solamente el material que incomodará en los posteriores tratamientos, sino que sustrae gran parte de la materia orgánica presente en los efluentes (Rojas, 2002).

Son numerosos los tipos de tratamientos a los que pueden someterse los diferentes efluentes y dependen, en gran parte, del compuesto que se desea eliminar. Para sustraer sólidos gruesos se utilizan tamices de distinta graduación; con el fin de eliminar arenas se utilizan desarenadores y para eliminar aceites y grasas se hace uso de desengrasadores. (Rojas, 2002). Una vez que las aguas residuales han sido sometidas a este tipo de tratamiento resulta importante llevar a cabo tratamientos secundarios, a fin de eliminar el alto contenido de materia orgánica soluble o suspendida junto a otros nutrientes que puedan estar presentes. Caso contrario, se descargaría agua altamente contaminada a cuerpos receptores, lo que implicaría un alto riesgo ambiental y para la salud de la sociedad relacionada (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, Stahl, 2015).

#### **4.2.2 Tratamiento secundario.**

Se lleva a cabo mediante procesos biológicos a fin de reducir compuestos orgánicos biodegradables presentes en los efluentes de forma disuelta y coloidal. En este tipo de tratamiento, los microorganismos utilizados se encuentran en condiciones controladas que aseguran su óptimo desempeño. Se diferencian dos procesos; uno de naturaleza bioquímica en el cual, mediante actividad metabólica, las bacterias producen la degradación y mineralización de compuestos biodegradables y otro de naturaleza físico-química donde se produce la sedimentación de los fangos secundarios ricos en microorganismos vivos y muertos (Delgado et al, 2004).

Al referirse a tratamientos secundarios se habla de biorremediación, el término proviene del concepto de remediación que se basa en la utilización de procesos físico-químicos a fin de evitar la contaminación y el daño del suelo. El caso particular de la biorremediación hace referencia a la utilización de organismos vivos debido a sus capacidades para degradar determinados contaminantes. Puede ser denominado de diferentes formas, según el organismo empleado, la técnica utilizada y el lugar de realización (Di Paola y Vicién, 2010).

El objetivo de este tipo de tratamiento depende del tipo de agua residual con la que se trabaje, ya que esto define los tipos de contaminantes y su proporción. Así mismo, dentro de los objetivos seguidos para efluentes industriales, residuos domésticos o aguas de uso agrícola, se encuentra la disminución de la cantidad de materia orgánica, sólidos coloidales y eliminación de nutrientes (Metcalf, 2004). La degradación puede llevarse a cabo en

medio aerobio o anaerobio, según la presencia o no de oxígeno disponible para los microorganismos. Esto definirá la fauna microbiana existente, los procesos y productos de degradación generados (Delgado et al., 2004).

### Degradación aerobia

La mayoría de los tratamientos secundarios desarrollados con microorganismos se desempeñan de forma aerobia. Este metabolismo es utilizado por microorganismos quimioheterótrofos, que obtienen materia de compuestos orgánicos y energía mediante un mecanismo de transporte de electrones con un aceptor de electrones externo (Madigan et al., 2015). Este proceso se denomina respiración, la cual puede darse tanto de forma aerobia como anaerobia, según si el aceptor final de electrones de las reacciones de óxido-reducción es o no el oxígeno. En los casos donde así sucede, estamos en presencia de la respiración aeróbica (Metcalf, 2004).

En este tipo de oxidación biológica, los microorganismos degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno y nutrientes necesarios para su metabolismo, este puede simplificarse en la siguiente ecuación (Wikilibros, 2015).

Materia Orgánica+Microorganismos+Nutrientes+O<sub>2</sub> => Biomasa+H<sub>2</sub>O+ CO<sub>2</sub>.

- Lodos activados

También conocido como fangos activados, es un proceso que incorpora los efluentes a tratar en una cisterna aireada junto a una comunidad de microorganismos que forman parte de los fangos activados. Tiene como objetivo la degradación de materia orgánica del residuo líquido, mediante comunidades bacterianas en suspensión (Delgado et al., 2004).

Una vez recolectados los efluentes objeto de tratamiento, se incorporan en grandes tanques, donde se mantendrá la aireación y homogeneización constante. Muchas de las bacterias que toman parte en este tratamiento crecerán y darán lugar a masas de agregados denominadas flóculos. Estos serán utilizados por otros organismos como sostén; protistas, hongos y demás microorganismos se adhieren a los flóculos, llevando a cabo su oxidación (Metcalf, 2004).

Así, una vez incorporada la mezcla en la cisterna de aireación permanece entre 5 y 10 horas, tiempo en el cual puede reducirse hasta un 95% la DBO<sub>5</sub> del líquido. A pesar de ser un tiempo corto para llevar a cabo la completa oxidación biológica de toda la materia orgánica, gran parte de esta se absorbe a los flóculos y se incorpora en las células microbianas. Luego, el material tratado pasa a un tanque de sedimentación para la separación de fases y extracción de fangos activos, parte de los cuales serán reutilizados en el tanque aireado a fin de mantener la actividad biológica y acelerar el proceso de degradación oxidativo (Delgado et al., 2004; Metcalf, 2004). El resto puede utilizarse como fertilizante una vez secado, puede quemarse o pasar a un digestor anaeróbico para su tratamiento final (Metcalf, 2004).

### Crecimiento microbiano

Los tratamientos secundarios biológicos toman parte gracias a la existencia, adición, crecimiento y recambio de organismo en el medio objeto de degradación, por ello resulta importante el estudio de la evolución de su comunidad. Cuando se habla de crecimiento microbiano se hace referencia al aumento en el número de células de una determinada población. Durante este proceso, una célula se divide y da lugar a dos en un tiempo conocido como tiempo de generación, en el cual se duplica la población (Madigan et al., 2015).

A pesar de la gran capacidad de división de los microorganismos, estos no pueden crecer por tiempo indefinido sin la ayuda del hombre. Necesitan disponer de nutrientes, materia y espacio para su crecimiento, es por lo que, en un cultivo discontinuo -donde no existe extracción de biomasa ni incorporación de nutrientes y materia en el tiempo las poblaciones microbianas describen un ciclo de crecimiento donde se distinguen tres fases (Madigan et al., 2015).

- Fase de latencia

Es un periodo de tiempo en el cual no existe crecimiento, los microorganismos presentes están abocados a la tarea de síntesis de enzimas para la producción de metabolitos esenciales y generar un reservorio de estos. Por ello, el tiempo de latencia puede ser muy variable según el medio y el estado en el que se encuentra la población de la cual se sacó el inóculo

En el laboratorio es importante reducir los tiempos de esta fase mediante la utilización de medios de cultivo ricos y de poblaciones microbianas fuente que se encuentren en la fase de crecimiento exponencial, que tengan ya las estructuras necesarias para la división.

- Fase exponencial

En esta fase de crecimiento las células ya presentan todas las estructuras necesarias para la división y comienza el crecimiento, duplicándose la población en intervalos regulares de tiempo. Esta fase tendrá lugar mientras no exista restricciones de algún tipo de elemento en el medio y, su velocidad de crecimiento depende de condiciones ambientales, así como de características intrínsecas de los organismos .

En procesos de degradación biológica controlados, mantener las poblaciones en esta fase mediante la extracción de desechos e incorporación de nutrientes, resulta beneficioso al disminuir los tiempos de degradación, posibilitando el tratamiento de mayores volúmenes.

- Fase estacionaria y fase de muerte

El crecimiento exponencial no puede mantenerse indefinidamente en cultivos discontinuos, al disminuir la concentración de algún nutriente o por la acumulación de residuos en el medio, el crecimiento poblacional se iguala a cero. Esto quiere decir que el número de células en el medio se mantiene estable, lo que no excluye que algunas células se dividen mientras que otras mueren. Luego de este período estacionario, donde el metabolismo energético y demás procesos de los microorganismos se dan más lentamente, la población entra en una etapa de muerte. Esta etapa sigue la función exponencial pero más lentamente que en el crecimiento.

## 4.3 Legislación

### 4.3.1 Ley 5961-Prevención del medio ambiente

Ley provincial que tiene como finalidad asegurar la preservación del ambiente en la provincia de Mendoza, mantener el equilibrio ecológico para asegurar el desarrollo sustentable.

La ley comprende que el uso racional de los recursos es uno de los pasos para el desarrollo sustentable, por ello incorpora diversos conceptos como conservación, preservación, contaminación y degradación (Ley N° 5961, 1993).

### **4.3.2 Ley de aguas**

La Ley de aguas de Mendoza fue sancionada en 1844, el 20 de noviembre. En su artículo 189 crea el Departamento General de Aguas, que luego de dos modificaciones, recibe la denominación de DGI, en el año 1916.

Lo respectivo al agua, su administración, uso, distribución y demás temas relacionados, están sujetos a las disposiciones de la Ley y bajo la tutela del Departamento General de Irrigación, al cual, dicha ley, le otorgo la denominación de Policía del agua. Estas facultades permiten y exigen al Superintendente del DGI llevar acabo las medidas necesarias para asegurar que las aguas no afecten la sanidad pública, la seguridad de las personas ni bienes en el marco de esta ley.

### **4.3.3 Resolución 778/96- Reglamento general para el control de contaminación hídrica.**

El Departamento General de Irrigación, como administrador del recurso hídrico provincial, ejerce sus facultades a fin de asegurar la cantidad y calidad del agua para sus distintos usos en la provincia de Mendoza. Con el presente reglamento busca preservar y mejorara la calidad de aguas; impedir la contaminación y degradación de todos los cuerpos de agua en la provincia; ordenar, adecuar y regular los vertidos existentes y conservar los ecosistemas acuáticos.

En el reglamento se dan los requerimientos técnicos a los cuales deben ajustarse todos los efluentes que sean objeto de vertido. Debiéndose cumplir las condiciones de calidad, caudal, frecuencia, periodicidad y ubicación del punto de vuelco para cada actividad.

Toda persona, empresa o establecimiento que viertan efluentes en el dominio público debe estar inscriptos en el Registro Único de Establecimiento (RUE) y poseer el Permiso de Vertido otorgado por el Superintendente General de Irrigación. Para esto, tiene que contar con un sistema de tratamiento de efluentes adecuados a fin de cumplir con las condiciones y exigencias impuestas en el reglamento. Caso contrario, todo aquel establecimiento que no presente el correspondiente permiso tiene prohibido el vuelco de sus efluentes al dominio público (Resolución N°778, 1996).

En el Anexo 1 de la resolución, se establecen los parámetros máximos permitidos y tolerables que deben presentar los efluentes antes de ser vertidos al dominio público. Este anexo fue modificado por la resolución N°627/00 y agrega otros sub anexos donde establece los parámetros que deben cumplir los vertidos industriales y cloacales para reúso agrícola (Resolución 627, 2000).

## **5 Materiales y métodos**

### **5.1 Área de estudio:**

Se trabajó sobre la parte hidrofílica del efluente derivado del maquinado de aceituna, tomado de la boca de salida de una industria dedicada a producir aceitunas de mesa en el departamento de Maipú en la provincia de Mendoza. Esta es una cooperativa que recibe aceitunas provenientes de numerosos productores y las transforma en distintos productos, como aceitunas de mesa, negras, descarozadas, rellenas y en salmuera. En la actualidad, dispone todos los efluentes generados en piletas de evaporación las cuales, al no poseer el diseño correcto, funcionan como piletas de acumulación. La empresa únicamente lleva

a cabo un tratamiento primario, separando los sólidos gruesos y demás partículas de gran tamaño.

## 5.2 Desarrollo del experimento:

El experimento tuvo lugar en la Universidad Tecnológica Nacional, en el laboratorio de aguas.

Para su desarrollo se usaron microorganismos de diversas cepas, aisladas del efluente de la misma industria olivícola por Lugones (2018). Estas cepas fueron aisladas en tres diferentes medios de cultivo, diferenciando tres grupos microbianos con distintos requerimientos nutricionales según el agar utilizado:

- Plate count Agar (PC): medio utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas mesófilas (Francisco Soria Melguizo, S.A., 2009)
- Agar EMB (EMB): se utilizó para el recuento de coliformes. Este medio es selectivo para aislar enterobacterias y demás bacilos negativos (Laboratorio Britania S.A., 2015)
- Agar diferencial WL (WL): medio de cultivo aplicado para el aislamiento de hongos, levaduras y algunas bacterias (Condalab, 2019).

En primera instancia, cuando el efluente se encontró a disposición, se llevó a cabo el tratamiento primario mediante el doble filtrado con papel de filtro Whatman 150 mm para asegurar la eliminación de la mayor cantidad de grasa y demás sólidos remanentes. Para facilitar la extracción, se dejó reposar el efluente en heladera durante 3 horas a una temperatura de 3° C, para que los ácidos grasos solidificaran y las fases se separen.

Para realizar el tratamiento secundario, mediante la degradación biológica, se llevaron a cabo 5 tratamientos con dos repeticiones cada uno. Previo, se armó para cada uno de los tres grupos nutricional dos caldos diferenciales con los mismos componentes del medio de cultivo sólido, pero sin el agregado de agar. Estos caldos fueron inoculados con los microorganismos aislados por Lugones y se dejaron en incubación a la temperatura habitual de crecimiento selectivo para cada grupo de microorganismos. Los organismos sembrados en caldos de cultivo con componentes EMB y PC se incubaron en estufa a una temperatura de 38°C por 48 horas y los organismos en WL se mantuvieron a 25°C por 72 horas. Una vez finalizado los períodos de incubación se contó con los 6 Erlenmeyer a utilizar en la bioaumentación.

Para el desarrollo del experimento, se armaron 10 Erlenmeyers con 0,5 l de efluente cada uno. En dos de estos, no se practicó la bioaumentación y se dejaron como testigos al mantener las comunidades de microorganismos nativas del efluente. Los ocho Erlenmeyer restantes, fueron esterilizados en autoclave e inoculados con los microorganismos previamente incubados en los caldos diferenciales (Figura 2). En los cuatro tratamientos donde se llevó a cabo la bioaumentación, se agregó 10 ml de los caldos de cultivos, a fin de contar con un inóculo de alrededor de  $10^{12}$  UFC/ml.



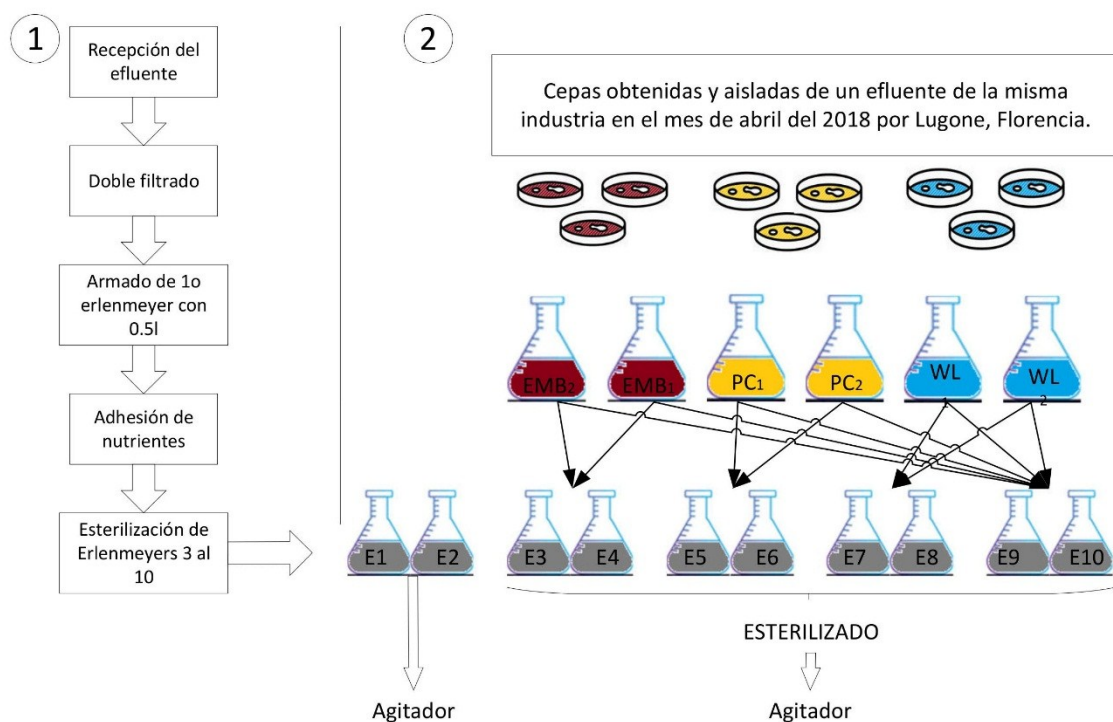


Figura 2: Esquema del procedimiento seguido para el armado de los 10 Erlenmeyers inoculados con caldos enriquecidos Plate count (PC), agar EMB (EMB) y agar diferencial WL (WL). Elaboración propia.

Tabla 2: Identificación de los tratamientos realizados en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria elaboradora de aceitunas maquinadas en el departamento de Maipú, Mendoza.

| Tratamiento | Erlenmeyers | Descripción  |
|-------------|-------------|--|
| Nativo      | 1 y 2       | Efluente sin esterilizar con microorganismo nativos  |
| EMB         | 3 y 4       | Efluente esterilizado, inoculado con microorganismos desarrollados en caldo para microorganismos que crecen en EMB.          |
| PC          | 5 y 6       | Efluente esterilizado, inoculado con microorganismos desarrollados en caldo para microorganismos que crecen en PC.           |
| WL          | 7 y 8       | Efluente esterilizado, inoculado con microorganismos desarrollados en caldo para microorganismos que crecen en WL            |
| Mezcla      | 9 y 10      | Efluente esterilizado, inoculado con microorganismos desarrollados en caldo para microorganismos que crecen en EMB, PC y WL. |

A todos los Erlenmeyer se les agregó una serie de compuestos nutricionales con el fin de acelerar su activación, estos fueron 0.5g de  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ; 0.5g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.5g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0.5g de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5g de  $\text{HPO}_4^{2-}$ ; 0.5g de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; 5g de glucosa, 1g de triple 15® (Solicitud AI INPI N° 20190102807). Mediante estos suplementos se buscó llegar a una relación carbono, nitrógeno y fósforo de 100:5:1. Una vez los Erlenmeyer se encontraron inoculados se los colocó en agitación y se dio por comenzado el experimento en

laboratorio. El ensayo tuvo una duración de 18 días, período en el cual los Erlenmeyer se mantuvieron bajo agitación y oscuridad a 220 rpm mediante un agitador Dragon Lab y a una temperatura estable de 25 °C.

Con el fin de caracterizar los tratamientos a lo largo del experimento se realizó un seguimiento microbiológico que concluyó con la elaboración de las curvas de crecimiento microbiano para cada uno de los tratamientos. Paralelamente se hizo una caracterización del efluente y un seguimiento de diferentes parámetros físico-químicos en los cinco tratamientos planteados. Para esto se tomaron muestras mediante pipetas correctamente esterilizadas; el volumen, la frecuencia de extracción y los Erlenmeyer implicados dependieron del análisis específico realizado. Análisis diarios como pH, conductividad eléctrica y DQO fueron medidos diariamente en la mañana.

### 5.3 Caracterización físico-química

#### 5.3.1 pH

Las muestras fueron tomadas diariamente mediante el pHmetro HACH Pocket Pro. Luego de la recolección de datos de cada Erlenmeyer, la muestra extraída fue devuelta (a fin de no modificar el volumen de manera sustancial) y, entre mediciones, se limpió con agua destilada el pHmetro para no alterar las siguientes mediciones. Acompañando a los datos de pH se colocaron los de temperatura al momento de toma de muestra.

#### 5.3.2 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica y la temperatura fueron tomadas diariamente con electrodo HACH Pocket Pro en cada Erlenmeyer durante todo el experimento. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 5.3.3 Sólidos Totales (APHA, AWWA, WPCF. ,1992).

Son aquellos materiales que se encuentran en las aguas residuales o limpias, de manera disuelta o en suspensión y se obtienen luego de evaporar una muestra mezclada en un horno a 103–105 °C. Se tomó una muestra inicial del efluente al ingresar al laboratorio para realizar la caracterización del efluente.

##### Instrumentos:

- Placa de evaporación de porcelana, platino o vaso alto de sílice con 100 ml de capacidad.
- Horno de mufla para operar a  $550\pm 50$  °C.
- Baño de vapor.
- Desecador.
- Horno de secado para operar entre 103-105 °C.

Nota: Estos materiales e instrumentos serán utilizados para las demás determinaciones de sólidos explicadas a continuación.

##### Procedimiento:

- 1) Previamente secar la placa de evaporación en estufa a una temperatura de 105 ° C durante una hora y colocarlas en desecador a fin de permitir el enfriamiento sin que la placa se humedezca.

- 2) Tomar el peso inicial de las placas una vez que se encuentren a temperatura ambiente.
- 3) Incorporar la muestra bien mezclada en la placa y llevarla a baño de vapor u horno de secado para su evaporación. El volumen de muestra debe proporcionar un residuo entre 2,5 y 200 mg.
- 4) Cuando la totalidad del agua se haya perdido por evaporación, llevar la placa a estufa y someterla a una temperatura de 103-105 °C por lo menos una hora. Dejar enfriar la placa en desecador y pesar.
- 5) Repetir el paso 4) hasta obtener un peso constante y anotar los resultados.

Calculo:  $mg \text{ de solidos totales } /l = \frac{(A-B) * 1000ml/l}{vol.de muestra ml}$

Donde:

A= peso de placa de evaporación(mg) + residuo seco(mg), y

B= peso de placa de evaporación(mg).

### **Sólidos disueltos totales**

Estos sólidos se corresponden con el material remanente luego de llevar a estufa, a 180 °C, una alícuota de efluente previamente filtrado con un filtro estándar de fibra de vidrio.

#### Instrumentos:

Se agregan a los elementos enumerados para Sólidos Totales:

- Embudo de filtro de membrana.
- Crisol de Gooch.
- Dispositivo de filtrado, con reservorio y disco de arandela gruesa como soporte del filtro.
  - Matraz de succión.
  - Horno de secado para operaciones a 180 ±2°C.

#### Procedimiento:

- 1) Previamente calentar la placa de evaporación en horno a una temperatura 180 ±2°C durante una hora y colocarlas en desecador a fin de permitir el enfriamiento sin que la placa gane humedad. Pesar inmediatamente antes de usar.
- 2) Seleccionar el filtro y el tamaño de la muestra, a fin de que el volumen de la alícuota seleccionada proporcione un residuo seco con una masa entre 2.5 y 200 mg. De ser necesario más de 10 minutos para completar el filtrado, debe aumentarse el tamaño del filtro o disminuir el volumen de muestra.
- 3) Filtrar el volumen medido de la muestra bien mezclada en un filtro de fibra de vidrio, lavar con tres volúmenes sucesivos de agua destilada, permitiendo el drenaje completo del filtro entre los lavados, y succionar durante unos tres minutos después de terminar el filtrado. Luego, transferir el producto a una placa de evaporación hasta que se seque en baño de vapor.
- 4) Secar el residuo por lo menos durante una hora en horno a 180 ±2°C, enfriar en un desecador y pesar.
- 5) Repetir el paso 4) hasta obtener un peso constante y anotar los resultados.

Calculo:  $mg \text{ de solidos totales disueltos } /l = \frac{(A-B) * 1000ml/l}{vol.de muestra ml}$

Donde:

A= peso de placa de evaporación(mg) + residuo seco(mg), y

B= peso de placa de evaporación(mg).

### **Sólidos suspendidos totales (SST), fijos (SSF) y volátiles (SSV)**

Los SST son el material remanente luego de filtrar un efluente y someterlo a secado a 103-105 °C. El filtro utilizado debe ser de tipo estándar, de fibra de vidrio. Estos sólidos, al ser sometidos a temperaturas de 550 °C se diferencian en volátiles y fijos. Al ser calcinados a 550±50 °C el residuo resultante corresponde a los SSF y aquellos compuestos que se perdieron durante la calcinación corresponden a los volátiles (Aguinaga, 1996).

Para la determinación de los SST se utilizó el método normalizado (APHA, AWWA, WPCF., 1992) que establece los siguientes pasos:

- 1) Tomar la membrana filtrante y colocarla sobre un crisol de porcelana. Exponerla durante una hora a 103- 105 °C, dejar enfriar y pesar.
- 2) Insertar la membrana filtrante de fibra de vidrio, con un diámetro de poro de 1,2 micrones, en el aparato de filtrado e iniciar la succión.
- 3) Hacer vacío y filtrar un volumen medido de muestra bien mezclada por la membrana filtrante. Lavar con tres volúmenes sucesivos de 10 ml de agua destilada.
- 4) Continuar succionando hasta eliminar todo vestigio de agua, y retirar el agua de lavado.
- 5) Separar la membrana filtrante y colocarla cuidadosamente con el residuo en el crisol.
- 6) Secar en un horno a 103- 105 °C durante una hora, dejar enfriar en desecador y pesar.
- 7) Repetir el paso 6) hasta obtener un peso constante y anotar los resultados.

$$\text{Calculo: } mg \text{ de solidos totales en suspensión/l} = \frac{(A-B) * 1000ml/l}{vol.de muestra ml}$$

Donde:

A= peso del filtro (mg) + residuo seco(mg), y

B= peso de filtro (mg).

### **Para los Sólidos fijos y volátiles (APHA, AWWA, WPCF., 1992):**

- 1) Llevar el residuo obtenido en la determinación de sólidos suspendidos totales a incineración en un horno de mufla a temperatura de 550 ± 50°C por 20 minutos.
- 2) Dejar enfriar la placa al aire hasta que haya disminuido el calor.
- 3) Colocar la placa en desecador para llevar a cabo el enfriamiento final en una atmosfera seca y pesar.
- 4) Repetir los pasos previos hasta obtener un peso constante y registrar los resultados.

$$\text{Calculo: } mg \text{ de sólidos volatiles /l} = \frac{(A-B) * 1000ml/l}{vol.de muestra ml}$$

$$\text{Calculo: } mg \text{ de sólidos fijos /l} = \frac{(B-C) * 1000ml/l}{vol.de muestra ml}$$

Donde:

A = peso de residuo + placa antes de incineración, mg,

B = peso de residuo + placa o filtro después de la incineración, mg, y

C = peso de la placa o filtro, mg

### **Sólidos sedimentables (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

Son los componentes de una suspensión que sedimentan luego de un período de tiempo específico en un cono Imhoff (Aguinaga, 1996). Estos pueden ser determinados en función de un volumen.

#### **Procedimientos:**

- 1) Con la muestra bien mezclada llenar el cono Imhoff hasta la marca 1-1 y comenzar la contabilización del tiempo, teniendo precaución de no agitar el cono ni su líquido.
- 2) Pasado los 15 minutos registrar el volumen del sólido sedimentado.
- 3) A las 2 horas registrar nuevamente el volumen del sólido.

### **5.3.4 Nitrógeno amoniacal por el método titulométrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

El método a elegir para determinar la concentración de amoníaco en una solución depende de dos factores, la concentración y la presencia de interferencias. En el caso de efluentes industriales, donde los valores altos de estos factores imposibilitan la determinación manual directa, es necesario llevar a cabo un paso preliminar, la destilación.

El procedimiento de destilación y titulación se emplea principalmente para concentraciones de N-NH<sub>3</sub> superiores a 5 mg/l.

#### **Destilación**

Con un tampón de borato se tampea la muestra a pH 9,5, a fin de reducir la hidrólisis de los cianatos y compuesto orgánicos nitrogenados. Se destila a una solución de ácido bórico y se determina el amoníaco titulométricamente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> estándar y un indicador mixto o un indicador de pH.

#### **Instrumentos:**

- Aparato de destilación.
- pHmetro.

#### **Reactivos:**

- Agua exenta de amoníaco para preparar todos los reactivos y diluciones.
- Solución tampón de borato.
- Hidróxido de sodio 6N.
- Agua decolorante.
- Agua neutralizante.
- Solución absorbente de ácido bórico puro.
- Solución indicadora de ácido bórico.
- Ácido sulfúrico.

#### **Procedimiento:**

- 1) Para la preparación del equipo se debe añadir 500 ml de agua y 20 ml de tampón borato a un matraz de destilación y ajustar el pH a 9,5 con solución de NaOH 6N. Se añade unas cuentas de vidrio para ayudar a la ebullición, y se utiliza esa mezcla para producir vapor en el aparato de destilación, hasta que en el destilado no aparezcan trazas de amoníaco.

- 2) En la preparación de la muestra se utilizan 500 ml de muestra de cloro o una porción diluida con agua a 500 ml. Cuando la concentración N-NH<sub>3</sub> sea inferior a 100 µg/l, utilizar un volumen de muestra de 1000 ml. Se elimina el cloro residual por adición de agente de cloro, equivalente al cloro residual, en el momento de la obtención. Si fuera necesario, neutralizar a pH aproximado de 7, con ácido o base diluidos mediante un medidor de pH. Añadir 25 ml de solución tampón de borato y ajustar el pH a 9,5 con NaOH 6N mediante un medidor de pH.
- 3) La destilación debe hacerse a una velocidad de 6 a 10 ml/min con el extremo del tubo de salida por debajo de la superficie de la solución ácida receptora. Recoger el destilado en un erlenmeyer de 500 ml que contenga 50 ml de solución indicadora de ácido bórico.

### **Titulación**

#### **Reactivos:**

Para preparar los siguientes reactivos debe utilizarse agua exenta de amoníaco.

- Solución de indicador mixta: Para su preparado deben disolverse 200mg de indicador rojo de metilo en 100 ml de alcohol etílico o isopropílico al 95% y combinarla con otra solución de 100 mg de azul de metileno disueltos en 50 ml de alcohol etílico o isopropílico al 95%.
- Solución indicadora de ácido bórico.
- Titulante estándar de ácido sulfúrico 0,02N.

#### **Procedimiento:**

- 1) Titular el amoníaco del destilado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02N titulante, hasta que el indicador vire a lavanda pálido.
- 2) Blanco: llevar un blanco durante todos los pasos del método y aplicar la corrección necesaria a los resultados.

#### **Cálculos:**

$$mg NH_3 - N/l = \frac{(A - B) * 280}{ml muestra}$$

Donde

A= volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> titulado para la muestra, ml.

B= volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> titulado para el blanco, ml.

### **5.3.5 Nitrito por el método colorimétrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

El método se basa en la formación de un colorante azo púrpura rojizo, siendo apto para la determinación de concentraciones entre un rango de 10 y 1000 µg de NO<sub>2</sub>-N/l.

#### **Instrumentos:**

- Equipo colorimétrico:
  - Espectrofotómetro, para uso a 543 nm, o
  - Fotómetro de filtro.

#### Reactivos:

- Agua exenta de nitrito.
- Reactivo colorante.
- Oxalato de sodio, 0.025M (0.05N).
- Sulfato amónico ferroso, 0.05M (0.05N).
- Solución madre de nitrito.
- Solución intermedia de nitrito.

#### Procedimiento:

- 1) En caso de existir sólidos en suspensión debe filtrarse la muestra a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y ajustarse el pH para que se encuentre entre 5 y 9.
- 2) Añadir 2ml de reactivo de color a 50ml de muestra a una porción diluida a 50 ml y mezclar.
- 3) Esperar entre 10 minutos y 2 horas para medir la absorbancia a 543nm.

#### Calculo:

Prepárese una curva patrón comparando la absorbancia de los patrones con la concentración de nitrito y calcular la concentración en la muestra a partir de la curva.

### **5.3.6 Sulfatos por el método gravimétrico con combustión de residuos (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

El sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) se distribuye ampliamente en la naturaleza y puede presentarse en aguas naturales en concentraciones que van desde unos pocos a varios miles de miligramos por litro. Cuando las concentraciones son mayores a 10mg/l, su concentración debe determinarse por método gravimétricos.

Este método se basa en la precipitación del sulfato en una solución de ácido clorhídrico (HCl) como sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) por adición de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ). La precipitación se realiza cerca de la temperatura de ebullición y, tras un período de digestión, el precipitado se filtra, se lava con agua hasta eliminar  $\text{Cl}^-$ , se somete a combustión o seca y se pesa como  $\text{BaSO}_4$ .

#### Instrumentos:

- Baño de vapor.
- Horno de secado, provisto de control termostático.
- Mufla, con indicador de temperatura.
- Desecador.
- Balanza analítica, capaz de pesar 0,1 mg.
- Filtro: Utilícese uno de los siguientes:
  - Papel de filtro, lavado al ácido, sin cenizas, de acabado duro, con suficiente retención para precipitados finos.
  - Filtro de membrana, con tamaño de poro alrededor de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Aparato de filtración, apropiado para el tipo de filtro seleccionado. (Recúbrase el soporte del filtro de membrana con silicona líquida para evitar que él precipitado se adhiera.)

### Reactivos:

- Solución de indicador rojo de metilo:
- Acido clorhidrico, HCl 1 +1
- Solución de cloruro de bario: Disuélvase
- Reactivo de nitrato de plata-ácido
- Silicona líquida.

### Procedimiento:

- 1) Eliminación de sílice: Si la concentración de sílice supera 25 mg/l, evapórese la muestra hasta casi sequedad en una cápsula de platino sobre baño de vapor. Añádase 1 ml HCl, inclínese y gírese la cápsula hasta que el contacto del ácido con el residuo sea total. Continúese evaporando a sequedad. Complétese el secado en un horno a 180 °C y, si hubiera materia orgánica presente, carbonícese a la llama de un mechero. Humedézcase el residuo con 2 ml de agua destilada y 1 ml HCl, y evapórese a sequedad sobre baño de vapor. Añádanse 2 ml HCl, recójase el residuo soluble con agua caliente y fíltrese. Lávese la sílice insoluble con varias porciones pequeñas de agua destilada caliente. Combínese filtrado y lavados. Deséchese el residuo.
- 2) Precipitación de sulfato de bario: Ajustese el volumen de la muestra clarificada para que contenga aproximadamente 50 mg  $SO_4^{2-}$  en un volumen de 250 ml. Se pueden tolerar concentraciones menores de  $SO_4^{2-}$ , cuando sea imposible concentrar la muestra al nivel óptimo, pero en esos casos límitese el volumen total a 150 ml.
- 3) Ajustese el pH con HCl a 4,5-5,0 utilizando un medidor de pH o el color naranja del indicador rojo de metilo. Añádanse de 1 a 2 ml HCl. Caliéntese a ebullición y añádase lentamente, con agitación, solución templada de  $BaCl_2$  hasta precipitación completa aparente; añádanse entonces unos 2 ml de exceso. Si el precipitado es pequeño, añádase un total de 5 ml de solución de  $BaCl_2$ . Digiérase el precipitado a 80-90 °C, preferiblemente toda una noche, pero no menos de 2 horas.
- 4) Filtración y pesada: Mézclase una pequeña cantidad de pulpa de papel de filtro sin cenizas con el  $BaSO_4$ , transfírase cuantitativamente a un filtro y fíltrese a temperatura ambiente. La pulpa ayuda a la filtración y reduce la tendencia del precipitado a deslizarse. Lávese el precipitado con pequeñas porciones de agua destilada templada hasta que los lavados estén libres de  $Cl^-$  comprobado mediante pruebas con reactivo  $AgNO_3-HNO_3$ . Póngase el filtro y precipitado en un crisol de platino tarado y llévese a ignición a 800 °C durante 1 hora. No dejar que se inflame el papel de filtro. Enfríese en desecador y pésese.

### Calculo:

$$mg \frac{SO_4^{2-}}{l} = \frac{mg BaSO_4 * 411,6}{ml muestra}$$

### **5.3.7 Cloruros por el método potenciométrico (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

El cloruro en forma de ion es uno de los aniones inorgánicos principales en las aguas, tanto naturales como residuales. Este método es apto para muestras turbias o coloreadas cuando el punto final podría ser difícil de observar.

El método se basa en la determinación los cloruros por titulación potenciométrica con solución de nitrato de plata y un sistema de electrodos de vidrio y plata-cloruro de plata. Durante la valoración se utiliza un voltímetro electrónico para detectar el cambio de



potencial entre los dos electrodos. El punto final de la valoración es la lectura del aparato a la que se produce el máximo cambio de voltaje, para un incremento pequeño y constante del nitrato de plata añadido. Para un trabajo más exacto pueden hacerse valoración en blanco, utilizando agua destilada sin cloro durante el procedimiento.

#### Instrumentos:

- Electrodo de vidrio y plata- cloruro de plata.
- Voltímetro electrónico.
- Agitador mecánico, con rotor recubierto de plástico o vidrio.

#### Reactivos:

- Solución patrón de cloruro sódico 0.0141M (0.0141N).
- Ácido nítrico, HNO<sub>3</sub> concentrado.
- Nitrato de plata patrón 0,0141 M (0,0141 N).
- Reactivos para el pre tratamiento:
  - Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
  - Peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.
  - Hidróxido de sodio, NaOH 1N.

#### Procedimiento:

- 1) En la estandarización deben seguirse las especificaciones de los fabricantes de cada uno de los aparatos a utilizar. Tras un tiempo de calentamiento suficiente (10 minutos), equilibrar los componentes eléctricos internos para ajustar el aparato a 0 milivoltios o, si fuera un medidor de pH, a una lectura de pH 7.
  - a. Introducir 10 ml de solución patrón de NaCl en un vaso de precipitados de 250 ml, diluir a 100 ml aproximadamente y añadir 2 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado. Introducir el agitador y los electrodos.
  - b. Ajustar el aparato al rango deseado de milivoltios o unidades de pH. Poner en marcha el agitador.
  - c. Añadir titulante de AgNO<sub>3</sub> patrón y registrar la lectura de la escala tras cada adición. Cuando se aproxime al punto final es importante que los incrementos sean iguales a 0.1 o 0.2ml y a intervalos más prolongados, a fin de determinar el punto final exacto.
  - d. Estimar el volumen de AgNO<sub>3</sub> utilizado en el punto en que se produce el máximo cambio de lectura del aparato por adición unitaria de AgNO<sub>3</sub>.
- 2) Análisis de la muestra:
  - e. Llevar con la pipeta 100 ml de muestra, o una porción que contenga no más de 10 mg de Cl<sup>-</sup>, en un vaso de 250 ml.
  - f. En presencia de interferencias como compuestos orgánicos, sulfito o demás, acidificar la muestra con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizando papel tornasol. Hervir durante 5 minutos para eliminar compuestos volátiles y de ser necesario añadir más H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para mantener el pH. Añadir 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y hervir durante 15 minutos, añadiendo agua destilada sin cloro para mantener el volumen por encima de 50 ml. Diluir a 100 ml, añadir solución de NaOH gota a gota hasta alcalinidad al papel de tornasol y luego un exceso de 10 gotas. Hervir durante 5 minutos, filtrar a un vaso de 250 ml y lavar el precipitado y papel varias veces con agua destilada caliente.
  - g. Añadir HNO<sub>3</sub> concentrado gota a gota hasta acidez al papel de tornasol y luego un exceso de 2 ml. Enfriar y diluir a 100 ml si fuera necesario. Sumergir el agitador y los electrodos y comenzar a agitar. Realizar todos los ajustes

necesarios de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ajustar el selector adecuadamente para medir la diferencia de potencial entre electrodos.

h. Completar la determinación titulando.

Cálculos:

$$mg Cl^- / l = \frac{(A - B) * N * 35.450}{ml muestra}$$

Donde:

A = ml AgNO<sub>3</sub>.

B = ml blanco-

N = normalidad del titulante.

### **5.3.8 Sodio y potasio por el método directo de llama de aire-acetileno (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

Las cantidades traza de potasio pueden determinarse en un fotómetro de llama de lectura directa o de patrón interno a una longitud de onda de 766 nm, y las cantidades traza de sodio a una longitud de onda de 589 nm. Se pulveriza la muestra en una llama de gas y la excitación se realiza en condiciones controladas y reproducibles. La línea espectral buscada se aísla utilizando filtros de interferencia o por medio de una disposición adecuada de la ranura en los dispositivos de dispersión de luz, tales como prismas o rejillas. La intensidad de la luz se mide por un potenciómetro con fototubos u otro circuito apropiado. El método se basa en que la intensidad de la luz a la longitud de onda correspondiente para cada elemento, es aproximadamente proporcional a la concentración del mismo.

Instrumentos:

- Espectrómetro de absorción atómica.

Reactivos:

- Aire purificado y secado a través de un filtro apropiado que elimina aceite, agua y otras sustancias extrañas.
- Acetileno, calidad comercial estándar.
- Agua libre de metales para preparar todos los reactivos y como agua de dilución.
- Solución de calcio.
- Ácido clorhídrico al 1%, 10%, 20%, 1 + 5 y 1 + 1 y concentrado.
- Solución de lantano.
- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- Ácido nítrico, HNO<sub>3</sub>, al 2%, 1 + 1 y concentrado.
- Agua regia, obtenida con tres volúmenes de HCl concentrado y un volumen de HNO<sub>3</sub> concentrado.
- Solución patrón de metales.

Procedimiento:

- 1) Preparación de la muestra: diluir y mezclar 100 ml de muestra o patrón con 10 ml de solución de lantano antes de la atomización.
- 2) Funcionamiento del espectrofotómetro:
  - a. Instalar en el instrumento una lámpara de cátodo hueco para el metal deseado y establecer el dial aproximado de longitudes de onda.

- b. Instalar una cabeza de quemador adecuada y ajustar su posición.
  - c. Conectar el aire y ajustar la velocidad del flujo de aire a lo especificado por el fabricante.
  - d. Conectar el acetileno, ajustar la velocidad de flujo al vapor especificado y encender la llama. Dejar estabilizar la llama unos cuantos minutos.
  - e. Hacer aspirar un blanco integrado por agua desionizada o una solución ácida con la misma concentración de ácido de los patrones y las muestras. Poner a cero el instrumento.
  - f. Hacer aspirar una solución patrón y ajustar la velocidad de aspiración del nebulizador para obtener la sensibilidad máxima.
  - g. Hacer aspirar un blanco de nuevo y volver a poner a cero el instrumento. Hacer aspirar un patrón próximo al medio del intervalo lineal.
  - h. Registrar la absorbancia de este patrón cuando está recientemente preparado. El instrumento está ahora preparado para funcionar.
  - i. Prepárese una curva de calibración trasladando a un papel de gráfica lineal la absorbancia de los patrones en función de sus concentraciones.
- 3) Análisis de muestras: enjuagar el nebulizador aspirando agua con 1,5 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado/l. Atomizar un blanco y ajustar a cero el instrumento. Atomizar la muestra y determinar su absorbancia.

#### Cálculos:

Calcular la concentración de cada metal, en µg/l para elementos traza y en mg/l para metales más corrientes, utilizando la curva de calibración apropiada. Alternativamente, leer en directo la concentración en el instrumento si este va equipado de lectura de salida. Si se ha diluido la muestra, multiplicar por el apropiado factor de dilución.

### **5.3.9 Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (García, Fernández, Fuentes 2015)**

El método se basa en la reacción de compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu en pH básico. De esta reacción se obtiene una coloración azul que puede determinarse espectrofotométricamente a 765nm.

#### Materiales:

- Espectrofotómetro UV-Visible.
- Balanza analítica.
- Centrífuga.
- Agita tubos.
- Matraces aforados de 25ml y 10ml.
- Vasos de precipitado de 50ml.
- Pipetas de 1.5 y 10 ml.
- Tubos de ensayo con tapón.
- Tubos de centrifuga.
- Cubetas de plástico de 3ml para espectrofotometría visible.

#### Reactivos:

- Ácido fáltico.
- Metanol.
- Agua destilada.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.

- Carbonato sódico 7,5%.
- Fluoruro de sodio.

Procedimientos:

- 1) Colocar 100µl del efluente homogeneizado en 5ml de agua destilada
- 2) Hecha la dilución preparar la muestra respetando el siguiente orden:
  - a. 100 µl de la muestra previamente diluida con pretratamiento: centrifugado, filtro común o filtro al vacío.
  - b. 8 ml de agua destilada
  - c. 500 l del Reactivo de Folin-Ciocateu
  - d. 1.5 ml de Carbonato de Sodio
- 3) Esperar unos minutos y llevar a estufa por 30 minutos
- 4) Agitar para homogeneizar.
- 5) Leer absorbancia a 750 nm.

**5.3.10 Dureza por el método titulométrico EDTA (APHA, AWWA, WPCF, 1992)**

La dureza total se corresponde con la suma de las concentraciones de calcio y magnesio expresadas como carbonato de calcio. El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y sus sales de sodio forman un complejo de quelatos solubles al añadirse a las soluciones de algunos cationes metálicos. Al añadir algún tipo de colorante, como negro de eriocromo, a una solución acuosa que contenga iones calcio o magnesio a un pH  $10 \pm 0,1$ , esta toma un color rojo vino. Si se añade EDTA, los iones calcio y magnesio formarán un complejo, y cuando todos estén incluidos en dicho complejo, la solución cambiara al azul, señalando el punto final de la titulación.

Reactivos:

- Solución tampón.
- Agentes complejantes para cuando las aguas presentes iones de interferencia.
- Indicador negro de eriocromo o calmagita.
- Titulante EDTA estándar, 0,01M.
- Solución de calcio estándar.
- Hidróxido de sodio ,1N.

Procedimiento:

- 1) Tratamiento previo de muestras de aguas contaminadas y residuales: utilícese la digestión de ácido nítrico-ácido sulfúrico, o bien ácido nítrico-ácido perclórico.
- 2) Titulación:
  - a. Seleccionar volumen de muestra que no requiera más de 15 ml de reactivo EDTA y realícese la titulación en cinco minutos a partir del momento de la adición del tampón.
  - b. Dilúyase 25 ml de muestra hasta alrededor de 50ml de agua destilada en un recipiente adecuado y añádase entre 1 y 2 ml de solución tampón.
  - c. Añádase una o dos gotas de solución indicadora. Poco a poco añadir titulante EDTA estándar, removiendo continuamente hasta que desaparezcan las últimas matices rojizos. Las últimas gotas añádanse con intervalos entre 3-5 segundos. En el punto final la solución suele ser azul.

Calculo:

$$\text{Dureza (EDTA) como mg de } \frac{\text{CaCO}_3}{\text{l}} = \frac{A * B * 1.000}{\text{ml de muestra}}$$

Donde:

A= ml de titulación para la muestra.

B= mg CaCO<sub>3</sub> equivalente a 1,0 ml de titulante EDTA.

### **5.3.11 Alcalinidad por el método de titulación (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

La alcalinidad se debe a la suma de todas las bases titulables, y se refiere a la capacidad de un agua para neutralizar ácidos. Los iones hidróxidos presentes en una muestra como resultado de la disociación o hidrolisis de los solutos reaccionan con las adiciones de ácidos estándar. La alcalinidad depende del pH de punto final utilizado.

Materiales:

- Titulador electrométrico que pueda ser leído hasta unidades de pH 0,05.
- Vaso de titulación.
- Agitador magnético.
- Pipetas volumétricas.
- Matraces volumétricos de 100, 200 y 1000 ml.
- Buretas de cristal de borosilicato de 10, 25 y 50 ml.
- Botella de poliolefina de 1 l.

Reactivos:

- solución de carbonato de sodio, aproximadamente 0,05N,
- ácidos sulfúrico o clorhídrico estándar 0,1 N,
- ácidos sulfúrico o clorhídrico estándar 0,02 N,
- solución indicadora de verde de bromocresol, indicador de pH 4,5,
- solución indicadora de púrpura de metacresol, indicador de pH 8,3,
- solución alcohólica de fenolftaleína, indicada a pH 8,3,
- tiosulfato de sodio 0,1 N.

Procedimiento:

- 1) Cambio de color: en principio, si existe cloro residual libre, añádase 0,05 ml de solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,1 M, o destrúyase mediante la aplicación de rayos UV. A continuación, añádase 0,2 ml (cinco gotas) de solución indicadora y titúlese sobre una superficie blanca hasta conseguir un cambio de color persistente.
- 2) Determinar el pH de punto final adecuado
- 3) Preparar conjuntamente la muestra y la titulación
- 4) Titular el pH de punto final sin registrar valores intermedios y sin provocar retrasos indebidos
- 5) A medida que se alcanza el punto final, realizar adiciones de ácido más pequeñas, comprobando que el pH alcance el equilibrio antes de añadir más reactivo.

Calculo:

$$\text{Alcalinidad, mg de CaCO}_3/\text{l} = \frac{A * N * 50.000}{\text{ml de muestra}}$$

Donde:

A= ml utilizado de ácido estándar.

N= normalidad de ácido estándar.

### **5.3.12 Azúcares reductores totales por el método del ácido dinitrosalicílico (Avila, Rivas, Hernández, & Chirinos, 2012).**

Según el método de Miller, en presencia de calor el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido por los azúcares reductores, observándose un cambio de color similar al café, con variaciones de amarillo hasta café. Es así que el método se basa en la determinación del cambio de coloración por lecturas de densidad óptica mediante la utilización de un espectrofotómetro a una determinada longitud de onda.

#### Instrumentos:

- Centrífuga.
- Baño María.
- Baño de hielo.
- Espectrofotómetro.
- Tubos Eppendorf.

#### Reactivos:

- Ácido clorhídrico 1M.
- Agua bidestilada.
- Ácido dinitrosalicílico.

#### Procedimiento:

- 1) Colocar 500  $\mu$ L de muestra, previamente centrifugada 10 minutos a 10000 rpm (Sorvall MC 12V DuPont), en tubo Eppendorf.
- 2) Agrega 50  $\mu$ L de HCl 1 M y se lleva 10 minutos a baño maría a 100°C.
- 3) Retirar del calor y llevar 10 minutos en baño de hielo.
- 4) Para la preparación del Blanco se realizan los mismos pasos, pero agregando 500  $\mu$ L de agua bidestilada.
- 5) Al agregar el Reactivo DNS, se forma un complejo amarillo – anaranjado cuya intensidad de color varía de acuerdo a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.
- 6) Proceder a la lectura de las muestras en Espectrofotómetro (SP 2000 – UV Spectrum UV-VIS Spectrophotometer) a 590 nm. Con los Datos de Absorbancia y la Curva patrón correspondiente al Reactivo preparado se calcula la Concentración de Azúcares reductores.

### **5.3.13 Demanda química de oxígeno (IMPEC)**

La DQO es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica susceptible de ser oxidada mediante un oxidante químico. El método se basa en oxidar la muestra en una cantidad, en exceso, pero conocida, de dicromato de potasio en medio ácido y con catalizadores. Luego, el potasio remanente es determinado por espectrofotómetro a una longitud de onda determinada (Aguinaga, 1996).

Actualmente distintas empresas venden viales, que corresponden a tubos que ya contienen los reactivos necesarios para la determinación.

### Procedimientos:

- 1) Precalentar el Termorreactor a 150°C
- 2) Abrir la tapa de un vial de rango apropiado y pipetear 2ml de muestra dentro del vial.
- 3) Preparar un blanco sustituyendo la cantidad de muestra por su equivalente en agua desionizada.
- 4) Invertir los viales varias veces para mezclar el contenido.
- 5) Colocar los viales en Termorreactor y calentar durante 2 Hs. a 150°C.
- 6) Apagar el Termorreactor y dejar enfriar por 20 minutos o hasta que los viales se enfríen a 120°C o menos.
- 7) Agitar los viales y colocar en un rack hasta que se encuentren a temperatura ambiente.
- 8) Leer el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. El valor que muestra el display es igual a la concentración de mg/l de DQO que contiene la muestra.

### **5.3.14 Demanda bioquímica de oxígeno (APHA, AWWA, WPCF. ,1992)**

La DBO corresponde a la cantidad necesaria de oxígeno consumida por los microorganismos para la degradación bioquímica de la materia orgánica presente en la muestra (Aguinaga, 1996).

La prueba mide el oxígeno requerido por los organismos en sus procesos metabólicos al consumir la materia orgánica presente en las aguas residuales o naturales y el método se basa en llenar hasta rebosar un frasco hermético con muestra diluida, e incubarlo a temperatura ambiente durante 5 días a 20 °C. El DBO se calcula mediante la diferencia entre el oxígeno disuelto final e inicial medidos antes y después de la incubación.

### Instrumentos:

- Frasco de 2.7 L color caramelo para preparar el agua de dilución.
- 9 botellas de incubación winkler de vidrio de 300ml para DBO con tapón de vidrio.
- Agitador magnético.
- Medidor de OD (Oxígeno disuelto).
- Probeta de 10ml.
- Pipeta y pipetas graduadas.
- Matraces para diluciones de las muestras.
- Guantes.

### Reactivos:

- Agua destilada,
- 10 ml de Solución tampón de fosfato: nutriente 1 DBO  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- 10 ml Solución de sulfato de magnesio:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- 10 ml Solución de cloruro de calcio:  $\text{CaCl}_2$ .
- 10 ml Solución de cloruro férrico:  $\text{FeCl}_3$ .
- 0.5ml Piridina.
- 10 ml de siembra efluente cloacal en lo posible.
- Solución sulfocrómica para desinfección.

### Procedimiento:

- 1) Conociendo la DQO de la muestra, calcular la cantidad de muestra necesaria para realizar la  $\text{DBO}_5$ . Es igual a  $2400/\text{DQO} = X\text{ml}$  de muestra. Llevar ese volumen a

- unidades posibles para ser tomadas con la pipeta. Realizar las diluciones necesarias y tomar dos volúmenes, el calculado y la mitad de ese valor en cada muestra.
- 2) Preparar el agua testigo o agua de dilución del ensayo. En el botellón caramelo, luego de enjuagarlo reiteradas veces, se coloca 2L aproximadamente de agua destilada y se le agrega 10ml de cada uno de los reactivos (solución tampón de fosfato, solución de sulfato de magnesio, solución de cloruro de calcio y solución de cloruro férrico). Luego, bajo campana y con pipeta se añade 0.5ml de piridina. Se tapa y agita. Por último, se añade 10ml de muestra cloacal y se enrasa hasta el cuello de la botella con agua destilada y se homogeniza.
  - 3) Enjuagar las botellas de incubación para la DBO, de 300 mL de capacidad. Lavarlas con agua, enjuagarlas varias veces, por último, enjuagar con agua destilada y escurrirlas antes de su uso. De las 9 botellas 2 se usan como blanco, a las cuales se las llama Agua 1 y Agua 2 en ellas se coloca solamente 300 ml de agua de dilución. Todas las muestras se hacen por duplicado, una con el volumen calculado y la otra con la mitad. Cada botella se llena hasta la mitad con agua de dilución, se añade el volumen de muestra correspondiente y se enrasa con agua de dilución. Se debe rotular cada botella colocando: número de muestra, dilución de la muestra y volumen colocado de la muestra dentro de la botella,
  - 4) Se mide el OD en cada botella. Se enciende el medidor de OD y se procede a hacer dos lecturas con agua destilada en el capuchón para calibrar el equipo, se anota su valor y temperatura. Luego se realiza la medición de OD y temperatura a las 9 botellas, debe controlar que el oxímetro quede vertical, que no permita entrada de oxígeno y que no haya burbuja de aire en la punta del mismo. Debe enjuagarse con agua destilada entre medición y medición tanto el imán usado en la agitación magnética como el oxímetro.
  - 5) Dejar en remojo con solución sulfocrómica por 24hs a la botella caramelo y luego de hacer la lectura final del ensayo hacer lo mismo con las botellas de winkler.
  - 6) Luego de cinco días, en los cuales se dejaron las botellas en incubación con un sello hidráulico, se lee el OD en todas las botellas, el agua 1 y 2 no debería tener gran consumo de oxígeno.

Calculo:

$$DBO_5 mg/l = \frac{D1 - D2}{P}$$

Donde:

D1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de su preparación, mg/l.

D2 = OD de la muestra diluida después de 5 días de incubación a 20 °C, mg/l.

P = fracción volumétrica decimal de la muestra utilizada.

### **5.3.15 Índice de Biodegradabilidad**

La demanda química y biológica de oxígeno son parámetros muy importantes para determinar la susceptibilidad de que un efluente sea biológicamente degradado. Estos determinan la cantidad de compuestos presentes en el efluente susceptibles de ser degradados por agentes químicos y biológicos, y su razón indica el índice de biodegradabilidad del efluente.

$$\text{Índice de biodegradabilidad} = \frac{DBO_5}{DQO}$$



A medida que la  $DBO_5$  se iguala a la DQO, el índice tiende a uno, indicando que la mayoría de la materia orgánica se corresponde con compuesto carbonados, nitrogenados y algunos compuestos químicos reductores, todos estos son susceptibles de ser consumidos por microorganismo y es por eso que el efluente es considerado como biodegradable. En cambio, a medida que el índice tiende a 0, debido a valores de DQO elevados en comparación con los de  $DBO_5$ , el efluente es considerado no biodegradable (Martínez Sosa, 2010). Efluentes que presentan un índice de biodegradabilidad menor a 0,2 son considerados poco biodegradables, aquellos que se encuentran entre 0,2 y 0,4 se considera biodegradables y aquellos efluentes que presentan valores mayores a 0,4 son muy biodegradables (Martínez Sosa, 2010).

## 5.4 Análisis microbiológico

A fin de seguir el crecimiento microbiano y corroborar el crecimiento y actuación de los diferentes grupos nutricionales analizados, se extrajo un mililitro de muestra de los tratamientos en periodos regulares de tiempo. Al inicio del experimento se extrajo la muestra correspondiente al Tiempo 0, luego se tomaron muestras cada dos horas y media a partir de la activación de los Erlenmeyers durante las primeras 24. El tiempo de activación se correspondió con la observación de burbujeo en la superficie de los erlenmeyer que indica una actividad microbiana intensa.

Tiempo 0= Inicio del experimento 26/11/2018 a las 9:45 am.

Tiempo 1= Activación de cada erlenmeyer.

Tiempo 2-10=  $T_x = T_{x-1} + 2^{\circ}30'$ .

### 5.4.1 Recuento en placa de unidades formadoras de colonias por el método de vertido en placa

El método se basa en el supuesto de que aquellas células viables, capaces de dividirse y formar descendencia crecerán en placas de agar y se dividirán para formar una colonia. El número de colonias presentes en el agar, luego de los períodos de incubación, reflejará el número de células viables de la muestra, denominadas unidades formadoras de colonias (Madigan et al., 2015).

Es importante que el número de colonias que se desarrolle en las placas no sea demasiado alto ni bajo. Ya que, en aquellas placas con un alto número de colonias es posible que algunas células se hayan visto imposibilitadas a dividirse debido a la competencia, además, algunas colonias podrían fusionarse y ocasionar errores en las interpretaciones de los resultados. En las placas con un recuento pequeño, la significancia estadística será baja. Por estos motivos, el recuento se realiza cuando la cantidad de colonias en las placas se encuentre entre 30 y 300, este intervalo es el más válido a efectos estadísticos (Madigan et al., 2015). Para lograr que las colonias se encuentren dentro de estos valores, es prudente realizar diluciones de las muestras y utilizar, de los resultados, aquellas placas que presenten entre 30 y 300 colonias luego del periodo de incubación correspondiente.

#### Instrumentos:

- Cámara de flujo laminar.
- Estufa de incubación.
- Medio de cultivos WL, EMB y PC estériles,
- Muestras de los erlenmeyer correspondientes a los distintos tiempos a analizar.
- Pipetas automáticas de 0.9 y 0.1 ml, con puntas descartables estériles.

- Tubos Eppendorf con puntas estériles.
- Agua destilada estéril.
- Placas Petri de vidrio de 100mm estériles.
- Vortex.

Para las muestras obtenidas se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y/o 1:10000 dependiendo del medio de cultivo correspondiente.

Procedimiento para realizar las diluciones sucesivas:

- 1) Esterilizar correctamente la mesada de trabajo.
- 2) Acomodar los tubos Eppendorf necesarios en una gradilla, para evitar confusión en el armado de diluciones y en el posterior vertido en placa.
- 3) Colocar todos los elementos a utilizar en la mesada y esterilizar con UV.
- 4) Colocar 0,9 ml de agua destilada estéril en todos los tubos Eppendorf.
- 5) Tomar uno de los tubos con muestras, homogeneizar y extraer 0,1ml y colocarlo en el tubo Eppendorf correspondiente a la dilución 1:10.
- 6) Desechar la punta utilizada, tomar una nueva y pasar 0,1ml de la dilución realizada y homogeneizada al tubo Eppendorf de la siguiente dilución.
- 7) Repetir el paso 6 hasta hacer todas las diluciones necesarias de todas las muestras.

Una vez se tuvieron las diluciones de las muestras se procedió a sembrarlas en el medio de cultivo correspondiente según cada tratamiento, como se observa en la Tabla 3. Se tomó 0,1 ml de la dilución seleccionada y se la colocó en una caja Petri estéril. Posteriormente se agregó el medio de cultivo fundido, justo antes de que llegue a su temperatura de solidificación y se mezcló con movimientos suaves en ocho (Madigan et al., 2015).

Para la preparación de los medios de cultivo se reemplazó el 25% del agua destilada por efluente filtrado.

*Tabla 3: Agar utilizados para sembrar las diluciones obtenidas de los distintos erlenmeyers y realizar el recuento de UFC*

| Tratamiento | Agares donde se sembró y se realizó el recuento. |
|-------------|--|
| Nativo      | EMB, PC y WL                                     |
| EMB         | EMB  |
| PC          | PC   |
| WL          | WL   |
| Mezcla      | EMB, PC y WL                                     |

Procedimiento para la siembra por vertido en placa:

- 1) Fundir los medios de cultivo evitando la ebullición y dejar que su temperatura baje hasta casi la temperatura de solidificación.
- 2) Pipetear 0,1 ml de la dilución correspondiente en una caja Petri.
- 3) Agregar el agar en la caja Petri y distribuir con suaves movimientos en 8.
- 4) Rotular y llevar a incubar en posición inversa según las especificaciones de cada medio de cultivo.

Luego de los tiempos de incubación se realizó el recuento de colonias en aquellas cajas Petri que presentaran un rango adecuado (entre 30 y 300 colonias).

Calculo:

$$\text{Unidades formadoras de colonias(UFC)/ml} = \frac{\text{colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de siembra}}$$

#### **5.4.2 Aislamiento- obtención de cepas puras**

La siembra por estrías es un método rápido y fácil para el aislamiento de aquellos organismos que forman colonias en placas de agar. El método se basa en tomar una colonia, aislarla y resembrarla varias veces seguidas, asegurando la obtención de un cultivo axénico (Madigan et al., 2015).

Materiales:

- Mechero Bunsen
- Asa de arito.
- Cajas de Petri estériles.
- Medios de cultivos WL, EMB y Pc estériles.
- Estufa de incubación.
- Cajas Petri con las colonias obtenidas del recuento.

Procedimiento:

- 1) Esterilizar adecuadamente la mesada de trabajo, prender el mechero y trabajar en un radio de 15 cm alrededor del mismo (zona aséptica).
- 2) Fundir completamente los agares evitando la ebullición.
- 3) Plaques las cajas de Petri y dejar solidificar.
- 4) Esterilizar el asa de siembra llevándolo hasta incandescencia en el mechero y dejar enfriar unos segundos.
- 5) Abrir una caja sembrada y tomar una colonia con el asa.
- 6) Realizar estrías sucesivas en la caja Petri que corresponda.
- 7) Rotular y continuar con la siguiente colonia morfológicamente diferente, repitiendo los pasos 4, 5, 6 y 7 hasta que todas las colonias estén aisladas.
- 8) Llevar a incubar en posición invertida.

Una vez pasado el tiempo de incubación se revisaron las colonias aisladas y se repitió este procedimiento 3 o 4 veces para asegurar que las colonias sean puras.

#### **5.4.3 Preservación mediante congelamiento**

Una vez finalizado el experimento, se procedió al almacenamiento de las cepas aisladas bajo condiciones que permiten preservarlas hasta que se requieran para su identificación, ya que no fue posible realizarla, debido al presupuesto limitado.

La criopreservación es un método que permite preservar microorganismos por periodos de tiempo prolongados a temperaturas de hasta -80° C. Al someter a temperaturas de congelamiento, se promueve la formación de cristales de hielo en la suspensión y dentro de la célula, lo que puede ocasionar la ruptura de membranas celulares ocasionando la muerte. Los crioprotectores son agentes químicos que protegen a los microorganismos de los daños que pueden tomar parte en el congelamiento y permiten la supervivencia hasta su descongelamiento y utilización (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, 2018).

Instrumentos:

- cepas por preservar, provenientes de un cultivo puro,
- asa de arito,
- mechero Bunsen,
- caldo de enriquecimiento líquido estéril,
- estufa de incubación que funcione a 38 °C,
- tubos de plástico esterilizables, resistentes a la congelación, con cierre hermético,
- perlas de vidrio,
- glicerol al 30%,
- autoclave y
- heladera con temperatura de -80°C.

Procedimiento:

- 1) Esterilizar adecuadamente la mesada de trabajo y trabajar en la zona aséptica determinada por el mechero Bunsen.
- 2) Esterilizar el asa hasta su incandescencia, tomar una colonia pura de la placa Petri e introducirla en un tubo con caldo de enriquecimiento líquido estéril. Repetir con todas las placas y rotular los tubos.
- 3) Incubar por 48 horas a 38 °C.
- 4) Colocar el glicerol y las perlas en los tubos con cierre hermético y esterilizar en autoclave.
- 5) Tomar con el asa estéril un volumen del tubo con caldo de enriquecimiento y sembrar en un tubo con glicerol y perlas. Rotular el tubo. Repetir para cada cepa.
- 6) Colocar los tubos en la heladera correctamente identificados.

## 6 Resultados y discusiones

### 6.1 Caracterización inicial del efluente

En la Tabla 4 se observaron los valores obtenidos de diferentes parámetros contaminantes del efluente. Estos fueron comparados con los máximos permitidos y tolerables determinados por la resolución 778 del 1996 y sus modificaciones.

*Tabla 4: Caracterización de la parte líquida de un efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.*

| Parámetro                     | Unidad | Valor Inicial del efluente | Máximo Permitido* | Máximo Tolerable* |
|-------------------------------|--------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Conductividad Eléctrica       | µS/cm  | 16250                      | 1400              | 2000              |
| Sólidos sedimentables 15'     | MI‰ml  | 12                         | 0,50              | 1                 |
| Sólidos sedimentables 120'    | MI‰ml  | 30                         | <1                | 10                |
| Sólidos Totales               | mg/l   | 7854                       |                   |                   |
| Sólidos Disueltos             | mg/l   | 7531                       |                   |                   |
| Sólidos suspendidos Totales   | mg/l   | 72,33                      | 40                | 80                |
| Sólidos suspendidos Fijos     | mg/l   | 0                          |                   |                   |
| Sólidos suspendidos Volátiles | mg/l   | 72,33                      |                   |                   |

| Parámetro           | Unidad                             | Valor Inicial del efluente | Máximo Permitido* | Máximo Tolerable* |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Cloruro             | Ppm                                | 491                        | 300               | 500               |
| Nitritos            | mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l | 0,33                       | 0,30              | 1                 |
| Nitrógeno amoniacal | mg NH <sub>3</sub> /l              | 76,43                      | 3                 | 6                 |
| pH                  |                                    | 5                          | 6,5-8,5           | 5,5-9             |
| Sodio               | mg/l                               | 2512                       | 250               | 400               |
| Sulfato             | mg/l                               | 722                        | >1                | 1                 |
| DQO                 | mgO <sub>2</sub> /l                | 13185                      | 75                | 250               |
| DBO <sub>5</sub>    | mgO <sub>2</sub> /l                | 4165                       | 30                | 120               |
| Potasio             | mg/l                               | 782                        |                   |                   |
| Alcalinidad         | mg CaCO <sub>3</sub> /l            | 385,39                     |                   |                   |
| Dureza              | mg CaCO <sub>3</sub> /l            | 3397,95                    |                   |                   |

\* Concentraciones establecidas por la Resolución 778/96 y sus modificaciones para el vertido de líquidos a cuerpos receptores

A lo largo del experimento se analizaron concentraciones de diversos parámetros contaminantes del agua según la legislación del DGI que regula el vuelco de líquidos a cuerpos receptores. Aquellos parámetros que se encontraron dentro de valores aceptables fueron:

- La temperatura, se correspondió con la ambiental ya que en ninguno de los procesos de elaboración se hace uso de agua a temperaturas extremas.
- Cloruros, con una concentración de 491 ppm. La presencia de este anión deriva del uso de salmueras (NaCl) durante la fermentación.
- Los Nitritos, presentaron una concentración de 0.33mg/l.
- Los SST, presentaron una concentración de 72.33 ± 6 mg/l, representada en su totalidad por SSV. La inexistencia de SSF, podría deberse a la riqueza en grasas fácilmente volatilizables característica de este tipo de efluente.

Por otro lado, existieron parámetros que no se posicionaron dentro de los máximos permitidos ni tolerables, estos fueron:

- El pH, con un valor de 5.
- La conductividad eléctrica, que superó ampliamente al permitido con una concentración de 16250 µS/cm.
- Los sulfatos, con una concentración de 722mg/l pueden causar problemas por su consumo en animales y humanos. Valores elevados de sales sulfatadas, especialmente de magnesio y calcio pueden causar diarrea a partir de los 600 mg/l y generar deshidratación (D'angelot, 2017). A su vez, podrían ocasionar daños en estructuras por la corrosión de tuberías de cobre y, de existir zonas anóxicas, las bacterias sulforeductoras utilizarían el sulfato como aceptor de electrones liberando sulfuro de hidrogeno, gas corrosivo y altamente tóxico. Este gas tiene un olor característico a huevo podrido el cual se notó en al manipular el efluente (Madigan et al., 2015).
- El Na, su valor alto de 2512 ± 210,40 mg/l se debió a la utilización de lejía y salmuera en los procesos de cocido y fermentación de las aceitunas de mesa
- El nitrógeno amoniacal, presentó una concentración de 76,43 ± 3,69 mg/l. La elevada presencia de amonio. en los efluentes podría deberse a la descomposición de la materia orgánica, el amonio está compuesto por el amoniaco o amonio no

ionizado ( $\text{NH}_3$ ) y el amonio ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ) que en solución acuosa se encuentran en equilibrio. Esto podría ocasionar problemas de toxicidad, ya que el efluente presentó valores elevados de materia orgánica, y la interconversión entre la forma ionizada menos toxica ( $\text{NH}_4^+$ ) y la no ionizada más toxica ( $\text{NH}_3$ ), depende del pH, temperatura y oxígeno disuelto. Bajo condiciones normales el amonio no ionizado representa alrededor del 0.6% del amonio total, pero a medida que aumenta el pH y la temperatura, la forma no ionizada puede ascender hasta representar el 72% del amonio total (Calvachi & Ortiz, 2013).

- Los sólidos sedimentables, con valores de 12 ml‰ml luego de 15' y 30 ml‰ml luego de 120'.
- La  $\text{DBO}_5$ , presentó un valor inicial de 4195 mg/l, en el día 2 de 2070 mg/l y en el día 5 de 30 mg/l, así se logró una reducción mayor al 99%.
- La DQO, con una concentración de 13185mg/l.

Así mismo, otros parámetros que no figuran en la legislación del DGI fueron analizados:

- El potasio presentó una concentración de  $782 \pm 84,50$  mg/l, este es un macronutriente de gran importancia para el correcto desarrollo de vegetales del suelo y, a pesar de que la toxicidad de este elemento no existe como tal en el suelo, los efectos negativos se relacionan con los resultados antagonistas que traen aparejados la deficiencia de algún otro nutriente
- La alcalinidad con una concentración de 385,39mg/l tiene la potencialidad de revestir tuberías y calentadores de agua como consecuencia de la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Valores satisfactorios de este parámetro se encuentran entre 100 y 200 mg de  $\text{CaCO}_3$ /l, ya que valores menores son potencialmente corrosivos y mayores presentan potencial de revestimiento.
- La dureza del efluente fue de 3397,95 mg  $\text{CaCO}_3$ /l, por ello se consideró al líquido como muy duro. Este valor sobrepasó al estipulado por el código alimentario argentino, que establece una dureza total máxima de 400mg de  $\text{CaCO}_3$ /l (Argentino, C.A.,1969).
- El valor de sólidos totales en el efluente fue de 7854 mg/l. La gran mayoría, 7531 mg/l, correspondieron a sólidos disueltos, que sobrepasaron en 5 veces al valor permitido por el Código Alimentario Argentino para agua potable (CA,1969).

Mediante el valor de la DQO y  $\text{DBO}_5$  se calculó el índice de biodegradabilidad del efluente. Este valor fue de 0.31, valor considerado por Martines Sosa (2010) como biodegradable, pero no tanto como el obtenido por Lugones (2018), cuyo efluente presentó un índice de biodegradabilidad de 0.89.

## 6.2 Ensayo de biorremediación de los diferentes tratamientos

### pH:

Los tratamientos comenzaron con valores medios de  $5,4 \pm 0,129$ . Estos se encontraron fuera del rango máximo permitido por la legislación, que exige valores de pH entre 6.5 y 8.5. Así mismo, una vez finalizado el experimento, los tratamientos se encontraron en valores de pH entre 6.5 y 6.8, posicionándose dentro de los valores máximos permitidos por la resolución 778 del Departamento General de Irrigación.

En la Ilustración 3, se observó en los primeros días, una disminución abrupta del pH que podría deberse a la acidificación del medio ocasionada por la respiración de los microorganismos aerobios mediante el ciclo de Krebs (Nelson, 2015). Luego de esta baja,

entré los días 1 y 3, comenzó la neutralización del pH, posiblemente por la producción de sustancias de tipo proteica de carácter básico que se generan durante el crecimiento microbiano, como son las histonas (Curtis & Schnek, 2008). En los días centrales del experimento, se observó una mayor variabilidad entre los tratamientos, mientras que a partir del día 11 todos presentaron valores semejantes, con una media de  $6.23 \pm 0.302$ . En el día 18, el valor medio para todos los tratamientos fue de  $6,6 \pm 0,095$ .

La variabilidad del pH entre los tratamientos es alta en los días centrales y disminuye hacia los extremos. Al analizar la desviación estándar, se observó que los valores mínimos se correspondieron con los días 0, 17 y 18, con valores de 0.129, 0.133 y 0.095 respectivamente.

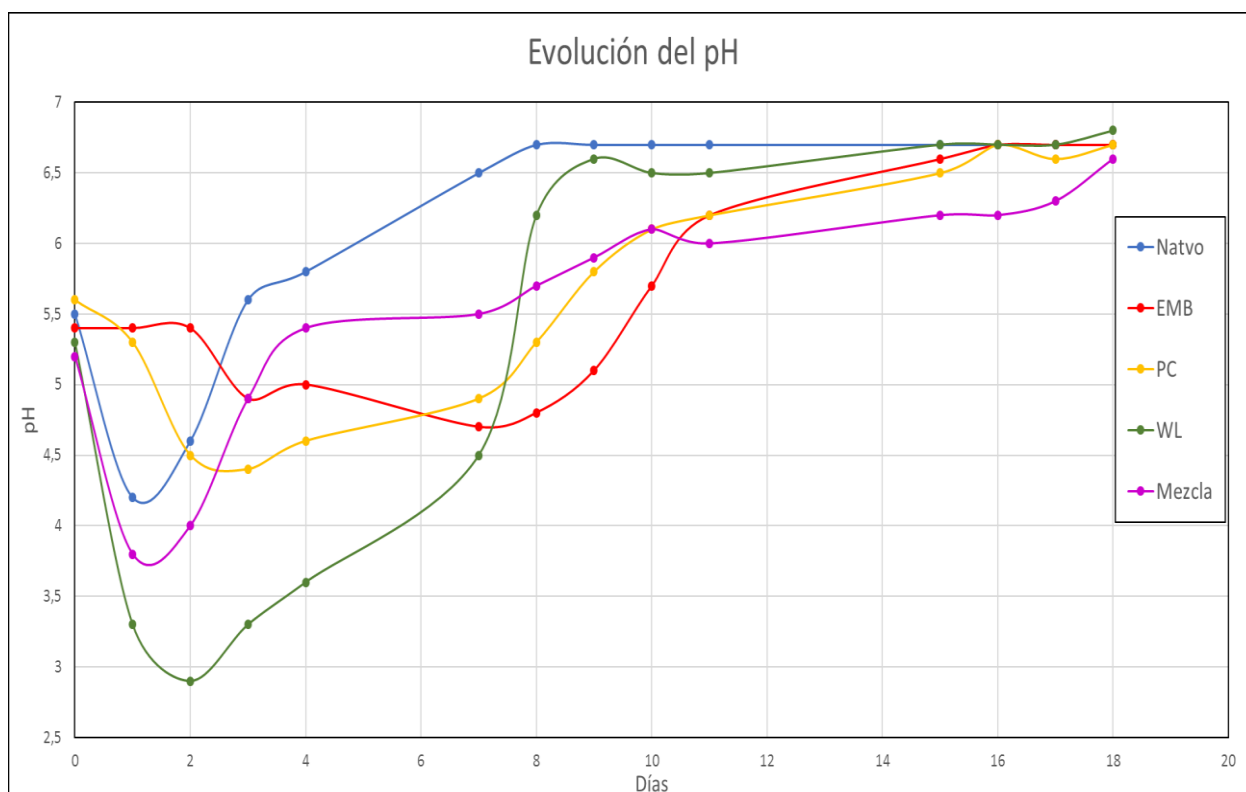


Ilustración 3: Evolución de pH para los tratamientos Natvo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia

### Conductividad eléctrica:

Al inicio del ensayo, como se observó en la Ilustración 4, los tratamientos presentaron un valor medio de  $25764 \mu\text{S}/\text{cm}$  y al finalizar de  $20829 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Ambos valores se encontraron muy por encima del máximo permitido por la legislación, que exige un valor de  $1400 \mu\text{S}/\text{cm}$  para el vertido de aguas a cuerpo receptores. Así mismo, se observó una leve tendencia a la disminución en todos los tratamientos, logrando en los 18 días del experimento una reducción del 19 %.

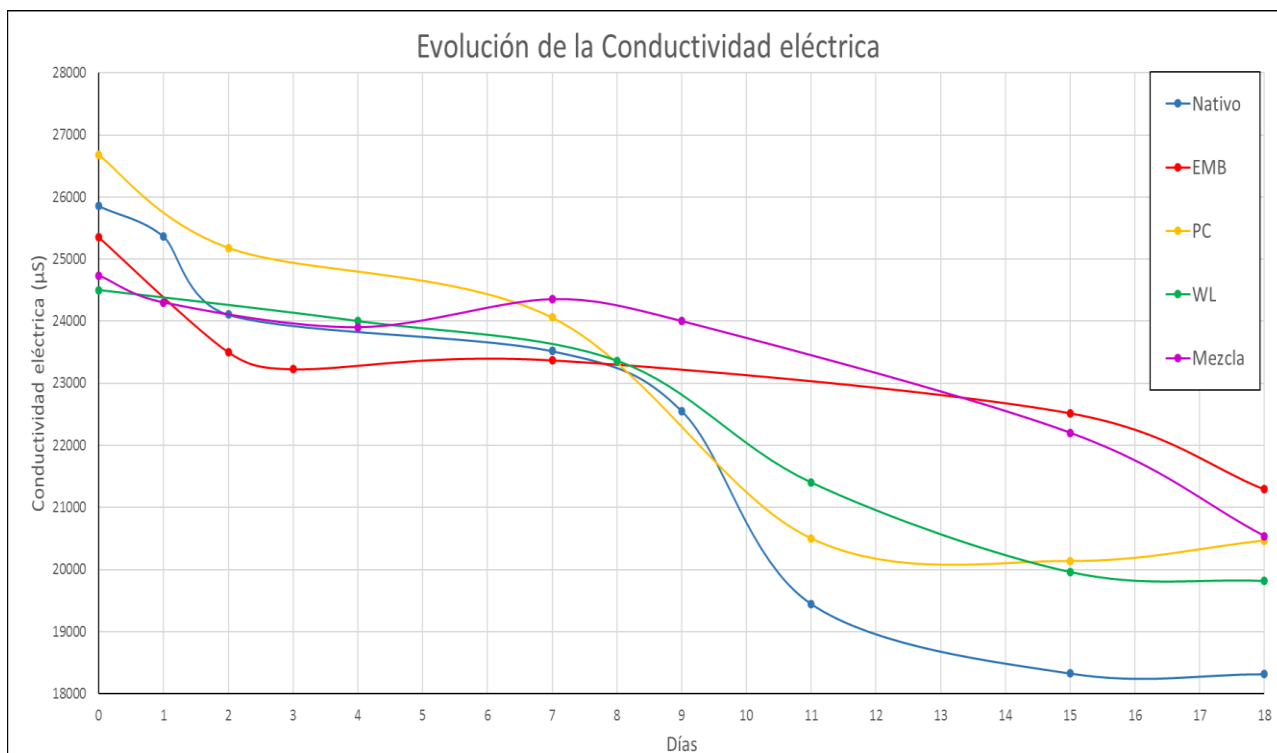


Ilustración 4: Evolución de la conductividad eléctrica para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia.

### Sólidos suspendidos totales

Al finalizar el experimento, se analizó la concentración de SST en los tratamientos y se observó un incremento en su concentración respecto al valor obtenido para el efluente. Los valores finales de SST se encontraron entre un rango de 1590 y 568 mg/l. La proporción de SSF también aumentó, ya que al finalizar el experimento los SST estaban compuesto por un  $35 \pm 4\%$  de SSF y un  $65 \pm 4\%$  de SSV, sin considerar al tratamiento WL, en el cual la proporción de SSF fue baja, de 12% (Tabla 5). Este aumento en la concentración de SST y la aparición de SSF podría deberse a la incorporación de sales inorgánicas como fuente nutricional.

Tabla 5: Valores de Sólidos Suspendidos Totales, Fijos y Volátiles obtenidos de los tratamientos al finalizar el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.

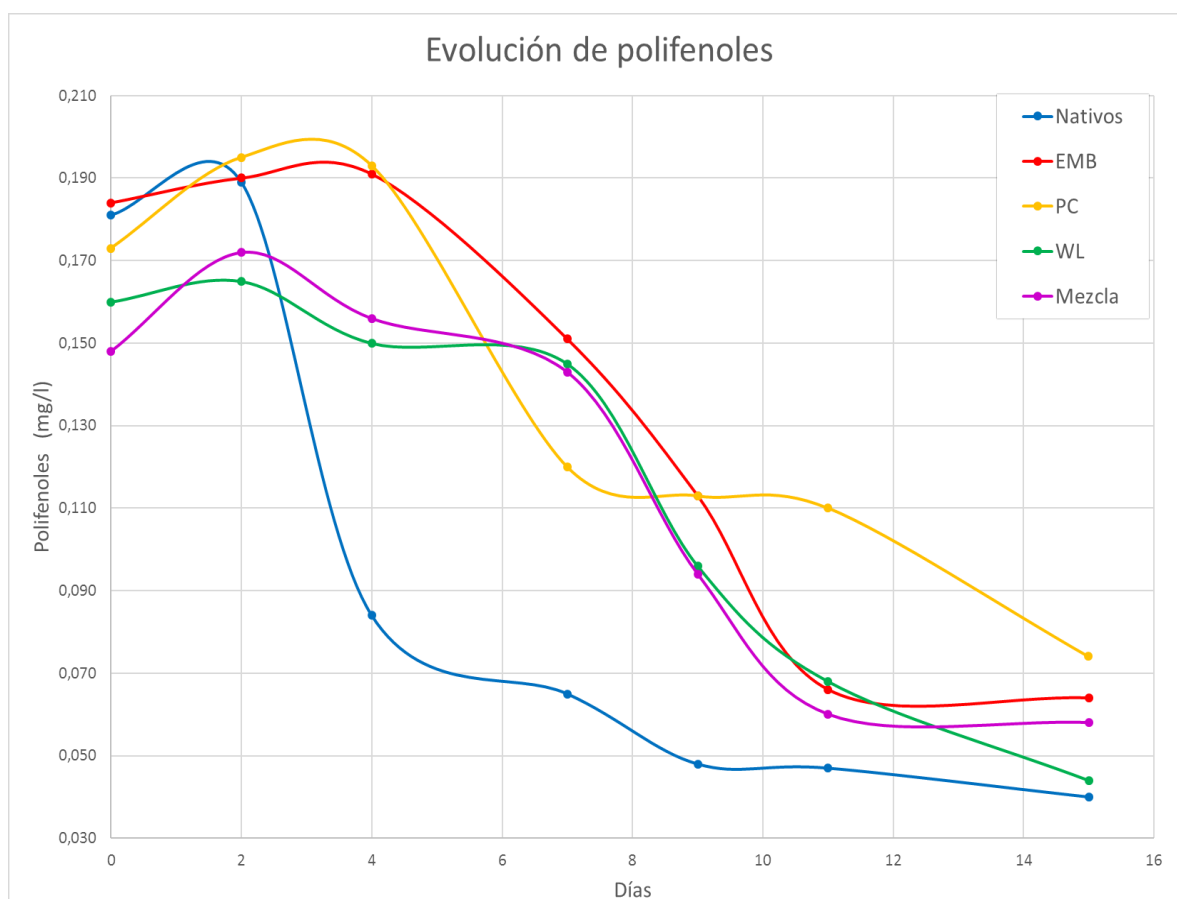
| Tratamiento | SST     | SSF    | SSV    | Proporción de SSF | Proporción de SSV |
|-------------|---------|--------|--------|-------------------|-------------------|
| Nativo      | 1590    | 640    | 950    | 40%               | 60%               |
| EMB         | 1277,42 | 451,61 | 825,81 | 35%               | 65%               |
| PC          | 690     | 215    | 475    | 31%               | 69%               |
| WL          | 568,18  | 68,18  | 500    | 12%               | 88%               |
| Mezcla      | 765     | 260    | 505    | 34%               | 66%               |



## Compuestos fenólicos

El valor promedio de polifenoles para los tratamientos al inicio del experimento fue de  $0.1692 \pm 0.015$  mg/l, este valor sobrepasó, al máximo tolerable de 0.1mg de fenoles/l de efluente establecido por la legislación para el vertido de líquidos a cuerpos receptores. Los diferentes tratamientos sufrieron una reducción de estos compuestos a lo largo del ensayo, en algunos se dio de forma más rápida, pero todos presentaron valores finales similares por debajo del máximo tolerable con valores de  $0.056 \pm 0.014$  mg/l. Así mismo, los tratamientos Nativo y WI presentaron valores por debajo del máximo permitido. Esto señaló que la presencia de polifenoles en el efluente no actuó como antagonista para los microorganismos, ya que estos se desarrollaron en su compañía y disminuyeron su concentración.

Al calcular la desviación estándar para cada uno de los días, a fin de vislumbrar las diferencias de los tratamientos con las medias diaria a lo largo del experimento, se notó que fueron mínimas para los días 0, 2 y 15, mientras que, en los días centrales, la variación de los datos respecto a la media fue mayor. Como se ve en la Ilustración 5, los valores de polifenoles iniciales y finales presentaron baja variabilidad, mientras que los centrales alta. Esto podría indicar comportamientos distintos de los diferentes grupos nutricionales actuantes a lo largo del experimento, afirmando que, sin importar las variaciones centrales dependiente de cada grupo nutricional, todos parten y llegan a valores similares.



*Ilustración 5: Evolución de la concentración de polifenoles para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia*

### Azúcares reductores:

La concentración de azúcares se redujo, en las primeras 24 horas del experimento, de 5 g/l hasta trazas, debido a que son azúcares de muy fácil consumo y muy accesible para los microorganismos que podrían haberse encontrado en crecimiento de tipo exponencial (Figura 6)( Maldonado M. comunicación personal, 2020).

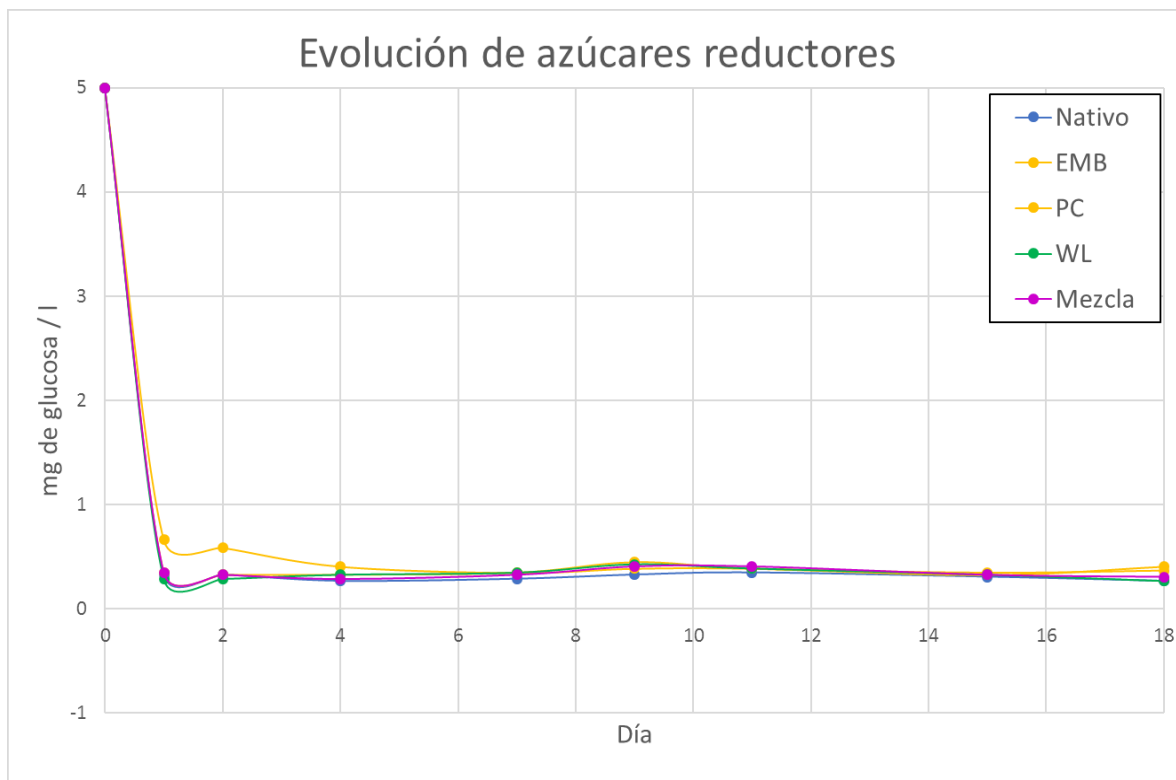


Figura 6: Evolución de la concentración de azúcares reductores para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.

### Demanda química y biológica de oxígeno:

En la Ilustración 7 se observó la evolución de los tratamientos según sus valores de DQO. Las concentraciones iniciales se encontraron entre 12000 y 15000 mg de O<sub>2</sub>/l de efluente y a lo largo del experimento los valores disminuyeron paulatinamente hasta llegar, en el día 18, a una concentración media de 1886 mg de O<sub>2</sub>/l. Se logró una reducción de la DQO del 85%.

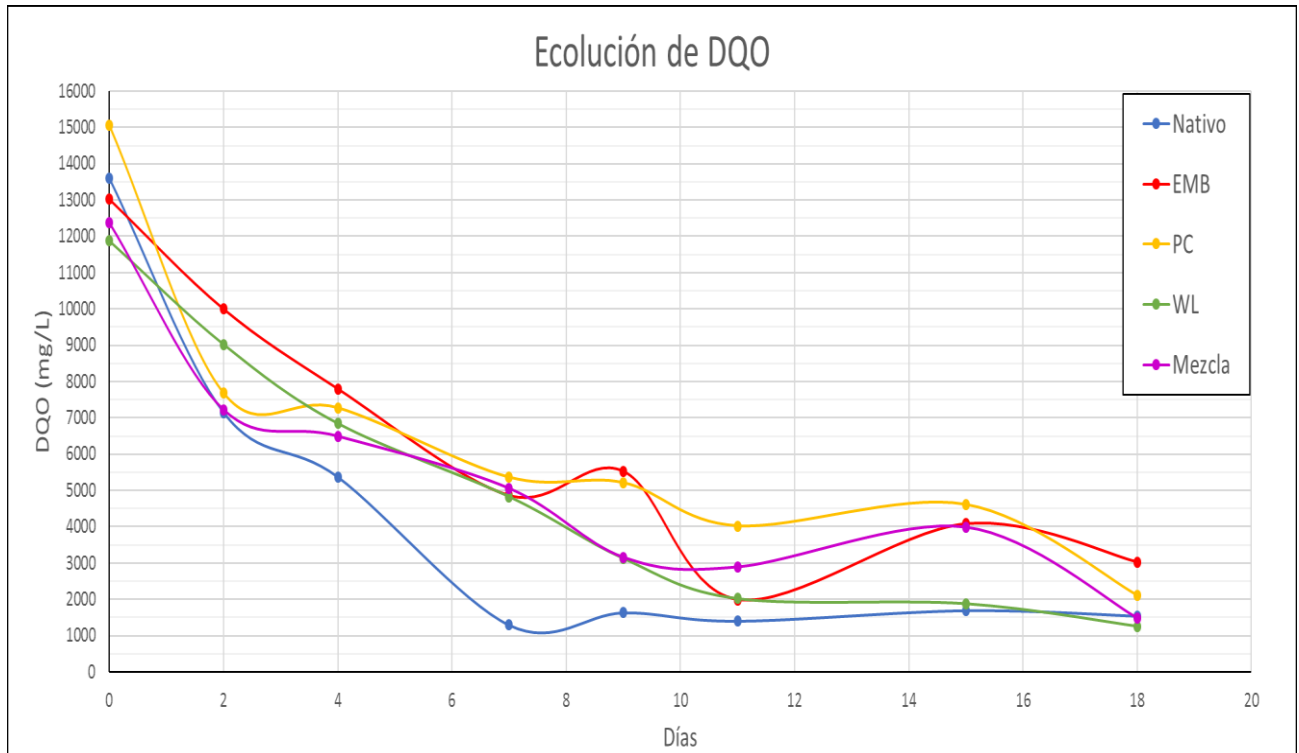


Ilustración 7: Evolución de la demanda química de oxígeno para los tratamientos Nativo, EMB, PC, WL y Mezcla a lo largo del experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.

## 6.3 Análisis microbiológicos

### 6.3.1 Crecimiento microbiano

En la Tabla 6 se observó los tiempos de latencia de los diferentes tratamientos. El tratamiento Mezcla fue el único que presentó periodos de latencia muy diferente de los demás, ya que se activó a las pocas horas de haber comenzado el experimento. Los demás tratamientos se activaron entre las 22 y 30 horas posteriores de haber comenzado el ensayo.

*Tabla 6: Periodo de latencia en horas de los tratamientos del experimento realizados en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.*

| Fecha   | Periodo de latencia* |                  | Tratamiento |
|---|----------------------|------------------|-------------|
| 26/11/2018  | 5:00                 | Erlenmeyer 10    | Mezcla      |
|   | 7:20                 | Erlenmeyer 9     |             |
| 27/11/2018  | 22:00                | Erlenmeyer 5 y 6 | PC.         |
|   | 22:45                | Erlenmeyer 3     | EMB         |
|   | 28:15                | Erlenmeyer 1 y 2 | Nativo.     |
|   | 29:30                | Erlenmeyer 7 y 8 | WL          |
|   | 30:00                | Erlenmeyer 4     | EMB         |
| * Tiempo en horas transcurrido desde el T0 hasta la activación de los tratamientos. |                      |                  |             |

#### Curva de crecimiento de bacterias aeróbicas mesófilas

En la Figura 8 se graficaron las curvas de crecimiento microbiano obtenidas a partir del recuento de colonias en placas cultivadas con agar EMB de los tratamientos Nativo, EMB y Mezcla. Los tres tratamientos mostraron curvas donde se distinguieron las diferentes fases del crecimiento microbiano, pero con variaciones.

El tratamiento PC presentó un crecimiento exponencial rápido, logró el mayor valor de UFC en el tiempo 1 y, luego, comenzó rápidamente su fase de muerte celular. A partir del T6 se mantuvo en valores bajos de UFC.

El tratamiento Mezcla presentó una curva similar a la de PC, pero con valores notablemente más bajos. Experimentó un crecimiento exponencial rápido entre el Tiempo 1 y 2, luego comenzó un periodo de muerte celular abrupta, sin fase estacionaria. Entre el T4 y T6 llegó a valores mínimos de UFC y luego comenzó una nueva fase de crecimiento, pero en este caso de tipo lineal.

El tratamiento Nativo no mostró crecimiento microbiano de tipo exponencial, sino lineal con dos picos, uno en el T4 y otro en el T8. A partir del T4 se mantuvo en un estado estacionario hasta el T6, que comenzó nuevamente el crecimiento poblacional. Su fase de muerte se hizo evidente luego del T8.

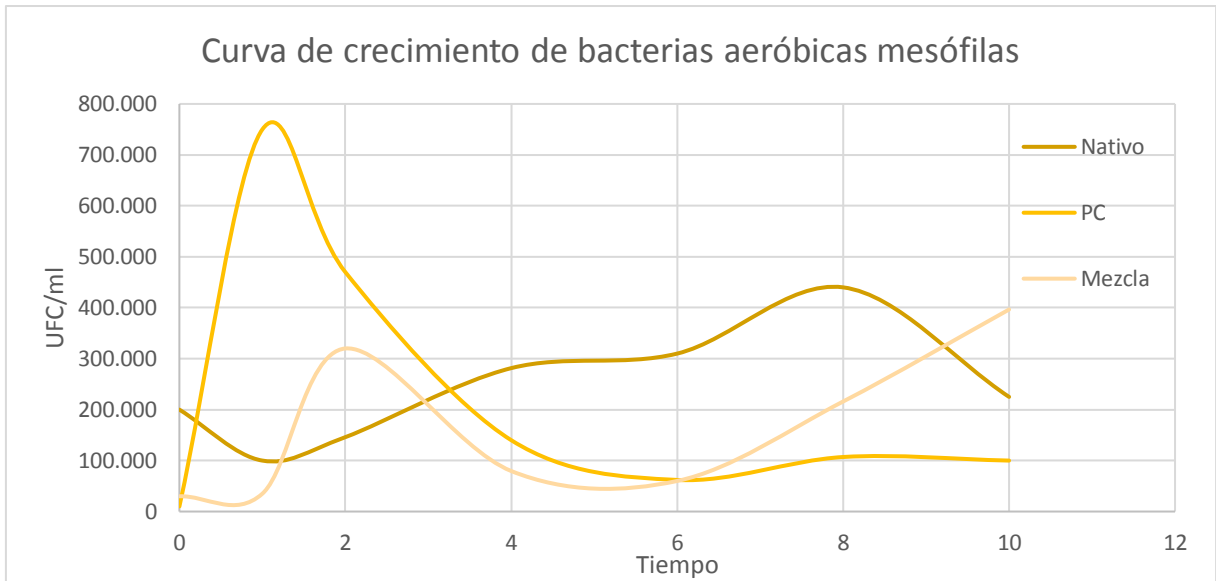


Figura 8: Curvas de crecimiento de bacterias aerobias mesófilas obtenidas de los tratamientos Nativo, PC y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.

Curva de crecimiento de levaduras y hongos:

En la Figura 9 se indican las curvas de crecimiento microbiano obtenidas a partir del recuento de colonias de hongos en placas cultivadas con agar WL. Los tratamientos WL y Nativo mostraron curvas de crecimiento similares, pero, el tratamiento WL presentó valores mayores de UFC/ml y llegó a este valor más rápidamente.

El tratamiento Mezcla presentó los valores más bajos de UFC y no mostró crecimiento exponencial, sino de tipo lineal a partir del T6.

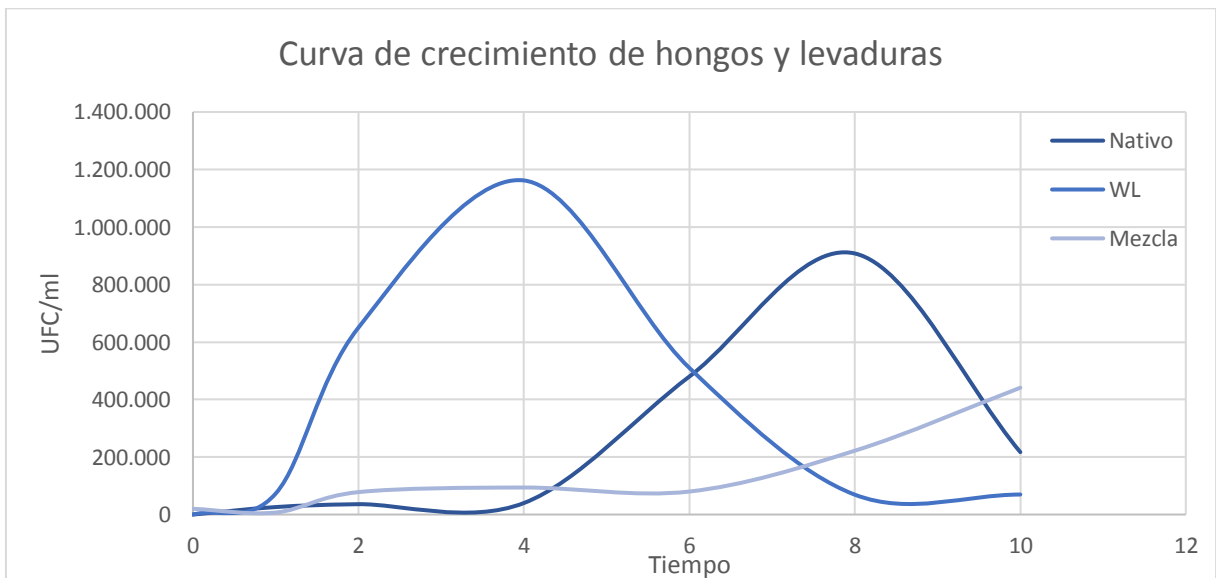


Figura 9: Curva de crecimiento microbiano para hongos y levaduras obtenidas de los tratamientos Nativo, WL y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.

### Curva de crecimiento microbiano para enterobacterias y demás bacilos negativos

En la Figura 10 se graficaron las curvas de crecimiento microbiano para enterobacterias. Los tratamientos EMB y Nativo obtuvieron curvas de crecimiento muy marcadas

El tratamiento Mezcla presentó su mayor valor de UFC/ml en el tiempo 0 y se mantuvo, a partir del T2, en valores bajos. El tratamiento EMB mostró un crecimiento exponencial muy marcado en el T1, que finalizó en el T2 cuando comenzó la fase de muerte celular lineal hasta el T8. Las enterobacterias en el tratamiento Nativo se mantuvieron en estado de latencia hasta el T4, cuando comenzó su crecimiento exponencial y a partir del T6 comenzó su estado de muerte que se prolongó hasta el T 10.

Al igual que para hongos-levaduras y bacterias aeróbicas mesófilas, el grupo nutricional de enterobacterias logró su mayor valor de UFC en aquellos tratamientos que solo fueron inoculados con un grupo nutricional. Es decir, los tratamientos PC, WL y EMB.

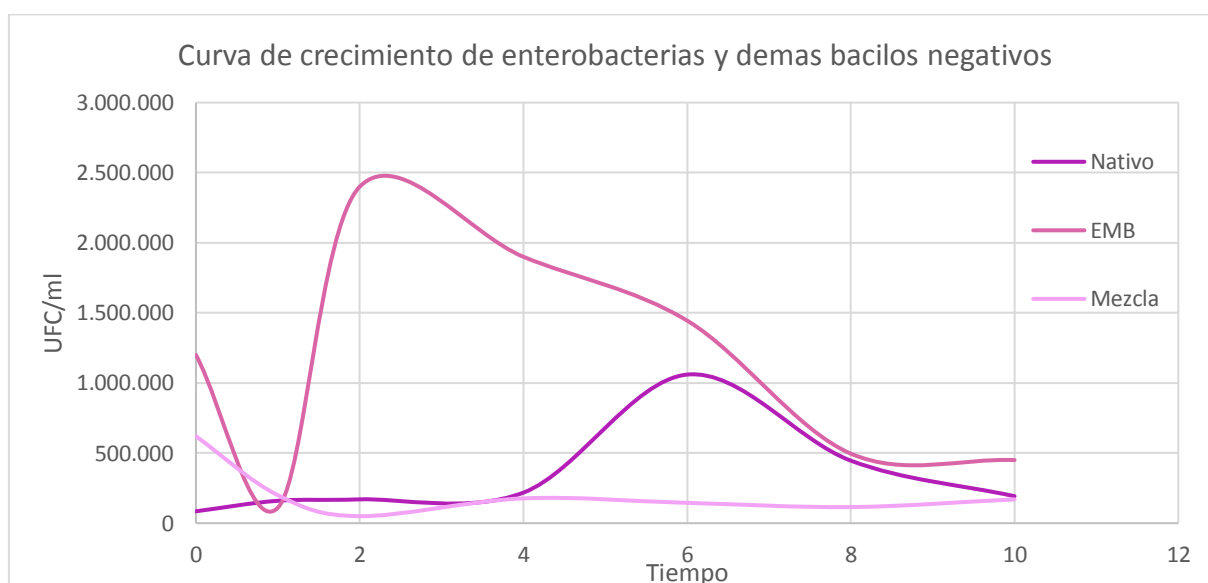


Figura 10: Curva de crecimiento microbiano para enterobacterias y demás bacilos negativos obtenidas de los tratamientos Nativo, EMB y Mezcla en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza. Elaboración propia.

### Curvas de crecimiento microbiano de todos los grupos nutricionales para los tratamientos EMB, PC, WL y Nativo:

En la Figura 11 se graficaron las curvas de crecimiento microbiano del tratamiento Nativo en puntos y las de los tratamientos EMB, PC y WL en líneas continuas. Las mayores poblaciones alcanzadas para cada uno de los agares se dieron en aquellos tratamientos inoculados con un único grupo nutricional (tratamientos EMB, WL y PC) y, dentro de estos tratamientos, los mayores valores de UFC se dieron en enterobacterias, seguidos de hongos y levaduras y, por último, bacterias aeróbicas mesófilas. Esto se vio también en el tratamiento Nativo, pero en menor escala.

En el tratamiento Nativo las bacterias aeróbicas mesófilas fueron las primeras en comenzar su fase de crecimiento, seguidas de enterobacterias y por último hongos y levaduras. Así mismo, las curvas de crecimiento de bacterias aeróbicas mesófilas fueron más achatadas y no experimentaron crecimiento exponencial.

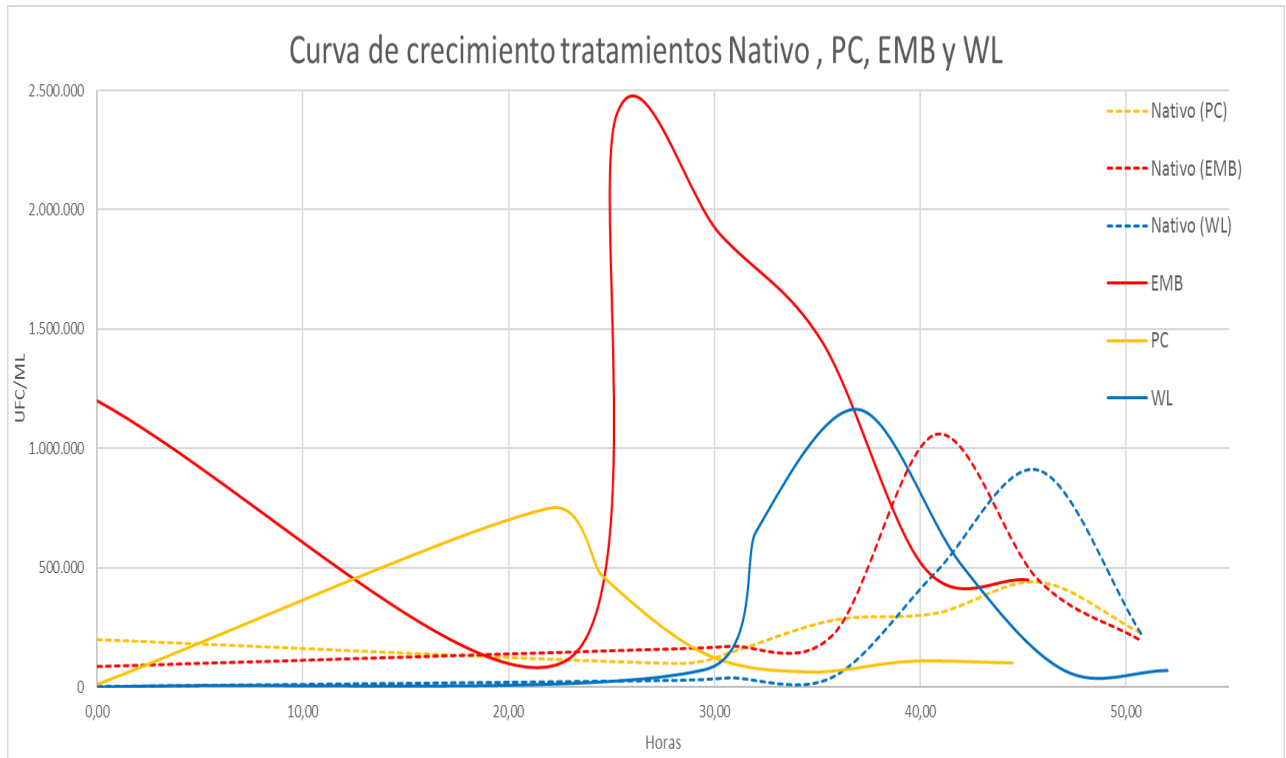


Figura 11: Curvas de crecimiento microbiano para los tratamientos PC, EMB, WL y Nativo desarrollados en el experimento llevado a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, sobre el efluente derivado del maquinado de aceitunas de una industria productora de aceitunas de mesa en el departamento de Maipú, Mendoza.. Elaboración propia.

## 7 Conclusiones

Mediante los diferentes tratamientos se logró disminuir en un 19% los valores de conductividad eléctrica del efluente, mientras que para parámetros como la  $DBO_5$  y DQO se lograron porcentajes de reducción mayores. La reducción media de los valores de DQO de los 5 tratamientos analizados fue del 86%. En el caso de la  $DBO_5$ , la reducción media para los tratamientos fue del 99%, a pesar de esto, su valor fue notablemente menor que el de la DQO y el efluente se consideró como biodegradable con un índice de biodegradabilidad medio-bajo de 0.31.

La concentración de polifenoles no fue una limitante para el desarrollo de los microorganismos. Estos, mediante sus actividades metabólicas a lo largo del ensayo, redujeron la concentración inicial de polifenoles en el efluente hasta localizarla entre valores aceptados por la legislación.

El amonio total hallado podría generar riesgos en la supervivencia y desarrollo de microorganismos utilizados, ya que su parte no ionizada, más frecuente y menos tóxica, se encontró en valores elevados, posibilitando la interconversión con su contraparte ionizada más tóxica en caso de existir cambios en las condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Se observó diferencias en las curvas de crecimiento de los diferentes grupos nutricionales según los tratamientos desarrollados. En los tratamientos PC, EMB y WL, donde solo se inoculó con un grupo microbiano, los valores de UFC/ml fueron más elevados que en los tratamientos Nativo y Mezcla, donde coexistieron los 3 grupos nutricionales.

Así mismo, los valores iniciales de los parámetros para todos los tratamientos se encontraron próximos entre ellos, lo mismo sucedió con los valores finales. Esto podría indicar que existe un rendimiento diferente según el grupo nutricional en los valores centrales, pero siempre parten y concluyendo en valores similares.

Al preservar las cepas bajo el método de criopreservación, se deja abierto el trabajo para su futura profundización, siendo recomendable la identificación taxonómica de los microorganismos actuantes en la degradación.



## BIBLIOGRAFÍA

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán (2018). "Manual de preservación. Colección de Cultivos Servicio Bacteriología especial". Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos aires, Argentina.

Aggelis, G., Ehaliotis, C., Nerud, F., Stoychev, I., Lyberatos, G., & Zervakis, G. (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 353-360.

Aggelis, G. G.; Gavala, H. N.; Lyberatos, G. SE—Structures and Environment: Combined and Separate Aerobic and Anaerobic Biotreatment of Green Olive Debittering Wastewater. *Journal of agricultural engineering research*, 2001, vol. 80, no 3, p. 283-292

Aguinaga, S. (1996). Manual de procedimientos analíticos para aguas y efluentes. *Laboratorio de DINAMA*.

APHA, AWWA, WPCF. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales.

Argentino, C. A. (1969). Ley 18.284. Capítulo XII(2019)-Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. *Agua potable Artículo*

Argentina.gob.ar. (2018). Buscan mejorar la competitividad en la cadena olivícola 11 de octubre de 2018. Recuperado de: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/buscan-mejorar-la-competitividad-en-la-cadena-olivicola>

Álvarez, D., Labuckas, D., Almada, A., Arancegui, J., Carrillo, G., Ibañez, M., Ramello, M., Crivello, M. (2018). Caracterización de efluentes de aceitunas verdes de Cruz del Eje. Cordoba. IV Congreso Argentino de Ingeniería- X Congreso Argentino de Enseñanza de la Ingeniería. Congreso llevado a cabo en Córdoba, Argentina.

Apella, C. M., & Araujo, Z. P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos básicos. *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*, 33-50.

AQUASTAT. (2010). AQUASTAT website. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Recuperado de: [www.fao.org/nr/water/aquastat/water\\_use/index.stm](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use/index.stm).

Avila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.

Benitez FJ, Acero JL, Gonzalez T, Garcia J. Organic matter removal from wastewaters of the black olive industry by chemical and biological procedures. *Process Biochem* 2001;37:257–65.

Benitez, J., Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., Acero, J. L., & Cercas, V. (1997). Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(2), 185-188.

Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., & Aust, S. D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228(4706), 1434-1436.

Burek, P., Satoh, Y., Fischer, G., Kahil, M. T., Scherzer, A., Tramberend, S., Nava, L. F., Wada, Y., Eisner, S., Flörke, M., Hanasaki, N., Magnuszewski, P., Cosgrove, B. y Wiberg,

D. (2016). Water Futures and Solution: Fast Track Initiative (Final Report). IIASA Documento de trabajo. Laxenburg, Austria, International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA). [pure.iiasa.ac.at/13008/](http://pure.iiasa.ac.at/13008/)

Cabezas, José María Estrada (2011). "El medio ambiente y la industria: el problema de los vertidos de efluentes líquidos", de: La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Sevilla, España.

Calvachi, G. L. C., & Ortiz, I. A. S. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y salud*, 15(1).

Castillo, P. (2013). El complejo olivícola argentino: principales tendencias para el aceite de oliva y aceituna de mesa. *JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE ESTUDIOS AGRARIOS y AGROINDUSTRIALES*, 8.

Condalab. (2019). Cat. 1026. "Agar Diferencial WL". Recuperado de: <https://www.condalab.com/int/en/search?controller=search&s=WI>

Consejo Oleícola Internacional (COI)

- 2019. World table olive figures. Recuperado de <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>.
- s/f. Sobre las aceitunas de mesa. Recuperado de <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/77-about-olives>.

Diario de Cuyo (21/12/2011). Crece el consumo de aceitunas descarozadas y "rodajadas". (2011, 21 de diciembre). *Diario de Cuyo*. <https://www.diariodecuyo.com.ar/suplementos/Crece-el-consumo-de-aceitunas-descarozadas-y-quotrodajadasquot-20111231-0188.html>

Infoabe (06/02/2019). Crisis en la producción de aceite de oliva: los costos son negativos en casi todas las provincias del país. *Infobae*.: <https://www.infobae.com/campo/2019/02/06/crisis-en-la-produccion-de-aceite-de-oliva-los-costos-son-negativos-en-casi-todas-las-provincias-del-pais/>

Curtis, H., & Schnek, A. (2008). Metabolismo y Energía. *Curtis. Biología*. Ed. Médica Panamericana.

D'angelot Mariano, 2017. Sulfatos presentes en nuestros suministros y en aguas naturales. Recuperado de: <https://gwc.com.ar/contaminantes-del-agua/sulfatos/#:~:text=Si%20se%20consume%20agua%20potable,puede%20experimentar%20deshidrataci%C3%B3n%20y%20diarrea.&text=Como%20medida%20de%20seguridad%20el,preparaci%C3%B3n%20de%20alimentos%20para%20beb%C3%A9s>.

DELGADO, M. N. G., BARRENETXEA, C. O., SERRANO, A. P., Blanco, J. M. A., & Vidal, F. J. R. (2004). *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Editorial Paraninfo.

Di Paola, M. M., & Vicién, C. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. *CEUR-CONICET. Argentina*.

Duek, A. E. (2016). El agua en las industrias alimenticias de Mendoza (Argentina): estimación de los requerimientos hídricos y la potencialidad de reúso agrícola. *Revista Ambiente & Água*, 11(2), 279-290.

Francisco Soria Melgueizo, S.A. (2019). Ficha técnica 770572. "Plate count Agar". Madrid, España. Recuperado de: [http://f-soria.es/Inform\\_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20PLATE%20COUNT%20AGAR.pdf](http://f-soria.es/Inform_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20PLATE%20COUNT%20AGAR.pdf)

Garbisu, C.; Amézaga, I.; Alkorta, I. (2002). Biorremediación y Ecología. Ecosistemas, XI (3), Opinión 1-2.

García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Gonzalez, M. D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., & Ramos-Cormenzana, A. (1990). Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 20(3-4), 423-432.

IMPEC. Viales DQO. Ficha técnica. Buenos Aires. Argentina.

Kopsidas, G. C. (1992). Wastewater from the preparation of table olives. *Water research*, 26(5), 629-631.

Kotsou, M., Kyriacou, A., Lasaridi, K., & Pilidis, G. (2004). Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater. *Process Biochemistry*, 39(11), 1653-1660.

Laboratorio Britania S.A.

- (2015) REF B0210105/06. "E.M.B. Agar (con Eosin y Azul de Metileno)". CABA, Argentina. Recuperado de: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a28240e1c004.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28240e1c004.pdf)
- (2015) REF B0216605/06. "Papa Glucosa Agar". CABA, Argentina. Recuperado de: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2969ba1d3f5.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2969ba1d3f5.pdf)

Ley N°5961. Preservación del Medio Ambiente, Boletín Provincial. Mendoza Argentina 25 de febrero de 1993.

Llano, J. F., Arreghini, M., Ugarte, S., Herrero, C., Herrero, O., & Maya, S. (2001) Efluentes líquidos del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco. Situación en la Provincia de Mendoza. Alcances en Energías Renovables y Medio Ambiente, Vol. 5, 2001.

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investig. en discapacidades*, 3(1), 10-18.

Lugones, F (2018). Biorremediación de efluentes provenientes de la industria de aceitunas maquinadas (Tesis de grado). Universidad Tecnológica Nacional. Mendoza, Argentina.

Madigan, H. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H, Stahl, D. A., (2015). Brock. Biología de los microorganismos. Ed. Pearson Educación S. A. Madris, España.

Martínez Soza, L. (2010). Estudio de la evolución de una ETAP para la adecuación legislativa.

Metcalf, E. (2004). Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización de Aguas Residuales. Tercera Edición Vol. 1. *España: Editorial McGraw-Hill*.

Mekonnen, M. M. y Hoekstra, A. Y. (2016). Four billion people facing severe water scarcity. *Science Advances*, Vol. 2, No 2. doi:10.1126/sciadv.1500323

Murgo, E (2019, 28 de marzo) Por qué Mendoza quedó relegada en la producción olivícola. Unidiversidad. Recuperado de: <http://www.unidiversidad.com.ar/que-paso-que-mendoza-queda-relegada-en-la-produccion-olivicola>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2015). *Lehninger: principios de bioquímica*.

OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos).

- 2011. Water Governance in OECD Countries: A Multi-Level Approach. OECD Studies on Water. París, OCDE. [www.oecd-ilibrary.org/environment/water-governance-in-oecd-countries\\_9789264119284-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/water-governance-in-oecd-countries_9789264119284-en)
- . 2012. OECD Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction. París, OECD Publishing. doi.org/10.1787/9789264122246-en

ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2018). Sustainable Development Goal 6: Synthesis Report 2018 on Water and Sanitation. Nueva York, Naciones Unidas. [www.unwater.org/app/uploads/2018/07/SDG6\\_SR2018\\_web\\_v5.pdf](http://www.unwater.org/app/uploads/2018/07/SDG6_SR2018_web_v5.pdf)

Orozco Jaramillo, Á. (2014). *Bioingeniería de aguas residuales: teoría y diseño* (No. 628.3 O-74b). ACODAL,.

Perdomo-Rivera, R., Otero-Fernández, M. G., & González-Leal, M. (2012). Validación del método del sulfato de brucina para la determinación de nitrógeno forma de nitrato en aguas superficiales. *Revista Cubana de Química*, 24(2), 155-165.

Resolución N°778. Visto el expediente Nro.: 217.029 caratulado: "Secretaría de asuntos institucionales s/ Reglamento General para el Control de Contaminación Hídrica"; (T.S.221.1996). Honorable Tribunal Administrativo del Departamento General de Irrigación, Mendoza, Argentina, 23 de diciembre de 1996.

Resolución N°627. VISTO: Expte. N° 225.481-E8 caratulado Policía del Agua s/ Modificación Resol 778/96 del H.T.A. (T-P-39-2.000). Honorable Tribunal Administrativo del Departamento General de Irrigación, Mendoza, Argentina, 17 de noviembre de 2000.

Rivas FJ, Beltrán FJ, Gimero O, Alvarez P:

- Treatment of brines by combined Fenton's reagent-aerobic biodegradation. II. Process modeling. *J Hazard Mater* 2003;96:277–90.
- Optimization of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines. *J Hazard Mater* 2003;96:277–90.

Rivas FJ, Beltrán FJ, Gimeno O. Joint treatment of wastewater from table olive processing and urban wastewater. Integrated ozonation—aerobic oxidation. *Chem Eng Technol* 2000;23(2):177–81.

Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 12(2).

Rojas, R. (2002). Sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Gestion integral de Tratamiento de Aguas Residuales*, 1(1), 8-15.

Saieg, L (2019, 14 de abril) Olivicultura: baja cosecha con una industria que no se recupera. *Diario los Andes*. <https://www.losandes.com.ar/article/view?slug=olivicultura-baja-cosecha-con-una-industria-que-no-se-recupera>

Ingeniería de aguas residuales. (2015). *Wikilibros*, . Consultado el 16:41, abril 2, 2020 en [https://es.wikibooks.org/w/index.php?title=Ingenier%C3%ADa\\_de\\_aguas\\_residuales&oldid=287785](https://es.wikibooks.org/w/index.php?title=Ingenier%C3%ADa_de_aguas_residuales&oldid=287785).

Water, S., & World Health Organization. (2006). Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations.

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de la UNESCO).

- 2019. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2019: No dejar a nadie atrás. París, UNESCO.
- 2017. *Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado*. París, UNESCO.