

TESINA DE GRADO DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

Biorremediación de efluentes provenientes de la industria de aceitunas maquinadas

Lugones, Florencia Belén

2018

Director: Dra. Maldonado, Mariela Beatriz

RESUMEN

Un tema muy debatido actualmente en todo el mundo se relaciona con la disponibilidad futura del agua. Ya se comienza a materializar en muchas regiones la escasez de la misma, tanto para el consumo humano como para las actividades económicas y otros usos. No se habla solo de problemas cuantitativos, sino de la calidad con la que esta se presenta.

Las industrias utilizan grandes volúmenes de agua en sus procesos, y muchas de ellas aún no cuentan con los correspondientes sistemas de tratamiento de efluentes, así existan leyes que regulan los parámetros requeridos para realizar el vertido y/ o efectuar un reúso de las mismas.

En este trabajo se evaluó la biodegradabilidad de la fase hidrofílica de un efluente proveniente del sector de aceitunas maquinadas, haciendo uso de los microorganismos nativos o autóctonos que se desarrollan en él.

Para ello, se llevó a cabo una caracterización físico- química inicial, cuyos valores indicaron la necesidad de realizar un tratamiento. A partir de estos resultados se calculó el índice de biodegradabilidad, que lo clasificó como un efluente biodegradable.

Se realizó un ensayo utilizando los principios del método aerobio de lodos activados, donde se lograron resultados satisfactorios a escala experimental, reduciendo los valores de la DQO y la DBO₅ en un 91,7% y 80%, respectivamente. También se obtuvo una reducción promedio del 35% en la conductividad eléctrica, cuyas causas deben ser investigadas ya que podría constituir una innovación en el contexto de esta investigación.

Finalmente, se abren interrogantes que conducen a futuras líneas de investigación dentro de la temática, y específicamente, con este efluente como materia prima.

PALABRAS CLAVE

Oxidación biológica, aguas residuales, Industria olivícola, efluentes de aceitunas maquinadas

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que constituyó el soporte de años de esfuerzo y preparación profesional, principalmente a mi padre y mi hermana, Gustavo y Marisol. A mi madre, Laura, que dejó en mi crianza las bases para que mi futuro fuera bello y alentador. Con gran amor les dedico este trabajo.

A mis profesores, amigos, compañeros de curso, que día a día me ayudaron a formar y acompañaron y alentaron en el proceso de aprendizaje.

A la Universidad Nacional de Cuyo y, particularmente, a la Facultad de Ciencias Agrarias, que como instituciones me han provisto las herramientas para una formación de calidad, que seguramente me abrirá camino hacia grandes oportunidades.

A la Universidad Tecnológica Nacional (UTN FRM), por brindarme la posibilidad de realizar mi tesina en su casa de estudios.

A mi directora de tesis, Dra. Mariela Beatriz Maldonado, por haber sido una guía y firme apoyo en la realización de este trabajo, por enseñarme a sortear dificultades y a ser apasionada por las convicciones propias.

A mis compañeros del proyecto PID 4529, Verónica, Anabel, Ivana, Franco, Ignacio, Ailén y Guido, por la dedicación, solidaridad y compañerismo con la que trabajaron en el mismo.

RESUMEN.....	ii
PALABRAS CLAVE.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
INTRODUCCIÓN	
1. Fundamentación	1
2. Hipótesis	2
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general	2
3.2. Objetivos particulares	2
4. Marco Teórico	
4.1. Industria olivícola y sus efluentes	2
4.1.1. Situación actual del mercado.....	2
4.1.2. Aceitunas maquinadas.....	3
4.1.3. Proceso de aderezo de la aceituna.....	4
4.1.4. Caracterización general de los efluentes de aceituna de mesa.....	5
4.2. Tratamiento de aguas residuales.....	6
4.2.1. Tratamiento primario.....	6
4.2.2. Tratamiento secundario.....	7
4.2.2.1. Tratamiento secundario anaerobio.....	7
4.2.2.2. Tratamiento secundario aerobio.....	7
4.2.2.3. Factores que intervienen en la oxidación biológica.....	9
4.2.2.4. Proceso de lodos activados.....	9
4.2.2.5. Determinación de la biodegradabilidad.....	10
4.2.2.6. Medida de la biodegradabilidad.....	10
4.2.2.7. Relación entre parámetros.....	11
4.3. Legislación.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	
5. Tratamiento primario del efluente.....	13
6. Tratamiento secundario del efluente.....	14
6.1. Técnicas físico- químicas.....	15
6.1.1. pH.....	15
6.1.2. Conductividad eléctrica.....	15
6.1.3. Sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles	16
6.1.4. Sólidos sedimentables.....	17
6.1.5. Nitrógeno amoniacal por el método titulométrico.....	18
6.1.6. Nitratos por el método del sulfato de brucina.....	19
6.1.7. Fosfatos por método colorimétrico	20
6.1.8. Cloruros por el método potenciométrico	21
6.1.9. Sodio y potasio por el método directo de llama de aire-acetileno.....	22
6.1.10. Polifenoles totales	23
6.1.11. Azúcares reductores totales por el método del DNS.....	24
6.1.12. DQO.....	25
6.1.13. DBO ₅	25
6.1.14. Alcalinidad por el método de titulación.....	27
6.1.15. Dureza por el método titulométrico EDTA.....	27

6.2.	Técnicas microbiológicas.....	28
6.2.1.	Recuento de bacterias viables en placa.....	29
6.2.1.1.	Preparación de las diluciones.....	29
6.2.1.2.	Siembra por técnica Pour plate.....	30
6.2.1.3.	Recuento de colonias.....	31
6.2.2.	Repique por estrías en superficie.....	31
6.2.3.	Técnica de coloración de Gram.....	32
6.2.4.	Observación al microscopio.....	33
6.2.5.	Preservación por el método de congelamiento	34

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.	Caracterización físico- química	35
7.1.	pH.....	35
7.2.	Temperatura.....	36
7.3.	Conductividad eléctrica y cloruros.....	36
7.4.	Oxígeno disuelto, DQO y DBO ₅	37
7.5.	Nitratos, nitrógeno amoniacal y fosfatos.....	37
7.6.	Sulfatos.....	37
7.7.	Sólidos.....	38
7.8.	Sodio y potasio.....	38
7.9.	Dureza y alcalinidad.....	39
7.10.	Polifenoles totales.....	39
8.	Ensayo de biorremediación.....	40
8.1.	Resultados físico- químicos....	40
8.1.1.	pH.....	40
8.1.2.	Conductividad eléctrica.....	41
8.1.3.	DQO.....	42
8.1.4.	DBO ₅	42
8.1.5.	Azúcares reductores.....	43
8.1.6.	Polifenoles totales.....	44
8.2.	Resultados microbiológicos.....	44
8.2.1.	Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos.....	45
8.2.2.	Recuento de levaduras.....	46
8.2.3.	Recuento de coliformes totales.....	47
8.2.4.	Crecimiento total.....	47
	CONCLUSIONES.....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	50
	ANEXO I.....	54
	ANEXO II.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Evolución del volumen de producción (tn) de aceite de oliva y aceitunas de mesa en el período 2000- 2011 en Argentina.....	3
<i>Figura 2.</i> Máquina deshuesadora- rodajadora de aceitunas modelo PSL- 51.....	4
<i>Figura 3.</i> Máquina deshuesadora- rellenadora de aceitunas mediante inyección.....	4
<i>Figura 4.</i> Aceitunas de mesa, presentación rodajadas.....	4
<i>Figura 5.</i> Aceitunas de mesa, presentación rellenas con pasta de pimiento.....	4
<i>Figura 6.</i> Esquema general de los procesos de elaboración en aceitunas de mesa.....	5
<i>Figura 7.</i> Tratamiento de aguas residuales en una planta de tratamiento tipo.....	6
<i>Figura 8.</i> Crecimiento de un microorganismo en medio líquido de volumen fijo.....	8
<i>Figura 9.</i> Diagrama de flujo del sistema de aeración extendida (fase líquida).....	10
<i>Figura 10.</i> Muestra del efluente donde se pueden observar las fases líquida y grasa.....	13
<i>Figura 11.</i> Solidificación de la fase hidrofóbica por enfriamiento.....	14
<i>Figura 12.</i> Prototipos donde se realizó el ensayo.....	15
<i>Figura 13.</i> Medición de sólidos sedimentables en cono de Imhoff.....	17
<i>Figura 14.</i> Coloración azul producida por la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin- Ciocalteu.....	23
<i>Figura 15.</i> Técnica de preparación de diluciones seriadas.....	30
<i>Figura 16.</i> Cámara de flujo laminar y materiales necesarios para realizar la siembra de las muestras.....	30
<i>Figura 17.</i> Técnica de siembra por estrías.....	32
<i>Figura 18.</i> Observación de levaduras al microscopio óptico mediante tinción.....	33
<i>Figura 19.</i> Observación de cocos Gramnegativos al microscopio óptico (colonia pura).....	33
<i>Figura 20.</i> Observación de cocos Grampositivos al microscopio óptico (colonia pura).....	33
<i>Figura 21.</i> Evolución del pH durante 14 días de ensayo.....	40
<i>Figura 22.</i> Evolución de la conductividad eléctrica durante 14 días de ensayo, a una temperatura de 25 °C.....	41
<i>Figura 23:</i> Evolución de la DQO durante 14 días de ensayo.....	42
<i>Figura 24.</i> Evolución de azúcares reductores durante las primeras 350 horas de ensayo...	43
<i>Figura 25.</i> Evolución de polifenoles totales durante 14 días de ensayo.....	44

<i>Figura 26.</i> Curva de crecimiento de recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, durante las primeras 20 horas de ensayo	45
<i>Figura 27.</i> Curva de crecimiento de levaduras, durante las primeras 20 horas de ensayo.....	46
<i>Figura 28.</i> Curva de crecimiento de coliformes totales, durante las primeras 20 horas de ensayo.....	47
<i>Figura 29.</i> Curvas de crecimiento: Recuento total vs. Coliformes totales vs. Levaduras, durante las primeras 20 horas de ensayo.....	48
<i>Figura 30, Figura 31 y Figura 32.</i> Repiques en medio PC.....	57
<i>Figura 33 y Figura 34.</i> Repiques en medio PG.....	57
<i>Figura 35.</i> Siembra en medio PG.....	58
<i>Figura 36 y Figura 37.</i> Repiques en medio EMB.....	58
<i>Figura 38 y Figura 39.</i> Siembra en medio EMB.....	58
<i>Figura 40, Figura 41, Figura 42, Figura 43 y Figura 44.</i> Repiques en medio EMB.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice de biodegradabilidad.....	11
Tabla 2. Caracterización físico- química del efluente.....	35
Tabla 3. Resultados finales del recuento de las colonias sembradas (UFC/ml), para cada grupo y tiempo (h).....	45
Tabla 4. Parámetros Físicos máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico.....	54
Tabla 5. Parámetros Químicos máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico.....	55

INTRODUCCIÓN

1. Fundamentación

Datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2017), estiman que dos tercios de la población mundial vive en regiones donde se sufre escasez de agua al menos un mes al año, y se espera que la demanda mundial aumente considerablemente en las próximas décadas. Calcagno y col. (2000), aseguran que en Argentina la sostenibilidad de las fuentes de agua, tanto superficiales como subterráneas, se encuentra gravemente amenazada debido a las actividades antrópicas. A su vez, la Provincia de Mendoza depende casi en su totalidad de la fusión de nieves y glaciares como provisión de este recurso, ya que presenta un marcado déficit hídrico consecuencia de la principal limitante de la Provincia que son los bajos volúmenes de precipitación anual. Según Garduño, H. (2003), esta problemática, junto al deterioro creciente de la calidad, “son los principales desafíos para la gestión del recurso hídrico en Mendoza”.

La escasez se relaciona directamente con la contaminación del agua, ya que la disponibilidad para los diferentes usos puede verse afectada por la alteración en sus propiedades. Al analizar las consecuencias que se producen al verter aguas residuales sin tratamiento o con uno inadecuado en cuerpos receptores tales como océanos, ríos, lagos, canales, etc., se pueden identificar efectos negativos para la salud humana, para el ambiente, y para las actividades económicas (ONU, 2017).

Rheinheimer, G. (1987), explica los procesos de la autodepuración natural en los ambientes acuáticos que sufren un constante aporte de productos de desecho y aguas residuales. Si bien en ella son importantes los procesos físico- químicos, como la sedimentación y la oxidación, destaca el papel de los organismos vivos, desde las aves y los peces hasta los microorganismos. Pero como el mismo advierte, este proceso se produce hasta que el volumen y composición de impurezas exceden la capacidad de transformación, momento en el que comienzan a producirse una serie de procesos negativos, como por ejemplo, un intenso consumo de oxígeno que origina zonas totalmente anaerobias. Esto ocasiona la muerte de casi todos los seres vivos superiores y también de muchos microorganismos.

Por su parte, las aceitunas maquinadas son aquellas aceitunas de mesa a las que se les ha agregado valor mediante procesos mecanizados, y que permiten su presentación como deshuesadas, rellenas, en mitades, cuartos, gajos, lonjas, pastas, etc., lo que las posiciona como “delicatesen” en el mercado actual. Al ser aceitunas ya fermentadas, su transporte y manipulación deben ser mediados por agua, la cual finalmente constituye el efluente y la principal causa de contaminación ambiental de este sector. El tratamiento se ve dificultado por la mezcla de cada una de estas aguas de procesos en balsas de evaporación, práctica común para su disposición. Las balsas deben contar con una serie de características técnicas, principalmente una correcta impermeabilización y un diseño que permita la evaporación. Generalmente esto no se cumple, convirtiéndose en medios de acumulación (debido a un aporte de efluente que supera la velocidad de evaporación), además de los riesgos de contaminación del subsuelo por posibles pérdidas (Cabezas, 2011).

De acuerdo a los datos estadísticos presentados por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018), Argentina es el principal productor de aceitunas de mesa fuera de la cuenca del Mediterráneo. Según el Censo Nacional Agropecuario 2002 (CNA 2002), Mendoza ocupa el segundo puesto en cuanto a cantidad de hectáreas de olivo implantadas para la producción de conservas, luego de la Provincia de La Rioja.

Un estudio realizado por el Instituto Nacional del Agua (INA, 2016), indica que el consumo actual de agua de la industria olivícola en Mendoza es de 0,207 hm³/año, lo que representa el 1,05% respecto a las demás industrias (bodegas, hortalizas, frutas, etc.). De este volumen consumido, 0,18 hm³ se descarga como efluente (que corresponde al 87% del mismo). A su

vez, se determina que el volumen de consumo que se consideraría sostenible es de 0,019 hm³/ año, lo que representaría un 10,55% del volumen que realmente se genera.

Frente al escenario actual del agua mencionado, sus proyecciones futuras y el crecimiento de la industria olivícola, el cual conlleva a una mayor generación de efluentes con efectos indeseables para el ambiente, es que se deben comenzar a implementar sistemas de tratamiento de aguas residuales atendiendo a las características propias de las mismas.

En este contexto, es interesante el concepto de biorremediación, que según definen Garbisu y col. (2002), es el “proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, el cual presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental”.

2. Hipótesis

“Es posible utilizar microorganismos nativos para biorremediar la fase hidrofílica del efluente generado en la industria de aceitunas maquinadas, mediante oxidación biológica”.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Comprobar si la fase hidrofílica del efluente generado en la industria de aceitunas maquinadas es susceptible de biorremediación mediante microorganismos nativos, a través de procesos de oxidación biológica a escala experimental.

3.2. Objetivos particulares

- a) Caracterizar físico- químicamente el efluente.
- b) Detectar la variación de los parámetros físico- químicos relevantes a través del ensayo.
- c) Cuantificar los grupos de microorganismos que actúan en las primeras etapas de la degradación.

4. Marco Teórico

4.1. Industria olivícola y sus efluentes

4.1.1. Situación actual del mercado

Según las series estadísticas publicadas por el Consejo Oleícola Internacional (2018), para la campaña 2017/2018 de aceitunas de mesa, la Unión Europea posee la mayor producción mundial, con 875.000 toneladas. Dentro de ella, el primer puesto lo ocupa España (582.000 tn), seguido por Grecia (235.000 tn) e Italia (48.000 tn).

A nivel mundial, España se encuentra seguida por Egipto (500.000 tn), Turquía (460.000 tn), Argelia (280.000 tn), Grecia (235.000 tn), y Marruecos (130.000 tn). En el continente sudamericano destacan Argentina (105.000 tn), Perú (70.000 tn) y Chile (13.000 tn), y en el norteamericano EE.UU. (66.000 tn) y México (20.000 tn).

Históricamente en Argentina, el cultivo del olivo ha experimentado “períodos de contracción y expansión”. A su vez, el sector olivícola a escala mundial, se mantuvo como un mercado estático y poco desarrollado hasta principios de la década de los '90. A partir de entonces, comenzó a adquirir una relevancia que condujo a un nuevo período en la olivicultura, a través del surgimiento de nuevos países líderes que comenzaron a colocar sus productos en mercados competitivos. Argentina por su parte, constituye uno de esos nuevos actores, posicionándose como el principal productor tanto de aceite de oliva como de aceitunas de mesa fuera de la cuenca del Mediterráneo (INTA, 2012).

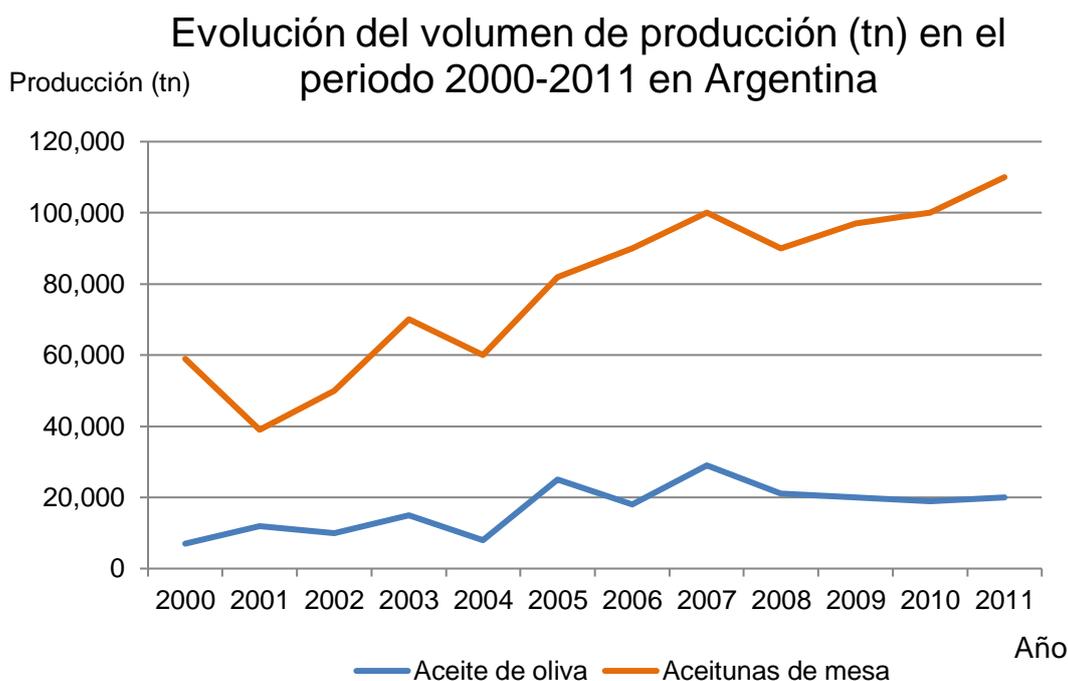


Figura 1. Evolución del volumen de producción (tn) de aceite de oliva y aceitunas de mesa en el periodo 2000- 2011 en Argentina

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la Dirección Nacional de Programas de Desarrollo Regional. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2011)

Según el Censo Nacional Agropecuario 2002, Argentina posee 49.010,8 ha destinadas a la producción de aceite de oliva (67%), y 23.761,2 ha destinadas a la producción de conservas (33%), donde las principales provincias productoras de esta última categoría son La Rioja (37,8%), seguida por Mendoza (22,6%), San Juan (20%) y Catamarca (11,8%).

4.1.2. Aceitunas maquinadas

La aceituna es la única drupa comestible que para poder ser consumida precisa de una transformación y de procesos de elaboración previos. Acompañando a un mercado gastronómico creciente, cada vez es más común y aporta mayor prestigio en el mercado la presentación de las aceitunas de mesa como deshuesadas, rellenas, mitades, cuartos, gajos, lonjas, pastas, etc. (figuras 4 y 5), que las posiciona como “delicatesen” y aporta un valor agregado a las mismas (Cabezas, 2011).

Hasta el año 1970 (Santos Siles, J., s. f.), el deshuesado y relleno se realizaba de forma manual. Este hecho demandaba una gran cantidad de mano de obra que se encarecía cada vez más, por lo que fue necesario realizar una “mecanización” de los procesos (figuras 2 y 3). Esto permitió abaratar los costos de producción, y a su vez se logró un aumento en la capacidad de fabricación, por lo que también aumentaron las exportaciones de este tipo de producto. Con el tiempo, las maquinarias fueron perfeccionándose y diversificándose.



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5

Figura 2. Máquina deshuesadora- rodajadora de aceitunas modelo PSL-51

Figura 3. Máquina deshuesadora- rellenadora de aceitunas mediante inyección

Fuente: OFM- Food Machinery

Figura 4. Aceitunas de mesa, presentación rodajadas

Figura 5. Aceitunas de mesa, presentación rellenas con pasta de pimiento

Fuente: Cabezas, 2011

4.1.3. Proceso de aderezo de la aceituna

El proceso de aderezo de la aceituna según describe Cabezas (2011), puede observarse en la figura 6.

En este procedimiento, luego de la recolección de los frutos, los mismos son transportados a las plantas de aderezo donde se realiza la selección y clasificación de los mismos. Luego se lleva a cabo la operación denominada “cocido”, cuyo objetivo principal es eliminar el amargor a través del tratamiento con una solución de hidróxido de sodio (NaOH), comúnmente llamada lejía. A continuación, los frutos se lavan varias veces con agua por períodos variables de tiempo para eliminar el exceso de lejía, y entonces las aceitunas se colocan en una salmuera de 10 °Bé donde sufren la fermentación láctica. Por último, se seleccionan y clasifican los frutos por tamaño para ser envasados como enteros, deshuesados, o rellenos con diversos ingredientes, y colocados en el mercado.

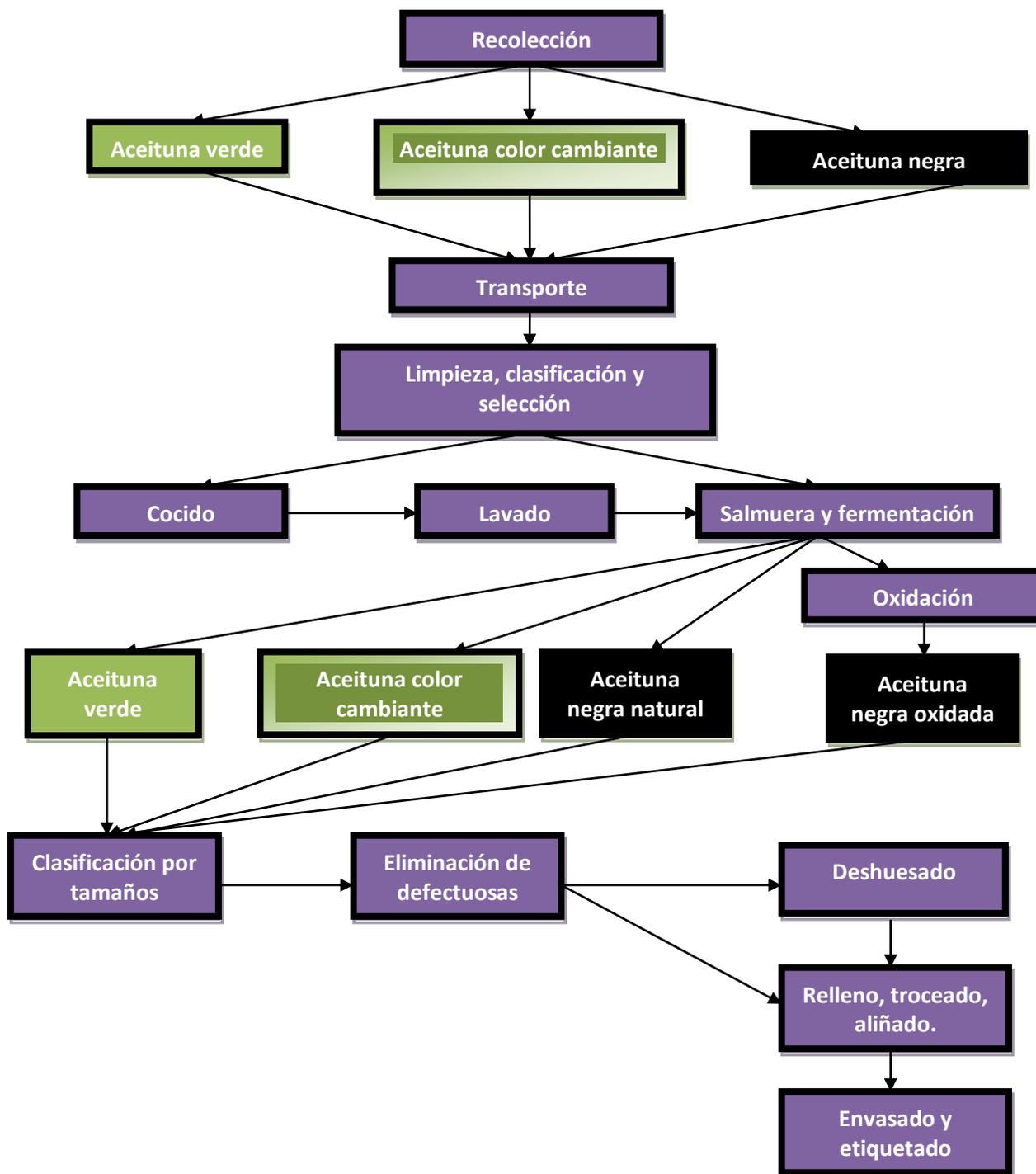


Figura 6. Esquema general de los procesos de elaboración en aceitunas de mesa
 Fuente: Elaboración propia a partir de “La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades”, Cabezas (2011)

4.1.4. Caracterización general de los efluentes de aceituna de mesa

En cada etapa de la elaboración se generan efluentes con características variables. Estos dependen del tipo de proceso que se aplica, de la variedad de aceituna que se emplea, y por lo tanto de cada industria. En líneas generales, los más comunes son las lejías de cocido y aguas de lavado tras el cocido, salmueras de fermentación, aguas del proceso de oxidación, aguas pluviales de los patios de fermentadores y de limpieza, y aguas de otros procesos como las derivadas del lavado de los frutos, del semielaborado (deshueso, relleno o en rodaja), derrames de salmueras de envasado, salmueras de conservación y de estabilización de negras, etc. El principal problema es que constituyen efluentes de grandes volúmenes, con alto contenido en materia orgánica, elevado porcentaje de sólidos en

suspensión y grasas, pH ácido o alcalino, elevada conductividad (por su alto contenido salino) y que además, son aguas fuertemente coloreadas por los polifenoles que forman parte de la composición de los frutos (Cabezas, 2011).

4.2. Tratamiento de aguas residuales

Como describe Kemmer (1989), “el tratamiento de aguas tiene por objetivo la prevención de la contaminación de los cuerpos de agua y de los suelos, además de proteger la salud y promover el bienestar de los miembros de la sociedad. Solo es posible en la medida que se utilicen las técnicas apropiadas de tratamiento y disposición del agua”.

Para lograr un tratamiento adecuado de efluentes, son necesarias una serie de operaciones y procesos que aseguren una remoción efectiva de la DQO, SS (sólidos suspendidos), agentes patógenos, nitrógeno y fósforo (Romero, 1999).

En este apartado se desarrollarán los diferentes procesos correspondientes a los tratamientos primario y secundario, que son los dos niveles que han sido aplicados en este trabajo. Dentro de ellos, será tratado con mayor detenimiento el tratamiento secundario (biológico), cuya metodología ha sido objeto de estudio en la presente investigación.

4.2.1. Tratamiento primario

El tratamiento primario o físico- químico (celeste en la figura 7) tiene como objetivo la remoción parcial de los sólidos suspendidos, materia orgánica y organismos patógenos, constituyendo una etapa previa que prepara el efluente para el tratamiento secundario. Se lleva a cabo a través de operaciones físicas y químicas como el tamizado, la sedimentación, la precipitación química, filtración, etc. (Romero, 1999).

En una planta de tratamiento tipo, los objetos de gran tamaño presentes en el efluente son retenidos por una serie de rejillas y cribas (filtrado). Una vez eliminados estos elementos, el agua se deja reposar en los depósitos de separación durante cierta cantidad de horas, constituyendo esta la etapa de sedimentación (Brock, 2009).

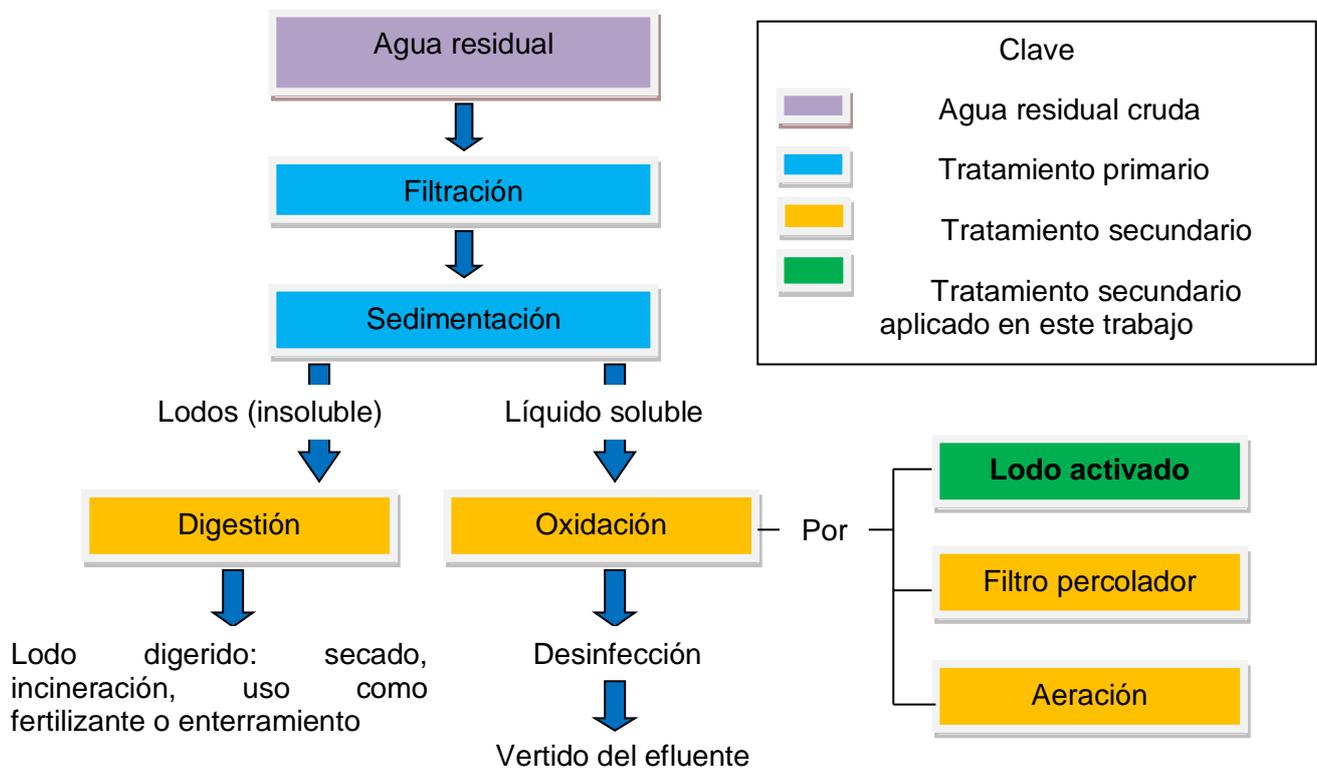


Figura 7. Tratamiento de aguas residuales en una planta de tratamiento tipo
Fuente: Elaboración propia a partir de Brock, 2009

4.2.2. Tratamiento secundario

La mayoría de las plantas de depuración implementan el tratamiento secundario de sus aguas, ya que luego del tratamiento primario permanecen niveles elevados de materia orgánica soluble o suspendida, junto a otros nutrientes. Esto se ve reflejado en altos niveles de DBO₅ (demanda biológica de oxígeno), producto de un gran crecimiento microbiano no controlado (Brock, 2009).

Es por ello que se aplica el tratamiento biológico, donde se remueven los compuestos orgánicos biodegradables y sólidos sedimentables (Romero, 1999).

Recordando el concepto que se introdujo previamente, biorremediación es el "...proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, el cual presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental" Garbisu y col. (2002), y ampliando con la definición de Frioni (2011) "(...). En particular, se estimula la biodegradación de productos con carácter xenobiótico, originados por actividades del hombre y que contaminan el ambiente".

Existen dos grupos principales de procesos biológicos: aerobios y anaerobios. Los procesos aerobios se efectúan en presencia de oxígeno y son los más comunes a nivel industrial, en los procesos anaerobios el tratamiento biológico ocurre en ausencia de oxígeno (Romero, 1999).

4.2.2.1. Tratamiento secundario anaerobio

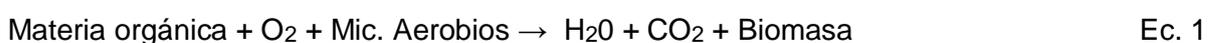
El proceso se lleva a cabo en grandes tanques cerrados llamados digestores de lodos o biorreactores, y en ausencia de oxígeno. En el actúan conjuntamente diferentes tipos de procariotas, llevando a cabo una serie de reacciones digestivas y fermentativas. Este sistema se utiliza generalmente en aguas con grandes cantidades de materia orgánica (DBO₅ muy alta), como las de la industria alimenticia y láctea (Brock, 2009).

En las primeras etapas de la degradación, los microorganismos anaerobios digieren los desechos macromoleculares por medio de enzimas, convirtiéndolos en componentes solubles. Estos mismos luego son fermentados generando una mezcla de ácidos grasos, H₂ y CO₂. En una nueva fermentación, las bacterias sintróficas consumen los ácidos grasos produciendo acetato, CO₂ e H₂. Por último, las bacterias metanogénicas fermentan el acetato produciendo CH₄ y CO₂, que son los principales productos en este tipo de proceso (Brock, 2009).

4.2.2.2. Tratamiento secundario aerobio

En este proceso, el oxígeno libre es esencial para los organismos aerobios como agente para la oxidación de la materia orgánica en CO₂. La oxidación biológica aerobia está constituida por reacciones de óxido- reducción, en las cuales el oxígeno molecular es el receptor final de electrones. Este es agregado al sustrato, y mediante la acción de los microorganismos, se produce la oxidación o mineralización del residuo. La reacción es muy eficiente, porque libera grandes cantidades de energía, necesaria para la síntesis del nuevo tejido celular (Romero, 1999).

Aunque las reacciones involucradas en el metabolismo microbiano son de una gran complejidad, se puede representar el proceso de oxidación aerobia mediante la ecuación 1.



Los microorganismos tienen la capacidad de respirar una gran variedad de moléculas orgánicas. En presencia de más de una fuente de alimentación, en general utilizan primero

aquellas moléculas simples de donde pueden obtener mayor cantidad de energía con el menor gasto para conseguirla. En orden decreciente de empleo: azúcares, alcoholes, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, hidrocarburos, almidón, pectinas, celulosa, lignina y por último, pesticidas (Frioni, L., 2006).

En el laboratorio, los microorganismos son estudiados bajo condiciones controladas y en medios de cultivo adecuados. La cinética de crecimiento consta de 4 etapas, que se pueden observar en la siguiente figura:

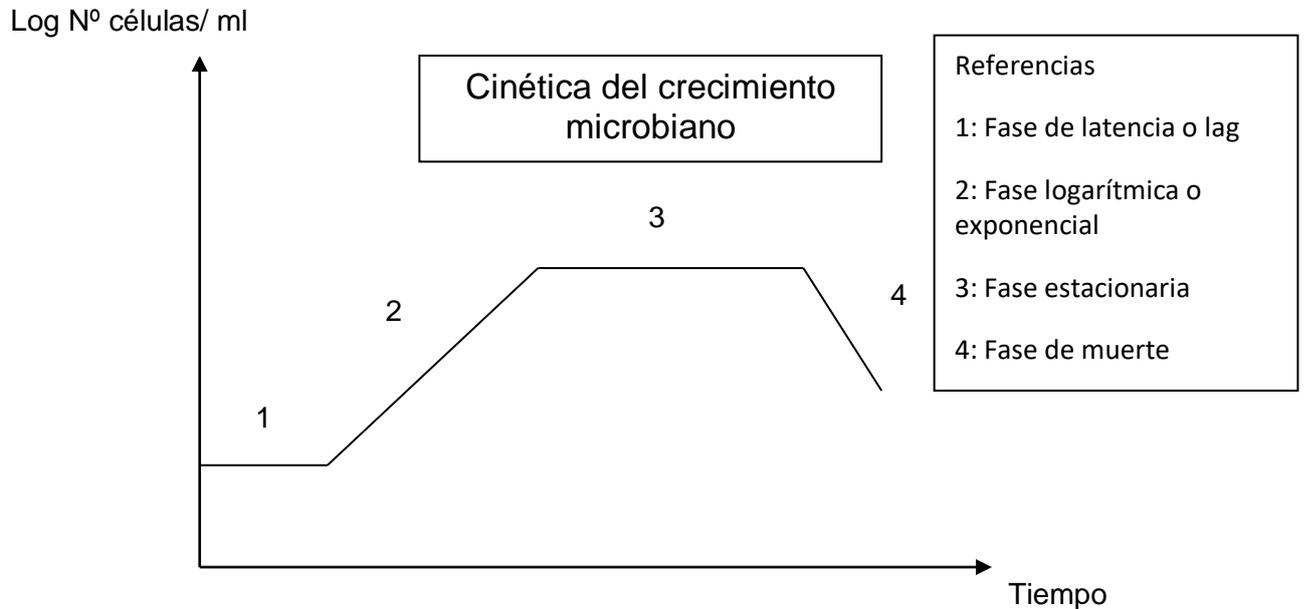


Figura 8. Cinética del crecimiento de un microorganismo en medio líquido de volumen fijo
Fuente: Elaboración propia a partir de *Frioni, L. (2006)*

Donde:

En la fase de latencia o fase lag (1), los microorganismos se comienzan a adaptar al medio pero todavía no hay división celular. Se preparan estructuras y enzimas necesarias para la degradación. Es recomendable acortar esta fase en el laboratorio, ya que implica gastos de energía y tiempo, por medio de estimulación a través del agregado de suplementos o uso de cepas jóvenes y/ o previamente adaptadas.

En la fase exponencial o logarítmica (2), es donde se logra el mayor crecimiento ya que la velocidad de multiplicación es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Aquellas industrias que trabajan con microorganismos, buscan trabajar en esta etapa y lo logran agregando al medio cualquier factor que se considere limitante para prolongarla el mayor tiempo posible.

En la fase estacionaria (3), el crecimiento se detiene. Esto puede deberse a la falta de nutrientes y/ o a la disminución de uno que se considere limitante, pero también a la aparición de sustancias inhibitoras o tóxicas que resultan del propio metabolismo celular. En este momento puede ocurrir que la velocidad de crecimiento iguale a la velocidad de muerte, por lo que la curva de crecimiento se mantendrá constante hasta que la velocidad de muerte comience a superar a la de división celular.

Cuando la velocidad de muerte domina por sobre la de crecimiento, se llega a la fase de muerte (4).

4.2.2.3. Factores que intervienen en la oxidación biológica

Tal y como explica Romero (1999), los factores que condicionan y/ o deben ser controlados en el proceso de tratamiento aerobio para que las reacciones se produzcan correctamente, y por tanto la depuración del efluente, son:

- Características físico- químicas del agua residual (determinan mayor o menor biodegradabilidad).
- Presencia de nutrientes esenciales para el crecimiento celular: C, H, O, N, P, S, Ca, Mg, etc.
- Relación aproximada C:N:P de 100:5:1. En caso de desequilibrio, es necesario suplementar con fuentes de N y P para permitir el crecimiento bacteriano.
- Oxígeno: condición fundamental, en las plantas de tratamiento el aporte de oxígeno se logra por burbujeo de aire.
- Temperatura: a mayor temperatura mayor velocidad de degradación, hasta los 37 °C, donde temperaturas mayores comienzan a ser letales para muchos microorganismos. En general, la temperatura óptima para el desarrollo bacteriano se encuentra entre los 20 °C y 28 °C.

4.2.2.4. Proceso de lodos activados

Los principios generales a partir del cual se ha desarrollado la metodología de este trabajo responden al proceso de lodos activados (color verde en la figura 6).

En este proceso, se mantiene un cultivo biológico formado por diversos tipos de microorganismos en contacto con el agua residual a tratar, dentro de un reactor biológico. El cultivo biológico, denominado licor de mezcla, está formado por un gran número de microorganismos agrupados en flóculos conjuntamente con materia orgánica y sustancias minerales. Dichos microorganismos transforman la materia orgánica mediante reacciones de oxidación biológica, y en el proceso se forman unos flóculos de biomasa fácilmente decantables que constituyen los denominados lodos activos o biológicos (Metcalf & Eddy, 1995).

Respecto al control de procesos, es necesario un sistema de aeración y agitación, que suministre el oxígeno necesario para la acción depuradora de las bacterias aerobias, que permita la homogenización del reactor y que evite la sedimentación de los flóculos y el lodo.

Una vez que la materia orgánica ha sido suficientemente oxidada, lo que requiere un tiempo de retención del agua en el reactor (tiempo de residencia), el licor de mezcla pasa al sedimentador secundario o clarificador. Aquí, el agua se deja reposar y los lodos floculados de biomasa tienden a sedimentarse, consiguiéndose separar el agua clarificada de los mismos. Este agua constituye el efluente que se vierte al cuerpo receptor y parte de los lodos floculados son recirculados de nuevo al reactor biológico para mantener en el mismo una concentración suficiente de microorganismos. El excedente se extrae del sistema y se evacúa para su tratamiento (Metcalf & Eddy, 1995).

En la siguiente figura, se observa un sistema de flujo continuo de lodos activados, con aeración extendida, que ilustra los procesos anteriormente explicados.

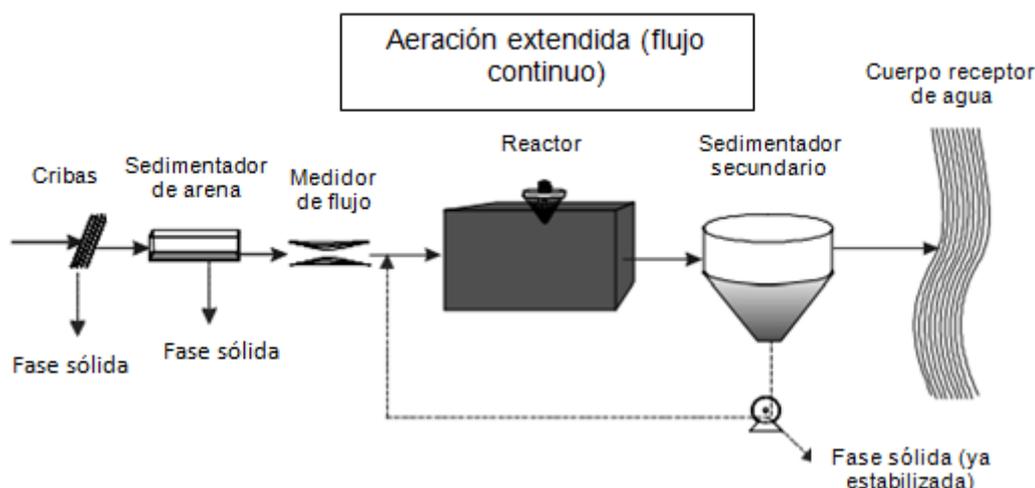


Figura 9. Diagrama de flujo del sistema de aeración extendida (fase líquida)

Fuente: de Lemos y von Sperling (2005)

Donde las cribas y el sedimentador de arena separan la fase sólida de la líquida; el medidor de flujo mide y controla el volumen que ingresa al reactor biológico; en el sedimentador secundario, se separan por sedimentación los lodos del agua clarificada. Parte de los lodos retorna al reactor, y la otra parte sale del sistema para ser estabilizada (tratada); al finalizar el proceso, el agua clarificada ya está lista para ser vertida en un cuerpo receptor de agua.

El reactor es el lugar donde se lleva a cabo la oxidación biológica; posee un sistema de aeración mediante sistemas de difusión o aeración mecánica. Allí, el agua es retenida entre 16 a 24 horas (de Lemos y von Sperling, 2005).

4.2.2.5. Determinación de la biodegradabilidad

El concepto de biodegradabilidad se refiere al nivel de susceptibilidad de un compuesto orgánico a ser degradado por los microorganismos. Por lo tanto, es un parámetro muy importante a tener en cuenta para evaluar la viabilidad del tratamiento secundario de un determinado efluente (Cisterna O., Pedro; Peña, Deisy, s.f.).

En las aguas residuales provenientes de las industrias, la biodegradabilidad es un tema complejo. Algunos compuestos presentes en el efluente pueden ser fácilmente biodegradables, pero factores medioambientales, concentración del sustrato, condiciones del ensayo, etc., pueden alterar su susceptibilidad para ser utilizados en los cultivos mezclados de microorganismos (Schönborn, 1986).

4.2.2.6. Medida de la biodegradabilidad

Como medida de la biodegradabilidad, se utilizan los conceptos de DQO y DBO₅ (Cisterna O., Pedro; Peña, Deisy, s.f.).

- Demanda química de oxígeno (DQO): corresponde a la cantidad de oxígeno requerido para oxidar completamente por medios químicos los compuestos orgánicos a CO₂ y H₂O, y las sustancias inorgánicas susceptibles de ser oxidadas.
- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅): se define como la cantidad de oxígeno utilizada por los microorganismos no fotosintéticos a una temperatura de 20 °C, para metabolizar los compuestos orgánicos degradables biológicamente. Para obtener un resultado estable y reproducible, el oxígeno consumido es medido durante un

período de cinco días. Durante los primeros dos días, los microorganismos rápidamente metabolizan los compuestos orgánicos disponibles y viables de degradar biológicamente.

4.2.2.7. Relación entre parámetros

Para diseñar una planta de tratamiento de lodos activados, es necesario saber cuánta materia orgánica biodegradable está presente en el efluente, por consiguiente, se necesita determinar la DBO₅. Sin embargo, es aconsejable medir en paralelo la DQO, y de esta forma recurrir a la razón DBO₅/DQO, llamada Índice de Biodegradabilidad (tabla 1), que es una aproximación cuantitativa de la biodegradabilidad de un efluente y puede utilizarse para controlar y operar la planta (Hernández, A., 1992).

Tabla 1.

Índice de biodegradabilidad

	No biodegradable	Poco biodegradable	Biodegradable
DBO ₅ /DQO	<0,2	0,2-0,4	>0,4

Fuente: Affranchino, G., comunicación personal, 2018

4.3. Legislación

La Ley de Aguas de Mendoza fue sancionada el 20 de noviembre de 1884. A los fines de cumplir acabadamente con las obligaciones a cargo de la administración, otorga al Departamento General de Irrigación (DGI) el poder de policía sobre las aguas, cauces naturales y artificiales, riberas y servidumbres (Art. 6, 10,190 y CC). En uso de esta facultad, el Superintendente del DGI puede imponer diversas sanciones, como multas, clausura del punto de vuelco (contaminación) e incluso el cierre del establecimiento, en el caso que se infecten las aguas (Art. 131 L. A.).

La contaminación hídrica y los asuntos que con ella se relacionan están regulados por la Resolución N° 778/96 de la Provincia de Mendoza, dictada el 23 de diciembre de 1996 y sus modificatorias (Resolución N°627/00, la cual establece los parámetros que deben tener los vertidos industriales y cloacales para reuso agrícola, además de modificar el principio de "Contaminador- Pagador" del Art. 59, por el principio "El que contamina paga").

De acuerdo con la misma, todos los establecimientos que viertan efluentes al dominio público hidráulico deberán obtener la autorización administrativa correspondiente y deberán contar con un sistema de tratamiento de efluentes adecuado para ajustarse a los requerimientos técnicos previstos en la legislación vigente. La autorización mencionada es el Permiso de Vertido y es otorgado por el Superintendente del DGI. Si los establecimientos no cumplen con los requisitos necesarios para obtener dicho permiso, deberán suscribir a un Convenio de Gestión de Permiso de Vertido, a través del cual se les otorga un plazo para adecuar la calidad de sus efluentes y mejorar sus sistemas de tratamiento.

En el artículo 12, se dispone que "los vertidos o vuelcos realizados al dominio público hidráulico deberán reunir las condiciones de calidad (química, física y bacteriológica), caudal (instantáneo máximo, promedio diario), frecuencia (variaciones diarias y/o semanales típicas), periodicidad (épocas del año en que se produce el vertido) y ubicación de su punto de vuelco, que fije el DGI".

También se establece la prohibición de la mezcla o confusión de efluentes industriales con efluentes cloacales para el vuelco de los mismos al dominio público hidráulico, y la

utilización de caudales de agua que sirvan para la dilución de efluentes, salvo casos especiales debidamente autorizados y habilitados.

A su vez, en el Anexo I, Artículo 1º, se establecen los parámetros físicos y químicos máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico (véase Anexo I).

Por último, la ley provincial N° 5961, “Ley General de Ambiente”, tiene como objetivo principal “la preservación del medio ambiente en todo el territorio provincial a los fines de resguardar el equilibrio ecológico y el desarrollo sustentable, siendo sus normas de orden público”. En esta ley se incluye el concepto de preservación, conservación, defensa y mejoramiento del ambiente y sus recursos, entre ellos el recurso agua (Art 3, inc. b), e introduce el deber de reposición a un estado anterior en caso de producirse un menoscabo, ya sea por parte de una persona física o jurídica (Sosa, R., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se desarrolló una metodología para lograr la degradación biológica de un efluente proveniente de la industria de aceitunas maquinadas, a través de microorganismos aerobios presentes en el mismo (nativos). La empresa se encuentra ubicada en el departamento de Maipú, Provincia de Mendoza, y actualmente sus aguas residuales son dispuestas en grandes piletas donde únicamente se lleva a cabo un tratamiento primario de separación de sólidos gruesos y objetos de gran tamaño.

El efluente a tratar fue proveído por la empresa que elabora las aceitunas maquinadas, dispuesto en bidones y correctamente extraído de la boca de vertido que descarga en las piletas de disposición. En dicha empresa no hay separación de las aguas de procesos, por lo que este vertido final resulta en una mezcla de cada una de ellas.

5. Tratamiento primario del efluente

El efluente está constituido por dos fases: una fase líquida (hidrofílica), y una grasa (hidrofóbica). A continuación, se pueden observar las dos fases.

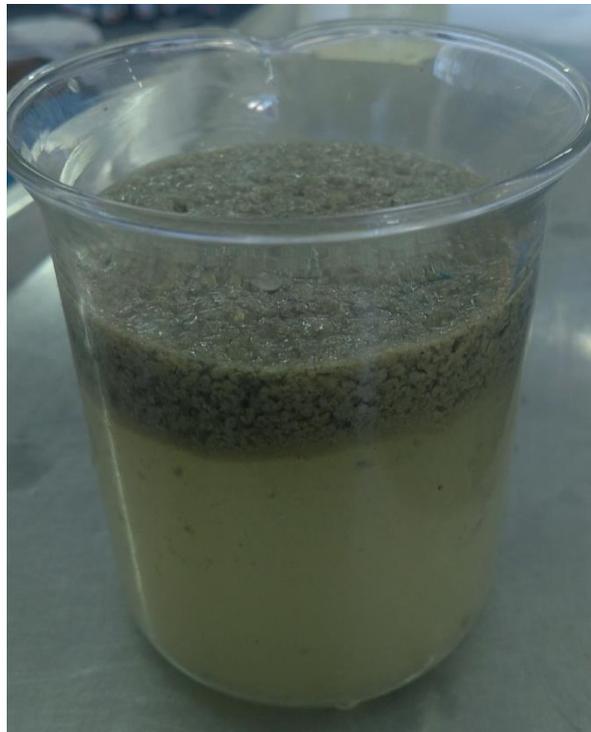


Figura 10. Muestra del efluente donde se pueden observar las fases líquida y grasa
Fuente: Propia

El trabajo tuvo por objetivo tratar la fase hidrofílica del mismo, por lo que fue necesario aumentar la separación de fases que naturalmente se produce por la menor densidad de las grasas sobre el líquido. Para ello, la fase hidrofílica se separó por calentamiento y luego enfriamiento del efluente. Esto se produjo gracias a que el punto de solidificación de varios ácidos grasos presentes en el efluente varía entre 18 °C y 23 °C, produciendo una separación físico- química donde las grasas se separan del líquido (Maldonado M., comunicación personal, 2018).



Figura 11. Solidificación de la fase hidrofóbica por enfriamiento (compárese con la figura 10)
Fuente: Propia

Una vez solidificadas las grasas, se retiraron del recipiente (constituyen un bloque fácilmente extraíble). El tratamiento de las mismas será objeto de investigaciones futuras.

Posteriormente, se realizó un doble filtrado (papel de filtro Whatman 150 mm), para eliminar la mayor cantidad posible de sólidos remanentes.

Por lo expuesto, el trabajo centró su atención en el tratamiento secundario (biológico) del efluente, ya que las técnicas de tratamiento primario son aplicadas en la industria, y en el laboratorio solo fueron complementadas a través de la técnica de filtrado y separación de grasas realizadas. Observando la figura 6, la etapa del trabajo realizado corresponde entonces a la coloreada en verde.

6. Tratamiento secundario del efluente

El trabajo consistió en la realización de un ensayo a escala experimental, donde el efluente fue dispuesto en 5 erlenmeyers. Cada uno de estos constituyó una repetición, y todos fueron colocados en agitación constante durante el tiempo que duró el ensayo (14 días), mediante un agitador modelo "Dragon Lab" a 220 rpm. La figura 12 ilustra lo anterior, donde se muestran 4 de los 5 prototipos.



Figura 12. Prototipos donde se realizó el ensayo
Fuente: Elaboración propia

El efluente fue suplementado con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, en relación 100:5:1.

Las condiciones fueron de aerobiosis, a temperatura ambiente de 25 °C, estable mediante un sistema de aire acondicionado.

A partir del día 0 (inicio del ensayo), se tomaron muestras de cada prototipo con pipetas esterilizadas en autoclave, primero cada 2 hs (días 0 y 1) y luego muestras diarias (cada 24 hs).

Cada muestra tomada fue identificada con su número correspondiente, en función del erlenmeyer al que pertenecía (1, 2, 3, 4 ó 5) y el momento en que fueron extraídas. Se colocaron a temperatura de refrigeración hasta su posterior utilización en las diferentes determinaciones que se llevaron a cabo.

Las determinaciones consistieron en dos tipos de análisis, uno físico- químico y otro microbiológico.

6.1. Técnicas físico- químicas

6.1.1. pH (APHA, 1992)

Las mediciones fueron realizadas por el método potenciométrico, con electrodo HACH Pocket Pro, diariamente durante el tiempo del ensayo.

El método de medida utiliza una celda electroquímica, consistente en un electrodo indicador sensible a la concentración de protones H^+ , un electrodo de referencia y la muestra (como electrolito de la celda). El potencial de la celda está relacionado con el pH.

6.1.2. Conductividad eléctrica (APHA, 1992)

Se determinó mediante electrometría con un electrodo conductimétrico, expresándose el resultado en microsiemens/centímetro ($\mu S/cm$) (APHA 1992). Las mediciones se realizaron con electrodo HACH Pocket Pro, diariamente durante el tiempo del ensayo.

6.1.3. Sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles (APHA, 1992)

Principio: se filtra una muestra bien mezclada con una membrana filtrante de fibra de vidrio, y el residuo retenido en el mismo se seca a un peso constante a 103- 105 °C. El aumento de peso del filtro, respecto al peso inicial, representa los sólidos totales en suspensión. El residuo se incinera, a peso constante, a una temperatura de 550 ± 50 °C. Los sólidos remanentes representan los sólidos totales fijos en suspensión, mientras que la pérdida de peso por ignición representa los sólidos volátiles en suspensión.

Materiales:

- placas de evaporación de 100 ml de capacidad, fabricadas con porcelana, platino o vaso alto de sílice,
- horno de mufla para operar a 550 ± 50 °C,
- baño de vapor,
- desecador,
- horno de secado, para operaciones a 103- 105 °C,
- balanza de análisis, capaz de pesar hasta 0,1 mg,
- plancheta de acero inoxidable o aluminio de 65 mm de diámetro o crisol de Gooch,
- discos de filtrado de fibra de vidrio,
- aparato de filtrado.

Procedimiento:

a) Sólidos suspendidos totales

- Análisis de la muestra:

- 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 filtración 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. Secar nuevamente en un horno a 103- 105 °C durante una hora.
- 6) Dejar enfriar y pesar.

Cálculo:

$$\text{mg de sólidos totales en suspensión/l} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{vol. de muestra, ml}}$$

Donde A = peso del filtro + residuo seco en mg, y
B = peso del filtro, mg

b) Sólidos fijos y volátiles

- 1) Incinerar el residuo producido en la determinación de sólidos suspendidos totales a peso constante, en un horno de mufla a temperatura de 550 ± 50 °C, durante 15 minutos.
- 2) Enfriar la placa o el disco de filtro al aire hasta que se haya disminuido el calor y transferir a un desecador.
- 3) Pesar la placa o el disco tan pronto como se hayan enfriado para equilibrar la temperatura.

Cálculos:

$$\text{mg de sólidos suspendidos volátiles/l} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

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

Donde A = peso de residuo + placa antes de la incineración, mg,
B = peso de residuo + placa o filtro después de la incineración, mg,
C = peso de la placa o filtro, mg

6.1.4. Sólidos sedimentables (APHA, 1992)

Principio: los sólidos sedimentables de las aguas de superficie y salinas, así como de los residuos domésticos e industriales, pueden ser determinados y expresados en función de un volumen (ml/l), mediante la sedimentación de los mismos en un cono de Imhoff.

Materiales:

- cono de Imhoff

Procedimiento:

- 1) Llenar un cono de Imhoff hasta la marca 1-1 con una muestra bien mezclada.
- 2) Dejar sedimentar durante 10 minutos y registrar el volumen de sólidos sedimentables del cono como ml/l.
- 3) Dejar sedimentar durante 110 minutos más y registrar el volumen de sólidos sedimentables del cono como ml/l.



Figura 13. Medición de sólidos sedimentables en cono de Imhoff

Fuente: Propia

6.1.5. Nitrógeno amoniacal por el método titulométrico (APHA, 1992)

Principio: el procedimiento de destilación y titulación se emplea principalmente para concentraciones de N-NH₃ superiores a 5 mg/l. La muestra se tampona a pH 9,5 con un tampón de borato para reducir la hidrólisis de los cianatos y los compuestos orgánicos nitrogenados. Se destila a una solución de ácido bórico y se determina el amoníaco titulométricamente con H₂SO₄ estándar y un indicador mixto.

Materiales:

- aparato de destilación
- pHmetro

Reactivos:

Para la destilación

- agua exenta de amoníaco para preparar todos los reactivos y diluciones,
- solución tampón de borato,
- hidróxido de sodio 6N,
- agua de clorante,
- agua neutralizante,
- solución absorbente de ácido bórico puro,
- solución indicadora de ácido bórico.

Para la titulación

- solución de indicador mixta: indicador rojo de metilo disuelto en 100 ml de alcohol etílico o isopropílico al 95% más 100 mg de azul de metileno disueltos en 50 ml de alcohol etílico o isopropílico al 95%. Combinar las dos soluciones,
- solución indicadora de ácido bórico,
- titulante estándar de ácido sulfúrico 0,02N.

Procedimiento de destilación:

- 1) Preparación del equipo: 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. Añadir unas cuentas de vidrio para ayudar a la ebullición, y utilizar esa mezcla para producir vapor en el aparato de destilación, hasta que en el destilado no aparezcan trazas de amoníaco.
- 2) Preparación de la muestra: utilizar 500 ml de muestra de cloro o una porción diluida con agua a 500 ml. Cuando la concentración N-NH₃ sea inferior a 100 µg/l, utilizar un volumen de muestra de 1000 ml. Eliminar el cloro residual por adición de agente de cloro, equivalente al cloro residual, en el momento de la obtención. Añadir 25 ml de solución tampón de borato y ajustar el pH a 9,5 con NaOH 6N mediante un medidor de pH.
- 3) Destilación: destilar 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.

Procedimiento de titulación:

- 4) Titular el amoníaco del destilado con H₂SO₄ 0,02N titulante, hasta que el indicador vire a lavanda pálido.
- 5) Blanco: llevar un blanco durante todos los pasos del método y aplicar la corrección necesaria a los resultados.

Cálculos para muestras líquidas:

$$\text{mg de N-NH}_3/\text{kg} = \frac{(A - B) \times 280}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde A = volumen de H₂SO₄ titulado para la muestra, ml, y

B = volumen de H₂SO₄ titulado para el blanco, ml

6.1.6. Nitratos por el método del sulfato de brucina (Perdomo y col., 2012)

Principio: este método se basa en la reacción de los iones nitrato presentes en una muestra de agua con sulfato de brucina en presencia de ácido sulfúrico, formándose un complejo de color amarillo medible a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro visible ultravioleta.

La medida de la intensidad de color es proporcional a la concentración del ión nitrato presente en la muestra.

Materiales:

- espectrofotómetro,
- balanza analítica,
- pH-metro,
- tubos Nessler,
- termostato,
- termómetro.

Reactivos:

- ácido clorhídrico,
- ácido sulfúrico,
- ácido sulfanílico monohidratado,
- arsenito de sodio,
- cloroformo,
- cloruro de sodio,
- hidróxido de sodio,
- nitrato de potasio,
- sulfato de brucina.

Procedimiento:

- 1) Colocar el número suficiente de tubos de reacción en la gradilla metálica.
- 2) Tomar una alícuota de 10 ml de la muestra en un tubo de ensayo.
- 3) Verter de forma independiente, en diferentes tubos de ensayo, 10 ml de los patrones preparados, siempre llevando un blanco de reactivo, obtenido a partir de agua destilada.
- 4) Colocar los tubos en un baño de agua fría (0 - 10 °C).
- 5) Añadir 2 ml de cloruro de sodio al 30% al blanco de reactivos, estándares y muestras. Mezclar el contenido de los tubos.
- 6) Añadir 10 ml de la disolución de ácido sulfúrico al 98% en cada tubo y mezclar. Permitir que los tubos alcancen el equilibrio térmico en el baño frío. Asegurarse que las temperaturas de todos los tubos están en equilibrio antes de continuar.
- 7) Añadir 0,5 ml del reactivo desarrollador de color ácido sulfanílico-brucina a cada tubo (excepto a los tubos de control de interferencias).
- 8) Mezclar cuidadosamente. Si al mezclar se observa una coloración rosa o amarilla, hacer una dilución mayor de la muestra antes de continuar.
- 9) Calentar los tubos en baño María a 92 °C, exactamente 20 min.

- 10) Remover los tubos del baño María, sumergirlos en un baño de agua fría, y esperar a que alcancen el equilibrio térmico a temperatura ambiente.

Nota: el calentamiento de los tubos debe ser uniforme. Si es necesario, corregir el color debido a la materia orgánica disuelta que causa color en el calentamiento. Es necesario realizar duplicados de muestras con todos los reactivos, pero sin agregar el reactivo desarrollador de color ácido sulfanílico- brucina.

Cálculos:

$$C = \frac{A - N}{m}$$

Donde C = concentración de la muestra,
A = absorbancia de la muestra,
N = intercepto de la curva de calibración, y
m = pendiente de la curva de calibración.

Los resultados se expresan en mg N-NO₃/l

6.1.7. Fosfatos por el método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico (APHA, 1992)

Principios: en una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar el ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato.

Materiales:

- Equipo colorimétrico: se requiere un espectrofotómetro, para uso a 400- 490 nm.
- Material de vidrio lavado al ácido: para determinar concentraciones bajas de fósforo, usar material de vidrio lavado con HCl diluido caliente y aclarar bien con agua destilada.
- Aparato de filtración y papel de filtro N° 42 o equivalente.

Reactivos:

- solución acuosa de indicador de fenolftaleína,
- ácido clorhídrico,
- carbón activado,
- reactivo vanadato- molibdato,
- solución patrón de fosfato.

Procedimiento:

- 1) Ajuste del pH de la muestra: si el pH de la muestra es mayor a 10, añadir 0,05 ml (una gota) de indicador de fenolftaleína a 50 ml de muestra y decolorar el color rojo con HCl antes de diluir a 100 ml.
- 2) Eliminación del color de la muestra: eliminar el excesivo color de la muestra agitando unos 50 ml con 200 mg de carbón activado en un erlenmeyer durante 5 minutos y filtrando para eliminar el carbón.
- 3) Desarrollo de color en la muestra: colocar 35 ml de muestra o menos, conteniendo de 0,05 a 1 mg de fósforo, en un matraz aforado de 50 ml. Añadir 10 ml de reactivo vanadato- molibdato y diluir hasta la señal con agua destilada.
- 4) Preparar un blanco con 35 ml de agua destilada en lugar de la muestra. Al cabo de 10 minutos o más, medir la absorbancia de la muestra frente a un blanco a longitud de onda de 400 a 490 nm. El color es estable durante días y su intensidad no es afectada por las variaciones de la temperatura ambiente.

5) Preparar la curva de calibrado.

Cálculo:

$$\text{mg P/l} = \frac{\text{mg P (en 50 ml volumen final)} \times 1.000}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

6.1.8. Cloruros por el método potenciométrico (APHA, 1992)

Principio: se determinan 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.

Materiales:

- electrodos 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, HNO₃ concentrado,
- nitrato de plata patrón 0,0141 M (0,0141 N),
- reactivos para el pre tratamiento:
 - a) ácido sulfúrico, H₂SO₄
 - b) peróxido de hidrógeno, H₂O₂ al 30%,
 - c) hidróxido de sodio, NaOH 1N.

Procedimiento:

- a) Estandarización: 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-1) 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 HNO₃ concentrado. Introducir el agitador y los electrodos.

a-2) Ajustar el aparato al rango deseado de mV o unidades de pH. Poner en marcha el agitador.

a-3) Añadir titulante de AgNO₃ patrón, registrando la lectura de la escala tras cada adición.

a-4) Estimar el volumen de AgNO₃ utilizado en el punto en que se produce el máximo cambio de lectura del aparato por adición unitaria de AgNO₃.

- b) Análisis de la muestra:

b-1) Llevar con la pipeta 100 ml de muestra, o una porción que contenga no más de 10 mg de Cl⁻, en un vaso de 250 ml.

b-2) En presencia de compuestos orgánicos, sulfito u otras interferencias, acidificar la muestra con H₂SO₄, utilizando papel tornasol. Hervir durante 5 minutos para eliminar compuestos volátiles. Añadir 3 ml de H₂O₂ 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.

b-3) Añadir HNO₃ 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.

b-4) Completar la determinación titulando.

Nota: para un trabajo más exacto, hacer una valoración en blanco, utilizando agua destilada sin cloro durante el procedimiento.

Cálculos:

$$\text{mg Cl}^-/\text{l} = \frac{(A-B) \times N \times 35.450}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde A = ml AgNO₃,
B = ml blanco, y
N = normalidad del titulante.

6.1.9. Sodio y potasio por el método directo de llama de aire-acetileno (APHA, 1992)

Principio: 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. La intensidad de la luz a la longitud de onda correspondiente para cada elemento, es aproximadamente proporcional a la concentración del mismo.

Materiales:

- 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, HNO₃, al 2%, 1 + 1 y concentrado,
- agua regia, obtenida con tres volúmenes de HCl concentrado y un volumen de HNO₃ 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 HNO₃ 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.

6.1.10. Polifenoles Totales (Fernández y col., s.f.)

Principios: el ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin- Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul (figura 14), susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm.

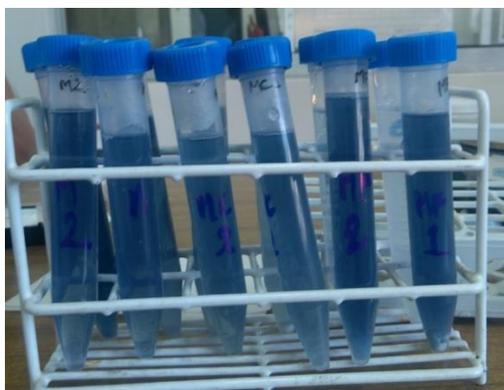


Figura 14. Coloración azul producida por la reacción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin- Ciocalteu

Fuente: Propia

Materiales:

- espectrofotómetro UV-Visible,
- balanza analítica,
- centrífuga,
- vortex,
- matraces aforados de 25 ml y 10 ml,
- vasos de precipitados de 50 ml,
- pipetas de 1, 5 y 10 ml,
- tubos de ensayo con tapón,
- tubos de centrífuga,
- cubetas de plástico de 3 ml para espectrofotometría visible.

Reactivos:

- agua destilada,
- reactivo de Folin- Ciocalteu,
- carbonato de sodio al 7,5%.

Procedimiento:

- 1) Colocar 100 µl de muestra del efluente en 5 ml de agua destilada.
- 2) Preparar la muestra, respetando el orden siguiente:
 - 2.1) 100 µl de la muestra previamente diluida,
 - 2.2) 8 ml de agua destilada,
 - 2.3) 500 µl del Reactivo de Folin- Ciocalteu,
 - 2.4) 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 765 nm.

6.1.11. Azúcares reductores totales por el método del ácido dinitrosalicílico (Ávila y col., 2012).

Principio: según el método de Miller (1959), los azúcares reductores en presencia de calor, al entrar en contacto con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), lo reducen desarrollando un cambio de color con variaciones de amarillo- anaranjado hasta café. El cambio de color se determina por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a 590 nm. La concentración de los azúcares reductores liberados en la muestra se determina graficando la absorbancia en función de la concentración e interpolando en la curva patrón del azúcar utilizado.

Materiales:

- centrífuga,
- baño María,
- baño de hielo,
- espectrofotómetro,
- tubos eppendorf.

Reactivos:

- ácido clorhídrico 1M,
- agua bidestilada,
- ácido dinitrosalicílico.

Procedimiento:

- 1) Colocar 500 μ l de la muestra, previamente centrifugada 10 minutos a 10.000 rpm, en un tubo eppendorf.
- 2) Agregar 50 μ l de HCl 1 M y llevar 10 minutos a baño María a 100 °C.
- 3) Retirar del calor y colocar por 10 minutos en baño de hielo.
- 4) Agregar el reactivo DNS, se formará un complejo amarillo- anaranjado cuya intensidad de color varía de acuerdo a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.
- 5) Proceder a la lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 590 nm. Con los datos de absorbancia y la curva patrón correspondiente al reactivo preparado, calcular la concentración de azúcares reductores.

Nota: para la preparación del blanco se realizan los mismos pasos pero agregando 500 μ l de agua bidestilada.

6.1.12. DQO (IMPEC ARGENTINA)

Principios: En la actualidad se utilizan unos viales (tubos) que ya contienen los reactivos (ácido sulfúrico, dicromato de potasio, sulfato de plata, sulfato de mercurio y ácido sulfámico).

Procedimiento:

- 1) Precalear el termoreactor a 150 °C.
- 2) Abrir la tapa de un vial de rango apropiado y pipetear cuidadosamente 2 ml de la 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 el termoreactor y calentar durante 2 h a 150 °C.
- 6) Apagar el termoreactor, agitar los viales y colocar en un rack hasta que se encuentren a temperatura ambiente.
- 7) Leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.
- 8) El valor que muestra el Display es igual a la concentración en mg O₂/l de DQO que contiene la muestra.

6.1.13. DBO₅ (APHA, 1992)

Principios: el método consiste en llenar con muestra, hasta rebosar, un frasco hermético del tamaño especificado, e incubarlo a la temperatura establecida durante 5 días. El oxígeno disuelto se mide antes y después de la incubación, y la DBO₅ se calcula mediante la diferencia entre el OD inicial y el final. Debido a que el OD se determina inmediatamente después de hacer la dilución, toda la captación de oxígeno, incluida la que ocurre durante los primeros 15 minutos, se incluye en la determinación de la DBO₅.

Se ha aceptado como norma realizar una incubación durante 5 días, a 20 °C, en la oscuridad y fuera de contacto con el aire, a un pH de 7- 7,5 y en presencia de nutrientes y oligoelementos que permitan el crecimiento de los microorganismos.

Materiales:

- frasco de 2,7 l color caramelo para preparar el agua de dilución,
- 9 botellas de incubación winkler de vidrio de 300 ml para DBO con tapón de vidrio,
- agitador magnético,
- medidor de OD,
- probeta de 10 ml,

- bols 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 de solución de sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- 10 ml de solución de cloruro de calcio CaCl_2 ,
- 10 ml de solución de cloruro férrico FeCl_3 ,
- 0,5 ml de piridina,
- 10 ml de siembra de 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 DBO_5 , de la siguiente forma: $2400/\text{DQO}=\dots$ ml. 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.
- 2) Preparar el agua testigo o agua de dilución del ensayo: en el botellón caramelo, luego de enjuagarlo reiteradas veces, se colocan aproximadamente 2 l de agua destilada y se agregan 10 ml de cada uno de los reactivos. Luego, bajo campana y con pipeta, se añaden 0,5 ml de piridina. Se tapa y agita. Se añaden 10 ml de muestra cloacal y se enrasa hasta el cuello de la botella con agua destilada y se homogeniza.
- 3) Lavar y enjuagar con agua varias veces las botellas de incubación para la DBO, de 300 ml de capacidad. Por último, enjuagar con agua destilada y escurrirlas antes de su uso. De las 9 botellas, 2 se usan como blanco y se las identifica como Agua 1 y Agua 2. En ellas se colocan solamente 300 ml de agua de dilución.
- 4) Medir el OD en cada botella: se enciende el medidor de OD y se procede a hacer dos lecturas (calibrar el equipo) con agua destilada en el capuchón, se anota su valor y temperatura. Luego se realiza la medición para las 9 botellas. Se deben registrar los valores de OD y temperatura. Deben 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 24 h la botella caramelo, y luego de hacer la lectura final del ensayo hacer lo mismo con las botellas winkler.
- 6) Luego de cinco días leer OD en todas las botellas, Agua 1 y 2 no deberían tener gran consumo de oxígeno.

Nota: Todas las muestras se hacen por duplicado, una con el volumen calculado y la otra con la mitad. Se debe rotular cada botella colocando: número de muestra, dilución de la muestra y volumen colocado de la muestra dentro de la botella.

Cálculos:

$$\text{DBO}_5 \text{ mg/l} = \frac{\text{D1} - \text{D2}}{\text{P}}$$

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, y
 P = fracción volumétrica decimal de la muestra utilizada.

6.1.14. Alcalinidad por el método de titulación (APHA, 1992)

Principio: los iones hidroxilo, presentes en una muestra como resultado de la disociación o hidrólisis de los solutos, reaccionan con las adiciones de ácido estándar. Por tanto, 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: añadir 0,2 ml (cinco gotas) de solución indicadora y titular sobre una superficie blanca hasta conseguir un cambio de color persistente, característico del punto equivalente.
- 2) Determinar el pH de punto final adecuado.
- 3) Preparar conjuntamente la muestra y la titulación.
- 4) Titular a 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.

Cálculos:

$$\text{Alcalinidad mg CaCO}_3/\text{l} = \frac{A \times N \times 50.000}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde A = ml utilizados de ácido estándar, y
N = normalidad del ácido estándar.

6.1.15. Dureza por el método titulométrico EDTA (APHA, 1992)

Principio: el ácido etilendiaminotetraacético y sus sales de sodio (abreviatura EDTA) forman un complejo de quelato soluble al añadirse a las soluciones de algunos cationes metálicos. Si a una solución acuosa que contenga iones calcio y magnesio a un pH de $10 \pm 0,1$ se añade una pequeña cantidad de colorante, como negro de eriocromo T o calmagita, la solución toma un color rojo vino.

Si se añade EDTA como reactivo de titulación, los iones calcio y magnesio formarán un complejo, y, cuando todos estos iones estén incluidos en dicho complejo, la solución cambiará del rojo vino al azul, señalando el punto final de la titulación.

Reactivos:

- solución tampón,
- agentes complejantes,
- indicador negro de eriocromo T o calmagita,
- titulante EDTA estándar 0,01 M,
- solución de calcio estándar,
- hidróxido de sodio 0,1 N.

Procedimiento:

- 1) Tratamiento previo de muestras de aguas contaminadas y residuales: utilizar la digestión del ácido nítrico- ácido sulfúrico, o bien, ácido nítrico- ácido perclórico.
- 2) Titulación de las muestras:
 - 2-a) Seleccionar un volumen de muestra que requiera menos de 15 ml de reactivo EDTA.
 - 2-b) Diluir 25 ml de muestra hasta alrededor de 50 ml de agua destilada en una batea de porcelana u otro recipiente adecuado.
 - 2-c) Añadir entre 1 y 2 ml de solución tampón. Por lo general, 1 ml será suficiente para conseguir un pH de 10 a 10,1.
 - 2-d) Añadir una o dos gotas de solución indicadora. Poco a poco, añadir titulante EDTA estándar, removiendo continuamente, hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos.
 - 2-e) Añadir las últimas gotas con intervalos de 3- 5 segundos. En el punto final, la solución es azul.

Nota: realizar la titulación en cinco minutos, medidos a partir del momento de la adición del tampón.

Cálculos:

$$\text{Dureza (EDTA) como mg de CaCO}_3/\text{l} = \frac{A \times B \times 1\,000}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde A = ml de titulación para la muestra, y

B = mg CaCO₃ equivalente a 1 ml de titulante EDTA.

6.2. Técnicas microbiológicas

A partir de las muestras que fueron extraídas, para cada prototipo (1 al 5) y tiempos (4, 8,12, 16 y 20 h), se realizaron diluciones sucesivas y luego la siembra por técnica Pour plate, para lograr el recuento de bacterias que crecen en los diferentes medios de cultivo utilizados:

- Agar Plate Count: recuento total de bacterias aerobias mesófilas (PC). Esta formulación está especificada en el Standard Methods para el examen de las aguas residuales. La triptona y el extracto de levadura suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas, que se requieren para el crecimiento de una vasta variedad de microorganismos, y la glucosa actúa como fuente de energía (Francisco Soria Melguizo, S.A., Ficha Técnica N° 770572, 2009).
- Agar EMB Levine: recuento de coliformes. El agar eosina- azul de metileno es un medio selectivo para el aislamiento de enterobacterias y otros bacilos Gramnegativos. El componente nutritivo lo aporta la peptona, y los indicadores eosina y azul de metileno permiten la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/ o sacarosa de aquellos que no, además de ejercer un efecto

inhibidor en una amplia variedad de bacterias Grampositivas (Laboratorios Britania, Ficha Técnica Agar EMB, 2015).

- Papa Glucosado Agar: recuento de hongos y levaduras (PG). Es un medio nutritivo no selectivo, en el cual la infusión de papa y glucosa favorecen un desarrollo exuberante, y es diferencial en base a la producción de pigmentos por los microorganismos que crecen en el mismo (Laboratorios Britania, Ficha Técnica Papa Glucosado Agar, 2015).

Luego se procedió al aislamiento de cada colonia a través de repiques por estrías en superficie, y una vez conseguidas colonias puras, se almacenaron para ser enviadas a identificar con el objetivo de conocer los grupos de microorganismos nativos o autóctonos que se encuentran en el efluente y que participan en las primeras etapas de la degradación.

Los procedimientos se describen a continuación.

6.2.1. Recuento de bacterias viables en placa

Principios:

Este método cuantifica el número de bacterias vivas (viables) que posee una muestra a investigar, ya que se basa en el recuento de colonias de microorganismos que crecen en un medio de cultivo sólido apropiado. El recuento de bacterias aerobias no mide necesariamente el número total de bacterias viables por gramo de muestra analizada, puesto que las células bacterianas se encuentran aisladas en pares, cadenas o racimos. Por este motivo, el conteo se expresa como Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) (Bonilla y col., 2016).

En este método se trabajó con diluciones de la muestra, debido a la necesidad de transportar la carga microbiana a un número de microorganismos aproximadamente ubicados entre 30 y 300 colonias por placa. Valores menores de 30 no son representativos estadísticamente, y valores mayores de 300 pueden estar influenciados por problemas de inhibición en el crecimiento a raíz de la competencia que se genera al encontrarse las colonias muy cerca unas de las otras (Bonilla y col., 2016).

Una vez listas las diluciones, se realizó la siembra por técnica Pour plate.

6.2.1.1. Preparación de las diluciones

Materiales:

- cámara de flujo laminar o mechero Bunsen,
- muestra del efluente,
- medios de cultivo PC, EMB Y PG, estériles. Se realizó una modificación en la preparación de los mismos, donde se utilizó 65% de agua destilada y 35% del agua de efluente filtrado,
- pipeta automática de 0,9 ml con puntas descartables estériles,
- pipeta automática de 0,1 ml con puntas descartables estériles,
- tubos eppendorf estériles con tapa,
- placas de Petri estériles,
- agua destilada estéril,
- vortex,
- recipiente para descartar las puntas.

Las diluciones se realizaron según lo indica el siguiente esquema:

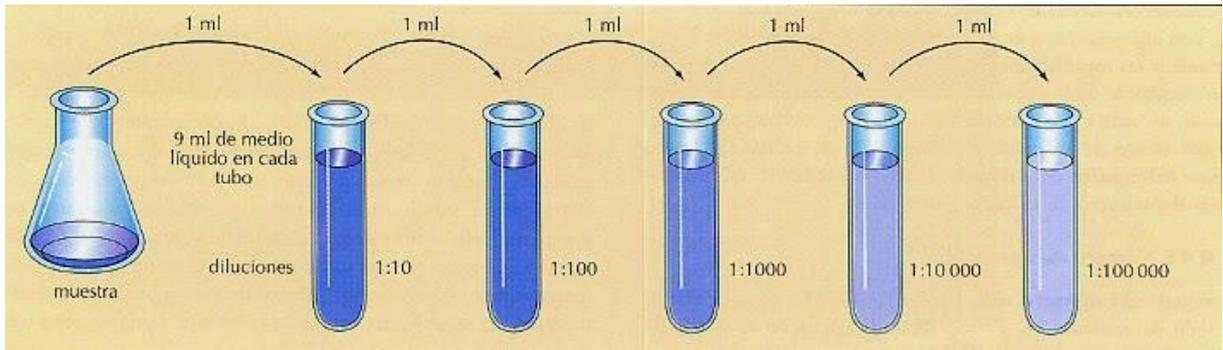


Figura 15. Técnica de preparación de diluciones seriadas
Fuente: Manual de prácticas de Microbiología básica, 2016

Procedimiento:

- 1) Preparar la cantidad de tubos eppendorf que sea necesaria, según el número de muestras y diluciones requeridas, y colocarlos en una gradilla.
- 2) Colocar 0,9 ml de agua estéril en cada tubo.
- 3) Colocar en el primer tubo 0,1 ml de muestra del efluente previamente homogeneizada en el vortex.
- 4) Desechar la punta utilizada y colocar una nueva, para realizar la adición de 0,1 ml del primer tubo al segundo. Volver a homogeneizar.
- 5) Proceder de igual manera para realizar todas las diluciones.

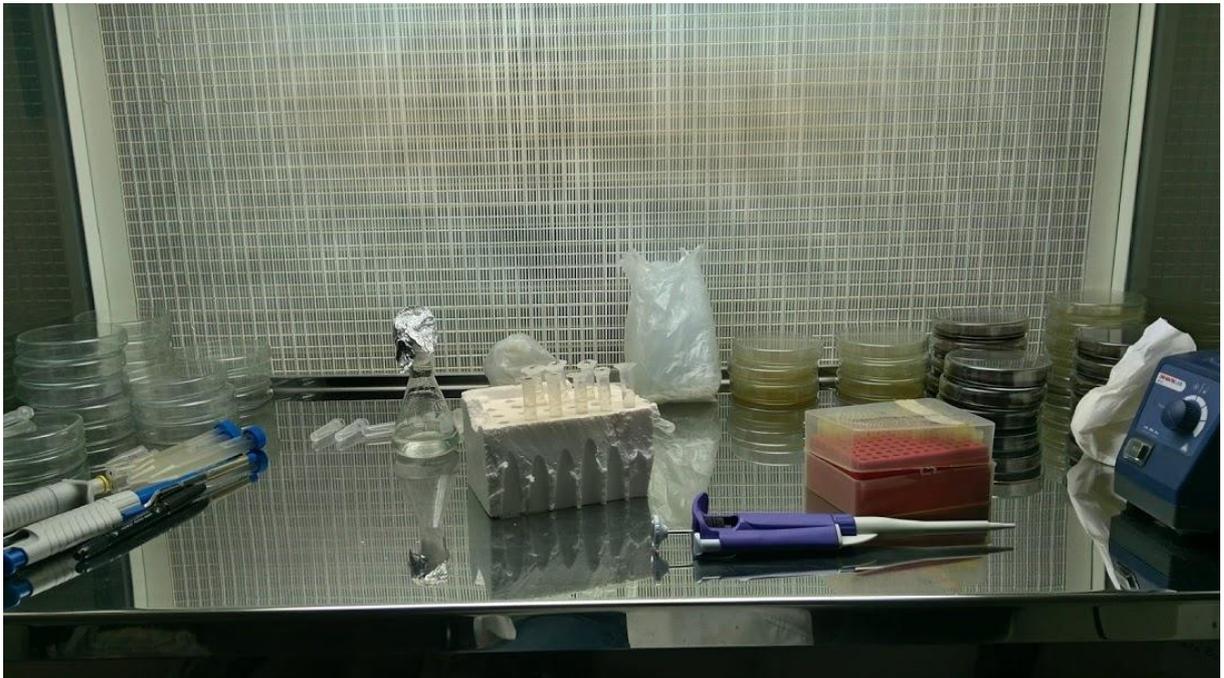


Figura 16. Cámara de flujo laminar y materiales necesarios para realizar la siembra de las muestras
Fuente: Propia

6.2.1.2. Siembra por técnica Pour plate

Las diluciones seleccionadas fueron de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . En cada caso se observó si era necesario sembrar diluciones mayores o menores, de acuerdo al crecimiento observado (recordar que este debe ser entre 30 y 300 colonias por placa).

Procedimiento:

- 1) Fundir completamente los medios de cultivo en el microondas, evitando la ebullición.
- 2) Plaquear las cajas de Petri estériles y dejar solidificar.
- 3) Inocular en forma aséptica un volumen de 0,1 ml en el centro de la placa, y distribuir por toda la superficie utilizando un movimiento en forma de 8. Rotular inmediatamente.
- 4) Llevar a incubar en posición invertida.

Nota: la incubación se realizó en estufa a 38 °C durante 48 horas para recuento total y coliformes, y a temperatura ambiente controlada (20- 22 °C) durante 5 días para el crecimiento de hongos y levaduras.

6.2.1.3. Recuento de colonias

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), cuyos resultados luego fueron utilizados para la construcción de la curva de crecimiento en función del tiempo.

Aquellas placas con crecimiento medio se contaron directamente. Si el crecimiento era mayor se procedía a dividir la caja en cuadrantes y contar las colonias de cada uno de ellos.

Cálculos:

El número de microorganismos se obtuvo según la siguiente fórmula

$$\text{Nº de microorganismos viables/ml} = \frac{\text{Nº de colonias contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{vol. de siembra}}$$

Donde el factor de dilución es 1/dilución

6.2.2. Repique por estrías en superficie.

Materiales:

- cámara de flujo laminar,
- mechero Bunsen,
- asa de arito,
- cajas de Petri estériles,
- medios de cultivo PC, EMB y PG,
- estufa de incubación,
- cajas con las colonias crecidas (de la siembra realizada anteriormente).

Procedimiento:

1. Fundir completamente los medios de cultivo en el microondas, evitando la ebullición.
2. Plaquear las cajas de Petri estériles y dejar solidificar.
3. Esterilizar el asa de siembra en el mechero Bunsen hasta su incandescencia y dejar enfriar por unos segundos.
4. Abrir mínimamente una caja sembrada, y tomar una colonia aislada con el asa.
5. Realizar el estriado en la nueva caja como indica la figura 17.
6. Rotular y proceder de la misma manera con todas las placas.
7. Llevar a incubar en posición invertida.

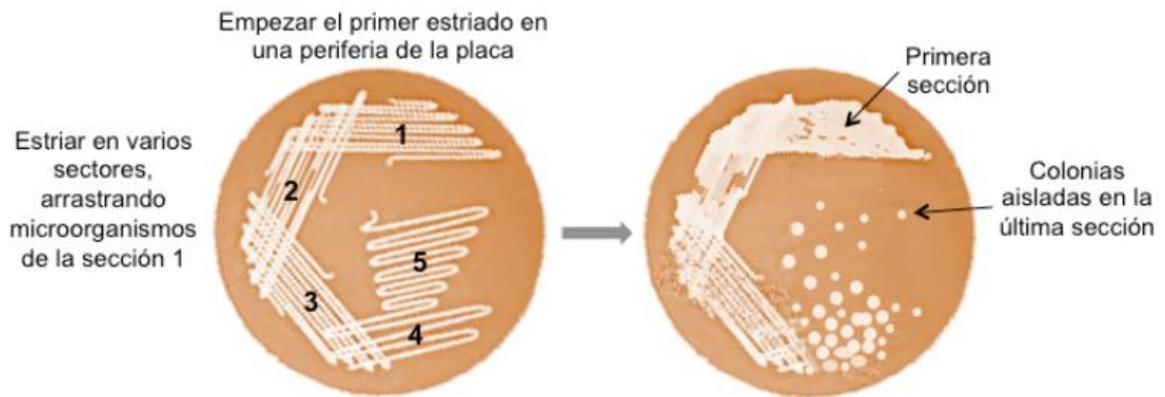


Figura 17. Técnica de siembra por estrías
Fuente: Manual de prácticas de Microbiología básica, 2016

Nota: para aquellas cajas sembradas que presentaron crecimiento de colonias morfológicamente diferentes, se realizó un repique para cada una por separado. Antes de cada repique se esterilizó el asa en el mechero. Las cajas se llevaron a incubar en las mismas condiciones descritas anteriormente para la siembra.

Este procedimiento fue repetido al menos 4 veces para asegurar el aislamiento de colonias puras.

Esto último fue corroborado mediante la técnica de coloración de Gram y la posterior observación en el microscopio óptico.

6.2.3. Técnica de coloración de Gram

Principios: es un método de tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gramnegativas y Grampositivas. Este principio está basado en las características particulares de la pared celular de cada grupo. Las bacterias Gramnegativas tienen una pared celular constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa. Las bacterias Grampositivas poseen una pared celular constituida por una capa gruesa de peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa (Colin y col., 2014).

El cristal violeta es el colorante primario y tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. El lugol sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta- yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. La mezcla de alcohol- acetona deshidrata la pared bacteriana, cierra los poros de la misma y destruye la membrana externa de las bacterias Gramnegativas. Las bacterias Grampositivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza el complejo cristal violeta- yodo, mientras que las Gramnegativas no lo pueden retener. La safranina funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener este complejo. Es por esto que las bacterias Grampositivas se observan de color violeta, mientras que las Gramnegativas se observan de color rosa (Colin y col., 2014).

Materiales:

- mechero Bunsen,
- pipeta estéril,
- agua estéril,
- asa de arito,
- pinza,
- portaobjetos.

Reactivos:

- agua destilada,
- cristal violeta,
- lugol,
- alcohol- acetona,
- safranina.

Procedimiento:

1. Se prepara el frotis, colocando una gota de agua estéril en el centro del portaobjetos con la pipeta estéril. Luego se toma la colonia objetivo con el asa de arito (la cual se esteriliza en el mechero previamente) y se esparce sobre la gota de agua estéril.
2. El frotis se flamea con una pinza repetidas veces a través de la llama del mechero, cuidando de no quemar el mismo, hasta observar que quedó correctamente fijado (seco).
3. Colocar como colorante primario cristal violeta sobre la zona fijada, dejar actuar 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
4. Colocar lugol, dejar actuar 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
5. Colocar alcohol- acetona, dejar actuar entre 15 a 30 segundos y enjuagar con abundante agua destilada.
6. Por último, colocar safranina, dejar actuar 1 minuto y enjuagar con agua destilada.

6.2.4. Observación al microscopio

Procedimiento:

- 1) Realizar la técnica de Gram.
- 2) Colocar aceite de inmersión sobre la zona coloreada.
- 3) Observar en el microscopio óptico cada uno de los portaobjetos con objetivo 100x.
- 4) Barrer todo el campo de observación para determinar si la muestra es pura (solo se observan microorganismos con la misma morfología y color, de acuerdo al grupo al que pertenece).
- 5) Describir forma, tamaño y modo de agrupación (bacilos, cocos, diplococos, en cadena, etc.).

Se anotaron los resultados y se separaron aquellas cajas que se individualizaron como cepas puras.

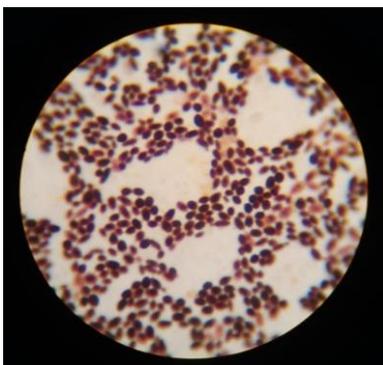


Figura 18

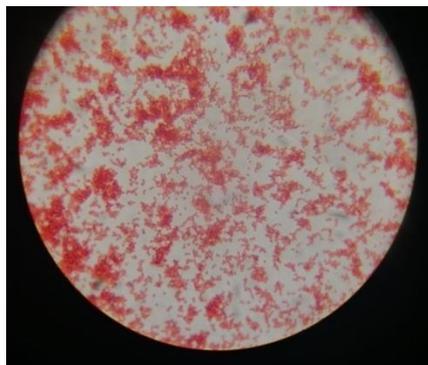


Figura 19

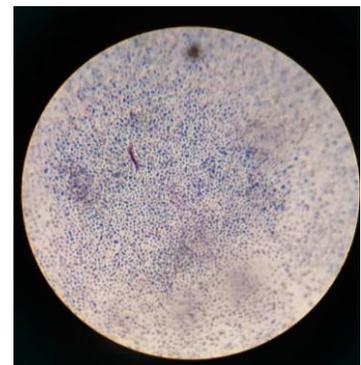


Figura 20

Figura 18. Observación de levaduras al microscopio óptico

Figura 19. Observación de cocos Gramnegativos al microscopio óptico (colonia pura)

Figura 20. Observación de cocos Grampositivos al microscopio óptico (colonia pura)

Fuente: Propia

6.2.5. Preservación por el método de congelamiento

Esta técnica fue utilizada para preservar las cepas puras hasta el momento en que se envíen a identificar.

Principio: las células se congelan en un medio líquido, que contiene un agente crioprotector (en este caso glicerol al 20%), y se guardan a temperaturas inferiores a 0 °C, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Luego cuando se quiere trabajar con las células, se descongelan las muestras (Arencibia y col., 2008).

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son la edad de las células (lo ideal es que sean colonias jóvenes); velocidad en la congelación y descongelación y la temperatura de almacenamiento. La temperatura de almacenamiento ideal es por debajo de -70 °C. La mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos, virus, bacteriófagos) sobreviven largos períodos el almacenamiento en estado de congelación por la reducción marcada de su ritmo metabólico (Arencibia y col., 2008).

Por razones de disponibilidad, en este trabajo se utilizó un congelador que trabaja con temperatura de -20 °C, donde las células se almacenaron en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), y se utilizaron 3 tubos por cada cepa (por si alguna se llegara a dañar). Además, se colocaron perlas de vidrio dentro de cada tubo, lo que posibilita tomar una muestra empleando una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto.

Materiales:

- cepas a 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 20%,
- autoclave,
- congelador con temperaturas menores o iguales a -20 °C.

Procedimiento

- 1) Esterilizar el asa hasta su incandescencia, tomar una colonia de la placa de Petri e introducirla en un tubo conteniendo caldo de enriquecimiento líquido estéril. Repetir con todas las placas y rotular los tubos.
- 2) Incubar 48 h a 38 °C.
- 3) Colocar el glicerol y las perlas en los tubos con cierre hermético y esterilizar en el autoclave.
- 4) Alrededor del mechero Bunsen, 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.
- 5) Colocar los tubos a -20 °C en el congelador del laboratorio.
- 6) Sellar con películas de plástico (film) y hacer pruebas de viabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. Caracterización físico- química

Previamente a la realización del ensayo, fueron cuantificados los siguientes parámetros (tabla 2), como una medida de la caracterización físico- química.

Los mismos serán comparados con los valores máximos permitidos y tolerados establecidos en la Resolución N° 778, anteriormente citada (Véase ANEXO I).

Tabla 2.

Caracterización físico- química del efluente

Variable	Valor medio	Unidad de medida
pH	6,2	-
Temperatura	27	°C
Conductividad eléctrica	37.200	µS/cm
Oxígeno disuelto	0,29	mg/l
DQO	17.410	mg/l
DBO ₅	15.500	mg/l
Nitratos	0,3789	mg/l
Nitrógeno amoniacal	6,19	mg/l
Fosfatos	7,74	mg/l
Sólidos sedimentables 10 min	2,875	mg/l
Sólidos sedimentables 2h	4,375	mg/l
SST	9.878,86	mg/l
SSF	162,14	mg/l
SSV	9.716,72	mg/l
Cloruros	5.575	mg/l
Sulfatos	137	mg/l
Sodio	3.098,2	mg/l
Potasio	1.271,8	mg/l
Alcalinidad total	510,46	mg/l
Dureza total	1.117,07	mg/l CaCO ₃
Polifenoles totales	1,55	mg ácido gálico/l

Fuente: Elaboración propia

7.1. pH

El valor obtenido (6,2) se encontró dentro de los máximos tolerados (5,5 a 9), si bien no está dentro de los máximos permitidos (6,5 a 8,2).

La medida del pH es muy importante en los estudios de aguas tanto naturales como residuales, ya que es una propiedad que afecta a muchas reacciones químicas y condiciona el crecimiento biológico. El rango de valores en la medición se sitúa entre 0 y 14, y es un indicador del grado de acidez o basicidad de una disolución. Valores inferiores a 7 y próximos a 0 indican aumento de acidez, en el valor de pH = 7 se encuentra la neutralidad, mientras que valores superiores a 7 y cercanos a 14 indican aumento de basicidad (Galvis, J.; Rivera, X., 2013).

En el caso de efluentes que serán vertidos, es importante considerar que para la mayoría de las especies acuáticas el rango de pH favorable está comprendido entre valores de 6 a 7,2. Si bien la mayoría de los peces pueden tolerar valores entre 5 y 9, generalmente fuera de este rango la vida no es posible debido a la desnaturalización de las proteínas, afectando no solo la composición de la flora y la fauna, sino también acarreado consecuencias físico-químicas dañinas como cambios en la solubilidad de los nutrientes, formación de precipitados, etc. (Castellanos, N.; Charry, M., 2016).

7.2. Temperatura

La temperatura medida en el laboratorio se encontró dentro de los valores permitidos (27 °C), aunque no refleja necesariamente la realidad del momento en que se descargan los vertidos. Para ello, debería ser medida "in situ", aunque al encontrarse el efluente dispuesto en piletas al aire libre, esta finalmente adopta temperaturas cercanas a la temperatura ambiente.

En general, este es un parámetro muy importante a ser medido ya que la actividad biológica se duplica (según el coeficiente de temperatura Q10) cada 10 °C de aumento de temperatura, pero superado cierto valor, comienza a ser dañino para la vida acuática. Y no solo eso, también comienza a modificarse la solubilidad de las sustancias, principalmente disminuyendo la del oxígeno. Aumentos exagerados de temperatura ocurren al ser vertidos efluentes industriales, principalmente de procesos de intercambio de calor, en cuerpos de agua (Aznar J., Antonio, 2000).

7.3. Conductividad eléctrica y cloruros

Como puede observarse en la tabla 2, el efluente posee un valor de conductividad eléctrica extremadamente alto (37.200 $\mu\text{S}/\text{cm}$) en comparación con la normativa, que es de 900 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (máximo permitido) y de 1.800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (máximo tolerado).

El agua pura, sin minerales, se comporta como aislante eléctrico. Al aumentar las sustancias disueltas en ella, aumenta esa capacidad de conducir electricidad. Es por ello que la conductividad eléctrica es una medida indirecta de la cantidad de sólidos disueltos. Las consecuencias que generan los vertidos industriales con grandes valores de conductividad eléctrica en cuerpos de agua, están relacionados con aumentos en la velocidad de corrosión del material del medio donde se transportan (si las demás condiciones: pH, temperatura y oxígeno disuelto lo favorecen), y aumentos en la solubilidad del CaCO_3 y otros materiales ligeramente solubles (Kemmer, 1989).

Por otro lado, y relacionado con la conductividad, se ha obtenido un valor de cloruros (Cl^-) de 5.575 mg/l, siendo el valor máximo tolerable de 400 mg/l. El valor elevado de este elemento posiblemente se deba a un fenómeno de difusión de Cl^- desde el interior de la aceituna, remanente del proceso de colocación en salmuera (NaCl) (Maldonado M. comunicación personal, 2018).

Las consecuencias de los altos niveles de cloruros se ven reflejadas en un impacto severo en la biota acuática, ya que al aumentar los iones de sales disueltas, aumenta la dureza y conductividad eléctrica del cuerpo del agua receptor (Jarava, R.; Planeta, P., 2017).

A su vez, si se considera la posibilidad de que aguas volcadas con estos valores de conductividad fueran utilizadas para riego, existiría el riesgo de salinización de suelos, con graves efectos en los mismos que por último afectaría el rendimiento de los cultivos (Drovandi, A., 2004); y toxicidad en las plantas en forma de quemaduras en las hojas, con dificultad para la absorción de nitratos y fosfatos, principalmente en frutales (Jarava, R.; Planeta, P., 2017).

7.4. Oxígeno disuelto, DQO y DBO₅

El valor obtenido de oxígeno disuelto (0,29 mg/l) es muy bajo, lo que concuerda con los altos valores de DQO (17.410 mg/l), y de DBO₅ (15.500 mg/l) encontrados, que también exceden por mucho los valores máximos establecidos: 75 mg/l permitidos y 250 mg/l tolerados para la DQO, y 30 mg/L permitidos y 120 mg/l tolerados para la DBO₅.

En este sentido, y tal como fue definido en el apartado anterior, la DQO y la DBO₅ son medidas de la materia orgánica presente en el efluente. Por tanto, como describe Kemmer (1989), al aumentar “el alimento” disponible en el agua residual, la actividad microbiana crece exponencialmente, por lo que las respiraciones hacen que disminuya el oxígeno disuelto en el agua. Los niveles de oxígeno pueden restablecerse si el aporte no es muy grande y no se produce con frecuencia, pero de lo contrario, pueden generar condiciones incompatibles con la vida de organismos superiores, y alteraciones en el ecosistema.

Según el Índice de biodegradabilidad (tabla 1):

$DBO/DQO > 0,4$ efluente biodegradable,

y los valores obtenidos en la caracterización, resulta que:

$$\frac{DBO_5}{DQO} = \frac{15.500}{17.410}$$

$$\frac{DBO_5}{DQO} = 0,89$$

A partir del cual se puede clasificar a este efluente como “biodegradable”.

7.5. Nitratos, nitrógeno amoniacal y fosfatos

Continuando con la comparación entre los resultados obtenidos y la Resolución N° 778, podemos determinar que el valor de nitratos (NO_3^-)= 0,3789 mg/l, se encuentra dentro de los valores permitidos por la legislación, pero no así los valores de nitrógeno amoniacal (NH_4^+)= 6,19 mg/l, y fosfatos (PO_4^{3-})=7,74 mg/l.

Estos parámetros son muy importantes, ya que son los causantes de la eutrofización cultural en cuerpos de agua. El fósforo y el nitrógeno son generalmente los nutrientes limitantes. Al aumentar sus concentraciones en el agua promueven el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas y macrófitos), y es esta proliferación y luego su muerte y descomposición, las que conducen a una marcada disminución de oxígeno disuelto donde la principal manifestación es la muerte masiva de peces y otros animales acuáticos. Además, tanto el ion amonio (NH_4^+), como el amoniaco no ionizado (NH_3), son especies tóxicas, aunque la toxicidad es mucho más grave en el segundo caso (Alonso, A. y col., 2007).

7.6. Sulfatos

La concentración de este anión (SO_4^{2-}) fue de 137 mg/l, lo que no representa un problema evidente puesto que el máximo permitido es de 250 mg/l.

Aunque dentro del marco de la legislación el valor es correcto, posiblemente en el efluente ocurran reducciones de sulfatos a sulfuros (SH_2^-), en zonas donde las condiciones son reductoras (por ejemplo, inmediatamente por debajo de la fase hidrofóbica). Esto podría explicar el olor a “huevo podrido” que este presenta, así como describe Kemmer (1989), donde en corrientes naturales de agua ricas en sulfatos los mismos pueden derivar en sulfuros que son compuestos tóxicos, corrosivos y que generan mal olor.

7.7. Sólidos

Por sólidos sedimentables se entiende “todo aquel material que se desprende de la suspensión en un período determinado” (APHA, 1992). En este trabajo se utilizó un periodo de 10 y 120 min.

Los sólidos suspendidos totales (SST) se definen como la porción de sólidos retenidos por un filtro de fibra de vidrio que posteriormente se seca a 103-105 °C hasta peso constante. Se dividen a la vez en dos fracciones: la fija y la volátil (Argandoña, L.; Macías, R., 2013).

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son aquellos que se volatilizan e incineran al calcinar los SST a temperaturas de 500 ± 50 °C. A estas temperaturas la materia orgánica se oxida en forma de CO₂ y agua, que se volatilizan, y la fracción inorgánica queda como cenizas. Es por ello que el contenido de SSV se interpreta en términos de materia orgánica, aunque es tan solo una aproximación puesto que también se volatilizan ciertas sales minerales. Los sólidos suspendidos fijos (SSF) son el residuo que queda luego de la calcinación (Argandoña, L.; Macías, R., 2013).

Los valores que se muestran en la tabla 2 se encuentran dentro del máximo tolerado, aunque la normativa específica que cuando el valor de la DBO₅ es mayor a 100 mg/l directamente no se admite su presencia, tal es el caso de este efluente.

Al interpretar los resultados con lo anteriormente explicado, y teniendo en cuenta los valores de la DBO₅ y la DQO obtenidos, es consistente encontrar un valor de SSV (aproximación de la materia orgánica) tan alto como lo es 9.716, 72 mg/l.

Es importante su determinación y tratamiento ya que producen obstrucciones, embanques, turbidez, olores desagradables y taponamiento de suelos (Fagot, L. y col., s.f.)

7.8. Sodio y potasio

Observando la tabla 2, tanto el sodio (Na) como el potasio (K) presentaron valores muy elevados. Respeto a la legislación en cuanto al sodio, el valor máximo tolerado es de 275 mg/l, y el obtenido fue de 3.098,2 mg/l.

Si bien el potasio no es un parámetro requerido dentro de la normativa, un exceso en las aguas de riego puede causar problemas en los cultivos. Como se explica en el capítulo “*Nutrición Mineral*”, del apunte preparado por la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (2014), el potasio es un nutriente esencial para las plantas y considerado un macronutriente en agronomía, es decir que se encuentra en grandes cantidades dentro del peso seco vegetal. Su principal función es el establecimiento del potencial osmótico y el mantenimiento de la electroneutralidad celular, donde actúa como catión principal. En exceso, puede actuar como antagonista del magnesio (reduciendo su incorporación en la planta), que es un nutriente muy importante en el metabolismo energético.

Asimismo, el sodio puede causar problemas de sodicidad o alcalinización cuando en la solución del suelo existe una concentración elevada de sales sódicas de tipo carbonato (CO₃²⁻) y bicarbonato (HCO₃⁻), afectando la estructura de los mismos por dispersión de las arcillas y solubilización de la materia orgánica (Pérez Valenzuela, B.R., 1999).

Es posible que la alta concentración de sodio se deba, así como con los cloruros, a un fenómeno de difusión desde el interior de la aceituna, donde el sodio remanente proviene del tratamiento alcalino (desamarizado o quemado). Este tratamiento se lleva a cabo para eliminar el sabor amargo conferido por la oleuropeína y aumentar la permeabilidad en el fruto (Maldonado, M., 2004).

7.9. Dureza y alcalinidad

La dureza del agua está determinada por el contenido de carbonatos (CO_3^{2-}), bicarbonatos (HCO_3^-), cloruros (Cl^-), sulfatos (SO_4^{2-}) y ocasionalmente nitratos de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y magnesio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, y es una característica indeseable porque puede producir incrustaciones en tuberías y calderas, y mayor consumo de jabones y detergentes. Para usos domésticos por ejemplo, se recomiendan niveles inferiores a 500 mg/l (Drovandi, A., 2004). El efluente posee 1.717,07 mg HCO_3^- /l como medida de dureza, por lo cual es debidamente necesario reducir estos valores para cualquier tipo de reúso.

Por su parte la alcalinidad, como explica Rigola L., M (1990), es una medida de la capacidad para neutralizar ácidos (actúa como un buffer). Contribuyen a la misma los iones bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}) e hidroxilo (OH^-), pero también los fosfatos (PO_4^{3-}) y el ácido silícico H_4SiO_4 , además de otros ácidos de carácter débil; también se consideran como fuente de corrosión y de posible generación de espumas, y se miden en la misma unidad que la dureza (mg HCO_3^- /l). Valores mayores a 75 mg HCO_3^- /l se consideran aguas muy amortiguadas. El efluente, presenta 510,46 mg HCO_3^- /l. Si bien es una característica deseada debido a su capacidad amortiguadora de pH, debe ser tratada para no provocar los daños anteriormente mencionados.

7.10. Polifenoles

Comparando con la tabla 5, los valores obtenidos en la determinación (1,55 mg ácido gálico/l) son mayores que los valores máximos permitidos (0,1 mg/l) para el total de los compuestos fenólicos.

Muchos compuestos fenólicos, como los clorofenoles, son indeseables en cuerpos de agua debido a que pueden causar la muerte de los organismos por toxicidad (Aznar Jiménez, Antonio, 2000).

No obstante, otros tipos de polifenoles, que son todas aquellas sustancias que poseen varios grupos fenol unidos a estructuras aromáticas o alifáticas, son beneficiosos para la salud (Gimeno Creus, 2004).

En la naturaleza, son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de estas. Actúan como fitoalexinas y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta. Muchos de ellos han sido señalados como compuestos que poseen numerosos beneficios para la salud: su poder antioxidante contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Por ejemplo, el hidroxitirosol y la oleuropeína, polifenoles presentes en el olivo, tienen la capacidad de ser captadores de radicales libres. Por otro lado, pueden inhibir la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, lo que se traduce en una disminución en la formación de tromboxano y leucotrienos. Además, el hidroxitirosol también inhibe la agregación plaquetaria y estabiliza las fibras de colágeno de la pared arterial (Gimeno Creus, 2004).

En un trabajo realizado por el Instituto de la Grasa (2012), se estudia la extracción de los compuestos polifenólicos a partir del alperujo del olivo, para el aprovechamiento de las propiedades benéficas de los mismos. Estos polifenoles están presentes en la aceituna y pasan al agua por difusión (Maldonado et al. 2011).

8. Ensayo de biorremediación

8.1. Resultados físico- químicos

Como ya se mencionó, el ensayo tuvo una duración de 14 días, que corresponde al tiempo donde se registró actividad microbiológica significativa.

A continuación, se presentan los resultados de las mediciones físico- químicas realizadas en el ensayo, para las 5 repeticiones efectuadas.

8.1.1. pH

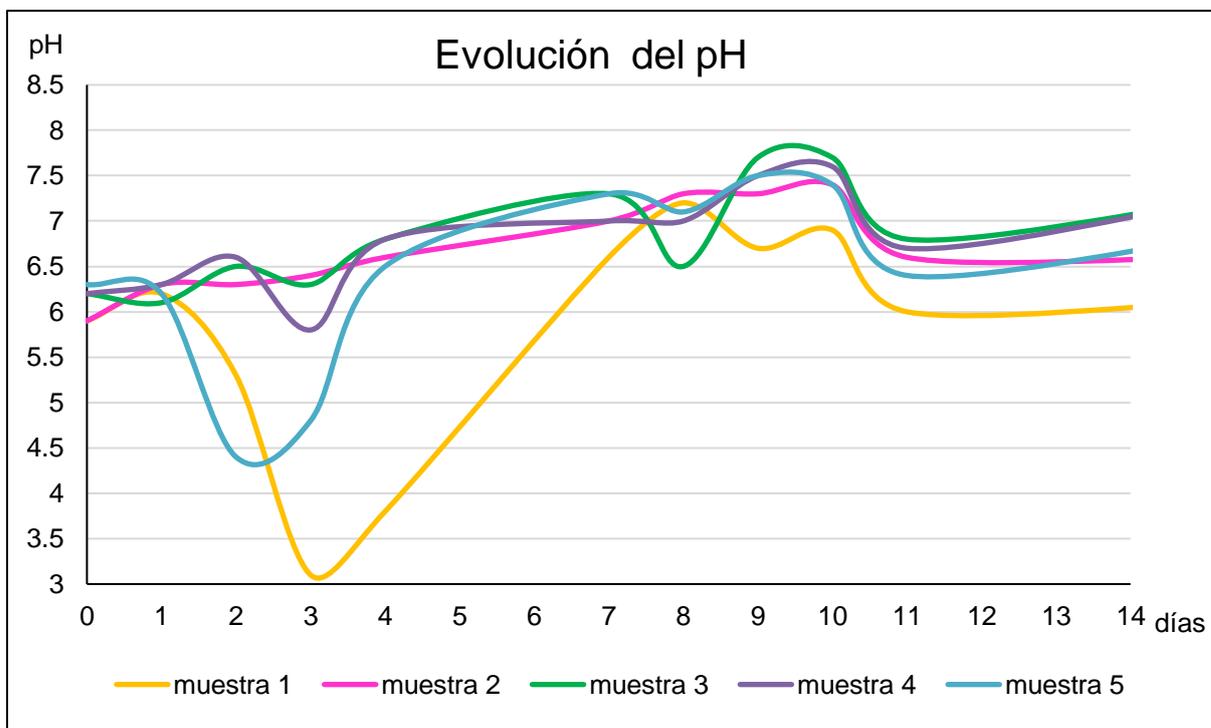


Figura 21. Evolución del pH durante 14 días de ensayo

Fuente: Elaboración propia

En la figura 21, se puede observar que las muestras iniciaron con un pH que comprendía el rango 5,9- 6,3, y que comenzaron a diferenciarse a partir del primer día de ensayo, donde la muestra 1 y 5 presentaron un elevado descenso de pH, registrando la muestra 1 la mayor acidificación correspondiente a un valor de 3,1. Estos valores comenzaron a ascender luego para que, en el séptimo día de ensayo los valores de todas las muestras se mantuvieran fluctuando entre 6,6 y 7,3. Finalmente, en el día 14 los valores se estabilizaron entre 6,1 a 7,2.

Si bien desde el principio los valores de pH se encontraban dentro de un rango de valores aceptables, se logró aumentar en unos décimos los mismos, comprendiendo el nuevo rango el valor de neutralidad de $\text{pH}=7$. Esto es importante porque, como se mencionó anteriormente, para la mayoría de las especies acuáticas el rango de pH favorable está comprendido entre valores de 6 a 7,2.

8.1.2. Conductividad eléctrica

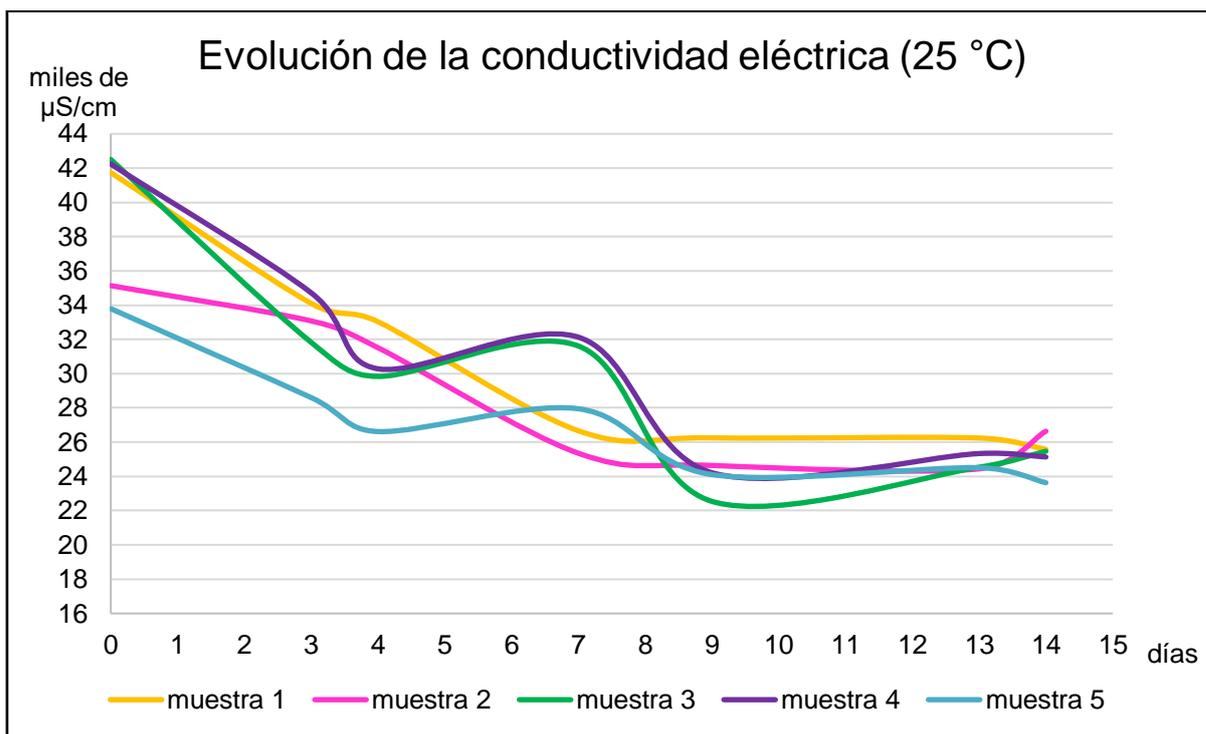


Figura 22. Evolución de la conductividad eléctrica durante 14 días de ensayo, a una temperatura de 25 °C

Fuente: Elaboración propia

En la figura 22 se puede apreciar que, si bien el valor de la conductividad eléctrica de las muestras 2 y 5 (34.464,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$ promedio), inicialmente era diferente respecto a las demás (42.156,86 $\mu\text{S}/\text{cm}$ promedio), todas alcanzaron un valor similar al momento del último día de ensayo. Este valor promedio final fue de 25.291 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

De estos datos, resulta un descenso promedio del 40% para las muestras 1,3 y 4, y de un 26,62% para las muestras 2 y 5.

Esto es muy interesante, si bien la disminución no fue total, la conductividad eléctrica es uno de los parámetros que generalmente se encuentran fuera de rango y cuyas tecnologías de corrección son muy caras.

Estimaciones realizadas por Borgo, E. (2013), a través de encuestas con distintas industrias de aceitunas de mesa en Mendoza, determinaron que la media (en litros) de consumo de agua potable por kilogramo de aceituna procesado era de 4,14 l/kg. Si una empresa lograra el máximo de producción promedio ($7 \cdot 10^6$ kg/año), entonces su consumo de agua potable sería de 28.980.000 l/año, aproximadamente.

Si consideramos, como se comentó anteriormente, que según el INA (2016) el volumen de efluente corresponde al 87% del agua potable consumida, la generación diaria sería de 69.075 l/día, lo que representa 2.878 l/h, en una empresa tipo. Este razonamiento es a modo de ilustración, ya que por supuesto estos volúmenes de descarga en la realidad no son constantes y hay épocas del año donde las descargas son mayores que en otros.

Se consultaron valores comerciales de equipos de ósmosis inversa en el mercado, y por ejemplo, un equipo con capacidad de 205 l/h, al 7 de Agosto de 2018, costaba \$98.000 (pesos argentinos). Para tratar el volumen producido por hora, se necesitarían 11 de ellos, lo que representa una inversión de \$1.078.000 (pesos argentinos), y esto solo para corregir la conductividad eléctrica.

Resulta interesante, entonces, que las 5 repeticiones en el ensayo hayan demostrado una reducción en este parámetro. Además es consistente con dos ensayos previos realizados no publicados (Maldonado, M., comunicación personal, 2018).

8.1.3. Demanda química de oxígeno (DQO)

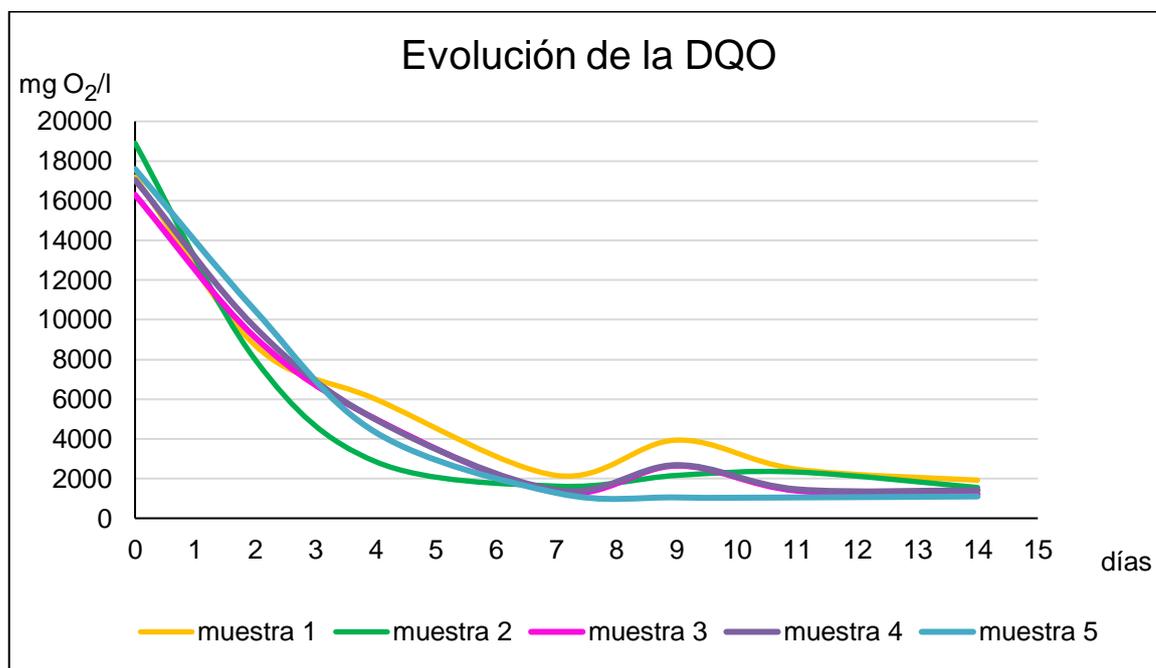


Figura 23: Evolución de la DQO durante 14 días de ensayo

Fuente: Elaboración propia

En la figura 23 se puede observar que los valores de DQO comenzaron a disminuir desde el primer día de ensayo, primero a una velocidad mayor (día 0 a día 7) y luego se hicieron asintóticos al eje de las x.

La disminución se registró para todas las muestras y todas presentaron un comportamiento similar. El valor promedio en el tiempo 0 fue de 17.410 mg O₂/l, y el valor promedio final fue de 1.439,21 mg O₂/l, lo cual arrojó un porcentaje de degradación promedio del 91,7%, transcurridos 14 días de tratamiento.

8.1.4. Demanda biológica de oxígeno (DBO₅)

Por razones operativas (cada determinación necesita 5 días, y además es costosa respecto a la cantidad de materiales que se requieren), se midió la DBO₅ solo al inicio y al final del ensayo.

El valor inicial fue de 15.500 mg/l, y el final de 3.100 mg/l. Esto representa una reducción del 80%.

8.1.5. Azúcares reductores

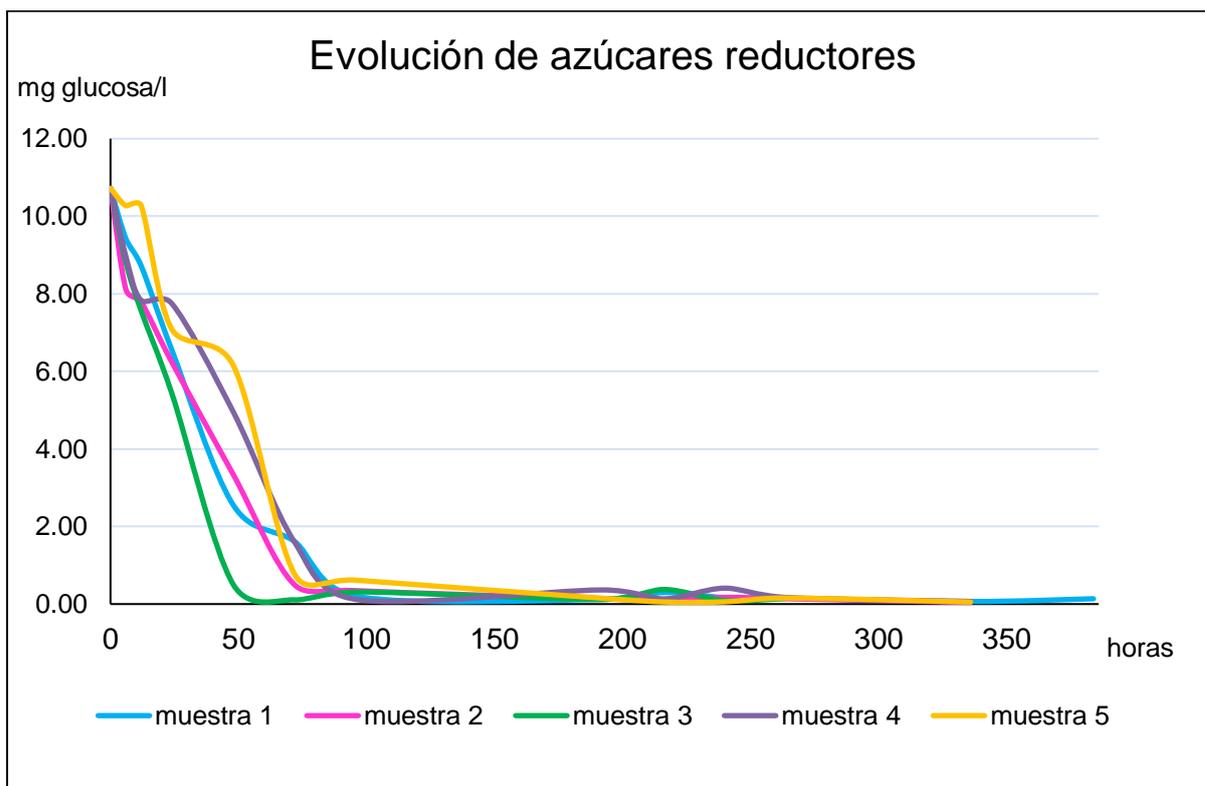


Figura 24. Evolución de azúcares reductores durante las primeras 350 horas de ensayo
Fuente: Elaboración propia

La evolución de azúcares reductores presentó una gran disminución a medida que transcurrieron las horas de ensayo, observándose en las primeras 100 horas (4 días) un consumo abrupto de los mismos que descendió desde 10,72 mg glucosa/l a 0,08 mg glucosa/l.

Los azúcares reductores destacan de entre los azúcares que contiene el olivo, y son los que constituyen la materia prima del proceso de fermentación de la aceituna aderezada. Entre ellos, se encuentran en mayor cantidad la glucosa (como componente principal), luego fructosa, manitol y como minoritarios xilosa y ramnosa (Barranco, D. y col., 2008).

Este consumo prácticamente completo en las primeras horas de oxidación, puede deberse a que estos azúcares son la fuente más rápida de obtención de energía para los microorganismos (monosacáridos). Asimismo, observando el gráfico de DQO, se puede apreciar que en los primeros 4 días la degradación de los compuestos que la provocan fue del 70%, lo cual puede ser explicado, al menos en parte, por la rápida utilización de estos azúcares por parte de los microorganismos.

8.1.6. Polifenoles totales

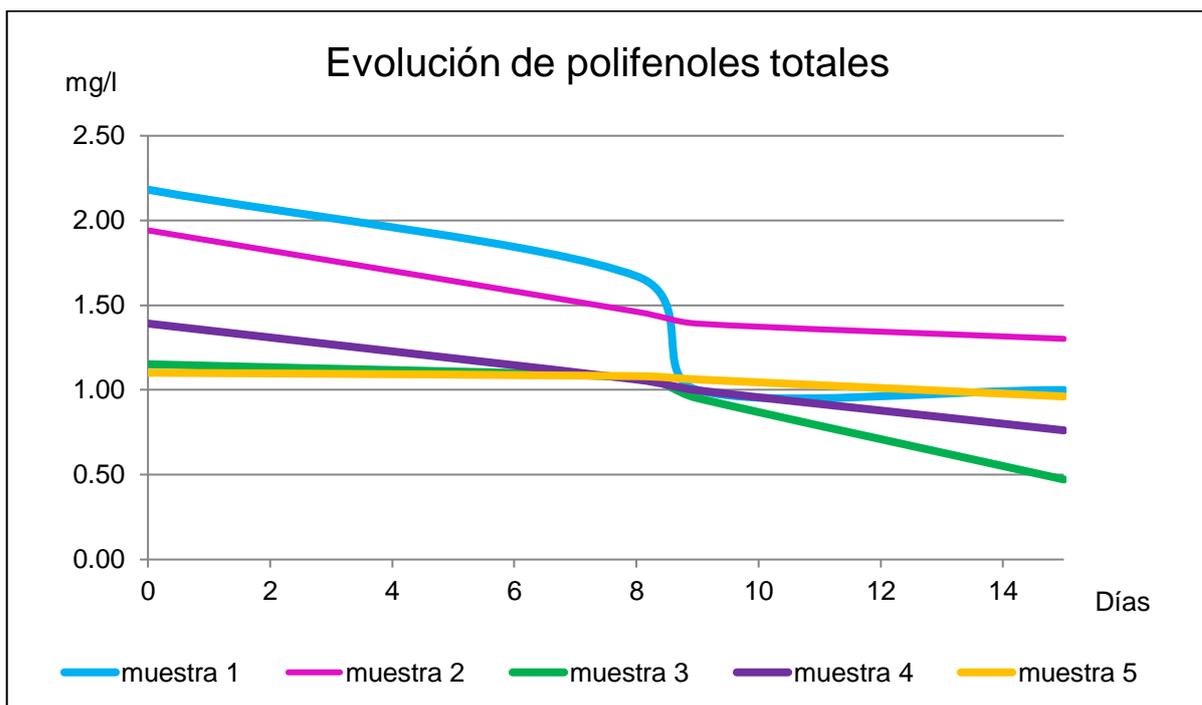


Figura 25. Evolución de polifenoles totales durante 14 días de ensayo

Fuente: Elaboración propia

En la figura 25 se puede observar que los valores iniciales de polifenoles para cada muestra fueron diferentes (comprendidos entre 1,10 mg/l y 2,20 mg/l). Conforme transcurrieron los días de ensayo, el valor fue disminuyendo hasta valores entre 0,50 mg/l y 1,40 mg/l.

Si bien los polifenoles poseen una estructura más compleja que los azúcares simples y moléculas de degradación más rápida, los microorganismos nativos del efluente estudiado demostraron capacidad para degradar los mismos.

Como se mencionó anteriormente, los efluentes de la aceituna de mesa contienen una gran cantidad de polifenoles, estos están presentes en el fruto y pasan al agua por difusión (Maldonado et al, 2011). En este efluente los valores de polifenoles encontrados fueron pequeños; posiblemente se encuentren en mayores concentraciones en aguas de procesos previos al maquinado.

8.2. Resultados microbiológicos

A continuación, se presentan los resultados finales del recuento de cada grupo, obtenidos a partir de las muestras sembradas y resultado de la suma de las diferentes colonias que crecieron en cada medio y para cada tiempo (tabla 3).

El propósito fue construir una curva de crecimiento inicial de microorganismos, por lo que el seguimiento tuvo una duración de 20 horas.

Se comenzaron a extraer muestras cuando se detectó el comienzo de la actividad microbiana, evidenciada por la generación de espumas y presentación de masa que iba sedimentando.

Tabla 3.

Resultados finales del recuento de las colonias sembradas (UFC/ml), para cada grupo y tiempo (h)

Tiempo (horas)	Coliformes Totales (UFC/ ml)	Recuento Total (UFC/ ml)	Levaduras (UFC/ ml)
4	9,99E+12	1,42E+14	0,00E+00
8	1,80E+15	5,26E+17	0,00E+00
12	7,83E+12	3,37E+16	0,00E+00
16	1,69E+13	1,54E+17	3,23E+07
20	1,17E+11	1,98E+15	5,52E+07

Fuente: Elaboración propia

8.2.1. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos

Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20 °C y 45 °C con una zona óptima entre 30 °C y 40 °C (ANMAT, 2014).

A continuación, se observa la curva de crecimiento obtenida a partir del recuento de colonias en placas cultivadas con agar PC.

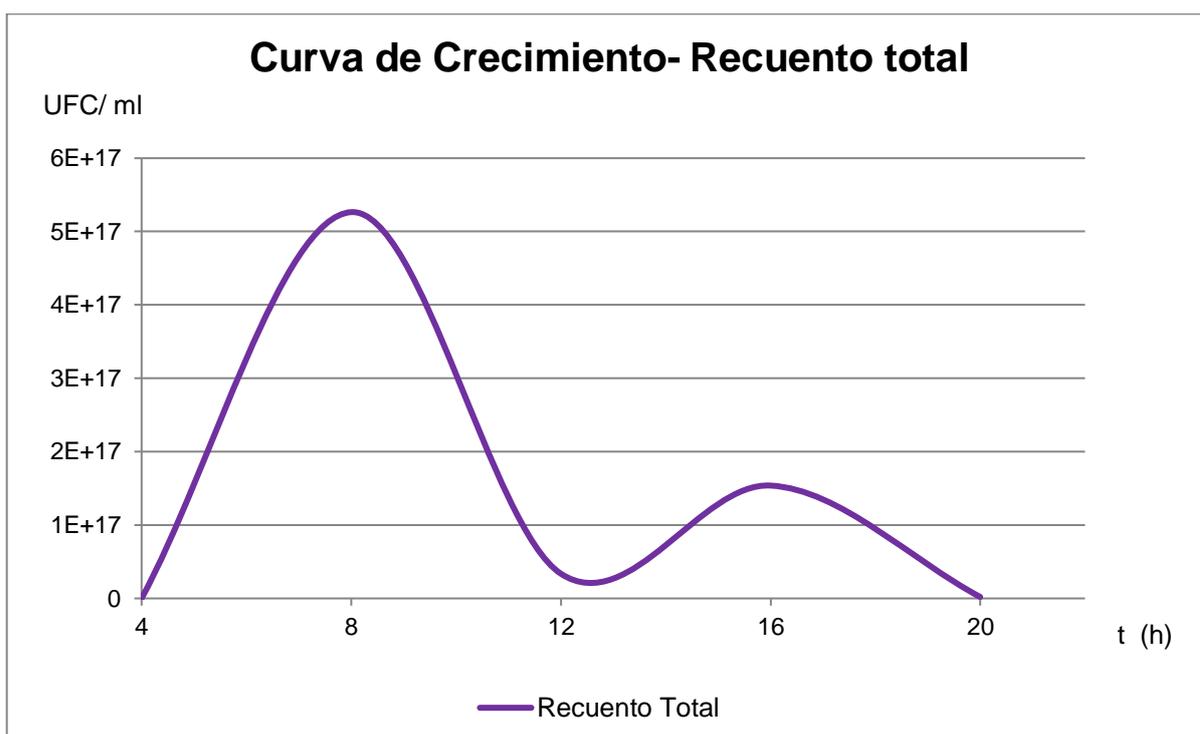


Figura 26. Curva de crecimiento de recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, durante las primeras 20 horas de ensayo

Fuente: Elaboración propia

Donde en el eje de las X la variable es el tiempo transcurrido tras el inicio del ensayo, y en el eje de las Y las Unidades Formadoras de colonias por mililitro de dilución.

Como se mencionó anteriormente, se evidenció el comienzo de la actividad metabólica a las 4 horas de transcurrido el ensayo. Es probable que hasta ese momento los microorganismos permanecieran en fase de latencia.

En la figura 26, a partir de $t=4$, pudo observarse un crecimiento exponencial que representa una velocidad de crecimiento máxima, y que llegó a su mayor expresión luego de 8 horas. Esto pudo deberse a que en un primer momento el licor de mezcla abundaba en moléculas de fácil degradación, tal como glucosa y los azúcares reductores más simples. Esto fue consistente, entonces, con el rápido descenso que sufrieron estos compuestos al principio del ensayo.

Rápidamente en $t=8$, comenzó la fase de muerte celular, viéndose la fase estacionaria reducida a unas pocas horas.

A partir de $t=12$, se observó un nuevo aumento en la biomasa microbiana, aunque mucho menor, donde posiblemente los microorganismos comenzaron a degradar otros azúcares simples remanentes, y también moléculas más complejas. También puede ser el caso de una sucesión microbiana, donde comienza a actuar un nuevo grupo de microorganismos capaces de oxidar los productos de degradación del consorcio que actuó en las primeras horas, o que se veía incapaz de presentar un crecimiento exponencial debido a algún tipo de inhibición (ya fuera por algún compuesto, o por los mismos microorganismos dominantes que se encontraban en los primeros momentos).

En $t=16$, comenzó una nueva fase de muerte celular.

8.2.2. Recuento de levaduras

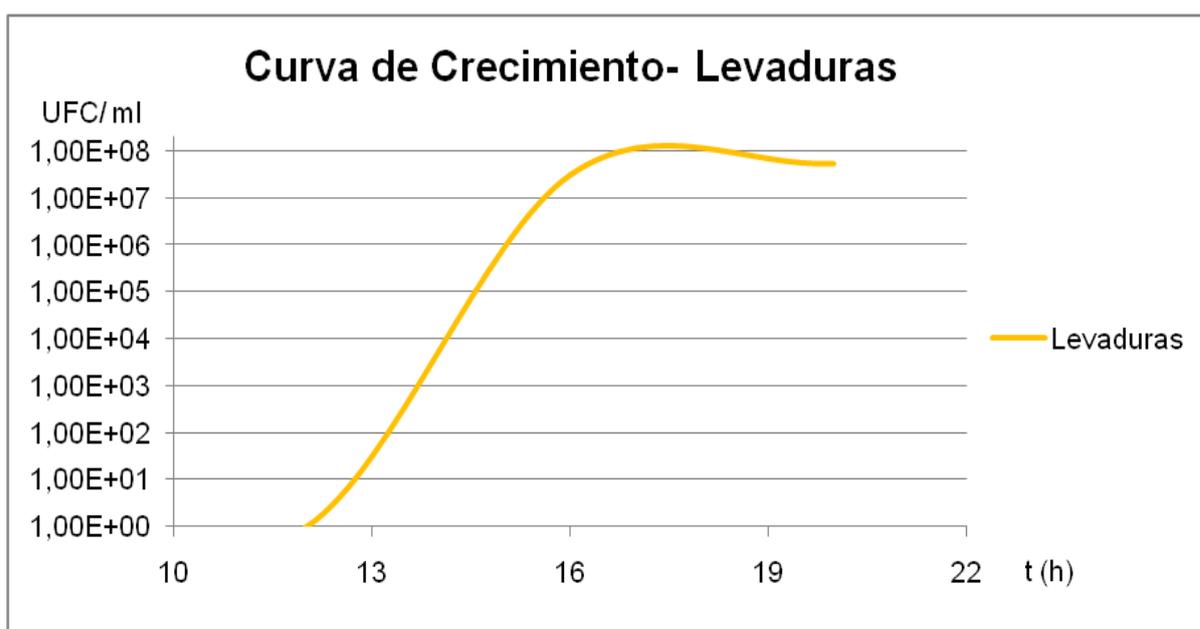


Figura 27. Curva de crecimiento de levaduras, durante las primeras 20 horas de ensayo
Fuente: Elaboración propia

Como puede observarse en la figura 27, las levaduras no se desarrollaron en el caldo de cultivo hasta 12 horas de transcurrido el ensayo, aunque si se encontraban presentes, posiblemente en estado de latencia.

En $t>12$, comenzó el crecimiento exponencial de estos microorganismos. Esto pudo deberse a un cambio en las condiciones del medio que favoreciera su actividad, ya sea a algún parámetro físico- químico, a la disponibilidad de nuevas fuentes de alimento (moléculas más oxidadas), a la degradación de algún compuesto que estuviera causando un efecto inhibitor sobre este grupo, o a la disminución y/o muerte de microorganismos que estuvieran compitiendo por la misma fuente de energía.

Aproximadamente a las 17 horas de transcurrido el ensayo alcanzaron un crecimiento máximo, y en $t=18$ comenzó una lenta muerte celular.

8.2.3. Recuento de coliformes

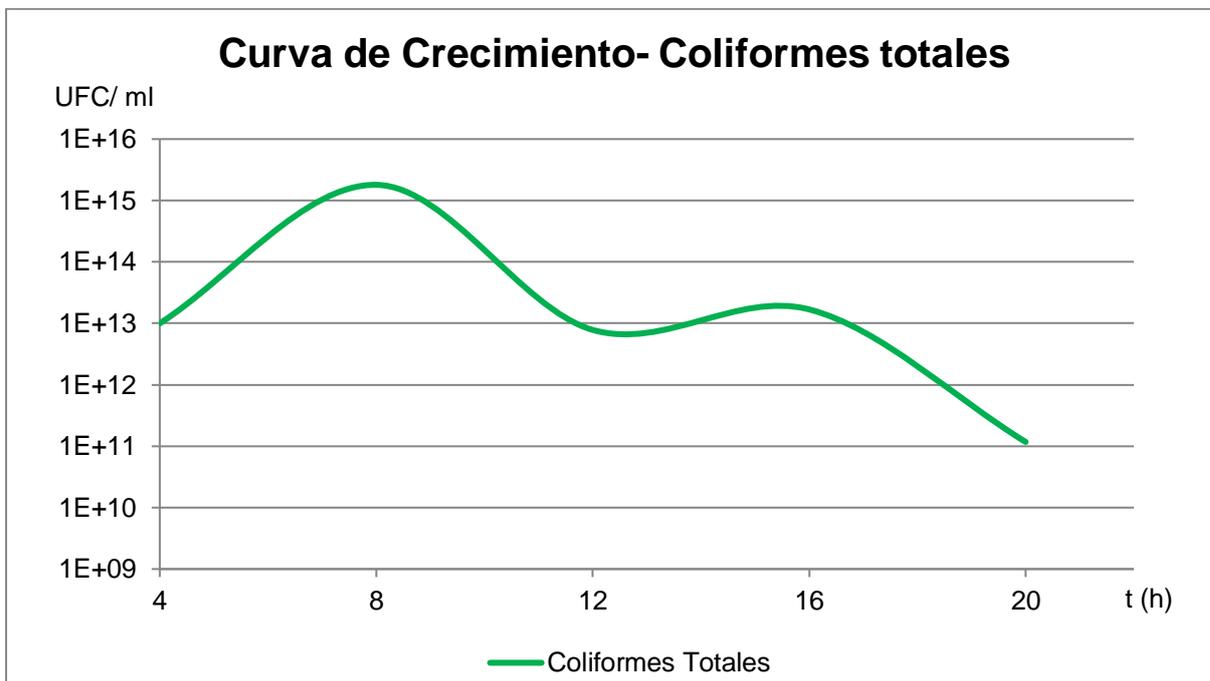


Figura 28. Curva de crecimiento de coliformes totales, durante las primeras 20 horas de ensayo

Fuente: Elaboración propia

Un indicador muy empleado para la contaminación microbiana del agua es el grupo de los microorganismos coliformes (indicadores de contaminación fecal). Son bacilos anaerobios facultativos, gramnegativos, no formadores de esporas, que fermentan la lactosa con producción de gas a las 48 horas en incubación a 36 °C (Brock, 2009).

El patrón de la curva en la figura 28 se asemejó al de recuento total, donde a las 8 horas se observó un máximo en el crecimiento microbiano, luego comenzó una fase de muerte celular, a las 12 horas comenzó un nuevo crecimiento, aunque a un ritmo menor, para luego entrar en una nueva fase de muerte a partir de $t=16$.

8.2.4. Crecimiento total

Por último, en la figura 29 se presentan los tres grupos estudiados en el mismo gráfico. Es importante observar que el crecimiento exponencial de las levaduras pareciera afectar de algún modo el crecimiento de coliformes y aerobios mesófilos, produciéndose una disminución de los valores en ambos, y el comienzo de una fase de muerte. Posiblemente las levaduras comenzaron a crecer en ciertas condiciones del medio que se hicieron favorables para el desarrollo de las mismas, pero que comenzaron a ser limitantes para los otros dos grupos.

Es probable que se hayan producido varios ciclos de crecimiento y muerte celular durante todo el ensayo, cada uno de ellos con características particulares y asociados a consorcios microbianos variables.

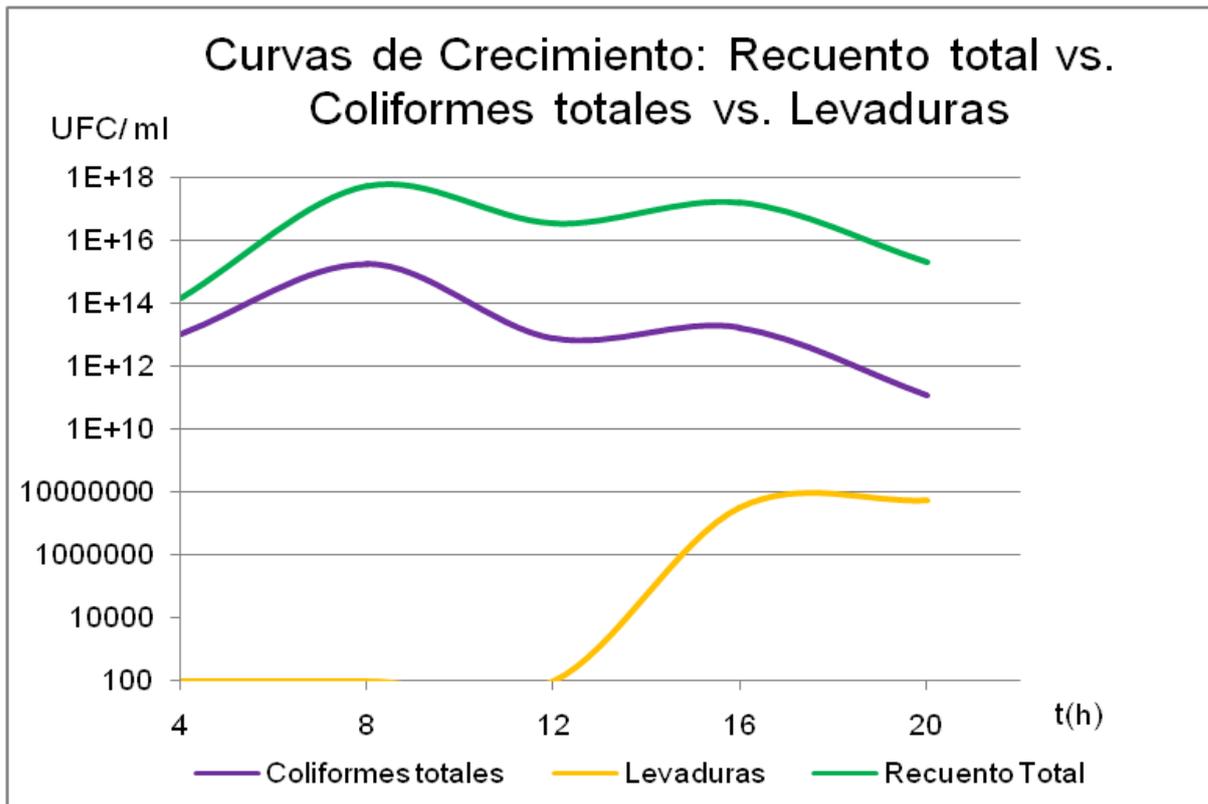


Figura 29. Curvas de Crecimiento: Recuento total vs. Coliformes totales vs. Levaduras, durante las primeras 20 horas de ensayo
Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES

La caracterización del efluente indicó que es necesario un correcto tratamiento de los mismos, ya que de ser liberado al medio sin las debidas correcciones (ya sea a un cuerpo natural o artificial de agua, o mediante una eventual infiltración hacia el subsuelo) produciría grandes alteraciones en el ecosistema, afectando sistemas biológicos, así como actividades productivas y/o el bienestar de la población. Asimismo, fue posible clasificar al efluente como “biodegradable”, según el Índice de biodegradabilidad.

Los resultados obtenidos, como una primera aproximación a la biorremediación de este efluente complejo y contaminante local, permitieron determinar que el método empleado-aerobio, de lodos activados- resulta eficiente en el tratamiento de las aguas residuales de esta empresa de aceitunas maquinadas, obteniendo valores finales satisfactorios respecto a la escala de trabajo utilizada (ensayo de laboratorio).

Se han logrado disminuir por la acción de los microorganismos presentes en efluente de manera natural (nativos o autóctonos viables) los parámetros indicadores de contaminación de aguas, DQO y DBO₅, en un 91,7% y 80% respectivamente. Los microorganismos consumieron los azúcares reductores hasta dejar trazas, y posiblemente luego consumieron compuestos más complejos. Esto fue consistente con la disminución de la DQO.

La disminución en la conductividad eléctrica fue de aproximadamente un 35%, y abre grandes interrogantes respecto a sus causas. Se deben realizar estudios más profundos para ahondar sobre estos resultados, así como estudiar la posibilidad de extraer los compuestos polifenólicos previamente al tratamiento y aprovechar sus propiedades beneficiosas para la salud.

Confirmada su biodegradabilidad, ahora es necesario continuar con la investigación de este efluente, realizando comparaciones de sus propiedades entre diferentes momentos de producción e ir aumentando la escala de trabajo, perfeccionando técnicas y procesos, para en un futuro instalar el sistema de tratamiento en planta mediante biorreactores, tratando los volúmenes reales que allí se producen.

De este trabajo surgen nuevas líneas de investigación, que se proponen a continuación:

- Estudio de la disminución de la conductividad eléctrica: causas y microorganismos involucrados.
- Identificación taxonómica de los microorganismos que actúan en las diferentes etapas de degradación y sustratos que degradan.
- Aumento de la eficiencia en técnicas y procesos aplicados en el tratamiento mediante lodos activados.
- Aplicación y comparación de métodos alternativos de tratamiento.
- Comparación estacional de las características físico- químicas del efluente.
- Extracción y reaprovechamiento de sustancias con valor comercial (por ejemplo, polifenoles y sus propiedades antioxidantes y benéficas para la salud humana).
- Tratamiento de la fase hidrofóbica (grasa) del efluente.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, A.; Camargo, J.A. (2007). *“Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático”*. Ecosistemas 16 (2): 98-110. Mayo 2007.

APHA, AWWA, WPCF (1992). *“Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales”*. Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid, España.

Arencibia Arrebola, Daniel Francisco y col. (2008). *“Métodos Generales de Conservación de Microorganismos”*. Taller Científico de los Laboratorios LIORAD VI: Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos, 1ª Edición. Finlay Ediciones, pp.1-14.

Argandoña, L.; Macías, R. (2013). *“Determinación de sólidos totales, suspendidos, sedimentados y volátiles en el efluente de las lagunas de oxidación situadas en la Parroquia Colon, Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí, durante el periodo de Marzo a Septiembre 2013”*. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.

Ávila N., Ramona; Chirinos, Marluy; Hernández M., Rómulo; Rivas P., Bernarda (2012). *“Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease”*. Multiciencias, vol. 12, núm. 2, pp. 129-135.

Aybar, V.; Ladux, J.; Matías, A.; Molina, S.; Ortiz, J. (2012). *“Olivicultura argentina y regional”*. INTA, Catamarca. Argentina.

Aznar Jiménez, Antonio (2000). *“Determinación de los parámetros físico- químicos de la calidad de las aguas”*. Instituto Tecnológico de Química y Materiales “Álvaro Alonso Barba”, Universidad Carlos III, Madrid, España.

Barranco, D. y col. (2008). *“El cultivo del olivo”*. Ediciones Mundi- Prensa, 6ª ed. Madrid, España.

Bonilla Salinas, Mónica; Le Borgne, Sylvie y col. (2016). *“Manual de prácticas de microbiología básica”*. Departamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería. UAM- Cuajimalpa, México.

Borgo, Estefanía (2013). *“Diagnóstico sobre los efluentes generados y vertidos en la Industria Olivícola en empresas del Gran Mendoza- Sector aceitunas verdes en conserva”*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

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.

Cabrera, J.; Passalacqua, Nancy (2014). *“Microorganismos Indicadores”*. Vol. 3. ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Argentina.

Calcagno, Alberto; Gaviño Novillo, Marcelo (2000). *“Informe sobre la Gestión del agua en la República Argentina”* (pp. 36- 39). Argentina.

Castellanos, Natalia; Charry, María (2016). *“Evaluación de la calidad físico- química y biológica de la laguna de Ubaque para el diseño de las medidas de manejo ambiental”*. Tesis de grado de Ingeniería Ambiental. Universidad Libre Colombia, Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia.

Cátedra de Fisiología Vegetal, apunte de clases (2014). *“Nutrición mineral”*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

Cisterna O., Pedro; Peña, Deisy (Sin fecha). “*Determinación de la relación DQO/DBO en aguas residuales de comunas con población menor a 25.000 habitantes en la VIII región*”. Chile.

Colin Castro, Claudia Adriana; Hernández Durán, Melissa y col. (2014). “*Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*”. Revista Investigación en Discapacidad, Vol. 3, Núm. 1. Enero-Marzo 2014, pp. 10-18. México.

Consejo Oleícola Internacional (COI). “*Cifras aceituna de mesa*”. Consulta: 24/04/2018, disponible en http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures?lang=es_ES

de Lemos C., Carlos A.; von Sperling, Marcos (2005). “*Biological wastewater treatment in warm climate regions*”. IWA, Londres.

Dirección Nacional de Programas de Desarrollo Regional. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Consulta: 23/04/2018, disponible en https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/d_programa_desarrollo_regional/

Drovandi, A. (2004). “*Problemática ambiental de los Recursos Hídricos en Mendoza*”. Apunte de clase. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

Dueck, Alicia Elena (2016). “*El agua en las industrias alimenticias de Mendoza (Argentina): estimación de los requerimientos hídricos y la potencialidad de reuso agrícola*”. Instituto Nacional del Agua (INA). Mendoza, Argentina.

Fagot, L.; Foresi, S.; Pereyra, M.; Rauck, T. (Sin fecha). “*Saneamiento del Colector Pescara. Sistema centralizado de reuso en riego de efluentes líquidos agroindustriales*”. Departamento General de Irrigación, Ministerio de Medio Ambiente y Obras Públicas. Mendoza, Argentina.

Fernández, Isabel; Fuentes, Ana; García, Eva (Sin fecha). “*Determinación de Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*”. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia.

Food Machinery- Líneas de deshueso, rodaja y relleno. Sevilla, España. Consulta: 12 de Agosto de 2018, disponible en <http://ofm.sascomsports.com/es/pitting-slicing-and-stuffing-line.html>

Francisco Soria Melguizo, S.A., Ficha Técnica N° 770572, “*Pate Count Agar*”. Madrid, España, Septiembre de 2009.

Froni, Lilian (2011). “*Microbiología: básica, ambiental y agrícola*”- 1ª ed. Editorial Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires, Argentina.

Galvis Toro, Juliana; Rivera Guerrero, Ximena (2013). “*Categorización físico química y microbiológica de los lodos presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales industriales (PTARI) de la empresa Jugos Hit de la Ciudad de Pereira*”. Trabajo de Grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías. Pereira, Colombia.

Garbisu, C.; Amézaga, I.; Alkorta, I. (2002). “*Biorremediación y Ecología*”. Revista Ecosistemas. Año XI, N° 3.

Garduño, Héctor (2003). “*Capítulo 6: Argentina (Provincia de Mendoza)*” de: Administración de derechos del agua. Experiencias, asuntos relevantes y lineamientos. FAO, estudio legislativo 81. Roma, Italia.

Gimeno Creus, Eva (2004). *“Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud”*. Offarm Vol. 23 Núm. 6, España.

Hernández, A. (1992). *“Depuración de Aguas Residuales”*. Colegio de Ingenieros de caminos, canales y puertos. Madrid, España.

IMPEC ARGENTINA. Ficha Técnica “Viales DQO”. Buenos Aires, Argentina.

INDEC. *“Censo Nacional Agropecuario 2002”*. Argentina. Consulta: 15 de Abril de 2018, disponible en https://www.indec.gov.ar/cna_index.asp

Jarava, Rafael; Planeta, Patricia (2017). *“Análisis de Alternativas para la Remoción de Cloruros presentes en las Aguas Residuales Industriales de Producción del Campo Cicuco Ecopetrol S.A.”*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Valledepar, Colombia.

Kemmer, F.N. (1989). *“Manual del agua. Su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Tomo I”*. Editorial McGraw Hill, Estados Unidos.

Laboratorios Britania, Ficha Técnica REF: B0216605, *“Papa Glucosado Agar”*. CABA, Argentina.

Madigan, Michael; Martinko, John y col. (2009). *“Brock. Biología de los Microorganismos”*. Ed. Pearson Educación S.A. Madrid, España.

Maestro Duran, R.; Borja Padilla, R. y col. (1991). *“Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín”*. Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.). Publicado en Revistas Científicas del CSIC, Vol. 42 Fasc. 4, pp. 271-276. Sevilla, España.

Maldonado, Mariela Beatriz (2004). *“El fenómeno de difusión de sodio durante el desamariado de aceitunas verdes de mesa”*. Tesis Doctoral, Programa de Posgrado en Biología. Universidad Nacional de Cuyo.

Maldonado, Mariela Beatriz; Zuritz, Carlos A. y col. (2011). *“A simple model of the diffusion phenomena taking place during the debittering process of green table olives”*. Grasas y aceites, 62 (1), enero-marzo, 39-48.

Metcalf & Eddy (1995). *“Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización”*. Volumen 1. Editorial McGraw Hill. Madrid, España.

Perdomo, Rodisnel; Otero, Mario; González, Maricela (2012). *“Validación del método del sulfato de brucina para la determinación de nitrato en aguas superficiales”*. Revista cubana de Química vol. XXIV, núm. 2, 2012, pp. 155-165. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

Pérez Valenzuela, Benjamín Ricardo (1999). *“Edafología en la agricultura regadía cuyana”*. Editorial Fundar. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

Resolución N°778 (1996). 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.

Rheinheimer, Gerhard (1987). *“Microbiología de las aguas”*. Instituto de Oceanografía de la Universidad de Kiel. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.

Rigola Lapeña, Miguel (1990). *“Tratamiento de aguas industriales: Aguas de proceso y residuales”*. Editorial Marcombo S.A.

Rodríguez, Guillermo; Rubio- Senant, Fátima y col. (2012). *“New Phenolic Compounds Hydrothermally Extracted from the Olive Oil Byproduct Alperujo and Their Antioxidative Activities”*. Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España.

Romero, J.A. (1999). *“Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño”*. Editorial Escuela colombiana de Ingeniería. Bogotá, Colombia.

Schönborn, W. (1986). *“Biotechnology: Microbial Degradation”*. Vol.8, VCH. Weinheim, Alemania.

Sosa, R. (2013). *“Propuesta de implementación de un sistema de tratamiento de efluentes en una bodega de Mendoza”*. Tesina de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.

Vanegas López, María Consuelo (2015). *“Guías para el laboratorio de Bacteriología”*. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas (pp.132-133). Ediciones Uniandes Bogotá, Colombia.

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas) (2017). *“Aguas residuales: El recurso desaprovechado”*, de: Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017, (pp. 1-5, 2, 13, 41). París, UNESCO.

ANEXO I

Resolución N° 778 de la Provincia de Mendoza

Artículo 1° del ANEXO I

Establécense los siguientes parámetros máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico:

Tabla 4.

Parámetros Físicos máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico

Ítem	Parámetro	Unidades	Máximo permitido	Máximo tolerable	Especificaciones singulares y observaciones
1	Color Verdadero	UCV	12	18	UCV o "true colour unit". Medido sobre efluente filtrado.
2	Conductividad Específica	Micro siemens a 25° C	900	1800	En algunos cuerpos receptores se permitirá valor mayor por tiempo limitado, siempre que no causen daños a terceros. Podrá exigirse control continuo.
3	Sólidos Sedimentables	ml/l	Menos de 1	10	Valores obtenidos en con de Imhoff en dos (2) horas. La exigencia podrá ser mayor para evitar posibles embanques. No se admitirán sedimentos cuando su DBO supere los 100 mg/l.
4	Sólidos Sedimentables Compactados	ml/l	0,5	1	Ídem anterior. Valores obtenidos a los 10 minutos. No se admitirán sedimentos cuando su DBO supere los 100 mg/l.
5	Sólidos Solubles en Éter Etílico	mg/l	50	100	Cerca de tomas para agua de bebida no podrá ser superior a 0,05 mg/l.
6	Temperatura	°C	30	45	Para casos especiales, se fijará el máximo en forma singular.

Fuente: Resolución N° 778 de la Provincia de Mendoza. Anexo I

Tabla 5.

Parámetros Químicos máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico

Nº	Parámetro	Unid.	Máximo Permitido	Máximo Tolerable	Especificaciones singulares y observaciones
7	Arsénico	mg/l	0,05	0,1	Si hay afectación sobre aguas subterráneas, menos de 0,05 mg/l. Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido es de 0,01 mg/l.
8	Boro	mg/l	0,5	1	Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será menor de 0,03 mg/l. Este parámetro podrá ser más estricto, según los cultivos irrigados.
9	Cadmio	mg/l	0,003	0,01	Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será menor a 0,003 mg/l.
10	Cianuros	mg/l	Menos de 0,05	0,05	Cerca de tomas de agua para bebidas, el máximo permitido será de 0,05 mg/l. Este parámetro podrá ser más estricto, según la afectación a la vida acuática.
11	Cloruros	mg/l	200	400	Este parámetro podrá ser más estricto si existe posibilidad de efectos corrosivos.
12	Cromo Hexavalente	mg/l	0,05	0,1	Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será menor a 0,05 mg/l. Este parámetro podrá ser más estricto, según la afectación a la vida acuática.
13	Cromo Total	mg/l	Menos de 0,5	0,5	Mayor exigencia es posible cerca de tomas de agua para bebida o afectación de vida acuática.
14	Detergentes	mg/l	1	1	El máximo tolerado podrá variarse en casos particulares, en función del tipo de cuerpo receptor, pero siempre será menor de 2 mg/l. Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo no podrá ser mayor a 1 mg/l.
15	Fenoles	mg/l	0,05	0,1	Cerca de tomas de agua para bebida, e máximo permitido será menor 0,5 mg/l.
16	Fosfatos	mg/l	0,4	0,7	Para lagos y embalses o lagunas, un valor puntual menor de 0,5 mg/l.
17	Hidrocarburos	mg/l	0,5	X	El máximo tolerado se fijará en función del tipo del cuerpo receptor y problemas que pueda causar. Siempre será menor de 5 mg/l. Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será menor a 0,1 mg/l. En todos los casos, el máximo permitido de hidrocarburos polinucleares será menor de 0,02 mg/l.
18	Manganeso	mg/l	0,1	0,5	Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será menor a 0,1

					mg/l.
19	Mercurio	mg/l	Menos de 0,001	0,005	Cerca de tomas de agua para bebida, el máximo permitido será de 0,001 mg/l o más estricto según afectación.
20	Nitratos	mg/l	Menos de 45	45	Dicho parámetro podrá ser más estricto en caso del vuelco directo o indirecto a lagos, embalses y lagunas.
21	Nitritos	mg/l	Menos de 0,1	0,1	-
22	Nitrógeno Amoniacal	mg/l N	1,5	5	Dicho parámetro podrá ser más estricto cuando se lo relacione con coliformes fecales. En caso de cuerpos receptores con vida acuática, el máximo permitido será de 0,02 mg.
23	pH	Nro.	6.5 a 8.2	5.5 a 9.0	En algunas industrias se exigirá control continuo, debiendo indicar tipo de tratamiento.
24	RAS	Nro.	6	X	El máximo a tolerar se fijará en función del cuerpo receptor, usos posteriores del agua y problemas que puedan causarse. En ningún caso podrá ser superior a 12.
25	Sodio	mg/l	150	275	Dicho parámetro podrá ser más estricto en aquellos casos de afectación a tomas de agua u otros casos especiales.
26	Sulfatos	mg/l	250	400	Dicho parámetro podrá ser más estricto en aquellos casos de posibilidad de corrosión.
27	Sulfuros	mg/l	Menos de 1	1	
28	Colifecales	nm/ 100 ml	200	1000	No se autorizará, salvo casos singulares, el mezclado de líquidos residuales con cloacales. Dicho parámetro podrá ser más estricto en aquellos casos en que pueda afectar el agua para bebida.
29	DBO	mg/l	30	120	En algunos desagües y drenajes se permitirá expresamente un valor mayor, por tiempo limitado, siempre que no se causen problemas a terceros o cuerpos receptores. Dicho parámetro podrá ser más estricto si pudiera haber influencia en tomas de agua potable.
30	DQO	mg/l	75	250	Ídem anterior.
31	Helminetos	huevos/ litro	Menos de 1	1	Ídem 28.

Fuente: Resolución N° 778 de la Provincia de Mendoza. Anexo I

ANEXO II

A continuación, se muestran algunos de los microorganismos que fueron sembrados y aislados a partir del efluente:

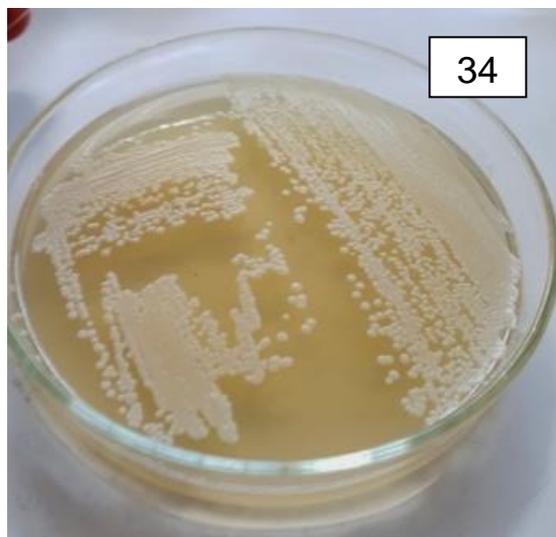
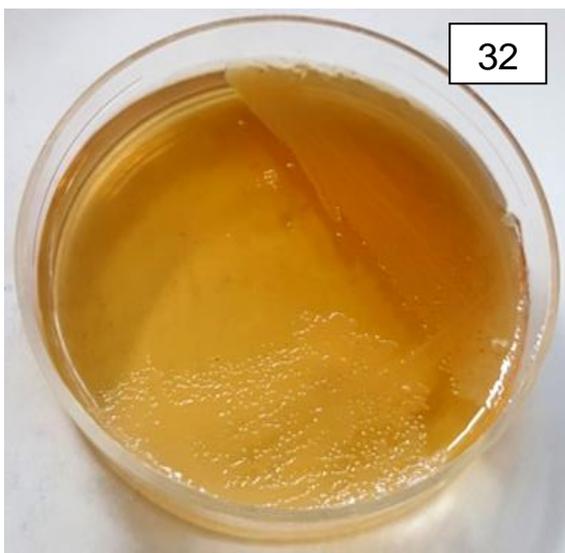
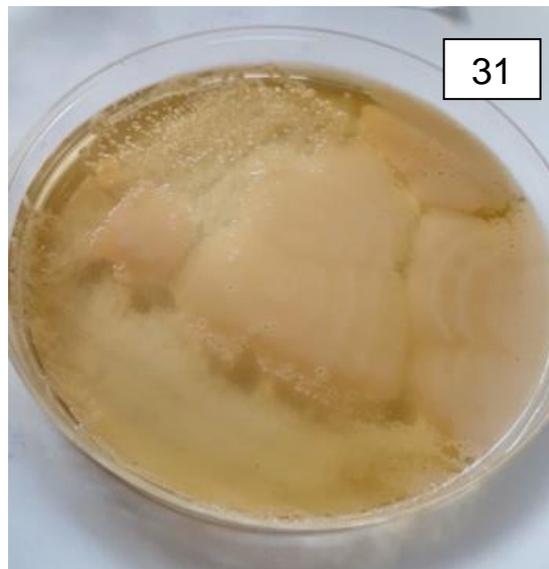
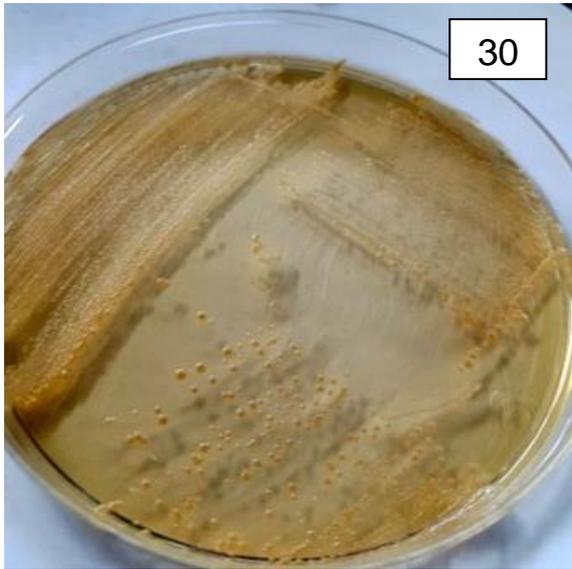


Figura 30, Figura 31 y Figura 32.
Repiques en medio PC

Figura 33 y Figura 34. Repiques en medio PG

Fuente: Propia

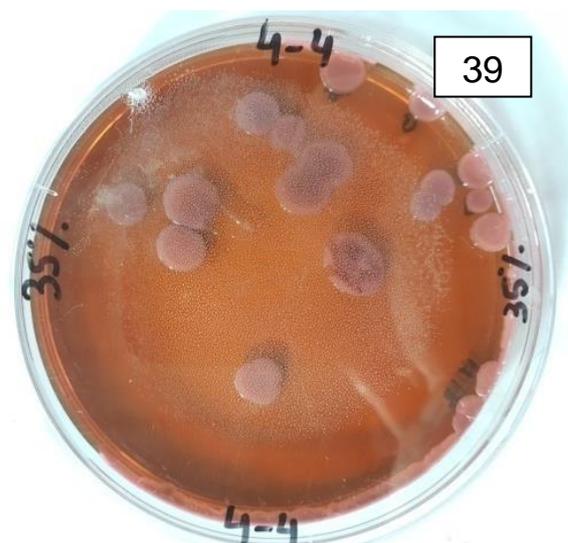
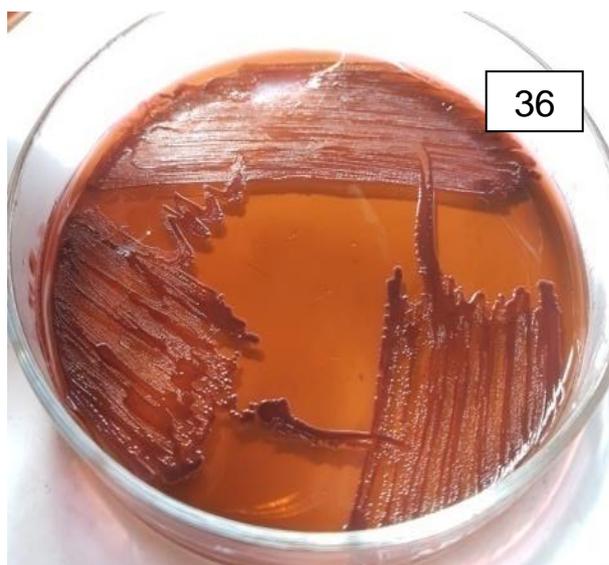


Figura 35. Siembra en medio PG

Figura 36 y Figura 37. Repiques en medio EMB

Figura 38 y Figura 39. Siembra en medio EMB

Fuente: Propia

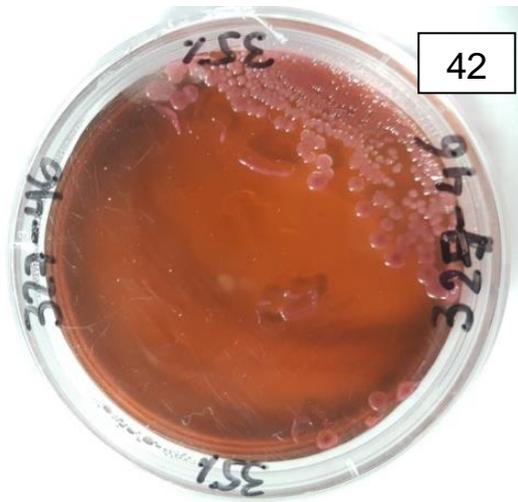
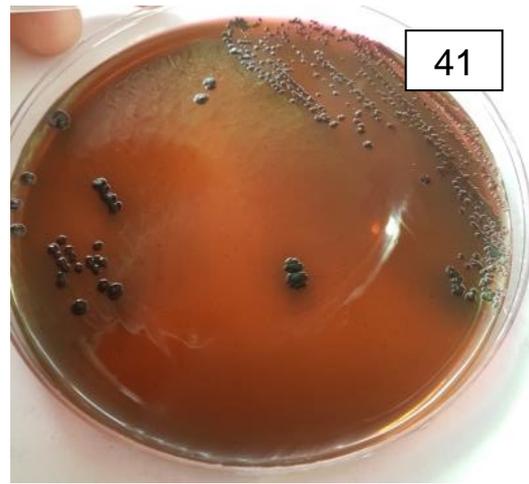
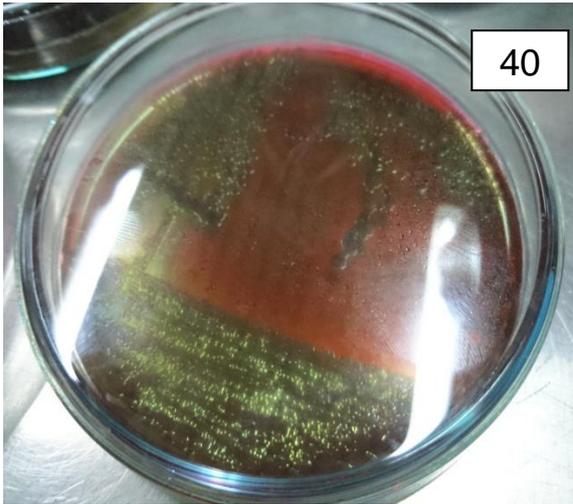


Figura 40, Figura 41, Figura 42, Figura 43 y Figura 44. Repiques en medio EMB
Fuente: Propia