

TESINA DE GRADO DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

USO DE MICROORGANISMOS
NATIVOS EN LA DEGRADACIÓN DEL
EFLUENTE DE DESAMARIZADO DE LA
ELABORACIÓN DE ACEITUNA

Autora: Romina Soledad Pasini

2020

Directora: Ing. Agr. Julieta Flamarique

Co-director: Ing. Agr. Emilio Rearte

RESUMEN

La industria olivícola es una actividad de importante relevancia dentro de la economía de la provincia de Mendoza. Durante el proceso de desamarizado en la producción de aceitunas de mesa, se generan efluentes cáusticos de gran carga orgánica, pH fuertemente alcalino y de alta concentración de compuestos polifenólicos que hacen al mismo difícil de degradar. Además, este efluente es fitotóxico e inhibidor del crecimiento microbiano resultando un grave problema para el ambiente.

En este trabajo se busca evaluar la degradación del efluente producido en el desamarizado mediante el empleo de microorganismos nativos. Para ello se llevaron a cabo dos ensayos de biorremediación con lejía del desamarizado con un inóculo compuesto por barro con microorganismos procedentes de las balsas de evaporación del efluente. Uno de esos ensayos se realizó con agregado de una fuente de carbono, mientras al otro no. Se realizó el seguimiento de una serie de parámetros en el tiempo. Los mismos fueron: pH, conductividad eléctrica, azúcares reductores, polifenoles totales, acidez total y crecimiento microbiano.

Se observó que los microorganismos son capaces de establecerse y desarrollarse bajo las condiciones de pH alto, produciendo una disminución de la materia orgánica presente y modificaciones en los parámetros iniciales.

PALABRAS CLAVES

Aceitunas de mesa, efluente, carga orgánica, microorganismos, desamarizado.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agrarias, por brindarme a mí y a otros estudiantes la posibilidad de acceder a una educación superior de calidad y con muy buenos profesionales.

A mi directora, co- director y evaluadores por participar en el proceso de elaboración de esta tesina de grado.

A Mayra, Clara y Javi, personas maravillosas a las cuales conocí durante el cursado de esta carrera y a las que aprecio mucho.

A Ariel, Javier, Macarena y Nur, con quienes pase años cursando y que fueron, dentro y fuera de la facultad un apoyo inestimable, y deseo que lo sigan siendo en el futuro.

A mis amigas de toda la vida, Ludmila y Andrea, que siempre estuvieron presentes en los momentos más importantes de mi vida.

A mis abuelos, Leonzo y Natividad, que aunque hace años que no están presentes, sentaron las bases de la persona que soy ahora.

A mi madre y hermano, Mirta y Franco, que siempre estuvieron y están a mi lado apoyándome en todo.

Y por último a mi padre, Marcos, que hace muy poco tiempo que ya no está presente, y que siempre me alentó para seguir estudiando a pesar todos los problemas que atravesáramos e hizo todo lo posible para que yo hoy llegue a terminar esta carrera.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN.....	ii
PALABRAS CLAVES.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
ÍNDICE DE IMÁGENES	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Fundamentación.....	1
1.2. Objetivos generales y particulares.....	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos particulares	3
1.3. Hipótesis	3
2. MARCO REFERENCIAL.....	4
2.1. La olivicultura en el mundo	4
2.2. Olivicultura en Argentina	3
2.3. Olivicultura en Mendoza	5
2.4. Aceitunas de mesa.....	9
2.5. Producción de aceitunas verdes fermentadas estilo Español.....	10
2.6. Efluentes industriales.....	12
2.7. Marco legal	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación del ensayo.....	15
3.2. Caracterización del efluente	15
3.3. Ensayos de biorremediación	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Caracterización del efluente	20
4.2. Ensayos de biorremediación	20
4.2.1. pH.....	21
4.2.2. Conductividad eléctrica.....	22
4.2.3. Acidez.....	23
4.2.4. Azúcares reductores.....	24

4.2.5.	Polifenoles totales	25
4.2.6.	Crecimiento microbiano	26
4.2.6.1.	Con agregado de fuente de carbono.....	26
4.2.6.2.	Sin agregado de fuente de carbono	29
5.	CONCLUSIONES.....	33
6.	PROSPECCIÓN	34
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	35
8.	ANEXO I.....	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de superficie implantada con olivo por continente. Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.	4
Gráfico 2. Porcentaje de superficie implantada con olivo en la República Argentina por Provincia (ha). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada el Censo Nacional Agropecuario 2018.....	5
Gráfico 3. Porcentaje de superficie implantada con olivo en la República Argentina por destino (ha). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada por el Censo Nacional Agropecuario 2018.....	5
Gráfico 4. Porcentaje de superficie implantada con frutales, por tipo de cultivo en la provincia de Mendoza. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.....	6
Gráfico 5. Distribución de la superficie con olivo por departamento productor en la provincia de Mendoza, en hectáreas, año 2010. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.....	8
Gráfico 6. Superficie (ha) con olivo por variedad en la provincia de Mendoza, año 2010. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.	9
Gráfico 7. Evolución del pH en el tiempo.	21
Gráfico 8. Evolución de la conductividad (mS/cm) en el tiempo.	22
Gráfico 9. Evolución de la acidez (% ác. Láctico) en el tiempo.	23
Gráfico 10. Evolución de azúcares reductores en el tiempo.....	24
Gráfico 12. Crecimiento microbiano en el tiempo del ensayo con agregado de fuente de carbono.....	26
Gráfico 13. Crecimiento microbiano en el tiempo del ensayo sin agregado de fuente de carbono.....	29

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Superficie olivícola en los oasis de Mendoza. Fuente: Elaboración propia a partir de información en formato shape de cultivos de la provincia suministrada por el IDR (2017).	7
Imagen 2. Esquema del proceso productivo para aceitunas verdes. Fuente: Ramirez Castro	11
Imagen 3. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al tercer día.	27
Imagen 4. Siembra de dilución 10^{-7} correspondiente al cuarto día.	27
Imagen 5. Tinción de nigrosina. Morfología de cocos.	28
Imagen 6. Tinción de gram. Bacterias Gram -	28
Imagen 7. Cuba de flotación, día 2 del ensayo.	29
Imagen 8. Cuba de flotación, día 10 del ensayo.	29
Imagen 9. Siembra de dilución 10^{-7} correspondiente al día 5.	30
Imagen 10. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al día 7.	30
Imagen 11. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al día 11.	30
Imagen 12. Tinción de nigrosina. Morfología de bacilos.	31
Imagen 13. Tinción de gram. Bacterias Gram +	31
Imagen 14. Cuba de flotación, día 10 del ensayo.	32
Imagen 15. Cuba de flotación, día 14 del ensayo.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie implantada con olivo por continente (*1000 ha.). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017.....	4
Tabla 2. Producción olivícola por país (*1000 t). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.....	2
Tabla 3. Consumo por país (*1000 t). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.	2
Tabla 4. Superficie con olivo en las principales provincias productoras argentinas (Año 2016). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada por el Censo Nacional Agropecuario 2018.....	4
Tabla 5. Valores de las determinaciones realizadas en el efluente.....	20
Tabla 6. Características macroscópicas o culturales de las colonias aisladas del ensayo con agregado de fuente de carbono.	27
Tabla 7. Características microscópicas o morfológicas de los microorganismos aislados en el ensayo con agregado de fuente de carbono.	28
Tabla 8. Características macroscópicas o culturales de las colonias aisladas en el ensayo sin agregado de fuente de carbono.....	30
Tabla 9. Características microscópicas o morfológicas de los microorganismos aislados en el ensayo con agregado de fuente de carbono.	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fundamentación

La agricultura es una de las actividades más importantes desarrolladas en el territorio provincial. Dentro de ella se encuentra el cultivo del olivo, que cuenta con una superficie de 12.088,3 ha destinada a la elaboración de aceite y 3,896 ha para la elaboración de aceitunas para conserva (INDEC, 2018). La mayor superficie implantada con olivo en Mendoza se encuentra en San Rafael, seguido por Maipú, Lavalle y Rivadavia, representando el 80% del total de la superficie olivícola de Mendoza (Instituto de Desarrollo Rural, 2010). Del total de la producción olivícola, el 43% corresponde a aceitunas para conserva y el 57% está destinado a la producción de aceite (Cáceres, 2009). Aproximadamente el 90% de la producción de aceite de oliva y el 80% de la producción de aceituna de mesa se exporta (Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo, 2016). Ello denota la importancia que tiene dicho cultivo para la economía de la provincia.

En la producción industrial, el fruto se somete a un proceso para quitar el amargor natural que posee de manera que sean comestibles. En esta etapa de desamarizado se producen efluentes cáusticos de importante carga orgánica, pH fuertemente alcalino y alta concentración de compuestos polifenólicos (Matías, 2012) que hacen difícil su degradación. Además, son fitotóxicos e inhibidores del crecimiento microbiano resultando un grave problema para el ambiente (McNamara, 2008). Por lo tanto, es necesario lograr la disminución de la carga orgánica, el contenido de polifenoles y la modificación del pH para que el efluente sea apto para su reuso o vuelco a cauce.

El tratamiento que reciben estos efluentes en diferentes partes del mundo consiste en la retención en piletas de evaporación. Sin embargo, este método causa malos olores y existe una gran posibilidad de contaminación de aguas superficiales y subterráneas, por escorrentía y lixiviación (Zarkadas, 2011).

En la actualidad, se han propuesto varias tecnologías y métodos para la degradación del efluente de aceitunas de mesa y su reutilización, lo que conduciría a una reducción considerable del volumen final de aguas residuales. Se encuentran métodos físicos (filtración con membranas), fisicoquímico (floculación, cal y tratamiento con carbón activado, oxidación química) y métodos térmicos. Además, procesos avanzados de oxidación (AOP) han sido examinados para el tratamiento de estas aguas residuales, los cuales involucran el uso combinado de O_3 / H_2O_2 u O_3 / UV , fotocatalisis TiO_2 / UV , oxidación electroquímica y oxidación en aire húmedo. Muchos de estos métodos, separan los contaminantes orgánicos en un concentrado que requiere un tratamiento adicional. Por otro lado, los métodos de oxidación química poseen una alta eficiencia de eliminación de compuestos orgánicos específicos y color, oxidación moderada de contenido orgánico y aumento sustancial de la biodegradabilidad del efluente, pero su costo comercial es muy elevado. Otros métodos son los de tratamiento biológico, que han sido reconocidos como procesos económicos y efectivos en comparación con métodos químicos (Patsios, 2015).

A nivel local, no existen antecedentes en el tema que va a tratar la presente tesina. Por ello se propone investigar alternativas para el tratamiento de lejías del desamarizado, orientado a la acción de microorganismos, así lograr disminuir la contaminación que se genera por el tratamiento incompleto que se realiza.

1.2. Objetivos generales y particulares

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la degradación del efluente producido en el desamarizado por tratamiento biológico, mediante el uso de sus microorganismos nativos.

1.2.2. Objetivos particulares

- Caracterizar química y físicamente el efluente del desamarizado.
- Analizar la evolución de la población microbiana durante el tratamiento biológico.
- Evaluar la dinámica de las variables seleccionadas: pH, carga orgánica y polifenoles totales.

1.3. Hipótesis

El tratamiento biológico de efluentes del desamarizado del proceso elaboración de aceitunas, utilizando los microorganismos nativos de las balsas de evaporación, permite reducir la carga orgánica, el contenido de polifenoles y modificar el pH del efluente, haciéndolo apto para el reuso agrícola.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. La olivicultura en el mundo

El olivo (*Olea europea L.*) es un cultivo milenario, utilizado para la elaboración de aceitunas de mesa y fabricación de aceite de oliva. Es originario de áreas cercanas al mar Mediterráneo, parte de Asia Menor, India, África y Europa, siendo extendido a América durante la colonización (Fernández Díez, 1971). Actualmente, el olivo es el cultivo permanente más presente en el mundo, representando el 1% de la superficie agrícola. La superficie implantada asciende a más de 11 millones de hectáreas distribuidas en 57 países (gráfico 1 y tabla 2) (Vilar, 2017)

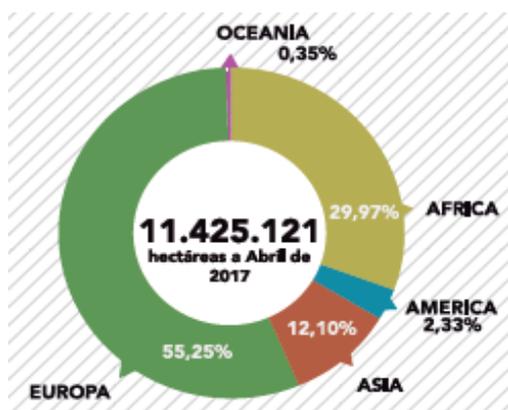


Gráfico 1. Porcentaje de superficie implantada con olivo por continente. Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.

Tabla 1. Superficie implantada con olivo por continente (*1000 ha.). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017.

Superficie por continente (x1000 ha)	
EUROPA	6.312,8
AFRICA	3.423,8
ASIA	1.382,8
AMERICA	266,0
OCEANIA	39,7

Con respecto a la producción, el 90% se destina a la obtención de aceite y el 10% restante se utiliza para la elaboración de aceitunas de mesa (Matías, 2012). Los principales productores son España, Túnez, Italia, Grecia, Marruecos y Turquía (tabla 2). Los principales consumidores de la producción olivícola son actualmente Italia, España, Estados Unidos, Grecia y Siria (figura 4).

Tabla 2. Producción olivícola por país (*1000 t). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.

Producción por países (x1000 t)				
	Media 1990-2009	Media 2009-2015	Campaña 2015-2016	Campaña 2016-2017
ESPAÑA	1.101,0	1.274,9	1.394,0	1.285,0
TURQUIA	117,2	166,3	143,0	220,0
ITALIA	623,4	395,1	470,0	183,0
GRECIA	361,5	284,3	310,0	180,0
SIRIA	128,2	164,7	215,0	150,0
MARRUECOS	78,3	123,3	130,0	100,0
TUNEZ	186,7	180,3	140,0	100,0
PORTUGAL	39,8	68,9	99,3	76,4
ARGELIA	40,3	52,1	73,5	72,0
ARGENTINA	19,9	20,3	25,0	26,5
JORDANIA	25,5	21,2	29,0	24,0
OTROS (46)	90,4	159,8	207,1	270,0
TOTAL	2.812,2	2.911,2	3.235,9	2.686,9

Tabla 3. Consumo por país (*1000 t). Fuente: Informe “Caja Rural de Jaén” sobre coyuntura para la olivicultura internacional, Campaña 2016/2017 elaborado por Vilar.

Consumo por países (x1000 t)

	Media 1990-2009	Media 2009-2015
ITALIA	769,7	609,6
ESPAÑA	554,3	528,2
USA	234,2	285,3
GRECIA	263,4	186,0
SIRIA	110,7	140,6
TURQUÍA	71,5	132,1
MARRUECOS	60,5	113,5
FRANCIA	101,3	109,4
PORTUGAL	75,5	78,4
BRASIL	32,1	65,3
REINO UNIDO	56,8	61,0
ARGELIA	39,3	59,4
ALEMANIA	45,7	59,2
JAPON	30,6	47,2
AUSTRALIA	36,8	39,8
CANADA	29,9	38,6
TUNEZ	42,3	33,7
RUSIA	11,3	24,0
JORDANIA	22,7	20,5
CHINA	6,0	12,6
OTROS (154)	219,5	350,7
TOTAL	2.814,1	2.995,1

2.2. Olivicultura en Argentina

En Argentina, la actividad olivícola es considerada una producción tradicional en las zonas irrigadas de los valles áridos del noroeste argentino (Catamarca y La Rioja) y Cuyo. En la década de los '90, se transformó en un nuevo actor del mercado mundial, convirtiéndose en el principal centro de producción de aceite de oliva y aceitunas de mesa fuera de la cuenca del Mediterráneo. Este incremento se produjo gracias a incentivos gubernamentales para fomentar la inversión en el sector agropecuario de capitales foráneos a economías regionales (Matías, 2012). La Ley Nacional de Diferimientos Impositivos N° 22.702 (1982) fue un importante paso para este cambio, permitiendo que ingresaran al circuito La Rioja, Catamarca y San Juan (Cáceres, 2009).

Según los resultados preliminares del Censo Nacional Agropecuario de 2018, las provincias con mayor superficie son La Rioja, Catamarca, San Juan y Mendoza (tabla 4 y gráfico 2) y, en menor proporción, Córdoba, Buenos Aires y Salta (Cáceres, 2009). Del total de la superficie implantada, el 33% corresponde a aceitunas con destino a conserva y al 67% a la producción de aceite de oliva (gráfico 3).

Tabla 4. Superficie con olivo en las principales provincias productoras argentinas (Año 2016). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada por el Censo Nacional Agropecuario 2018.

Superficie con olivo por provincia	
Provincias	Superficie (hectáreas)
La Rioja	26.169,3
Mendoza	15.985,6
Catamarca	15.484,4
San Juan	13.211,6
Otros	7.029,3
Total	77.879,2

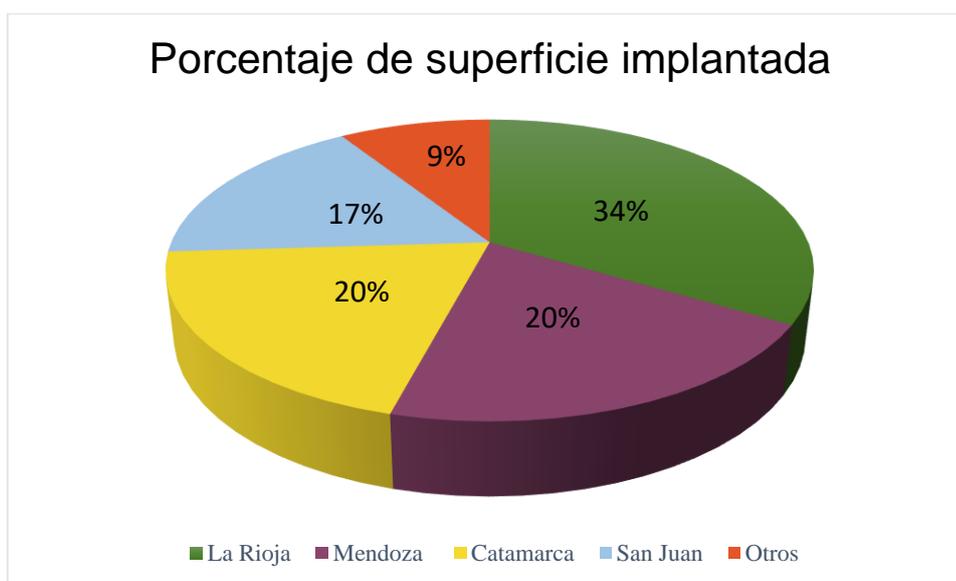


Gráfico 2. Porcentaje de superficie implantada con olivo en la República Argentina por Provincia (ha). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada el Censo Nacional Agropecuario 2018.

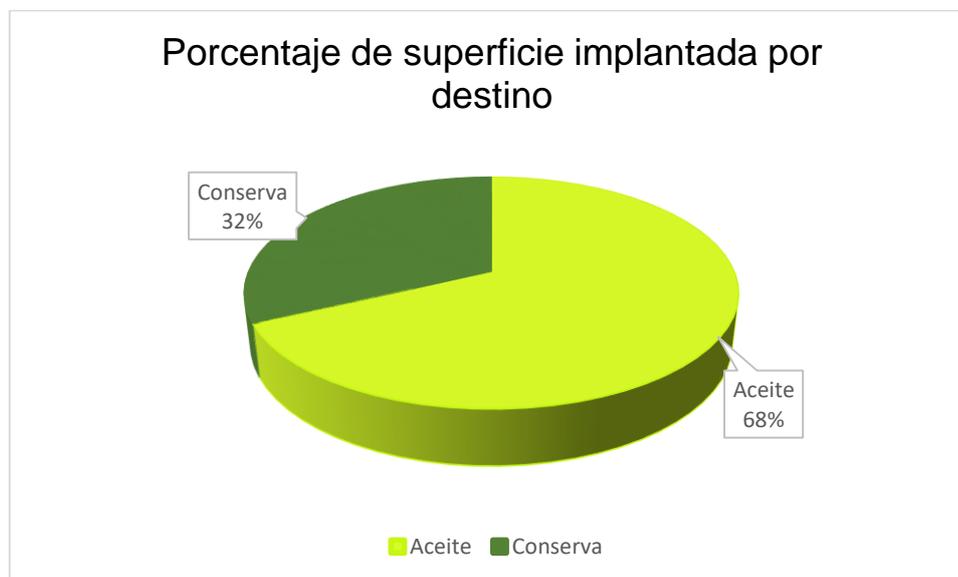


Gráfico 3. Porcentaje de superficie implantada con olivo en la República Argentina por destino (ha). Fuente: Elaboración propia a partir de información suministrada por el Censo Nacional Agropecuario 2018.

Durante la Campaña 2017, la producción primaria ascendió a 450.000 t, de las cuales 300.000 t fueron destinadas a la producción de aceite de oliva, mientras 150.000 t a la elaboración de aceitunas de mesa (Consejo Federal Agropecuario, 2017).

Argentina, es actualmente el décimo productor mundial de aceitunas en conserva, y onceavo de aceites de oliva. La producción nacional representa alrededor del 4% del total mundial (Consejo Federal Inversiones, 2011). La superficie implantada con olivos en el país se estima en alrededor de 77.879,2 ha (INDEC, 2018).

2.3. Olivicultura en Mendoza

La superficie implantada en Mendoza con frutales en 2018 era de 75.568,2 ha (IDR, 2010). Las principales especies implantadas corresponden a frutales de pepita, carozo y secos. En el gráfico se muestra la participación de cada uno en el total de superficie. El olivo es la especie

de mayor participación en el total de la superficie frutícola de la provincia, con 15.985,6 ha (INDEC, 2018).

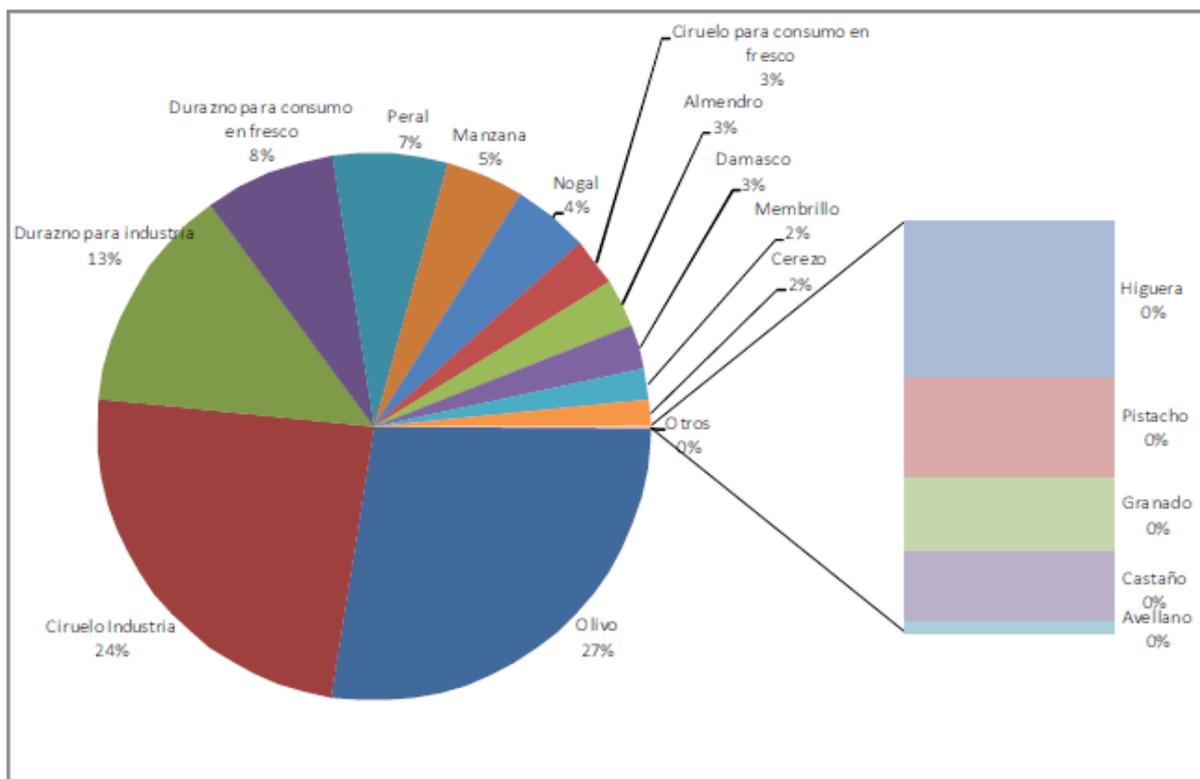


Gráfico 4. Porcentaje de superficie implantada con frutales, por tipo de cultivo en la provincia de Mendoza. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.

El cultivo se concentra principalmente en las regiones del Oasis Norte (8.365 ha), Este (4.495 ha), Sur (7.758 ha) y, en menor extensión, en Valle de Uco con 28 ha (imagen 1) (Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo, 2016).

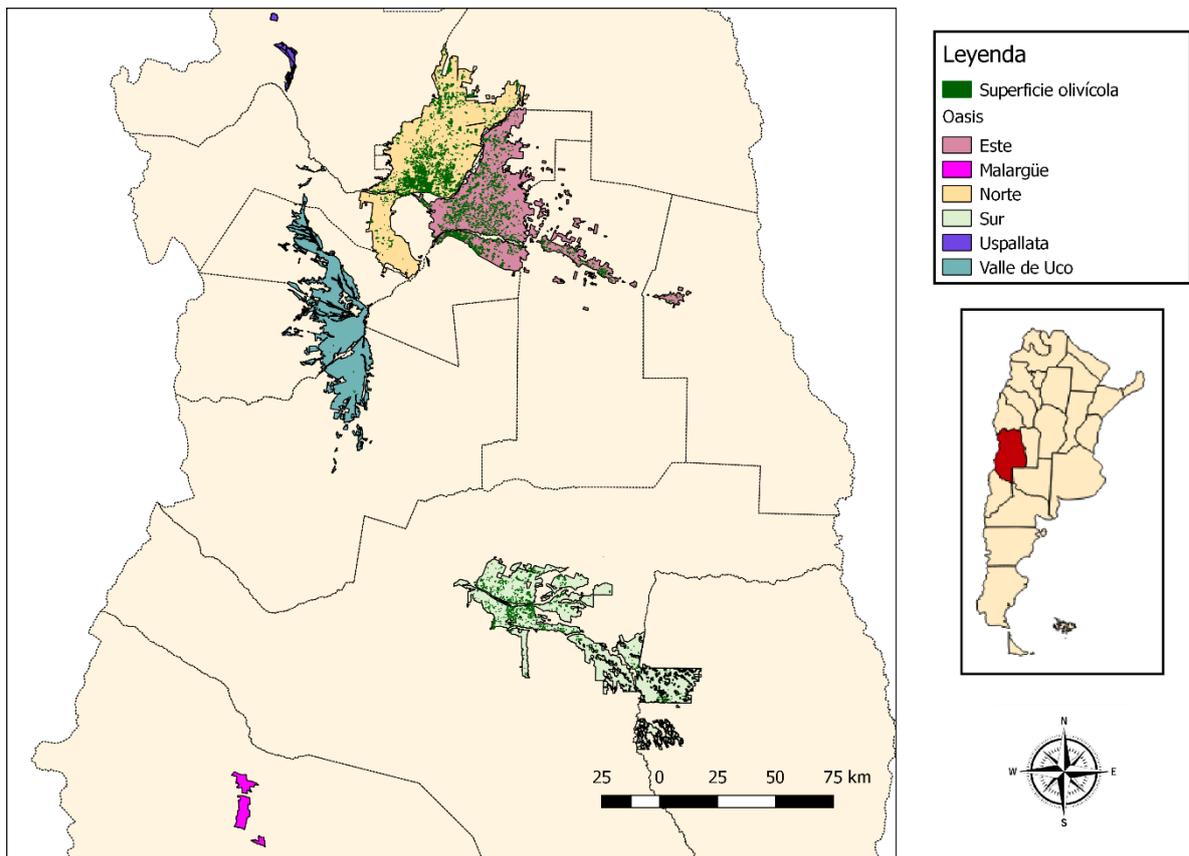


Imagen 1. Superficie olivícola en los oasis de Mendoza. Fuente: Elaboración propia a partir de información en formato shape de cultivos de la provincia suministrada por el IDR (2017).

En el gráfico 5, se muestra la superficie con olivo por cada departamento, registrando la máxima superficie San Rafael con 7.678 ha, Maipú con 4.117 ha, Lavalle con 2.579 ha y Rivadavia con 2.385 ha. representando el 80% del total. Le siguen en valores decrecientes San Martín con 1.069 ha, Las Heras con 928 ha, y Junín con 903 ha. Guaymallén, Luján de Cuyo, Santa Rosa, General Alvear, La Paz y Tunuyán registran los menores valores de superficie (IDR, 2010).

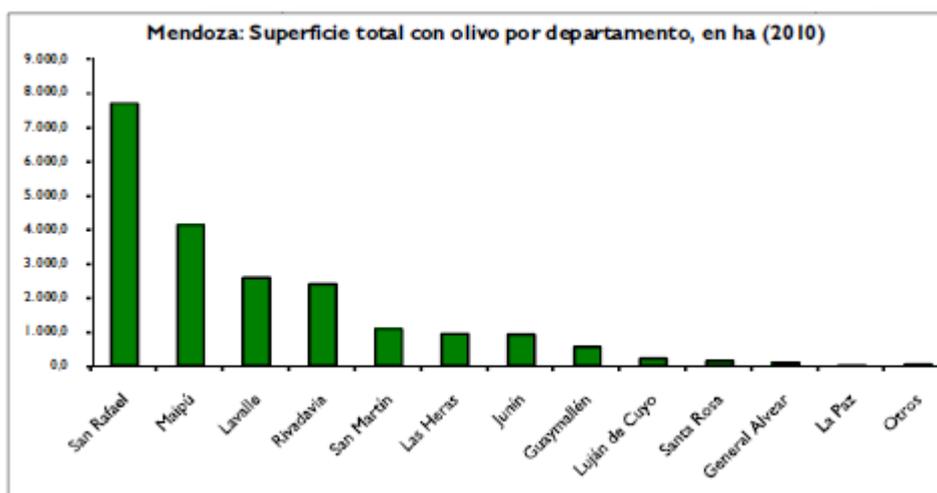


Gráfico 5. Distribución de la superficie con olivo por departamento productor en la provincia de Mendoza, en hectáreas, año 2010. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.

Del total de la producción, el 43% corresponde a aceitunas para conserva y el 57% está destinado a la producción de aceite (Cáceres, 2009). Las principales variedades de olivo cultivadas son Arbequina y Arauco, como se observa en el gráfico 6 (IDR, 2010). Según el Informe productivo de Mendoza, Arbequina representa el 36% de la superficie implantada, mientras que Arauco el 20% (Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo, 2016).

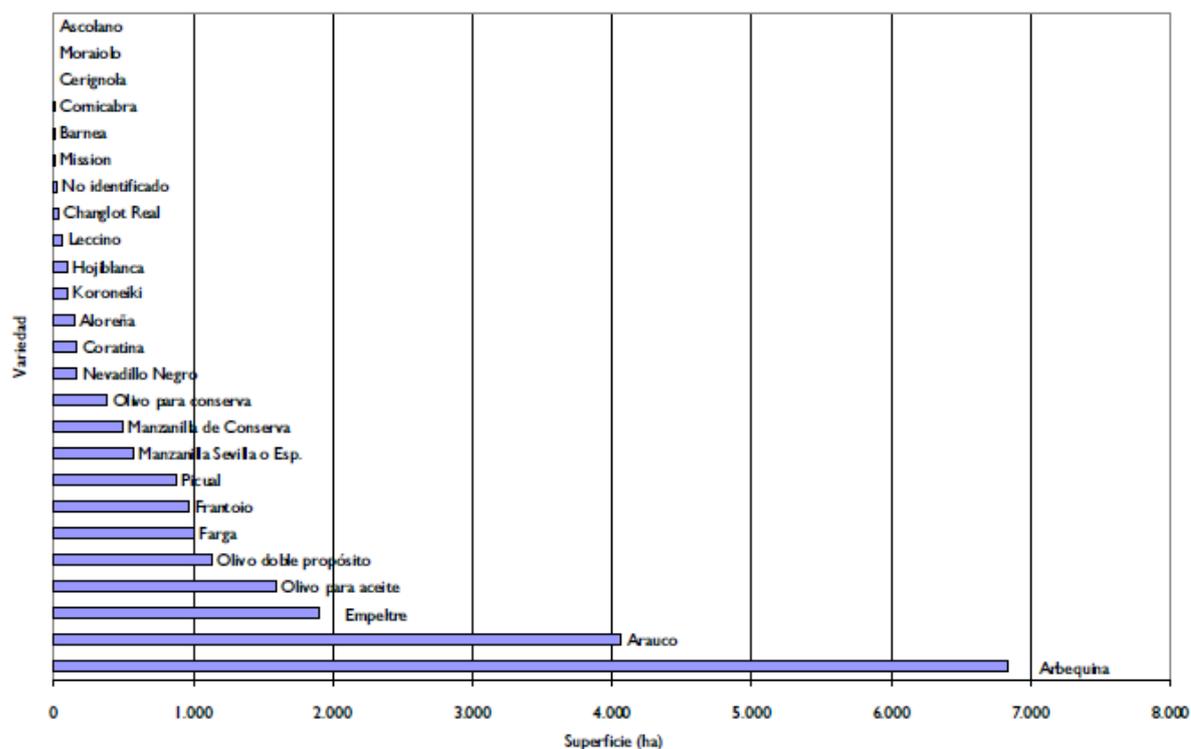


Gráfico 6. Superficie (ha) con olivo por variedad en la provincia de Mendoza, año 2010. Fuente: Censo Frutícola Provincial 2010.

Aproximadamente el 90% de la producción de aceite de oliva y el 80% de la producción de aceituna de mesa se exporta. Con respecto a los destinos de dicha producción, el aceite de oliva es exportado principalmente a Brasil, España y Estados Unidos. En cuanto a las exportaciones de conservas el principal destino es Brasil (Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo, 2016).

2.4. Aceitunas de mesa

Las aceitunas de mesa se diferencian entre sí por su forma de elaboración. Existen diferentes tipos, entre las que se destacan aceitunas verdes fermentadas estilo español, negras oxidadas o estilo californiano, naturales en salmuera y aceitunas deshidratadas (Ramírez Castro, 2015).

- Aceitunas verdes fermentadas estilo español: Se colocan en una solución de hidróxido de sodio, conocido como “lejía”, para eliminar el amargor propio del fruto (desamarizado). Posteriormente son sumergidos en agua para extraer el exceso de lejía y puestos en una solución de cloruro de sodio.
- Aceitunas negras oxidadas o estilo californiano: La etapa principal es la denominada de ennegrecimiento. Consiste en la aplicación de tratamientos con hidróxido de sodio alternados con lavados de agua donde se inyecta aire. Cada tratamiento dura 20 horas aproximadamente. En el último lavado se aplica una sal ferrosa para asegurar la fijación del color negro logrado durante el proceso.
- Aceitunas naturales en salmuera: Los frutos recolectados se colocan en una solución de cloruro de sodio de alta graduación y, en algunos casos, acidificada con ácido acético. Durante la permanencia en la salmuera la aceituna pierde el amargo por difusión de la oleuropeína desde el fruto hacia la salmuera.
- Aceitunas deshidratadas: El fruto totalmente maduro después de ser lavado, se coloca formando capas alternas con cloruro de sodio permitiendo así su deshidratación. Luego se lavan y se secan a temperatura ambiente.

2.5. Producción de aceitunas verdes fermentadas estilo Español

En la imagen 2 se observa un esquema del proceso de elaboración de las aceitunas verdes fermentadas (Fernández Llano, 2001).

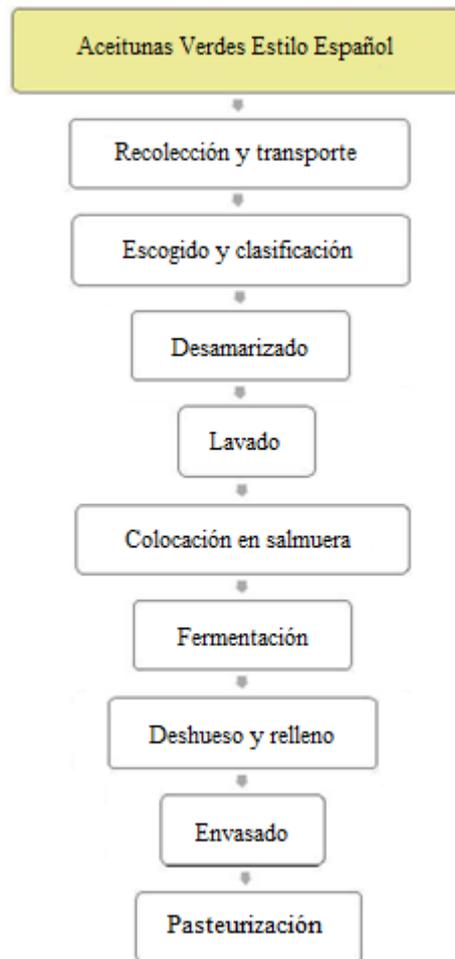


Imagen 2. Esquema del proceso productivo para aceitunas verdes. Fuente: Ramirez Castro

Luego de producida la recolección del fruto, pesado y clasificado, se lleva a cabo el desamarizado o tratamiento con hidróxido de sodio. Este compuesto elimina gran parte del glucósido amargo oleuropeína a través de la ruptura de la molécula. Se produce la difusión de compuestos desde la aceituna a la solución. La concentración de hidróxido depende de la variedad, temperatura y grado de madurez y va de 2,5 a 2,8% en épocas de altas temperaturas y 3,2% cuando baja la temperatura, para asegurar una buena penetración. El desamarizado finaliza cuando la solución penetra hasta las 2/3 partes del fruto. En la industria local, las aceitunas permanecen en esta solución durante 10 a 12 horas, generalmente a razón de 1500 litros de NaOH cada 2000 kg. de aceitunas. Esta soda es reciclada durante la temporada, generando un efluente cargado de compuestos orgánicos, pH alcalino, fuertemente coloreado y cáustico (Fernández Llano, 2001).

A continuación, se realiza el lavado del fruto con agua potable para eliminar el exceso de hidróxido de sodio proveniente de la etapa anterior. Por lo general, en nuestra Provincia se emplean dos lavados de 12 horas cada uno (Fernández Llano, 2001).

Finalmente, se somete al fruto a un tratamiento con cloruro de sodio con el fin de favorecer la fermentación láctica. En Mendoza la concentración de la solución de NaCl utilizada es del 7%. Además, durante esta etapa es necesario ajustar el pH a 3,8 con HCl al 2% debido a que el mismo aumenta por la disolución del NaOH remanente del fruto. Este tratamiento con salmuera dura aproximadamente 5 meses (Fernández Llano, 2001).

Cabe destacar que el deshueso o descarozado y relleno de la aceituna no siempre se hace. La industria Argentina en este momento está ofreciendo al mercado aceitunas con carozo, rellenas, deshuesadas, en rodajas y en pasta (Marginet Campos, 2015)

2.6. Efluentes industriales

El efluente derivado de este tipo de industria se caracteriza por presentar un pH alto, un nivel muy alto de conductividad, entre 70 y 90 mS.cm⁻¹, y una concentración alta de materia orgánica, entre 7 y 20 g.L⁻¹ en términos de demanda química de oxígeno, que incluye compuestos fenólicos en concentraciones entre 700 y 1500 mg.L⁻¹ (Ferrer-Polonio, 2015). Se calcula que la producción de aguas residuales se encuentra entre 3,9 y 7,5 m³ por tonelada de producto final (Zarkadas, 2011).

A nivel mundial el tratamiento que recibe estos tipos de efluentes consiste en la retención en lagunas de evaporación. Sin embargo, este método tiene un impacto negativo en el ambiente debido al espacio que necesitan, a la presencia de olores desagradables, y al riesgo para las personas y animales (Bravo *et al.*, 2007).

La biorremediación es una opción que posibilita la destrucción o la disminución de los peligros de varios contaminantes usando la actividad biológica natural. Estos tiempos de tratamientos

suelen tener menores costos, técnicas de poca tecnología que en general tienen aceptación pública y pueden ser llevadas a cabo *in situ* (Vidali, 2001).

Para los fines de esta tesina, nos referiremos a los efluentes derivados del tratamiento de desamarrizado con hidróxido de sodio aplicado a las aceitunas de mesa. Se buscará disminuir y corregir los parámetros antes mencionados a través del uso de microorganismos nativos.

2.7. Marco legal

Los efluentes generados por la industria no pueden ser volcados al ambiente de forma directa, sino que deben ser sometidos a algún tipo de tratamiento para eliminar el riesgo de contaminación sobre los recursos naturales que se encuentren próximos. Además, los procesos industriales deben adecuarse a la política ambiental, provincial y nacional, haciendo un aprovechamiento integral, racional y eficiente de los recursos dentro del marco del desarrollo sustentable. Por ello es imprescindible la continua actualización de la normativa en materia de contaminación hídrica, debiendo ajustarse a los requerimientos de la sociedad y de la protección de los recursos para mantener y asegurar la calidad de los mismos (Sosa, 2013).

Los efluentes industriales, luego de ser tratados, pueden volcarse a cauces públicos o bien usarse en riego de cultivos especiales en las denominadas Áreas de Cultivos Restringidos Especiales (ACRE) según las resoluciones N° 778 (1996) y N° 627 (2000) del Departamento General de Irrigación. Es este ente el encargado de la vigilancia del recurso hídrico de la provincia de Mendoza, con el fin de preservar la salud pública y promover el bienestar común de los habitantes del territorio provincial (Chumbita, 2017).

Dentro de la Resolución N° 778, se establece la prohibición en el territorio de la provincia de toda contaminación, alteración o degradación de las aguas, sean estas superficiales o subterráneas. A su vez, también prohíbe el vertido, derrame o infiltración directa o indirecta a los cursos naturales de aguas bajo la jurisdicción del Departamento General de Irrigación.

Para obtener un permiso de vertido, toda industria debe contar con el pertinente tratamiento de efluentes que permitan a las aguas reunir las condiciones de calidad, caudal, frecuencia, periodicidad y ubicación de su punto de vuelco.

La Resolución N° 627 propone nuevos parámetro exigibles y/o tolerables para el vertido de líquidos a cuerpos receptores establecidos por la resolución 778/96 para efluentes cloacales e industriales. En el ANEXO I se encuentran los parámetros máximos permitidos y tolerados para los vertidos directos e indirectos al dominio público hidráulico. A su vez, fija las normas para vertido de efluentes líquidos industriales para reuso agrícola y determina que los espacios donde se aplicará el reuso de los efluentes se denomina “Área de Cultivos Restringidos Especiales”, A.C.R.E., siendo la Superintendencia quien podrá otorgar permisos de reuso de efluentes.

A nivel nacional, la Ley General del Ambiente (N° 25.675) tiene como fin asegurar la preservación, conservación, recuperación y mejoramiento de la calidad de los recursos ambientales. Intenta prevenir los efectos nocivos o peligrosos que las actividades antrópicas generan sobre el ambiente para posibilitar la sustentabilidad ecológica, económica y social del desarrollo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del ensayo

Las lejías de desamarizado y barros fueron extraídos de la Fábrica Galdeano S. A. ubicada en el distrito Cruz de Piedra, departamento de Maipú. La empresa se caracteriza por hacer reuso de la lejía durante toda la temporada provocando que los efluentes se saturen de compuestos polifenólicos y materia orgánica. Las muestras del efluente fueron tomadas en bidones estériles de 20 L y se conservaron en una cámara de frío a una temperatura de 4° C hasta su análisis y uso.

3.2. Caracterización del efluente

Del material recolectado se analizó: DQO (Demanda Química de Oxígeno) según el Standard Method (1980), conductividad eléctrica (APHA 1992), pH por electrodo (American Public Health Association "APHA", 1992), humedad (%), cenizas (%), materia orgánica (%), proteínas totales por método Bradford (Bradford, 1976), azúcares reductores totales por método del ácido 3,5 dinitrosalicílico "DNS" (Miller, 1959), nitrógeno total, fósforo, potasio y polifenoles totales según la técnica de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1965).

3.3. Ensayos de biorremediación

Los ensayos de biorremediación se llevaron a cabo en una cuba de vidrio de 27 litros de volumen utilizando la lejía del desamarizado diluida. El volumen de trabajo fue de 15 litros. Se colocó un 10% de inóculo, compuesto por barro con microorganismos procedentes de balsas de evaporación del efluente, un 25% de lejía y 65% de agua destilada.

Se realizaron 2 ensayos consecutivos. En el primer ensayo, se añadió una fuente de carbono, de nitrógeno y fósforo para enriquecer el medio.

- Jarabe de glucosa: se agregó al inicio del ensayo 20 g.L⁻¹. Cuando el contenido de azúcares reductores llegó a trazas se agregó nuevamente la misma cantidad de jarabe. De esta manera se pretendió mantener el proceso de degradación de la materia orgánica por parte de los microorganismos.
- Sales minerales: se añadieron 2 g.L⁻¹ fosfato de amonio, 2 g.L⁻¹ sulfato de amonio, 1 g.L⁻¹ sulfato de magnesio, 1 g.L⁻¹ cloruro de amonio y 1 g.L⁻¹ suplementos con microelementos.
- Antiespumantes: Aceite mezcla y solución de siliconas.

En el segundo ensayo, se añadieron fuentes de nitrógeno y fósforo, sin el agregado de la fuente de carbono.

- Sales minerales: se añadieron 2 g.L⁻¹ fosfato de amonio, 2 g.L⁻¹ sulfato de amonio, 1 g.L⁻¹ sulfato de magnesio, 1 g.L⁻¹ cloruro de amonio y 1 g.L⁻¹ suplementos con microelementos.
- Antiespumantes: Aceite mezcla y solución de siliconas.

En ambos casos, se aplicó una agitación constante de 1550 rpm. La temperatura se mantuvo en alrededor de 25±1° C siendo controlada cada 8 h.

Durante la realización de los ensayos (14 días cada uno) se llevó a cabo el seguimiento de las variables seleccionadas para observar los efectos que se producen. Las variables que se midieron fueron: pH, conductividad eléctrica, azúcares reductores, polifenoles totales y acidez total. Se observaron las características organolépticas del efluente, y se siguió la evolución de la población microbiana dentro del proceso que se realizó.

Determinaciones

- pH

Las mediciones de pH fueron realizadas cada 8 h por el método potenciométrico con un electrodo. Este método utiliza una celda electroquímica, que consiste en un electrodo de

indicador sensible a la concentración de protones, un electrodo de referencia y la muestra. El potencial de la celda está relacionado al pH.

- Conductividad eléctrica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Se determinó por electrometría con un electrodo conductimétrico en milisiemens/centímetro ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) cada 8 h.

- Azúcares reductores ($\text{g de glucosa}\cdot\text{L}^{-1}$).

La misma consiste en que los azúcares en contacto con el ácido 3, 5–dinitrosalicílico (DNS, Miller, 1959) y en presencia de calor, se reducen desarrollando un cambio de color con variaciones de amarillo–anaranjado hasta café. Luego por espectrofotometría la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro UV/Visible a 590 nm. La concentración de azúcares reductores en las muestras se determinó mediante la ecuación lineal obtenida de una curva de calibración de glucosa y se expresó con gramos de azúcar reductores por litro ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

- Polifenoles totales ($\text{mg de ácido gálico}\cdot\text{L}^{-1}$).

Los polifenoles totales se midieron cada 8 h a través de la técnica Folin–Ciocalteu (Singleton, 1965). Esta se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin–Ciocalteu, a pH básico dado lugar a una coloración azul, susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El contenido fenólico de las muestras se determinó mediante la ecuación lineal obtenida de una curva de calibración de ácido gálico y se expresó como mg de ácido gálico equivalentes por litro de muestra ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para el cálculo de porcentaje de disminución de polifenoles totales se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Remoción de Polifenoles Totales (\%)} = ((\text{Pol Tot}_{\text{inicial}} - \text{Pol Tot}_{\text{final}}) / \text{Pol Tot}_{\text{inicial}}) * 100$$

- Acidez total (% de ácido láctico).

Cada 8 h se realizaron titulaciones (ácido-base) con fenolftaleína como indicador y como agente titulante se usó hidróxido de sodio (NaOH). La titulación se detiene cuando se produce el viraje de color de la muestra a una tonalidad rosácea debido a una reacción ácido – base.

A través del volumen ocupado de NaOH se puede determinar el porcentaje de ácido láctico presente en la muestra.

- Observaciones organolépticas: cambios en la coloración, presencia de olores, precipitados, etc.
- Determinaciones microbiológicas.

Se tomaron muestras cada 24 h para determinar la evolución de la población microbiana a través de recuentos en placa utilizando diluciones seriadas en los dos tratamientos bajo estudio, diferenciados en el agregado o no de azúcar.

Recuentos en placa: Se realizaron bajo campana de flujo laminar. Para realizar el recuento de microorganismos, se llevó a cabo el método de siembra por extensión, para ello se tomaron muestras del efluente proveniente de la cuba de vidrio, en tubos estériles de 15 ml y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} con agua destilada estéril en microtubos de 1,5ml. De las diluciones seleccionadas, se recolectaron muestras de 100 μ l y se sembraron en placas de Petri por duplicado con 15 ml de medio de cultivo Plate Count Agar Britania con una concentración de 23,5 g.L⁻¹, adicionado con un 25% de lejía para mantener las condiciones del ensayo. Las cajas se incubaron de 24 a 48 horas en estufa a $25\pm 1^{\circ}$ C y luego se realizó el recuento de microorganismos mediante la siguiente fórmula:

UFC/ml = número de unidades formadoras de colonias. inversa de la dilución x volumen sembrado.

Siembra en estría: A partir de las colonias que se desarrollaron en las cajas del ensayo anterior, se realizaron siembras por estrías utilizando agar para recuento en placa sin lejía para el aislamiento de microorganismos. Una vez que los microorganismos fueron aislados se procedió a la caracterización cultural o macroscópica de las colonias evaluando el color, borde, tamaño y textura. Las características morfológicas o microscópicas de los microorganismos también fueron estudiadas, para ello se llevaron a cabo diferentes métodos de observación de microorganismos tales como tinción con nigrosina y tinción de Gram, con el fin de caracterizar forma, agrupación y tamaño de los mismos.

Tinción con nigrosina: Esta tinción ácida negativa, actúa de forma contraria al resto de técnicas de coloración, debido a que no tiñe la estructura de los microorganismos, sino el fondo del frotis de una coloración oscura. Esto se debe a que la nigrosina es incapaz de penetrar los polisacáridos que rodean a los microorganismos, dejando a los mismos con una coloración clara o incolora en un fondo oscuro, permitiendo la observación de las formas celulares.

Tinción de Gram: Este método permite diferenciar las bacterias en dos grandes grupos, los cuales son Gram negativas y Gram positivas. Esta diferencia se basa en las características de sus paredes celulares. Las Gram negativas tienen una pared constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa. Mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular de peptidoglicano gruesa, pero con ausencia de una membrana celular externa. Para diferenciarlas se utiliza un colorante primario, cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Con el fin de impedir la salida de este colorante de la pared se utiliza el lugol, que forma un complejo cristal violeta – yodo. Una mezcla de alcohol –acetona deshidrata la pared bacteriana, cerrando sus poros y destruyendo la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La presencia de mayor cantidad de peptidoglicano en las Gram positivas provoca una mayor retención del complejo cristal violeta – yodo, mientras las Gram negativas se ven imposibilitadas de retenerlo. Finalmente, la safranina se utiliza como colorante de contratinción, tiñendo las bacterias que no pueden retener el complejo. Ello nos permite observar en el microscopio óptico a las bacterias Gram positivas con una coloración violeta, mientras las Gram negativas se presentan con una tonalidad rosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del efluente

La muestra de la lejía de desamarizado fue tomada en el mes de abril de 2016. Los valores de las variables, que constituyen a la descripción del efluente se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de las determinaciones realizadas en el efluente.

Determinaciones	Valores
Densidad (g/ml)	1,02
Humedad (g%g)	93,26
Cenizas (g%g)	6,30
MO (g%g)	0,44
Conductividad eléctrica (dS/m)	33,00
pH	13,72
Nitrógeno Total (mg/L)	474,30
Nitrógeno orgánico y NH ₄ (mg/L)	352,00
Fósforo (mg/L)	120,00
Potasio (mg/L)	3913,00
Sodio (ppm)	22000,00
Proteínas Totales (µg/ml)	6,32
Azúcares reductores (g/L)	0,44
DQO (mg O ₂ /L)	43988,00
Polifenoles Totales (mg/L)	608,68

Como se observa en la tabla 5, las determinaciones realizadas en conductividad eléctrica, pH, sodio, fósforo, nitrógeno, fenoles y DQO arrojaron valores extremadamente altos. Dichos valores superan los valores permitidos y tolerables impuestos, determinados por la Resolución N° 627 del Departamento General de Irrigación (DGI) de la provincia de Mendoza para el reúso agrícola.

4.2. Ensayos de biorremediación

4.2.1. pH

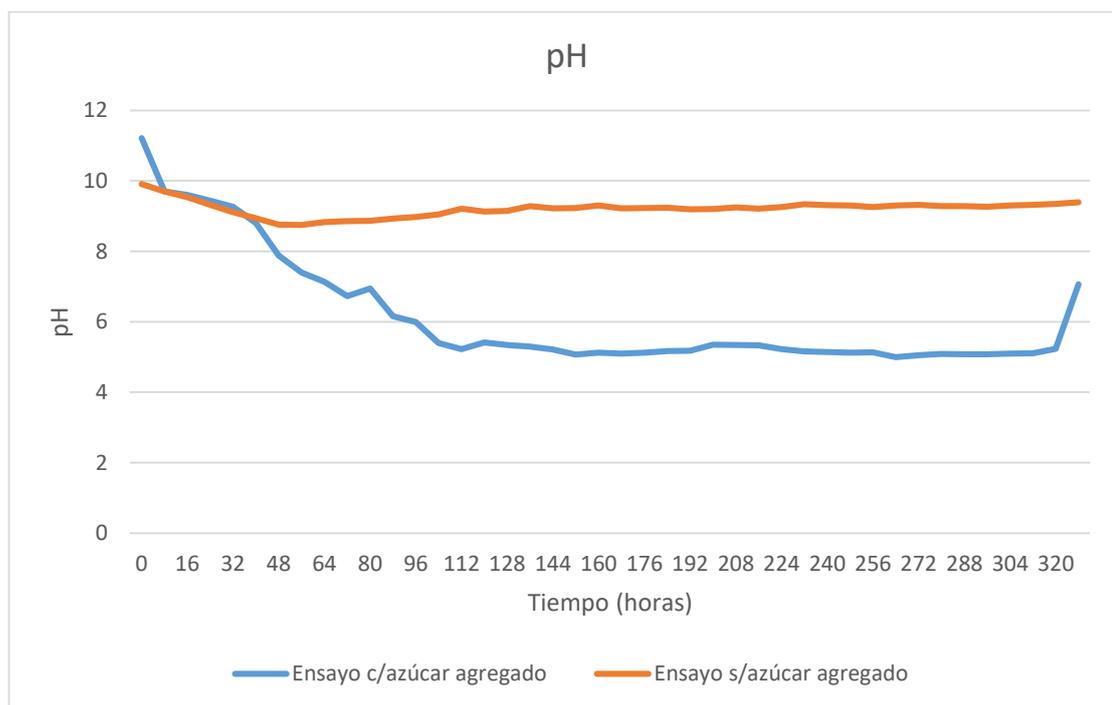


Gráfico 7. Evolución del pH en el tiempo.

En el gráfico 7 se observa una disminución marcada de los valores de pH del ensayo con agregado de azúcar. Al inicio éste posee un valor de pH de 11,21; decayendo hasta un valor mínimo de 5 a las 264 horas desde el comienzo del ensayo y manteniéndose en valores cercanos a éste hasta el final del ensayo. Este descenso de pH se corresponde con el aumento de la concentración de ácido láctico. Este mismo fenómeno fue registrado en el trabajo de Brenes (1995), donde el pH disminuye rápidamente debido principalmente a la formación de ácido láctico. Además, señala que esto puede causar una transformación de los compuestos fenólicos.

En el ensayo sin el agregado de la fuente de carbono se muestra que los valores de pH disminuyen al comienzo del ensayo y luego comienzan a aumentar hasta mantenerse constantes por encima de 9,2. Este fenómeno de aumento de pH se observa en el trabajo realizado por Ferrer-Polonio (2015) en el tratamiento de salmueras de aceitunas en un reactor biológico, en donde el pH aumenta de 4 a 8,2 unidades debido a que los microorganismos

oxidan los ácidos orgánicos presentes a dióxido de carbono y agua, por ello el pH del medio aumenta.

4.2.2. Conductividad eléctrica

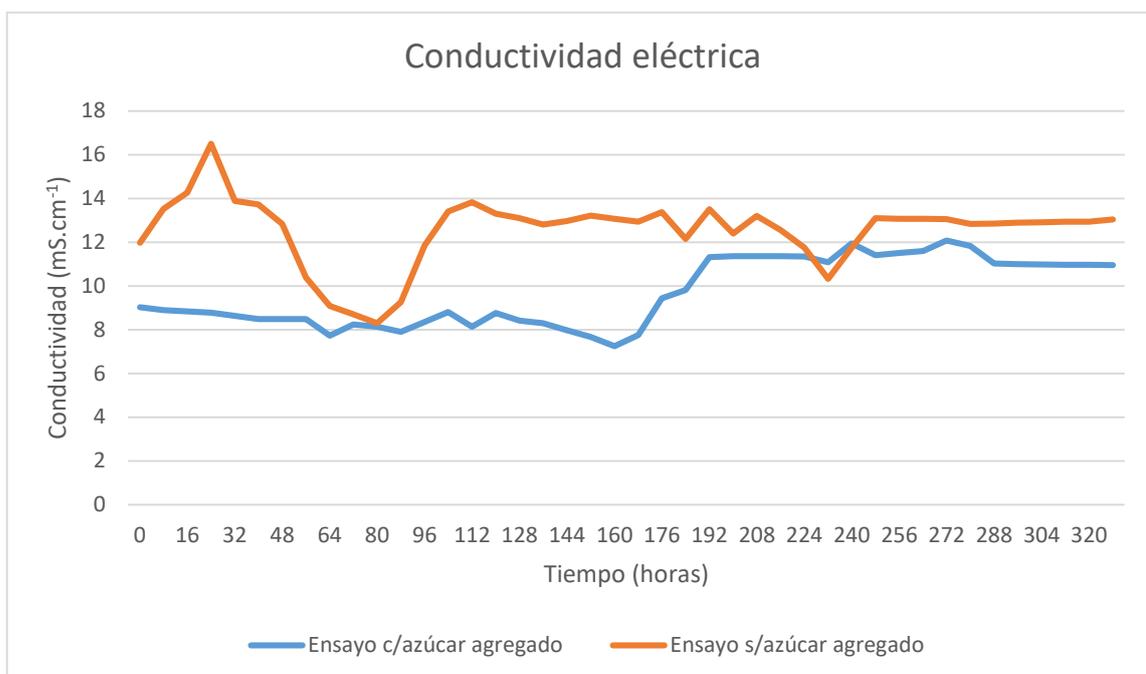


Gráfico 8. Evolución de la conductividad (mS/cm) en el tiempo.

En el ensayo con agregado de fuente de carbono –gráfico 8- se observa una tendencia suave a la disminución hasta casi 7 mS.cm⁻¹ a las 160 horas, para luego volver a subir a partir de dicho momento, manteniéndose prácticamente constante entre los valores de 11 a 12 mS.cm⁻¹ hasta el final del ensayo. En el otro ensayo se observan que los valores de conductividad cambian al comienzo, alcanzando un pico a las 16 horas y su menor valor a las 80 horas, para luego mantenerse en niveles relativamente constantes. Esta tendencia a mantener valores constantes de conductividad eléctrica también fue reportado por Ferrer-Polonio (2015), en su trabajo sobre el tratamiento biológico de salmueras de aceitunas en biorreactores, donde manifiesta que la conductividad eléctrica a lo largo del proceso también permanece en valores constantes.

4.2.3. Acidez

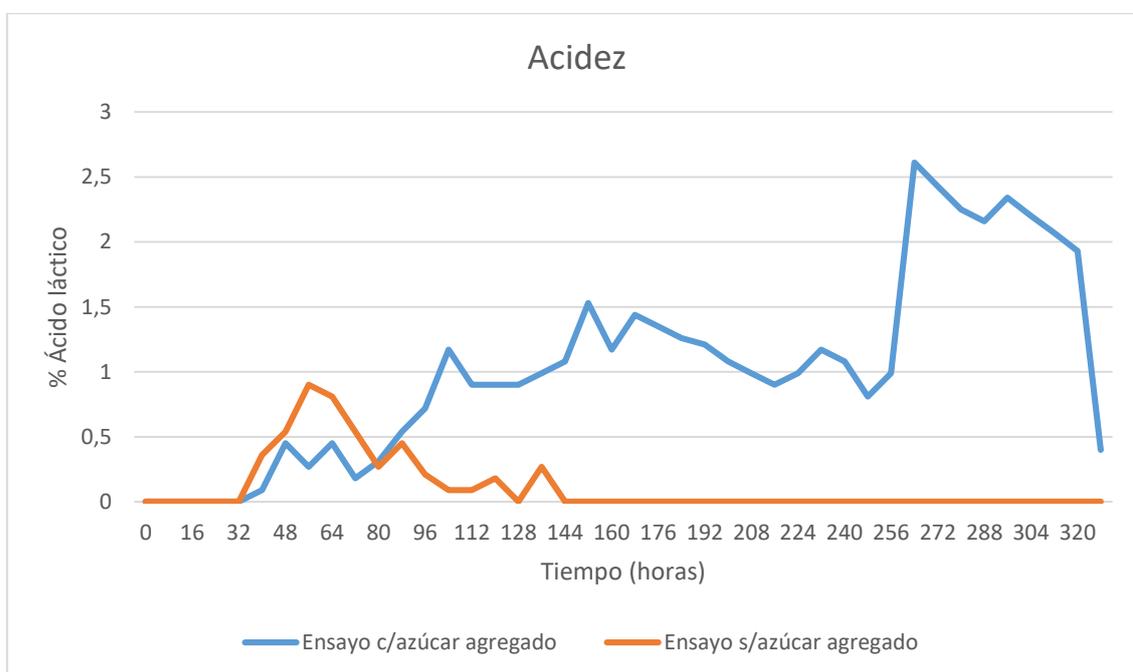


Gráfico 9. Evolución de la acidez (% ác. Láctico) en el tiempo.

El gráfico 9 se muestra los valores de porcentaje de acidez, los cuales en el ensayo con azúcar agregado presentaron un aumento a lo largo del tiempo, llegando el valor máximo a 2,61% de ácido láctico a las 264 horas, siendo consistente con una disminución del pH en el medio. En el trabajo de Lamia (2003) con cepas de *Aspergillus niger* en tratamiento aerobio, también se pudo observar un comportamiento similar en la acidez, el cual fue atribuido al consumo de glucosa y generación de ácidos orgánicos y/o fenólicos a partir de polifenoles con elevado peso molecular que se encuentran presentes en el medio.

Por otra parte, en el ensayo sin agregado de azúcar se registró un pico de acidez a las 56 horas de 0,9%, consistente con la disminución de pH manifestada. Posteriormente, el porcentaje de acidez disminuyó hasta hacerse 0, lo cual puede deberse al consumo de los ácidos orgánicos producidos, por parte de los microorganismos, lo que resulta en un aumento de pH (Patsios, 2015).

4.2.4. Azúcares reductores

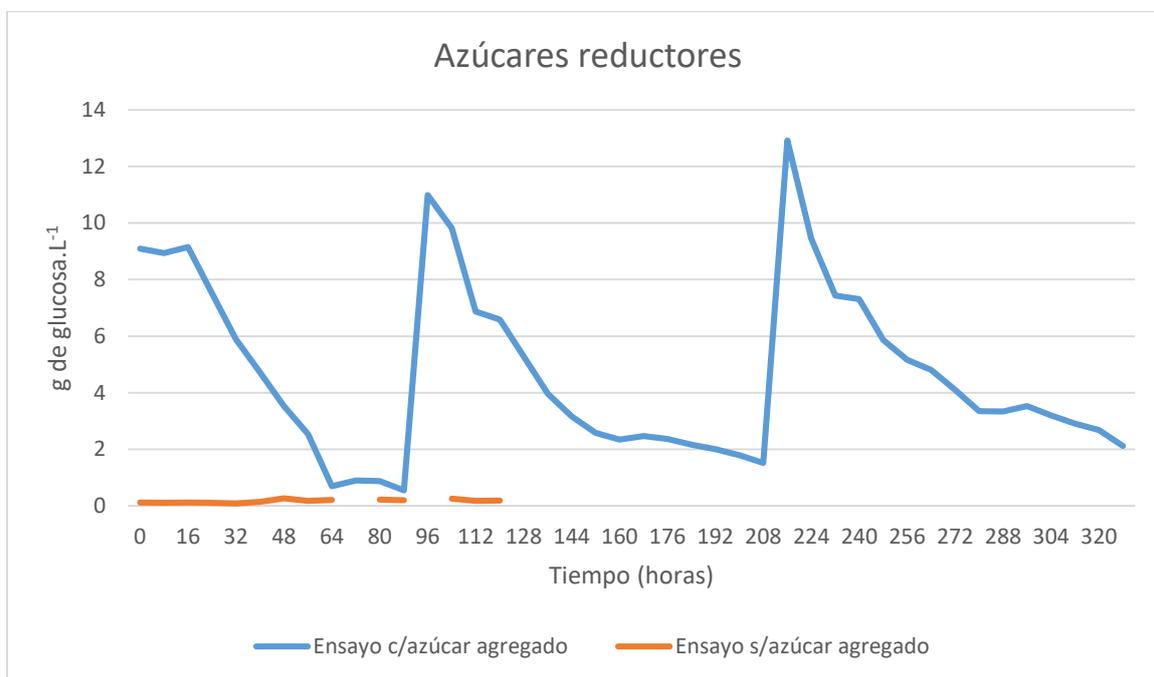


Gráfico 10. Evolución de azúcares reductores en el tiempo.

El gráfico 10 se muestra la variación de la concentración de los azúcares reductores en ambos ensayos. En el ensayo sin agregado de fuente de carbono se observan dos picos de concentración, a las 48 y 104 horas con 0,26 y 0,25 g.L⁻¹ respectivamente. A este ensayo, se decidió detenerlo a las 120 horas, debido a que las trazas de azúcares reductores se mantuvieron en valores inferiores a 1 g.L⁻¹ al no tener fuente de carbono externa.

En la determinación de azúcares reductores del ensayo con azúcar agregado se observan 3 picos, los cuales corresponden a los agregados de jarabe de glucosa. La caída en la concentración luego del agregado presenta una forma de tipo exponencial, que es consistente con un consumo rápido de hidratos de carbono. Este mismo comportamiento fue registrado por De Castro (2001) al analizar la evolución de los azúcares presentes en efluentes durante la etapa de fermentación en tratamientos de aguas de lavado sin corrección de pH, detectando

una disminución muy rápida de la concentración de glucosa y fructosa, coincidente con el descenso de los valores de pH y el crecimiento de diferentes microorganismos.

4.2.5. Polifenoles totales

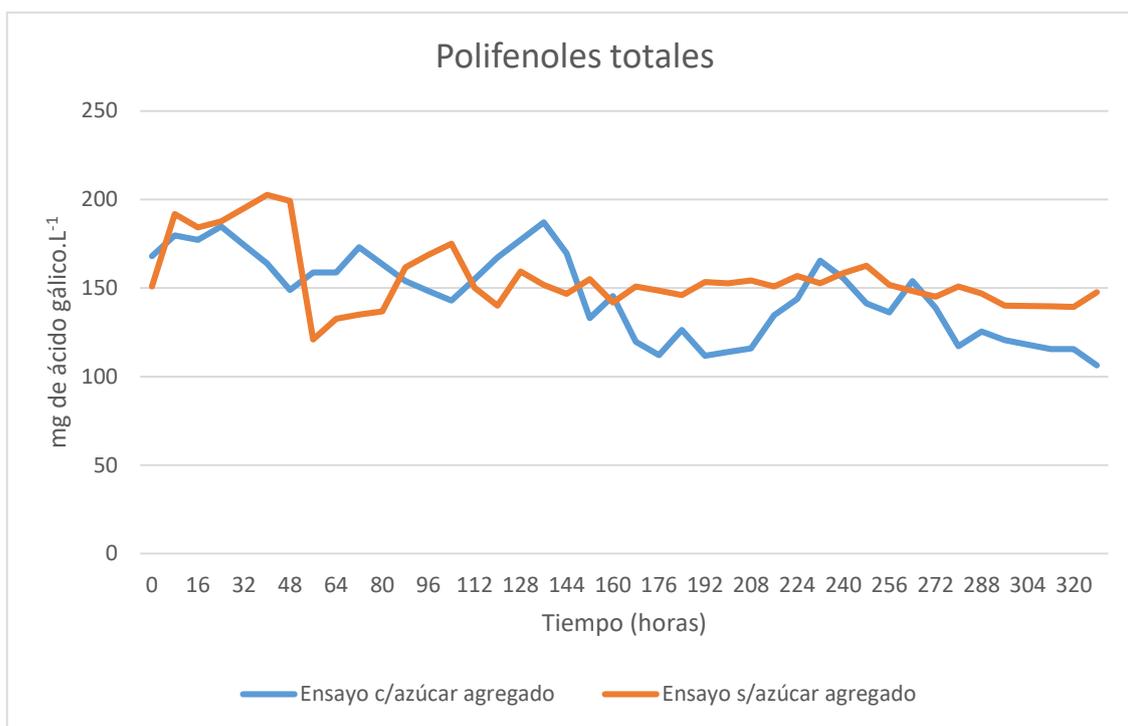


Gráfico 11. Evolución de polifenoles totales (mg ác. Gálico/L) en el tiempo.

El gráfico 11 se muestra la evolución del contenido de polifenoles. Se observa un descenso paulatino del contenido de polifenoles en el ensayo con azúcar agregado, que parte desde valores de 168 hasta alcanzar los 113,83 mg.L⁻¹. Al final del ensayo se registra un contenido de polifenoles totales de 63.

En el ensayo sin fuente de carbono agregado, el contenido de polifenoles se mantuvo constante a lo largo del tiempo del ensayo, alrededor de los 150 mg.L⁻¹. Esto puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos poliméricos que no se degradan fácilmente por la acción microbiana, como manifiesta en su trabajo *Brenes et al.* (2000), sobre el tratamiento biológico aerobio de salmueras de aceitunas fermentadas.

4.2.6. Crecimiento microbiano

4.2.6.1. Con agregado de fuente de carbono

En el gráfico 12 se puede observar la evolución de los microorganismos durante el período comprendido por el ensayo para la cuba de biorremediación con agregado de fuente de carbono. Al comienzo el crecimiento fue muy pobre ya que los microorganismos, se encontraban en fase de latencia. El mayor crecimiento se produjo entre los días 4 y 5, siendo este último el día en el cuál se agregó glucosa al medio nuevamente. En el segundo agregado de glucosa no se registró un incremento marcado del crecimiento microbiano, lo que podría explicarse por la posible presencia de otros factores que se encuentran limitando el aumento de población, como por ejemplo la falta de algún nutriente o la presencia de alguna sustancia inhibidora del crecimiento (imágenes 3 y 4).

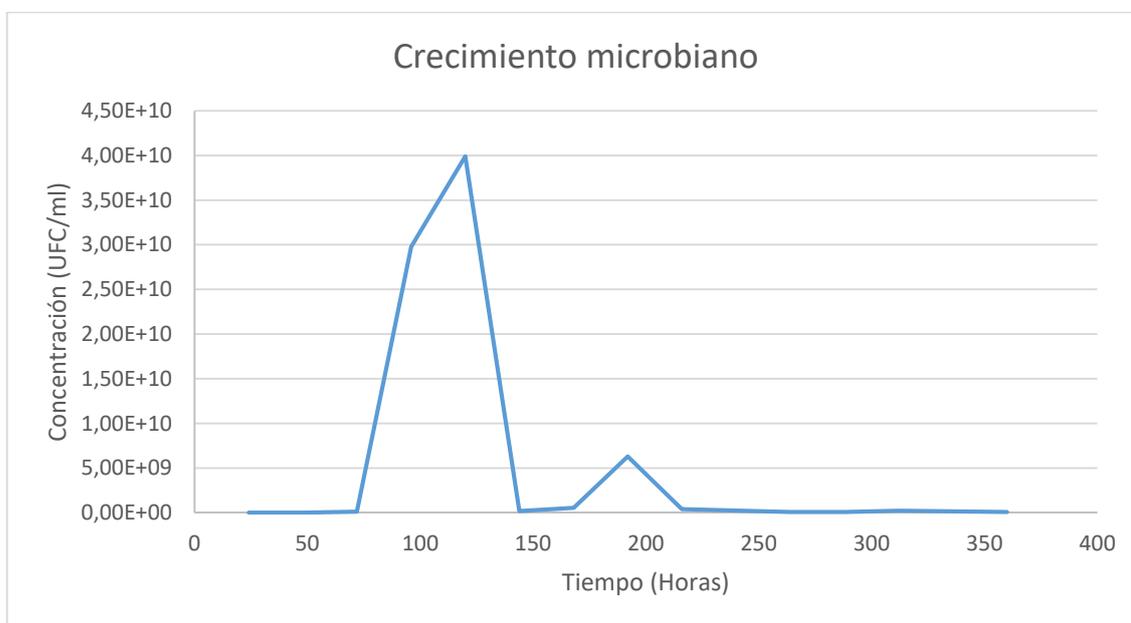


Gráfico 12. Crecimiento microbiano en el tiempo del ensayo con agregado de fuente de carbono.

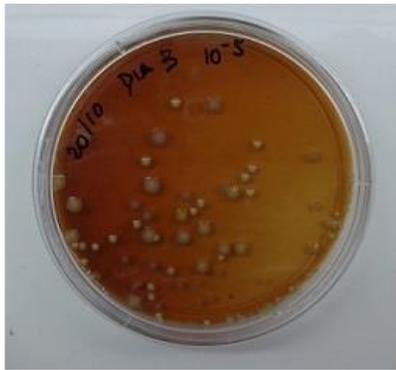


Imagen 3. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al tercer día.

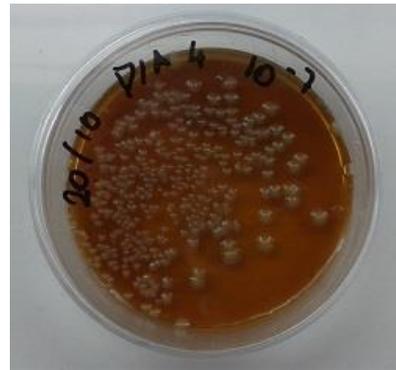


Imagen 4. Siembra de dilución 10^{-7} correspondiente al cuarto día.

En el ensayo se logró aislar un total de 10 microorganismos diferentes. Cada uno de ellos presenta homogeneidad en sus características culturales (tabla 6), sin detectar marcadas diferencias a nivel macroscópico. En la tabla 7 se registraron los resultados de las tinciones de nigrosina y Gram. Se muestra la presencia de levaduras y bacterias, siendo en este último grupo predominantes las Gram+.

Tabla 6. Características macroscópicas o culturales de las colonias aisladas del ensayo con agregado de fuente de carbono.

Aislados	Características Morfológicas				
	Color	Borde	Tamaño	Consistencia	Otras
1	Amarillo pálido	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada
2	Amarillo intenso	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada. Se observa borde de avance translúcido
3	Blanquecina	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada
4	Ocre	Liso	2 mm	Creмоса	Sobreelevada. Anillos concéntricos de distintas tonalidades.
5	Amarillo pálido	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada.
6	Amarillo	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada.
7	Blanquecina	Liso	1 mm	Creмоса	Sobreelevada
8	Rosada	Liso	>2 mm	Creмоса	Sobreelevada
9	Blanco	Liso	>1 mm	Creмоса	
10	Blanco amarillenta	Liso	>1 mm	Creмоса	

Tabla 7. Características microscópicas o morfológicas de los microorganismos aislados en el ensayo con agregado de fuente de carbono.

Aislado	Tinción con nigrosina	Tinción de Gram
1	Cocos	Gram +
2	Cocos	Gram +
3	Cocos	Gram -
4	Levaduras	-
5	Cocos	Gram +
6	Bacilos	Gram +
7	Cocos en cadena	Gram +
8	Levaduras	-
9	Levaduras	-
10	Bacilos cortos	Gram +



Imagen 5. Tinción de nigrosina. Morfología de cocos.

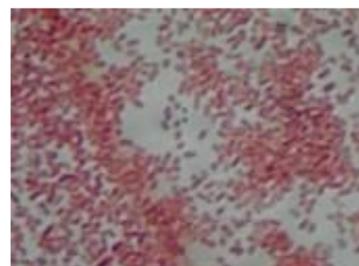


Imagen 6. Tinción de gram. Bacterias Gram -

Características organolépticas

En cuanto al color del medio, se observó un cambio de la coloración al tercer día, comenzando con un color marrón oscuro (imagen 7), tornándose marrón claro en los días siguientes (imagen 8). Lamia (2003) y Ayed *et al.* (2013) afirman que la decoloración es fuertemente afectada por la concentración de glucosa y la agitación.

Se detectaron aromas de fermentación, como así también aromas lácticos, provenientes de la actividad microbiana registrada. Se registró la presencia de precipitados, probablemente generados por la combinación de los distintos compuestos presentes en el medio, sumado al agregado del barro como inóculo y a la masa de microorganismos generada.



Imagen 7. Cuba de flotación, día 2 del ensayo.



Imagen 8. Cuba de flotación, día 10 del ensayo.

4.2.6.2. Sin agregado de fuente de carbono

En el gráfico 13 muestra la evolución del crecimiento microbiano en el ensayo sin fuente de carbono. Al inicio se observa una marcada fase de latencia, que se perpetuó durante 9 días. Luego, a partir del noveno día, la población comenzó a aumentar.

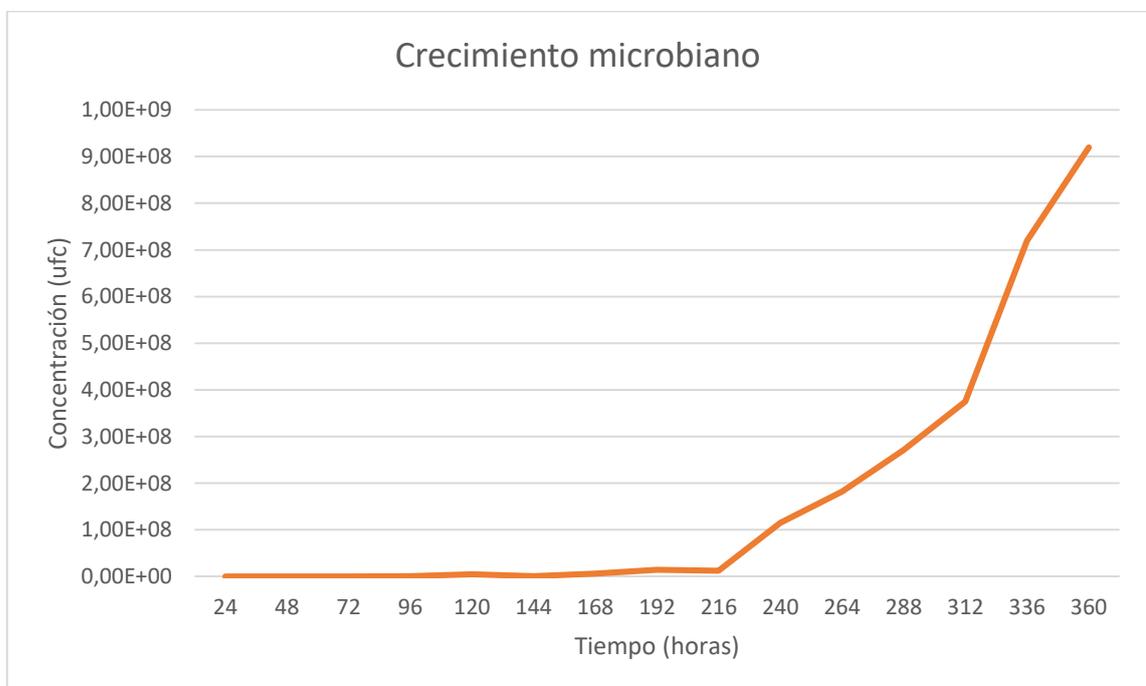


Gráfico 13. Crecimiento microbiano en el tiempo del ensayo sin agregado de fuente de carbono.



Imagen 9. Siembra de dilución 10^{-7} correspondiente al día 5.



Imagen 10. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al día 7.



Imagen 11. Siembra de dilución 10^{-5} correspondiente al día 11.

En el ensayo se logró aislar un total de 14 microorganismos diferentes. En ellas se puede observar una relativa homogeneidad de sus características macroscópicas o culturales (tabla 8), sin detectar marcadas diferencias a nivel macroscópico. En la tabla 9 se registran los resultados de las tinciones de nigrosina y Gram.

Tabla 8. Características macroscópicas o culturales de las colonias aisladas en el ensayo sin agregado de fuente de carbono.

Aislados	Características Morfológicas				
	Color	Borde	Tamaño	Consistencia	Otras
1	Blanca	Irregular	>1 mm	Rugosa	Sobreelevada
2	Amarilla	Liso	>1 mm	Cremosa	
3	Ocre	Liso	>1 mm	Cremosa	
4	Blanca	Liso	>2 mm	Cremosa	
5	Blanca	Liso	>1 mm	Cremosa	Tornasolada
6	Blanca	Liso	>2 mm	Húmeda	Translúcida
7	Blanquecina	Irregular	>2 mm	Rugosa	
8	Blanquecina	Irregular	>2 mm	Rugosa	Sobreelevada
9	Blanca	Liso	>1 mm	Cremosa	
10	Amarilla	Liso	>1 mm	Rugosa	
11	Amarilla	Irregular	<1 mm	Rugosa	
12	Rosada	Liso	2 mm	Cremosa	
13	Rosado claro	Liso	2 mm	Cremosa	
14	Blanca	Irregular	>1 mm	Húmeda	Translúcida

Tabla 9. Características microscópicas o morfológicas de los microorganismos aislados en el ensayo con agregado de fuente de carbono.

Aislado	Tinción con nigrosina	Tinción de Gram
1	Bacilos	Gram +
2	-	-
3	-	-
4	Levaduras	-
5	-	-
6	Bacilos	Gram -
7	Bacilos	Gram +
8	Bacilos	Gram +
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	Levaduras	-
13	Levaduras	-
14	Bacilos cortos y pequeños	Gram -

Los microorganismos aislados que no figuran en la tabla 9 son debido a que no se les realizó las tinciones. Los mismos fueron descartados luego de realizado un screening donde demostraron no tener un buen desempeño.



Imagen 12. Tinción de nigrosina. Morfología de bacilos.



Imagen 13. Tinción de gram. Bacterias Gram +

Características organolépticas

La coloración del medio dentro de la cuba fue cambiando durante el ensayo, pasando de un color marrón chocolate (imagen 13) hacia tonalidades más oscuras (imagen 14). Esto podría estar relacionado a la oxidación de compuestos polifenólicos que no se logran degradar por

acción microbiana y permanecen remanentes en el medio, como se mencionó anteriormente Brenes en el tratamiento de salmueras de aceitunas verdes fermentadas por lodos activados, reportó que la presencia de polifenoles que se encuentran en estado polimerizado, no son degradados y son responsables del color de las soluciones remanentes (Brenes *et al*, 2000).



Imagen 14. Cuba de flotación, día 10 del ensayo.



Imagen 15. Cuba de flotación, día 14 del ensayo.

Se observó presencia de precipitados con gran turbidez, y una menor cantidad de espuma con respecto al ensayo con agregado de fuente de carbono, lo cual queda evidenciado en la cantidad de agentes antiespumantes agregados al medio, la cual fue menor en este ensayo.

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de ensayo se ha podido evaluar la degradación del efluente de desamarizado por medio de microorganismos provenientes de los barros. En el ensayo sin agregado de fuente de carbono, se detectó que tanto los valores de pH como el contenido de polifenoles no varían marcadamente a lo largo de la realización del mismo. Mientras, la acidez total se mantiene dentro de un rango de valores cercanos a cero, lo cual indica que hay una baja producción de ácidos orgánicos. Esto difiere a lo que ocurrió en el otro ensayo, donde se registra un oscurecimiento del medio.

En el ensayo con agregado de glucosa como fuente de carbono se registra una disminución de los compuestos del tipo polifenólicos, un aumento de la acidez y disminución del pH. También se observa un cambio de coloración del medio, el cual se aclara. De lo expuesto, se puede determinar que la disponibilidad de materia orgánica reducida que sirve como fuente de carbono es de gran importancia para el proceso de degradación y decoloración del efluente.

Con todo lo anteriormente expuesto es posible afirmar que el uso de microorganismos nativos permite la reducción de la carga orgánica, el contenido de polifenoles totales y modificar el pH del medio. Se registró que los microorganismos son capaces de establecerse y desarrollarse bajo condiciones de pH alto, degradando materia orgánica y modificando las condiciones iniciales de su medio.

6. PROSPECCIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores con respecto a la disminución de los parámetros antes estudiados a partir de microorganismos provenientes de las propias balsas de evaporación. A su vez, el uso de una fuente de carbono beneficia el crecimiento microbiano y mejora las características del efluente. Se debería continuar con los estudios para determinar cuáles son los microorganismos que mejor se desarrollan en el efluente e investigar y cuáles son las características ambientales ideales que permitan promover el desarrollo de los mismos. Esto con el fin, de seleccionar los microorganismos que demuestren mayor eficiencia en la biorremediación. De esta manera, se podría lograr que las condiciones del efluente cumplan con los parámetros requeridos para su reúso.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ayed, L., Chammam, N., Asses, N., & Hamdi, M. (2013). Optimization of biological pretreatment of green table olive processing wastewaters using *Aspergillus niger*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5, 212.
- Bravo, K. S., López, F. A., García, P. G., Quintana, M. D., & Fernández, A. G. (2007). Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on their polyphenol content and on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *International journal of food microbiology*, 114(1), 60-68.
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, A. H., & Garrido, A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(10), 2702-2706.
- Brenes, M., García, P., Romero, C., & Garrido, A. (2000). Treatment of green table olive waste waters by an activated-sludge process. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75(6), 459-463.
- Cáceres, R., & Novello, R. M. Robert. (2009). Análisis de la cadena del olivo en Argentina. *Estudios socioeconómicos de los sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales*, 2, 43-60.
- Consejo Federal de Inversiones (2011). Plan Estratégico Olivícola Argentino – PEOA 2020. Recuperado de: <http://biblioteca.cfi.org.ar/wp-content/uploads/sites/2/2015/12/plan-olivicola.pdf>
- Consejo Federal Agropecuario (2017). I Reunión Comisión Regional Cuyo 2017. Recuperado de: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cfa/regionales/_archivos//000000_2017/000000_Cuyo/000000_1ra%20Reuni%C3%B3n/000000_Material/000000_Regional%20CUYO.pdf
- Chumbita, N. (2017). *Caracterización y propuesta de tratamiento para efluentes líquidos generados en la elaboración de aceite de oliva en la Planta Piloto de la Facultad de*

Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias).

- De Castro, A., & Brenes, M. (2001). Fermentation of washing waters of Spanish-style green olive processing. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 797-802
- Fernández Díez, M, J. (1971). The Biochemistry of fruits and their products. (A.C. Hulme, Ed.), vol. 2, pp. 255-279, Academic Press, Londres.
- Fernández Llano, J., Arreghini, M., Ugarte, S., & Herrero, C. (2001). Efluentes líquidos del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco. Situación en la provincia de Mendoza. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 5.
- Ferrer-Polonio, E., Mendoza-Roca, J. A., Iborra-Clar, A., Alonso-Molina, J. L., & Pastor-Alcañiz, L. (2015). Comparison of two strategies for the start-up of a biological reactor for the treatment of hypersaline effluents from a table olive packaging industry. *Chemical Engineering Journal*, 273, 595-602.
- Instituto de Desarrollo Rural – IDR (2010). Censo de fruticultura provincial 2010. Recuperado de: https://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2012/02/publicacion_censo2.pdf
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2018). Censo Nacional Agropecuario 2018. Recuperado de: https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/economia/cna2018_resultados_preliminares_agricultura.pdf
- Lamia, A., & Moktar, H. (2003). Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*, 39(1), 59-65.
- Ley N° 25.675 “Ley General de Ambiente”. Boletín oficial de la República Argentina, 27 de noviembre de 2002.
- Marginet Campos J. L. (2015). *Aceitunas de mesa. Análisis de cadena alimentaria*. Dirección Nacional de Alimentos-Dirección de Industria Alimentaria, Ministerio de

Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina. Recuperado de:
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/html/29/29_05_aceitunas_mesa.htm

- Matías, A., Molina, S., Aybar, V., Ladux, J., & Ortiz, J. (2012). Olivicultura argentina y regional. *Documento de Trabajo. INTA*.
- McNamara, C. J., Anastasiou, C. C., O'Flaherty, V., & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 127-134.
- Ramírez Castro, E. M. (2015). Estudio de la degradación enzimática del Glucósido Amargo Oleuropeína durante el procesamiento de aceitunas de mesa.
- Patsios, S. I., Papaioannou, E. H., & Karabelas, A. J. (2015). Long-term performance of a membrane bioreactor treating table olive processing wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(8), 2253-2262.
- Resolución N° 627/00. Dirección General de Irrigación. Mendoza, Argentina, 17 de Noviembre de 2000.
- Resolución N° 778/96. Dirección General de Irrigación. Mendoza, Argentina, 23 de diciembre de 1996.
- Secretaría de Política Económica y Planificación del Desarrollo. (2016). Informes productivos provinciales: Mendoza. Recuperado de:
<https://www.argentina.gob.ar/economia/politicaeconomica/microeconomica/informesproductivos>
- Sosa, R. (2013). *Propuesta preliminar para la implementación de un sistema de tratamiento de efluentes en una bodega de Maipú, Mendoza* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias).
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry*, 73(7), 1163-1172.

- Vilar J.; Pereira J. E. (2017). Juan Vilar Consultores Estratégicos. *Informe Caja Rural de Jaén sobre la coyuntura para la olivicultura*. Recuperado de: <https://www.juanvilar.com/informe-caja-rural-jaen-coyuntura-la-olivicultura/>
- Zarkadas, I. S., & Pilidis, G. A. (2011). Anaerobic co-digestion of table olive debittering & washing effluent, cattle manure and pig manure in batch and high volume laboratory anaerobic digesters: effect of temperature. *Bioresource technology*, 102(8), 4995-5003.

8. ANEXO I

Resolución N° 627 de la Provincia de Mendoza

Anexo I – b) Resolución 778/96 H.T.A.

NORMAS PARA VERTIDO DE EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES PARA REUSO AGRÍCOLA

Ítem	Parámetro	Unid.	Vertidos en Acres Controlados	ESPECIFICACIONES SINGULARES Y OBSERVACIONES
A: PARÁMETROS ORGANOLEPTICOS				
1	Color	U.C.V.	No objetables	Siempre que el mismo, por su intensidad, pueda influir en el proceso de fotosíntesis. En algunos casos se analizarán las estructuras químicas de los compuestos responsables del color
2	Olor		No objetables	Para acres, deberá verificarse la no afectación a operarios y/o residentes.
3	Sabor		No objetables	Para acres, deberá verificarse la no afectación a operarios y/o residentes.
4	Turbiedad	UTN		Debe verificarse la causal de la turbiedad en algunos casos. Relacionar con los sólidos sedimentables.

B: PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS				
5	Aluminio	Mg/l	5	El valor se ajustará a los resultados de los análisis de pH del suelo.
6	Amonio	Mg/l N		Los valores serán estrictos si hay asociación con coliformes fecales.
7	Cloro Libre Residual	Mg/l		Deberá fijarse para casos de vuelcos de líquidos que hayan tenido carga microbiana. Debe controlarse y establecerse ante la presencia de sustancias nitrogenadas máximo de cloro residual combinado.
8	Cloruros	Mg/l	600	Este parámetro podrá ser regulado, si no existe posibilidad de efectos corrosivos. Ver tipos de cultivos en cada ACRE.
9	Conductividad	US/cm	2250	Verificar afectación a bebida de ganado o avícola. Si se detectan efectos negativos en cultivos, limitar caudales vertidos, para minimizar aumento salinidad habitual del recurso. En Acres, estipular cultivos. Ver lavado de terrenos. Impedir perjuicios a mediano plazo.
10	Detergentes	Mg/l	2	No provocar problemas en los cauces, suelos y cultivos. Se analizará el valor fijado para casos particulares
11	Dureza Total	Mg/l CO3Ca		En industrias con importantes aportes de calcio y/o magnesio, o para vuelcos de concentraciones de lavado de aguas de calderas, resolver en cada caso

12	Hierro Total	Mg/l	5	Puede contribuir a acidificación suelo y disminución de P y Mo, esenciales para plantas, para cuyo caso se estudiará el valor a fijar
13	Sodio	Mg/l	400	Verificar afectación a cultivos y caudales máximos a admitir. Se analizarán los contenidos en suelo de sodio intercambiable
14	Sulfatos	Mg/l	600	Problemas con bacterias sulforeductoras. Verificar riesgos de corrosión e interferencias con tratamientos de líquidos residuales
15	Zinc	Mg/l	2	Tóxico para muchos cultivos a concentraciones muy variables. Disminuye toxicidad si pH>6 y suelos textura fin o de carácter orgánico
16	pH	Unidades	6.5 a 8.5 de pH	Verificar incidencia en cultivos o bebidas de ganado o avícola. En 8.5 algunas industrias se exigirán control continuo.

C. SUSTANCIAS TOXICAS INORGÁNICAS

17	Arsénico	Mg/l	0.1	En ACRES, verificar toxicidad en tipo de cultivos. Fitotoxicidad comprobada 2 mg/l, para ciertas hierbas, 0.5 mg/l para el arroz
18	Bario	Mg/l	1	Se analizará el valor fijado para casos particulares
19	Boro	Mg/l	0.5	Verificar afectación a suelos y cultivos
20	Cadmio	Mg/l	0.01	Es tóxico para varios cultivos, siendo los límites recomendados bajos debido a su capacidad para acumularse en suelos y en los cultivos hasta concentraciones que pueden ser perjudiciales para las personas
21	Cianuros	Mg/l	0.1	Se analizará el valor fijado para casos particulares
22	Cobre	Mg/l	0.5	Verificar afectación a cultivos y limitar caudales, aconsejándose el valor fijado para casos particulares
23	Cromo Hexavalente	Mg/l	0.1	Escasos conocimientos sobre fitotoxicidad, analizándose el

				valor fijado para casos particulares
24	Cromo Total	Mg/l	0.5	Ídem anterior
25	Fluoruros	Mg/l	1	Para suelos alcalinos o neutros, puede aceptarse > cantidad de F. En períodos máximos de riesgos < de 20 años
26	Manganeso	Mg/l	0.2	Tóxico para diversas plantas a concentraciones entre unas décimas y unos miligramos por litro, aunque principalmente en suelos ácidos
27	Mercurio	Mg/l	0.003	Para Acres justificar valores > 0.001 mg/l
28	Nitratos	Mg/l NO3	*	Límite a determinar según afectación al acuífero, estableciéndose valores para cada caso en particular
29	Nitratos	Mg/l NO2	*	Ídem anterior
30	Plata	Mg/l	0.05	Límite a determinar según afectación al acuífero, estableciéndose valores para cada caso en particular
31	Plomo	Mg/l	0.5	Verificar afectación a vida acuática y uso p/bebida ganado o

				avícola En ese caso, en el recurso $Pb < 0.1$ mg/l. Puede inhibir crecimiento células vegetales a concentraciones elevadas. Se establecerán valores para casos particulares
32	Selenio	Mg/l	0.02	Límite a determinar según afectación al acuífero, estableciéndose valores para cada caso en particular

D. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

33	Coliformes Totales	NMP por 100 ml (tubos múltiples)	*	Valores deben ser estudiados en cada caso, según afectaciones en las futuras áreas a irrigar
34	Coliformes Fecales	NMP por 100 ml (tubos múltiples)	1000	Se puede exigir menor presencia de coliformes, teniendo en cuenta el tipo de cultivo a irrigar
35	Helmintos	Huevos /litro	1	No se permiten en general mezclas de líquidos cloacales con industriales

E. OTROS PARÁMETROS CONTROLABLES EN VUELCOS A RECURSOS SUPERFICIALES

36	DBO	Mg/l O ₂	*	En todos los casos, determ. individual. puede ser más o menos estricto en función de su potencial afectación al recurso hídrico, tanto superficial como subterráneo
37	DQO	Mg/l O ₂	*	En todos los casos, determ. individual. puede ser más o menos estricto en función de su potencial afectación al recurso hídrico, tanto superficial como subterráneo
38	Temperatura	°C	30	Se restringirán caudales a volcar. Casos singulares deben ser analizados
39	Sólidos Sedimentables en dos horas	MI/l	10	Valores deben ser estudiados en cada caso, según afectaciones en las futuras áreas a irrigar
40	Sólidos Solubles en éter etílico	Mg/l	50	Valores deben ser estudiados en cada caso, según afectaciones en las futuras áreas a irrigar. Grasas deben ser de origen vegetal o animal