

BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS DE LEJÍAS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA ACEITUNERA POR BIOESTIMULACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS Y HALOTOLERANTES

TESINA DE GRADO PARA LA CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

Lesik Dimitri Exequiel

Año 2023

BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS DE LEJÍAS PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA ACEITUNERA POR BIOESTIMULACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS Y HALOTOLERANTES

TESINA DE GRADO PARA LA CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

Almirante Brown 25, Luján de Cuyo, Mendoza

Autor: Dimitri Exequiel Lesik

Teléfono: 2616962060

Correo Electrónico: dimitrilesik@gmail.com

Directora: Dra. Mariela Beatriz Maldonado

Correo Electrónico: marielabeatriz1972@yahoo.com.a

Comisión Evaluadora

- **Ing. Iván Funes Pinter**
- **Ing. Carolina Barbuzza**
- **Ing. Paula Castro**

RESUMEN

La industria aceitunera constituye una actividad con promesas de crecimiento y generación de divisas para los próximos años en la República Argentina. Siempre que el sector logre mejoras en la actividad productiva y en la calidad del producto final, se prevé un crecimiento del 504% que generarían 462,8 millones de dólares por exportación para el año 2030. Esta oportunidad está en vistas de ser atendida por el gobierno nacional, quien considera en su agenda medidas para impulsar el desarrollo del sector, especialmente en las provincias de La Rioja, Mendoza y San Juan quienes concentran el 78% de la producción. Sin embargo, este crecimiento no solo tiene implicancias económicas; un crecimiento del sector implicaría también un aumento del impacto ambiental que actualmente se ejerce. La producción de aceitunas de mesa consume aproximadamente 2 m³ de agua por tonelada de aceitunas procesadas, de los cuales del 80 al 95% se convierte en aguas residuales que son vertidas al dominio público. Durante el desamarizado de aceitunas se genera un efluente salino y altamente alcalino llamado “aguas de lejías”, cuyo tratamiento tiende a ser técnicamente muy difícil y costoso. Estos, junto con los efluentes generados durante el lavado de aceitunas (de características similares) representan el 75% de los efluentes totales generados. El tratamiento aeróbico de estos residuos a cargo de poblaciones de microorganismos previamente bioestimulados, surge como una opción para su depuración, debido a resultados positivos en efluentes similares. El mejoramiento de las condiciones finales de este residuo permitiría pensarlo como opción de re uso para otras actividades, evitando así su deposición final. En este trabajo se buscó estudiar el potencial de Biorremediación que poseen sobre estos efluentes, dos grupos de microorganismos: los nativos, es decir los propios del residuo, y los halotolerantes, que fueron inoculados sobre el residuo desde una fuente externa de microorganismos.

Se realizó primero una caracterización físico química de una muestra de aguas de lejías proporcionadas por una aceitunera local, que permitió conocer los niveles de contaminación inicial. Luego se lo sometió a un ensayo que replicó las condiciones de un tratamiento biológico y aeróbico, y se bioestimularon poblaciones de microorganismos nativos y poblaciones halotolerantes previamente inoculadas. Durante 14 días de ensayo se hicieron mediciones de parámetros físicos químicos claves de contaminación: pH, Conductividad Eléctrica (CE), Demanda Química de Oxígeno (DBO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), concentración de azúcares reductores y concentración de polifenoles, y se construyeron gráficos de evolución para cada uno de los parámetros mencionados. También se optó por registrar el crecimiento microbiano de bacterias mesófilas aeróbicas, y de hongos y levaduras. Los resultados de este trabajo dan cuenta que la actividad metabólica de ambos grupos de microorganismos (nativos y halotolerantes) lograron ser buenos depuradores de aguas de lejías, logrando reducciones importantes en todos los parámetros. La reducción en la concentración de azúcares reductores y de polifenoles, parece no tener diferencias entre ambos grupos de microorganismos estudiados, y alcanzaron valores muy lejanos respecto al contenido inicial. Esto se complementa con la evolución de la DQO y la DBO₅, ambos con reducciones que al alcanzaron, al menos el 98% respecto al valor inicial. Esto explica el comportamiento depurador de estos microorganismos, ya que lograron degradar una parte importante del contenido de materia orgánica original del efluente. Respecto al pH, todos los tratamientos mostraron bajas al final del ensayo, generando un efluente con valores cercanos a la neutralidad. En este sentido, los microorganismos halotolerantes mostraron mejor desempeño, ya que lograron una reducción a 7,5 unidades de pH partiendo de 11,8 unidades.

Por último, la CE también sufrió reducciones respecto a los valores iniciales, siendo los nativos quienes lograron la máxima reducción observada (cerca al 19%). Para este parámetro, el trabajo no generó evidencias que indique un posible mejor rendimiento de los halotolerantes por sobre los nativos. Tampoco se logró visualizar un comportamiento explícitamente diferente en ambos grupos, por lo que se estima que los microorganismos nativos posiblemente sean también halotolerantes.

Para finalizar, queda mencionar que si bien ninguno de los tratamientos estudiados logró reducir todos los parámetros considerados a valores que puedan permitir el vuelco del efluente tratado al dominio público, (según las normativas correspondientes) esto no quita la posibilidad del re uso en la propia industria. Sus resultados son óptimos para reutilizarlo en el propio desamarizado de aceitunas, permitiendo una recirculación del agua consumida y una reducción del volumen final del efluente a producir.

PALABRAS CLAVES

Biorremediación, Aguas de Lejías, Bioestimulación, Microorganismos Nativos, Microorganismos halotolerantes

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me acompañó con mucho amor en este largo camino de formación profesional y que siempre me alentaron a seguir, pese a las circunstancias: a mis hermanos Nahuel, Román, Lilén y Lautaro, y a mi padre Jorge, por su apoyo incondicional y especialmente a mi madre Patricia quien me inculcó el amor por aprender y que, a pesar de su ausencia, sigue siendo el mapa que me guía hacia el logro de mis objetivos.

A la Educación Pública a la cual le debo mi formación académica desde pequeño, y particularmente a la Facultad de Ciencias Agrarias por brindarme las herramientas para ejercer una profesión que intenta aportar un grano de arena más hacia la construcción de un planeta sano y para todos.

A la Universidad Tecnológica Nacional (UTN FRM) por brindarme el espacio y asistencia técnica que requirió el desarrollo de esta tesina.

A mi directora, Mariela Beatriz Maldonado por sus conocimientos, paciencia y dedicación ofrecida durante el desarrollo de este trabajo, y a su equipo de colaboradores por el compañerismo y entusiasmo con el que participaron

RESUMEN	ii
PALABRAS CLAVES.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBLEMA DE ESTUDIO	1
1.2. OBJETIVOS	2
1.2.1. Objetivo Principal	2
1.2.2. Objetivos Específicos.....	2
1.3. HIPOTESIS	3
1.4. MARCO TEÓRICO.....	3
1.4.1. Industria aceitunera e Impactos ambientales asociados	3
1.4.2. Ahorro de agua y Oportunidad de Re uso de efluentes de lejías	9
1.4.3. Biorremediación por bioestimulación	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Caracterización del Efluente	12
2.2. Ensayo de Biorremediación	13
2.2.1. Determinaciones Periódicas del Ensayo.....	14
2.2.2. Procesamiento de Datos.....	14
2.2.3. Monitoreo del crecimiento Microbiológico	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	16
3.1. Caracterización del efluente.....	16
3.2. Ensayo de Biorremediación	18
3.2.1. Evolución del pH	18
3.2.2. Evolución de la CE.....	21
3.2.3. Evolución de la DQO y DBO ₅	24
3.2.4. Evolución de la concentración de azúcares.....	25
3.2.5. Evolución de la concentración de polifenoles	27

3.2.6.	Monitoreo Microbiológico	28
3.2.1.	Discusión General de los resultados según las normativas provinciales que regulan la descarga al dominio público de efluentes industriales	30
4.	CONCLUSIONES.....	31
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	34
6.	ANEXOS.....	37
6.1.	Anexo I: Procedimientos de Laboratorio para la caracterización del Efluente	37
6.1.1.	Determinación de la DQO (APHA 1992).....	37
6.1.2.	Determinación de la DBO ₅ (APHA 1992).....	38
6.1.3.	Determinación de sólidos Solubles totales, Solidos suspendidos fijos y Solidos Solubles volátiles (APHA, 1992).....	40
6.1.4.	Determinación de Solidos sedimentables (APHA, 1992).....	42
6.1.5.	Determinación de Cloruros (APHA, 1992)	42
6.1.6.	Determinación de Sulfatos (APHA, 1992).....	44
6.1.7.	Determinación de Nitratos (Perdomo y col., 2012)	45
6.1.8.	Determinación de Sodio, Potasio, Calcio y Magnesio	46
6.2.	Anexo II: Procedimiento de Laboratorio para la determinación de parámetros medidos en el ensayo	48
6.2.1.	Determinación de la DQO y DBO ₅	48
6.2.2.	Determinación de azúcares reductores (Ávila y col., 2012).....	48
6.2.3.	Determinación de polifenoles (Fernández y col., s.f.)	49
6.3.	Anexo III: Procedimiento para el Monitoreo Microbiológico	50
6.3.1.	Preparación de las Diluciones.....	50
6.3.2.	Siembra por vertido en placa (Pour Plate).....	51
6.1.	Anexo IV: Tablas complementarias.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Escenario Actual y Potencial de las exportaciones del sector olivícola</i>	<i>4</i>
Tabla 2	<i>Caracterización físico química de aguas residuales por operación, en el procesamiento de aceitunas verdes.....</i>	<i>5</i>
Tabla 3	<i>Comparación de la caracterización de aguas de lejías realizada por Fernández Llano, con los valores máximos permitidos para vuelco según resolución 52/20 del DGI</i>	<i>8</i>
Tabla 4	<i>Consumo de agua y producción de efluentes por tipo de industria alimenticia en la provincia de Mendoza.....</i>	<i>10</i>
Tabla 5	<i>Comparativa de valores de partida de los parámetros físicos considerados para el efluente sin tratamiento con respecto a los valores máximos permitidos según las normativas consideradas.....</i>	<i>17</i>
Tabla 6:	<i>Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para los valores medios de pH obtenidos al final del ensayo (día 14) de los tratamientos estudiados.....</i>	<i>21</i>
Tabla 7	<i>Evolución de los valores promedio de la CE (en ms/cm²) durante 367 horas de ensayo para los tratamientos con bioestimulación al 50% y 25% de aguas de lejías de microorganismos nativos y halotolerantes.....</i>	<i>22</i>

Tabla 8 Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)	23
Tabla 9: DBO5 finales para cada tratamiento considerado en el ensayo, respecto al valor inicial encontrado según caracterización del efluente previo al ensayo.....	25
Tabla 10: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para la DBO ₅ (en mg/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)	25
Tabla 11: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para azúcares reductores (en g/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)	27
Tabla 12: Concentración media final de polifenoles (en mg/L) para cada tratamiento al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4).....	27
Tabla 13: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para la concentración de polifenoles (en mg/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)	28
Tabla 14 Comparación de Valores post tratamiento de los parámetros de contaminación físico químico considerados en el ensayo, con los valores máximos permitidos de cada normativa correspondiente a la provincia de Mendoza, San Juan y Mendoza	31
Tabla 15: Evolución de los valores promedios de pH durante 336 horas de ensayo para los tratamientos aeróbicos con bioestimulación al 50%y 25% de aguas de lejías a cargo de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4)	51
Tabla 16 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los controles al inicio y al final del ensayo.....	52
Tabla 17 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los tratamientos al 50% de lejías al inicio y al final del ensayo	52
Tabla 18 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los tratamientos al 25% de lejías al inicio y al final del ensayo	53
Tabla 19: Evolución de los valores promedios de CE durante 336 horas de ensayo para los tratamientos aeróbicos con bioestimulación al 50% y 25% de aguas de lejías a cargo de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4).....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Modelo sencillo del ordenamiento y entrada de los iones una vez que se disuelve capa cerosa (Izquierda), Modelo sencillo de salida de azúcares reductores y aceituna con exceso de carga negativa al final del desamarizado (derecha). Fuente Maldonado 2011</i>	10
<i>Figura 3: Evolución del pH en aguas de lejías al 50% con bioestimulación de microorganismos halotolerantes (T2) y de aguas al 50% sin bioestimulación de microorganismos(C1)</i>	18
<i>Figura 2: Evolución del pH en aguas de lejías al 50% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1) y de aguas al 50% sin bioestimulación de microorganismos (C1)</i>	18
<i>Figura 4: Evolución del pH en aguas de lejías al 25% con bioestimulación (T3) y de aguas al 25% sin bioestimulación de microorganismos (C2)</i>	19
<i>Figura 5: Evolución del pH en aguas de lejías al 25% con bioestimulación de microorganismos halotolerantes(T4) y de aguas al 25% sin bioestimulación de microorganismos (C2)</i>	19
<i>Figura 6: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejías al 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T3), halotolerantes (T4) y el control sin bioestimulación (C2).</i>	20
<i>Figura 7: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejías al 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T3), halotolerantes (T4) y el control sin bioestimulación (C2).</i>	20
<i>Figura 8: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4).</i>	21
<i>Figura 9: : Curvas de evolución de la CE promedio (en ms/cm²) en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2).</i>	23
<i>Figura 10: Curvas de reducción promedio (%) de la DQO a lo largo de 30 días de ensayo en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2).</i>	24

<i>Figura 11: Curvas de tendencia de la concentración de glucosa (en g/L) a lo largo de 367 horas de ensayo en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2)</i>	<i>26</i>
<i>Figura 12: Curvas de tendencia de la concentración de glucosa (en g/L) a lo largo de 367 horas de ensayo en aguas de lejías para los controles C1 y C2</i>	<i>26</i>
<i>Figura 13: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG, expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos nativos bioestimulados al 50% de lejías</i>	<i>28</i>
<i>Figura 14: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG, expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos nativos bioestimulados al 25% de lejías</i>	<i>29</i>
<i>Figura 16: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG), expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos halotolerantes bioestimulados al 25% de lejías</i>	<i>29</i>
<i>Figura 15: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG), expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos halotolerantes bioestimulados al 50% de lejías</i>	<i>29</i>
<i>Figura 17: Técnica para la preparación de diluciones seriadas</i>	<i>50</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. PROBLEMA DE ESTUDIO

En el presente trabajo se buscará estudiar la evolución de parámetros físicos – químicos críticos contaminantes; pH, Conductividad Eléctrica (CE) , Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), Concentración de azúcares reductores y concentración de polifenoles, sobre efluentes de lejías de la fábrica “Olivícola XXX”, cuando son sometidos a un tratamiento biológico y aeróbico a cargo de microorganismos nativos del efluente, y por microorganismos halotolerantes aislados de una muestra de sal proveniente del Mar Muerto. Los resultados de esta evolución serán comparados con las exigencias de las normativas que regulan la descarga de efluentes industriales en la provincia de Mendoza (resolución 52/2020 del DGI), San Juan (decreto 2101/2006) y La Rioja (decreto reglamentario 773/93), a fin de realizar interpretaciones de calidad del efluente tratado que describan su potencial de re uso en la región más productora de aceitunas de mesa del país.

El vertido de “aguas de lejías” constituye el principal impacto en la producción de aceitunas de mesa, ya que el mismo posee una gran cantidad de sólidos disueltos, una elevada CE, DBO₅ y contenidos altos de azúcares y polifenoles (Maldonado, 2015). El efluente se genera durante el proceso de desamarizado de aceitunas, y se mezcla con el efluente generado por el lavado posterior del fruto, de similares características. Estos efluentes no reciben tratamiento y en su mayoría son volcados a las acequias o canales públicos (Ivars 2021), aun cuando estos residuos no cumplen con los requerimientos técnicos, expresados en las normativas de cada provincia considerada. Para los productores, el tratamiento químico de estos residuos supone un costo económico que está fuera de sus posibilidades financieras (Ivars 2021), y debido a sus características, también se dificultan el empleo de métodos clásicos de tratamiento de aguas residuales que exigen procesos delicados y costosos (Fernández Llano, 2001). Su vertido crea entonces, un problema ecológico significativo (Sánchez, 2012) debido a su alto potencial contaminante y una falta a la normativa vigente, que podría tener una preponderancia mayor debido al auge de la industria en los próximos años.

Además, las aceituneras hacen un consumo elevado de agua: en un estudio local se estimó un consumo de 2 m³/ t de aceituna procesada (Fernández Llano, 2001), mientras que otros autores estiman que en Mendoza la agroindustria puede consumir de 3,9 a 7,5 m³ por tonelada de producto olivícola producida (Sasal et al, 2015). Este consumo es importante porque es el origen del volumen de efluente producido y vertido.

Por otro lado, el tratamiento de aguas residuales industriales cada vez se torna más importante en regiones semiáridas como Cuyo, donde la disponibilidad del recurso hídrico se proyecta escaso a consecuencia de los efectos del calentamiento global (Duek, 2016). El efluente tratado podría ser aprovechando para re uso, no sólo como recurso hídrico de riego, sino también dentro del mismo proceso del desamarizado. El re uso de lejías (sin previo tratamiento) es una práctica común dentro de la industria, pero no así en fábricas locales (Borgo, 2013) debido a que el efecto que ejerce el desamarizado sobre las aceitunas disminuye con lejías reutilizadas, como consecuencia de su alta concentración orgánica (Maldonado, 2015). Bajo esta consideración, un tratamiento biológico que logre disminuir la carga orgánica de la lejía podría potenciar el número de reúsos (sin afectar al desamarizado) lo que permitiría disminuir el consumo agua potable y por tanto los caudales finales de efluente de la industria.

Todo este contexto crea la necesidad de contar con un tratamiento eficiente y de bajo costo para las aguas de lejías generadas por el sector. La Biorremediación mediada por microorganismos nativos provenientes del propio efluente, surge como una opción de tratamiento biológico que ya ha sido estudiada en la industria aceitunera con resultados positivos, reduciendo la carga orgánica y la CE, pero sólo para efluentes provenientes del maquinado de aceitunas. Experiencias similares se obtuvieron con microorganismos nativos inoculados (aislados de otros trabajos con lejías) (Valsecchi Punzi, 2020), y con microorganismos autóctonos del propio residuo (Maldonado, 2020), con previa estimulación de sales nutritivas (bioestimulación) en donde se obtuvieron resultados similares en términos de reducción de parámetros críticos de contaminación.

Por último, teniendo en cuenta la salinidad del efluente, otra opción de tratamiento a estudiar es la Biorremediación mediada por microorganismos halotolerantes. Si bien la utilización de estos microorganismos sobre efluentes provenientes de la industria aceitunera local no ha sido estudiada, existen trabajos que nos indican tendencias sobre su aplicación biotecnológica (Ramírez et al, 2004). Incluso algunos muestran resultados positivos en la disminución de la CE en extractos de suelos afectados por salinidad que fueron biorremediados, utilizando consorcios de microorganismos halófilos (Puchaicela García, 2021)

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Principal

- ✓ Estudiar el potencial de biorremediación que tiene el tratamiento aeróbico mediado por microorganismos nativos y halotolerantes, con previa bioestimulación, sobre las aguas de lejía producidas durante el desamarizado de aceitunas de una empresa local.

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Someter aguas de lejías provenientes de la aceitunera local a un ensayo de depuración aeróbica durante 14 días, mediado por microorganismos nativos y por microorganismos halotolerantes
2. Realizar una caracterización inicial del efluente a tratar, midiendo parámetros claves de contaminación (pH, CE, DQO, DBO₅, Sólidos sedimentables, entre otros) y compararlo con las condiciones de vertido al dominio público permitidas por las resoluciones locales más relevantes, para describir el nivel base de contaminación del efluente.
3. Monitorear parámetros físico químicos del efluente (pH, CE, DQO, DBO₅, concentración de azúcares reductores y de polifenoles) durante todo el proceso degradativo
4. Determinar sobre el efluente ensayado (aguas de lejías): pH, CE y DQO, de forma periódica.
5. Determinar la DBO₅ en el efluente estudiando al final del ensayo, y comparar estos valores con el valor medido en la caracterización inicial del efluente.
6. Determinar la concentración de polifenoles en el efluente estudiado al final del ensayo, y comparar estos valores con información bibliográfica sobre concentraciones del mismo parámetro en efluentes sin tratamiento.
7. Monitorear el crecimiento microbiano de bacterias aeróbicas mesófilas y de hongos y levaduras durante todo el proceso degradativo, y generar curvas de crecimiento

microbiano exploratorias que describan la participación de estos grupos sobre dicho proceso

8. Construir curvas de evolución de los parámetros físico químico estudiados periódicamente para los 14 días de ensayo

1.3. HIPOTESIS

- El tratamiento aeróbico de aguas de lejías, mediada por microorganismos nativos propios del residuo y por microorganismos halotolerantes inoculados (Biorremediación), con previa bioestimulación, genera un efluente tratado con potencial de re uso al reducir parámetros físicos químicos críticos de contaminación (pH, CE, DQO, DBO₅, concentración de azúcares reductores y de polifenoles). Se espera que los halotolerantes tengan mejor desempeño que los nativos por ser microorganismos inoculados desde un ambiente más hostil en términos de salinidad, y por tanto mejor adaptados a estas condiciones, pudiendo utilizar mejor los recursos presentes en el efluente ensayado.

1.4. MARCO TEÓRICO

1.4.1. Industria aceitunera e Impactos ambientales asociados

1.4.1.1. Situación mundial y regional del sector

La industria aceitunera a nivel mundial, está mostrando un cambio en el modelo de producción de aceitunas, tanto para la producción de aceite de oliva como de aceitunas en conservas. La tendencia indica un cambio hacia un modelo de alta productividad y eficiencia, denominada olivicultura intensiva y súper intensiva. Este modelo se trata del establecimiento de explotaciones modernas con mayor densidad de plantas por hectárea, en superficies de regadío y bajo un sistema totalmente mecanizado de la producción primaria. Este modelo a nivel mundial avanza considerablemente: anualmente se plantan alrededor de 150 mil hectáreas de olivos, de las cuales el 80% corresponde a olivares modernos. (*Argentina Productiva 2030, 2022*). El cambio a hacia este modelo está anclado en mejorar los márgenes de rentabilidad: bajo los sistemas tradicionales el costo medio mundial puede escalar a € 3,44 mientras que bajo el modelo intensivo los costos podrían reducirse hasta los € 2,1, según datos del Consejo Oleícola internacional (*Consejo Oleícola Internacional, 2015*). España quien es el principal productor a nivel mundial, bajo un sistema de producción tradicional, comienza a tomar medidas para migrar hacia un sistema productivo de tipo intensivo. Portugal, por su parte está en pleno proceso de incorporación de avances tecnológicos y productivos, con vistas a convertirse en el tercer productor mundial para el año 2030 (*Argentina Productiva 2030, 2022*), desplazando del mercado a países como Egipto y Turquía quienes no han demostrado intenciones políticas en lograr un cambio en sus sistemas de producción.

La región de Cuyo es la principal productora de aceitunas de mesa, con una superficie La República Argentina posee cerca de 25.000 hectáreas implantadas de olivo para conservas de las cuales 19.338 se concentran en la Región de Cuyo, convirtiéndola en la principal productora de aceitunas de mesa del país. A nivel nacional la provincia de La Rioja concentra la mitad de esta superficie (50%), seguido por Mendoza (16%) y San Juan (12%) según el *Instituto Nacional de estadísticas y Censo, (2020)*. También es destacable la participación de

Catamarca (16%) y Córdoba (6%). En cuanto a los sistemas productivos, solo la provincia de Mendoza cuenta con cultivos de alta intensidad mientras que, en el resto de las provincias productoras, el modelo sigue siendo tradicional. Frente a esto el gobierno nacional quiere impulsar el sector con la creación de un Instituto Nacional de Olivicultura (INO) que permitiría no sólo sortear los problemas estructurales y coyunturales de la actividad sino también mejorar sensiblemente la inserción del complejo a los mercados internacionales. Esta medida junto a otras que el Ministerio de desarrollo productivo recomienda al gobierno nacional, basadas en imitar acciones públicas que han sido exitosas en países como España y Portugal, potenciaría el sector en la República Argentina con un crecimiento estimado del 504% para el año 2030, respecto al 2021, siempre que estas medidas logren mejoras en la productividad y en la calidad del producto (*Argentina Productiva 2030, 2022*). En el siguiente cuadro, se puede ver el escenario potencial del sector en términos de exportaciones para el año 2030.

Tabla 1 Escenario Actual y Potencial de las exportaciones del sector olivícola

Exportaciones	Escenario promedio actual (promedio 2016-2020)	Escenario potencial		Variación	
		Por incrementos de productividad	Por incrementos de productividad y calidad	(b) / (a)	(c) / (a)
	(a)	(b)	(c)		
Aceitunas en conserva	USD 76,6 millones	USD 210,1 millones	USD 462,8 millones	+174,3%	+504,2%
Aceite de oliva	USD 85,6 millones	USD 220,2 millones	USD 324,5 millones	+157,2%	+279,1%
Totales del complejo	USD 162,3 millones	USD 430,3 millones	USD 787,3 millones	+165,1%	+385,1%

Fuente: *Argentina Productiva 2030 (2022) "Olivicultura en Argentina. Aprendiendo de la experiencia internacional: políticas públicas para el desarrollo sostenible del sector"*

1.4.1.2. Impacto ambiental del sector en la región

El crecimiento de este sector no sólo promete mayores y mejores ingresos económicos para la población local, sino también aumentar su impacto ambiental. Ya en la actualidad, productores de aceitunas de la provincia de Mendoza admiten “desaguar” sus efluentes en las acequias próximas, justificando la imposibilidad de que pequeñas empresas pueda internalizar totalmente su costo ambiental (*Ivars 2021*). La contaminación por el vertido de estos efluentes, lo convierte en la principal problemática medioambiental a solucionar del sector. En los siguientes apartados se describen sus características físico químicas relevantes para posteriormente entender su importancia como fuente de contaminación.

Agua residual del proceso de desamarizado

El método de producción de aceitunas de mesa más ampliamente utilizado, y que cubre la mayor parte de la demanda internacional y nacional, es el de “aceitunas aderezadas con salmuera a la Sevillana” (*Borgo, 2013*). Durante este proceso se produce un residuo líquido muy alcalino y salino, producto de la mezcla de dos efluentes de similares características: uno proveniente del desamarizado de aceitunas, donde las aceitunas son tratadas con una

solución de Na (OH) al 2,5%, que ablanda la pulpa y quita el amargor del fruto, y un segundo efluente proveniente de la etapa de “lavado”, que limpia y despoja a las aceitunas del exceso Na (OH). Ambos efluentes son críticos en parámetros como el pH, Conductividad Eléctrica (CE), y materia orgánica pero el primero, conocido también como “*efluente o aguas de lejías*”, tiende a ser un poco más extremo en sus valores (Fernández Llano, 2001), tal y como se muestran en la Tabla 2. Un tercer residuo se suma a la ecuación, relacionado con el tratamiento en salmueras de las aceitunas (la salmuera en sí misma), sin embargo, este último presenta características diferentes, y a diferencia de los dos primeros se produce al menos 3 meses después del desamarizado y lavado, por lo que está separado temporalmente del resto de los residuos líquidos (Arancibia, 2008). Por esta razón, los impactos y la necesidad de tratamiento de los residuos generados por el desamarizado y lavados posteriores prevalecen por sobre los de salmuera (Fernández Llano, 2001).

Tabla 2 Caracterización físico química de aguas residuales por operación, en el procesamiento de aceitunas verdes

Parámetro	unidad	Lejías	Lavados			Salmueras	
			Primero	Segundo	Promedio	España	PRODIA
PH		12,2	11,2	9,8	10,5	3,9	4,1
DBO ₅	(mg/l)	15000	12300	15600	13950	9500	14347
DQO	(mg/l)	23000	24600	28400	26500	10700	41667
Sól. Disueltos Totales	(mg/l)	48200	6500	49600	48050	118500	95227
NaOH libre	(g/l)	11,0	1,5	0	0,75		
Na Cl						97	72,8
Sólidos Sed. 10'	(ml/l)			0,6		< 0,1	
Sól Sedimentables 2 hs	(ml/l)			4,3		0,3	
Sólidos Totales	(mg/l)				52165		
Cloruros	(g/l)						45,06
Sodio	(g/l)						28,63

Fuente: Fernández Llano (2001) “Efluentes Líquidos del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco. Situación en la Provincia de Mendoza”

Contaminación y Parámetros Considerados

Hablamos de contaminación cuando vemos un cambio indeseable en las características físicas, químicas o biológicas del aire, agua o el suelo que puedan afectar de manera adversa la salud, la supervivencia o las actividades de los seres humanos u otros organismos vivos (Maris da Silva, 2018). Las características físicas químicas del efluente estudiado junto con su destino más común en la región de cuyo (descarga al dominio público, principalmente acequia y canales) promueven la idea de ser un factor de contaminación en aguas y suelos locales.

Considerando el pH altamente alcalino del efluente, el vertido del mismo puede cambiar las propiedades químicas en el cuerpo hídrico receptor y generar condiciones de toxicidad para personas y animales consumidores, como así también promover la contaminación de aguas subterráneas a causa de su infiltración en profundidad. Por ejemplo, el vertido de aguas de lejías aumenta el pH del cuerpo receptor. El pH modula el riesgo de toxicidad del amoníaco: a pH alto, las formas de nitrógeno menos tóxicos como el amonio (NH₄⁺), cambian a su forma más tóxica, amoníaco (NH₃), aumentando su concentración en el cuerpo hídrico receptor del efluente (Kubitza, 2017). Algo similar ocurre con las concentraciones de nitritos (NO₂⁻¹) y ácidos nitrosos (HNO₂): a medida que aumenta el pH, aumenta la concentración de NO₂⁻¹ en detrimento de la concentración de HNO₂. El ión nitrito suele ser considerado como el principal responsable de la toxicidad en animales, pudiendo afectar a animales domésticos y ganadería cercana (Camargo & Alonso, 2007).

La *Conductividad Eléctrica* (CE) mide la capacidad del agua como conductor de corriente eléctrica debido a la existencia de sales disueltas. Mientras mayor sea la concentración de sales disueltas, mayor será la CE. En zonas rurales, el vertido de efluentes salinos a cuerpos receptores saliniza agua de riego que es utilizado en los cultivos locales. Esta salinización, conduce a consecuencias severas para el desarrollo del cultivo ya que limita la cantidad de agua disponible para ser absorbida por las plantas, restringiendo la producción (Tartabull & Betancourt, 2016) y aporta sales al suelo promoviendo fenómenos de desertificación, reducción de la producción agrícola y el desplazamiento de la población, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria y económica de las comunidades locales (Cohelo Castro & Dos Santos, 2019)

El contenido de materia orgánica de un efluente, también es un indicador crítico de contaminación. Efluentes con altas cargas orgánicas vertidos al dominio público, pueden afectar el agua y el suelo de uso agrícola de zonas aledañas. El aporte de sustancias orgánicas al suelo agrícola induce un rápido y alto crecimiento de microorganismos, que, al requerir de N y P para completar su desarrollo, lo toman del suelo provocando la inmovilización de estos nutrientes y dejan de estar disponibles para las plantas (Arrheghini et al, 2018). Parámetros como sólidos sedimentables, definidos como aquellos sólidos capaces de sedimentar fácilmente durante un periodo de tiempo determinado, nos dan una idea aproximada de la carga sólida orgánica que trae el efluente (principalmente en los sólidos sedimentables en 2 horas), sin embargo, no es una medida real del mismo debido a que muchas de las moléculas orgánicas se encuentran disueltas en el efluente o en estado coloidal y no sedimentan (Hernández Muñoz, 2000).

La *Demanda Biológica de Oxígeno* (DBO₅) constituye una buena medida del nivel de materia orgánica y actividad microbiana de un efluente. La DBO₅ se define como la cantidad de oxígeno consumido por un agua residual durante la oxidación por vía biológica de la materia orgánica biodegradable presente en dicho residuo líquido, medidas en condiciones de ensayo y durante cinco días de incubación (Hernández Muñoz, 2000). Mientras mayor sea la materia orgánica del efluente, mayor será la actividad microbiana y su consumo de oxígeno para degradar dichos compuestos, lo cual se reflejará en valores altos de DBO₅. Valores altos de DBO₅ indican contaminación orgánica y mala calidad del agua (Calidad del Agua, 2018). En este sentido el índice de biodegradabilidad es una buena manera de medir el potencial que tiene un efluente de ser degradado por actividad microbiana. El mismo se define como la relación entre la DBO₅ y la DQO, y se usa como una medida de la proporción de materia orgánica oxidable respecto al total de material oxidable (tanto orgánico como inorgánico). Valores altos y cercanos a la unidad, describen un efluente con alto contenido orgánico con posibilidad de ser degradado por microorganismos mediante su respiración, en tanto que valores bajos describe un efluente con un contenido de materia orgánica pobre, y por tanto con bajas posibilidades de ser remediado mediante microorganismos (Hernández Muñoz, 2000).

Dentro de estos compuestos orgánicos, las aguas de lejías tienden a tener altas concentraciones de polifenoles que le dan el color pardo al residuo (Maldonado 2011). Según la bibliografía consultada, estas concentraciones pueden ir de 4000 mg/l para efluentes generados por el desamarizado, a 6000 mg/l cuando se los mezcla con efluentes de un segundo y tercer lavado de aceitunas (Garrido Fernández, 1983). Caracterizaciones del efluente más locales y cercanos en el tiempo, también demuestran contenidos altos de compuesto fenólicos, cercanos al 2410 mg/L para los efluentes del desamarizado que trepa a

3020 mg/L cuando se los mezcla con los generados en el primer lavado de las aceitunas (Gerbaldo et al, 2019).

Durante el desamarizado, desde el interior de la pulpa migran hacia la solución numerosos compuestos orgánicos, entre ellos polifenoles como las oleuropeínas. Estas son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías metabólicas del Shiquimato y de los fenilpropanoides. A pesar de que muchas de ellas son consideradas como beneficiosas para la salud por sus propiedades antioxidantes, en altas concentraciones su ingesta puede generar efectos anti nutricionales debido a su actividad como agentes quelantes, interfiriendo en la absorción de hierro consumido en la dieta diaria de personas y animales, y generando cuadros de anemia. Además, pueden tener efectos tóxicos si su ingesta se encuentra entre el 1% y el 5% total de su dieta. (Valencia Aviles et al 2017). Por otro lado, los polifenoles en altas concentraciones generan problemas para el tratamiento de efluentes industriales: en tratamientos basados en la digestión anaeróbica alteran la permeabilidad de las membranas citoplasmáticas de las bacterias involucradas en el proceso, provocando la fuga del material celular al medio exterior e inactivación enzimática, haciendo que el proceso sea menos eficiente (Moreno, 2020). Por todo esto, la concentración de polifenoles en aguas de lejías, resulta un parámetro interesante para analizar la calidad del mismo.

1.4.1.3. Legislación

Considerando las tres provincias que generan la mayor producción de aceitunas del país, (La Rioja, San Juan y Mendoza) si se comparan las exigencias establecidas en las normativas de cada provincia (para el vertido de efluentes industriales al dominio público) con la caracterización físico química que logró Fernández Llano en su trabajo, podemos ver que las aguas de lejías superan los valores de pH, CE, DBO₅, DQO y Na (OH) libre en todas las normativas, (Tabla 3) lo que hace imposible que empresas de la industria puedan gestionar un permiso de vertido o re uso en la región. Como consecuencia, los residuos líquidos de este sector son volcados al dominio público sin previa autorización (Ivars 2021), aumentando las posibilidades de contaminación sobre otros cuerpos de agua, u otros medios receptores como el suelo.

Tabla 3 Comparación de la caracterización de aguas de lejías realizada por Fernández Llano, con los valores máximos permitidos para vuelco según resolución 52/20 del DGI

Parámetro	Unidad	Lejías	Mendoza	San Juan	La Rioja
			Resolución 52/20 DGI	Decreto 2107/2006	Decreto Reglamentario 773/93
pH		12,2	6,5 - 8,5	6,5 - 9	5,5 - 10
CE	µs/cm	37200 ¹	-	1400	<3000
DBO ₅	mg/l	12300	30	50	<200
DQO	mg/l	24600	75	125	<700
Sólidos Sedimentables (10 min)	ml/l	-	0,5	0,5	<0,5
Sólidos Sedimentables (2 hs)	mg/l	-	1	1	-
Sólidos suspendidos totales	mg/l	-	40	40	250
Na (OH) libre	mg/l	11000	250	250	-

Fuente: Elaboración propia a partir de datos extraídos de Fernández Llano, (2021) "Efluentes Líquidos del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco. Situación en la Provincia de Mendoza" y de la resolución 52/20 del DGI de la provincia de Mendoza, decreto 2107/2006 de la Provincia de San Juan y el decreto reglamentario 773/93 de la provincia de La Rioja

Con respecto a los sólidos sedimentables y sólidos suspendidos totales, Fernández Llano no determinó sus valores en aguas de lejías, pero debido a los valores de DBO₅ y DQO se estiman que serían valores altos que posiblemente superen a los máximos permitidos por tales normativas, ya que estos valores son bastante similares entre sí.

Lo mismo ocurre con la CE donde el trabajo de Fernández Llano no expone un valor de caracterización, sin embargo, sabemos que este valor está alrededor de 37200 µS/cm al menos para efluentes provenientes del maquinado de aceitunas, tal y como nos muestra Lugones en "Biorremediación de efluentes provenientes de la industria de aceitunas maquinadas" (Lugones, 2018)*. En el caso de Mendoza comparar este valor de CE con lo permitido según la resolución 52/20 del DGI supone determinar el índice de peligrosidad del efluente y el rango de CE de partida que declara la fábrica, ya que el valor máximo permitido en este parámetro está sujeto a ambas variables. Al no encontrarse información suficiente sobre el índice de peligrosidad de aguas de lejías (en parte porque el índice fue introducido con la resolución 52/20 promulgada el 20 de febrero del año 2020 y por tanto todavía no se cuentan con estudios específicos de cada efluente en la industria), en este trabajo se optó por comparar la CE con la recomendada para el uso agrícola de aguas residuales, según el documento 47 de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), sobre "Tratamiento y uso de aguas residuales en la agricultura". En este documento se declaran 3 grados de restricción de uso de aguas residuales en la agricultura, según distintos parámetros de salinidad, infiltración, toxicidad y otros. Para salinidad el parámetro usado es la CE, llegando al máximo grado de restricción con valores iguales o superiores a los 30000 µS/cm (FAO, 1992). Este valor es superado por la caracterización realizada por Lugones (Lugones, 2018). Si bien es verdad que Lugones trabajó con efluentes provenientes del todo el proceso de producción aceitunas maquinadas, podemos inferir que la CE del efluente proveniente de la etapa del desamarizado tiene valores más extremos, tal y como nos mostró Fernández Llano (Fernández Llano, 2001)

¹ Valor completado con el obtenido en el trabajo de Lugones "Biorremediación de efluentes provenientes de la industria de aceitunas maquinadas"

En el caso de San Juan y La Rioja, sus normativas si expresan valores máximos permitidos para la CE y, tal como se observa en la tabla 3 son superados por el valor publicado por Lugones (Lugones, 2018).

Ante este pequeño análisis, podemos decir a priori, que las características físico químicas de las aguas de lejías en general no cumplen con las condiciones mínimas para ser vertidas al dominio público.

1.4.2. Ahorro de agua y Oportunidad de Re uso de efluentes de lejías

1.4.2.1. Posibilidad de Ahorro

Según Duek, un manejo eficiente del agua por parte de las industrias alimenticias de Mendoza permitiría reducir el consumo de agua hasta valores de 7,11 hm³ anuales, lo que implica una disminución del 64% del consumo promedio. Además, el autor estima que la industria aceitunera consume un total de 2,7 litros de agua por kilogramo de aceituna procesada y expone que este valor dista mucho de los consumos óptimos (cerca de 0,25 litros por kg de aceituna procesada) extraídos de fuentes bibliográficas. Por otro lado, en el mismo trabajo se desarrolló un indicador que mide el esfuerzo relativo que cada tipo de industria debe realizar para alcanzar los valores de consumo estimados en los escenarios de uso sostenible del recurso hídrico (Índice de convergencia Relativa). Para valores cercano a cero, se entiende que la industria estaría más próximo al consumo hídrico óptimo. En el caso de la industria aceitunera, este indicador es de 0,907 lo cual demuestra que los esfuerzos de este sector para alcanzar un consumo óptimo deben ser mayores (Duek, 2016)

Se estima también que las industrias olivícolas consumen un total de 0,207 hm³ y que generan un efluente aproximado de 0,18 hm³, lo cual pone en evidencia que la mayor parte del agua consumida termina vertiéndose como residuo (Duek 2016). Esta situación es similar, en general en la mayor parte de las industrias alimenticias de Mendoza tal y como se aprecia en la tabla N° 4.

Según Fernández Llano, el 75% del total del agua utilizada en un año productivo por una aceitunera, se distribuyen entre el proceso de desamarizado y del lavado de aceitunas. Se estima también que cerca del 75% del volumen de agua consumido se transforma en efluente (Borgo, 2013). En algunos de estos trabajos los autores describieron las características de los residuos de cada etapa, y resolvieron que son bastante similares: pH muy alcalino, elevado DQO, DBO₅ y sólidos disueltos totales, entre otros parámetros, (*Fernández Llano, 2001*). Esto puede verse en la Tabla N° 2 del presente trabajo. Teniendo en cuenta esto, el tratamiento de aguas de lejías también podría aplicarse en el tratamiento de efluentes provenientes del posterior lavado de aceitunas, o bien para el diseño de un tratamiento conjunto de ambos residuos

Tabla 4 Consumo de agua y producción de efluentes por tipo de industria alimenticia en la provincia de Mendoza.

Tipo de industria	Consumo de agua (hm ³)	Relación volumen volcado / volumen consumido - (rango)	Efluente (hm ³) */
Bodegas	3,199	0,90 – 0,95	2,96
Conserveras de hortalizas	3,725	0,90 – 0,95	3,45
Conserveras de frutas	10,100	0,80 – 0,95	8,84
Industria olivícola	0,207	0,80 – 0,95	0,18
Industria cervecera	0,670	0,50 – 0,70	0,40
Embotelladoras de agua mineral	1,567	0,20 – 0,30	0,39
Industria de gaseosas	0,186	0,20 – 0,40	0,06

Fuente: Duek A. (2016) "El Agua En Las Industrias Alimenticias De Mendoza (Argentina): Estimación De Los Requerimientos Hídricos Y La Potencialidad De Reúso agrícola"

1.4.2.2. Posibilidad de re uso

Un efluente sometido a un tratamiento óptimo que logre remediar sus parámetros críticos de contaminación, aumenta sus posibilidades de ser re utilizado, y de esta manera la industria lograr una mejora en la gestión del agua mediante su ahorro. Una de las opciones de re uso de las aguas de lejías, está dentro del mismo proceso productivo. Durante el desamarizado los aniones hidroxilos disueltos en la lejía destruyen la capa de cera de las aceitunas y permeabilizan la estructura, permitiendo la salida de compuestos orgánicos que pasan a

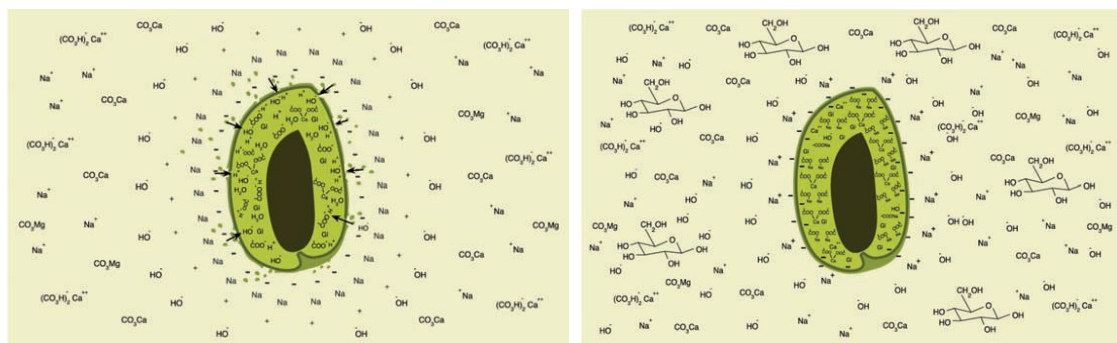


Figura 1: Modelo sencillo del ordenamiento y entrada de los iones una vez que se disuelve capa cerosa (Izquierda), Modelo sencillo de salida de azúcares reductores y aceituna con exceso de carga negativa al final del desamarizado (derecha). Fuente Maldonado 2011

formar parte de la solución externa (Figura 1). Este proceso hace que el fruto se ablande y pierda gran parte del gusto amargo (Maldonado, 2011), y termina aumentando la carga orgánica de la solución, achicando el gradiente que promueve este flujo. Como consecuencia, si se quiere re usar la lejía (sin tratamiento) en el mismo proceso la calidad del desamarizado decae ya que la aceituna no logra despojarse lo suficiente de compuestos claves de su estructura (como pectinas, ácidos grasos, ceras, polifenoles, etc.) para lograr la consistencia y sabor apropiado del mercado (Maldonado et al, 2015). Por esta razón, en la provincia de Mendoza solo el 50% de estas fábricas reutilizan lejías durante el desamarizado (Borgo, 2013).

Sin embargo, Maldonado testó la calidad de las aceitunas producidas con lejías reutilizadas, encontrando que los consumidores no notaron diferencias hasta la reutilización número 6 (Maldonado, 2015). Estudios españoles sobre el reúso de lejías en la industria, obtuvieron resultados alentadores: la DQO de la lejía aumenta en los primeros re usos con un moderado

incremento hasta alcanzar un valor constante, a partir del re uso numero 9 o diez (*Fernández Llano, 2001*). Esto nos indica que el re uso es una posibilidad, y debido a que la función del desamarizado se hace menos efectiva a medida que aumente la carga orgánica de la lejía re utilizada, cualquier tratamiento que logre reducir la carga orgánica estaría en condiciones de generar un producto residual de re uso para este proceso que potencie la reutilización del mismo.

Otro destino posible para para estos residuos líquidos tratados, es su aplicación como riego en superficies A.C.R.E (Áreas de cultivos restringidos especiales) o su vertido al dominio público. En el caso de Mendoza el DGI establece las condiciones necesarias que debe cumplir un residuo líquido para ambos casos. Estas condiciones están descriptas en la resolución 52/2020 de la misma institución y en ambos destinos se requiere un permiso que es otorgado por el mismo departamento, siempre que se cumplan los requisitos expresados en la normativa. Por lo tanto, un tratamiento que lograr reducir el pH, CE y su carga orgánica a valores permitidos por tal normativa, podría ser empleado para riego en superficies ACRE o bien simplemente vertido al dominio público sin que el mismo represente un potencial impacto ambiental grave a futuro.

1.4.3. Biorremediación por bioestimulación

La Biorremediación consiste en la utilización de organismos vivos para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en sustancias inocuas para el medio ambiente y la salud humana (*Rodríguez, 2003*). Esta técnica es eficaz para la eliminación de contaminantes, al mismo tiempo que es descripta como de bajo costo, por su menor consumo energético y baja producción de lodos, en comparación con tratamientos físico químicos tradicionales (*Barrera, 2018*). La Biorremediación mediada por microorganismos nativos, es decir microorganismos propios del residuo a tratar, ha tenido buenos resultados en la industria aceitunera. En residuos líquidos proveniente de la producción de aceitunas maquinadas, y utilizando Biorremediación por depuración natural, se demostró que los microorganismos nativos son capaces de reducir la DQO y la DBO₅ en un 91,7% y 80% respectivamente, asociada a una reducción del pH durante los primeros 4 días de tratamiento (*Lugones, 2018*). Durante la Biorremediación las bacterias consumen los compuestos orgánicos, y algunos inorgánicos, disueltos y los convierten en dióxido de carbono, agua y energía para producir nuevas células. Los agentes contaminantes son convertidos en biomasa insoluble, que pueden ser removidos mecánicamente del flujo de residuos (*Foster & Whiteman, s.f.*). Teniendo en cuenta esto, la reducción del pH descripta por Lugones probablemente se deba a la liberación de ácidos ocurridos durante el ciclo de Krebs propio del metabolismo aeróbico de los microorganismos (*Maldonado 2021*). La degradación de la materia orgánica disuelta en aguas de lejías, promovida por microorganismos nativos o halotolerantes, podría generar este cambio en el pH. Este aspecto es de suma importancia, ya que, debido a las características del efluente, se necesita un tratamiento que logre disminuir el pH a valores permitidos. Estos resultados podrían acentuarse si consideramos un tratamiento que enriquezca de nutrientes el medio, promoviendo el uso de carbono orgánico como principal fuente de carbono, generando una estimulación de las poblaciones microbianas que traerá consigo un aumento de la actividad metabólica total (Bioestimulación), y por tanto una caída de pH a valores útil para el objetivo del tratamiento. Por todo lo mencionado, la bioestimulación surge como una mejora de Biorremediación. Existen evidencias en suelos contaminados con diésel, donde la

Biorremediación por bioestimulación logró mejores resultados que la depuración natural (sin estimulación previa), logrando reducir el 48,18% de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (Valderrama, 2019). Esto también puede verse en aguas residuales industriales, donde se demostró un porcentaje de degradación de aceites en un 42%, respecto al 12% del control (Atenuación Natural) (Gamba & Pedraza, 2018). Estas evidencias motivan la idea de que la bioestimulación pueda ser efectiva en el tratamiento aeróbico de aguas de lejías, teniendo incluso resultados positivos en el tratamiento aeróbico de efluentes aceituneros, donde por bioestimulación de consorcios de microorganismo nativos se logró una reducción de hasta el 80% en parámetros de contaminación como la DQO y DBO₅ (Maldonado, 2022). Con respecto a la CE, se sabe que es un parámetro muy difícil de remediar, sin embargo, Maldonado logró que la Biorremediación mediada por microorganismos nativos generara caídas de la CE de hasta el 35% en efluentes provenientes de la industria olivícola (Maldonado et al, 2022).

Por otro lado, los microorganismos halotolerantes han sido utilizados como consorcios depuradores de aguas residuales salinas, logrando reducir hasta el 85% del carbono orgánico (Valdez Gustélum, 2014) y en la biodegradación de crudo presentes en medio acuático salino, con resultados prometedores (Díaz 2001). Otro trabajo reporta una reducción de la CE en suelos afectados por salinidad (Puchaicela García, 2021). Estos trabajos resultan interesantes, ya que podrían prometer resultados positivos al utilizar microorganismos halotolerantes en la biorremediación de un efluente altamente salino como son las aguas de lejías. Se sabe que, en las grandes salinas del mundo, como el Atacama y el Mar Muerto, existe una gran diversidad de microorganismos halófilos y halotolerantes (Campos Pardo, 1997), que podrían ser aislados y probados en el tratamiento aeróbico del residuo problema de este trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo consistió en un ensayo que trató de simular un tratamiento secundario, microbiológico y aeróbico a escala piloto, con adición de una mezcla nutritiva que estimulara poblaciones de microorganismos nativos (presentes en las propias muestras de lejías utilizadas) y halotolerantes (inoculados), y se monitoreó el desempeño del tratamiento durante 14 días. Durante el mismo, se hicieron determinaciones de parámetros fisicoquímicos para visualizar los cambios que sufrieron las lejías tratadas producto de la actividad aeróbica de los microorganismos mencionados. Previo a este ensayo se realizó una caracterización inicial del residuo de lejía a utilizar, para conocer las condiciones y los parámetros de contaminación desde el cual se parten. Por último, se llevó a cabo un análisis microbiológico exploratorio, a partir del cual se trató de determinar el número de microorganismo mesófilos viables mediante un recuento en placa en dos medios de cultivos selectivos, bacterias mesófilas aeróbicas y hongos y/o levaduras. Los resultados del recuento se utilizaron para construir curvas de crecimiento de cada grupo y monitorear su actividad durante los 14 días de ensayo, y asegurar que los procesos degradativos se den como consecuencia de la actividad metabólica microbiana

2.1. Caracterización del Efluente

Para obtener un punto de comparación se llevó a cabo una caracterización del efluente a ensayar, tomando una muestra de cinco litros previamente agitada, para realizar los siguientes análisis según Standard Methods (Rice, Baird, and Eaton 2017): DQO, DBO₅, pH por pH-

metro, temperatura con termómetro digital con una precisión de $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$, CE con conductímetro, sedimentos sólidos a los 10 min y 2 horas en cono Inhoff. Sólidos solubles totales, sólidos suspendidos fijos, sólidos solubles volátiles obtenidos por método gravimétrico, cloruros por titulación potenciométrica, sulfatos por método gravimétrico con combustión de residuos, nitratos por espectrofotometría de absorción ultravioleta, carbonatos y bicarbonatos por volumetría con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Para los elementos de sodio, potasio, calcio y magnesio se enviaron muestras a la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) donde se nos informó que se midieron por espectrofotometría.

2.2. Ensayo de Biorremediación

Para estudiar la Biorremediación del efluente a cargo de grupos de microorganismos nativos y halotolerantes se realizaron 4 tratamientos (T) y se mantuvieron 2 controles (C):

- T1: Tratamiento aeróbico con microorganismos nativos del efluente en una solución al 50% de lejías y bioestimulados con mezcla nutritiva
- T2: Tratamiento aeróbico con microorganismos halotolerantes (provenientes del mar muerto) en aguas de lejías al 50% y bioestimulados con mezcla nutritiva
- T3: Tratamiento aeróbico con microorganismos nativos del efluente en una solución al 25% y bioestimulados con mezcla nutritiva
- T4: Tratamiento aeróbico con microorganismos halotolerantes en aguas de lejías al 25% y bioestimulados con mezcla nutritiva
- C1: Control 1, tratamiento aeróbico con microorganismos nativos del efluente en una solución de lejías al 50% y sin bioestimulación con mezcla nutritiva
- C2: Control 2, tratamiento aeróbico con microorganismos nativos del efluente en una solución de lejías al 25% y sin bioestimulación con mezcla nutritiva

Todos los tratamientos fueron estimulados con la adición de un coctel de sales nutritivas (Bioestimulación) en las siguientes proporciones:

- 2 g/L de PO_4HK_2 , NH_4Cl
- 0.5 g/L de citrato de sodio
- 1 g/L de KCl, 1 g/L de MgSO_4 y triple 15®,
- 15 g/L de glucosa anhidra como fuente de carbono.

Las muestras del efluente de lejía obtenida de la aceitunera local se colocaron en dos Erlenmeyer de 1000 ml hasta completar 500 y 250 ml en cada uno, respetando las correspondientes disoluciones (al 25 y al 50%) de los tratamientos planteados, para luego completar la mezcla hasta los 1000 ml con agua destilada. Para el caso de los tratamientos T4 y T5, se procedió a inocular microorganismos criogenizados y asilados previamente de una muestra de sal proveniente del Mar Muerto. Los Erlenmeyer reposaron sobre agitadores orbitales, que garantizaron un efecto vortex apropiado que asegurase las condiciones aeróbicas del ensayo. Los controles carecieron de bioestimulación, y consistieron en aguas de lejías al 50 y 25% cada una. Todos los tratamientos y controles se realizaron por triplicado. El ensayo duró 14 días y se mantuvo a una temperatura óptima de entre 25 a 30° C, durante los cuales se programaron determinaciones periódicas de los parámetros elegidos.

2.2.1. Determinaciones Periódicas del Ensayo

Durante los 14 días de ensayo, se hicieron determinaciones de pH cada 8 horas (los primeros dos días) y 24 horas (los días restantes), con un medidor de pH Pocket Pro. De forma similar se determinó la CE cada 24 horas con un conductímetro de mano de la misma marca. Para la determinación de azúcares reductores y polifenoles, se extrajo una muestra de 200 micro litros de cada repetición y control para cada tratamiento, cada 24 horas y se los conservó en una heladera a 4°C para poder ser medidas al final de la experiencia, en el Laboratorio de Análisis de Agua y Suelo, ubicado en la Facultad Regional Mendoza de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN). La variable azúcares reductores se determinó utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), propuesto por Ávila (*Ávila y col., 2012*)

Para la DQO se tomaron muestras del efluente problema sin tratamiento (día 0) y para cada tratamiento, una muestra para los días 4, 11 y 14 respectivamente. Para la DBO₅, debido a limitaciones de recursos de laboratorio, se optó por realizar dos mediciones: una para lejía original sin tratamiento y otra medición para cada tratamiento al final de la experimentación. Las determinaciones se realizaron siguiendo las consideraciones del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (ALPHA 1992) en el Laboratorio de Análisis de Agua y Suelo (UTN, Regional Mendoza)

Para la determinación de polifenoles totales, se optó por aplicar el ensayo de Folin – Ciocalteu (Fernández y col, sf.) a 3 muestras de cada tratamiento considerado al final de la experiencia, y se los comparó con valores de concentraciones iniciales de aguas de lejías tomados de bibliografía previa.

Para ver el detalle de cada una de las técnicas utilizadas en los apartados 2.1 y 2.2, consultar el [Anexo I](#) y [Anexo II](#) de este escrito.

2.2.2. Procesamiento de Datos

Los resultados obtenidos en la caracterización inicial del efluente fueron tabulados en una tabla comparativa junto con los valores máximos permitidos para el vuelco al dominio público según las normativas consideradas en este trabajo, a saber: Resolución 52/20 del DGI, Decreto 2107/2006 y Decreto Reglamentario 773/93 de la provincia de Mendoza, San Juan y La Rioja respectivamente.

Para los resultados obtenidos en el ensayo de biorremediación, en los parámetros de pH y CE se tomaron los valores promedios (y su correspondiente desvió estándar) y se realizaron curvas de seguimiento medio en función del tiempo para interpretar su evolución durante los 14 días de ensayo. Para el caso de la DQO, se tomaron las mediciones realizadas para una de las repeticiones de cada tratamiento y se registró su evolución durante el tiempo de ensayo, expresadas en porcentajes de reducción respecto al valor inicial de la lejía sin tratamiento. Mientras que, en la DBO₅, tal y como se describió en la metodología, se tomaron los valores promedios de una de las repeticiones de cada tratamiento al final del ensayo, y se los comparó con el valor de DBO₅ de la lejía sin tratamiento. Los valores finales de cada parámetro fueron comparados con las exigencias de las normativas consideradas y se extrajeron conclusiones sobre la calidad del residuo tratado. Los datos fueron procesados en panillas de caculo utilizando el Software Office Excel 2016.

Para todos los parámetros excepto DQO, se realizó un Análisis de varianza (ADEVA) y un test de Tukey para encontrar diferencias significativas entre los valores medios obtenidos en cada tratamiento al finalizar los 14 días de ensayo (336 horas).

2.2.3. Monitoreo del crecimiento Microbiológico

Como se mencionó anteriormente las curvas se construyeron a partir de un recuento en placa de microorganismos aeróbicos, utilizando la técnica de siembra pour plate (vertido en placa) que permite obtener de una muestra, el número de microorganismos viables, es decir, capaz de reproducirse. La técnica consiste en mezclar un volumen conocido de suspensión microbiana con un medio de cultivo agarizado, líquido a 40 – 50°C en cajas de Petri previamente esterilizadas, homogeneizar e incubar. Después de 3 días de incubación, las colonias se desarrollan en toda la masa del medio de cultivo y en su superficie, pudiendo realizar un conteo de colonias. Estas colonias son llamadas Unidades Formadoras de Colonia (UFC) puesto que se supone que proviene de la multiplicación y división de un microorganismo viable presente en la muestra antes de la incubación. Para la siembra se realiza al menos 3 diluciones decimales de la suspensión microbiana original en agua estéril y se coloca un volumen preestablecido en cada una de ellas en las cajas Petri con su correspondiente medio de cultivo. De las cajas sembradas se elige para el recuento, la que presente entre 30 y 300 colonias, ya que para un alto número de colonias es posible que algunas células se hayan visto imposibilitadas a dividirse por competencia, o algunas podrían fusionarse y ocasionar errores en las interpretaciones de los resultados, mientras que en placas con un recuento pequeño, la significancia estadística será baja. Por estos motivos el recuento en placas con un número de colonias dentro del intervalo mencionado es quien aporta mayor validez a efectos estadísticos (Madigan et al., 2015)

Se llevó a cabo el recuento de 2 grupos de microorganismos aeróbicos: bacterias y hongos por un lado y levaduras por el otro, para lo cual se utilizó dos medios de cultivos selectivos que permitan su crecimiento:

- Recuento en placa Agar (PCA): basado en un alto contenido nutricional que permite el crecimiento y desarrollo de bacterias aeróbicas mesófilas. Contiene triptona y extracto de levadura que se comportan como fuentes de nitrógeno y vitaminas, además de glucosa como fuente de carbono (Laboratorio Britania S.A. 2015)
- Papa Glucosado Agar (PG): en el cual la infusión de papa y el contenido de glucosa favorecen el desarrollo exuberante de hongos y levaduras (PG) (Laboratorio Britania S.A. 2015)

Para la construcción de las curvas de crecimiento se utilizaron datos de recuentos en placa (en N° organismos viables /ml de muestra) de muestras tomadas para cada uno de los tratamientos establecidos y para los días 2,3,4,5, 7, 9, 12 y 14 de ensayo. Por cada tratamiento y día considerado, se tomó 1 ml de muestra y se hicieron al menos 3 diluciones decimales para los primeros días, y hasta seis diluciones los últimos (debido a que en la medida que las poblaciones microbianas crecen son necesarias más diluciones para lograr un recuento claro y estadísticamente válido). De las diluciones se tomaron 0,1 ml y se sembraron en placas de Petri con cada uno de los medios de cultivos mencionados (previamente esterilizados) y siguiendo la técnica de siembra elegida. Se dejó solidificar y se los llevó a incubación a unos 37° C para PC y a 25°C para PG, ambos en posición invertida durante 72 horas. Luego de la

incubación se seleccionaron aquellas placas con un número de colonias de entre 30 y 300, y se procedió a registrar el número de UFC por placa. Para traducir este valor al número de microorganismo viables por ml de muestra se procedió a multiplicar las UFC por el factor de dilución correspondiente, y dividirlo por el volumen de siembra (0,1 ml). Los datos fueron tabulados y graficados a escala logarítmica para lograr que las fases exponenciales del crecimiento microbiano puedan ser apreciadas como rectas, y realizar interpretaciones de forma más prácticas en los resultados.

Para más detalles sobre la técnica de siembra utilizada y el posterior recuento de microorganismo viables, consultar el anexo III de este trabajo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización del efluente

Tal y como se planteó en la metodología, se procedió a realizar una caracterización de parámetros físico - químicos iniciales del efluente a trabajar, para conocer las condiciones desde la cuales se partía en términos de contaminación.

Como se puede apreciar en la Tabla N° 5, el efluente sin tratamiento superó ampliamente (en casi todos los parámetros considerados en la caracterización del efluente) los valores máximos permitidos según las normativas consideradas en las tres provincias claves de la producción de aceitunas de mesa. El único parámetro que estaría permitido para las tres normativas, son los sólidos sedimentables a los 10 minutos. Sin embargo, el mismo parámetro para un tiempo de sedimentación de 2 horas sobrepasó los límites máximos establecidos de forma considerable. Esto se explica porque las aguas de lejías son efluentes con sólidos suspendidos livianos, que tardan en sedimentar debido a que su peso no es lo suficientemente grande como para vencer el empuje del propio residuo.

Se destacó también, una CE excesivamente elevada y una alta concentración de materia orgánica reflejada en valores altos de DBO_5 . Según la bibliografía consultada, una parte importante de esta materia orgánica corresponde a polifenoles, que también superan ampliamente los límites máximos considerados (Maldonado 2011). El índice de biodegradabilidad es de 0,74, y según la escala definida por Hernández Muñoz corresponde a un efluente con alta biodegradabilidad con altas posibilidades de ser remediado por actividad microbiológica.

Esta caracterización amplía la información preexistente e indica que este tipo de efluentes tiene un alto potencial de contaminación, si estos son drenados a cauces o acequias del dominio público. La CE lo posiciona como aguas excesivamente salinas, con valores superiores a 4000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Wainstein, 1969) y por tanto con un alto potencial de salinización de suelos. Esto afectaría el crecimiento de la vegetación (nativa, silvestre o de cultivos aledaños) en el caso de que estas aguas logren alcanzar espacios de flora nativa, o bien se terminen mezclando con el agua para riego de cultivos locales. En este último caso, la mezcla atenuaría las consecuencias, pero sin dejar de reducir la calidad de agua de riego. Por otro lado, los valores de la Relación de Absorción de Sodio (RAS) es muy alta, y estaríamos en presencia de aguas de alta peligrosidad sódica, donde la fuerte acción dispersante del sodio provocaría la disgregación y dispersión del suelo, adquiriendo una estructura física pobre, deficiente de

aireación y lenta infiltración al mismo tiempo que elevaría el pH. Estas condiciones generarían un ambiente pobre para el crecimiento de la vegetación. (Calidad del Agua, 2018)

Tabla 5 Comparativa de valores de partida de los parámetros físicos considerados para el efluente sin tratamiento con respecto a los valores máximos permitidos según las normativas consideradas

Constituyente	Unidad	Agua de Lejía	Máximo permitido según normativa		
			Resolución 52/20 DGI (Mza)	Decreto 2107/2006 (S. Juan)	Decreto Reglamentario 773/93 (La Rioja)
CE [$\mu\text{S}/\text{cm}$]		57.533	-	1400	<3000
pH [unidades de pH]		13,09	6,5 - 8,5	6,5 - 9	5,5 - 10
Sólidos Totales	mg/L	38.020			
Sólidos Sedimentables (10')	ml/L	0,2	0,5	0,5	<0,5
Sólidos Sedimentables (2 horas)	ml/L	51	1	1	-
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	37.656	40	40	250
Sólidos Suspendidos Fijos		36.020	-	-	-
Sólidos Solubles Volátiles	mg/L	1.636	-	-	-
DQO	mg/L	68.150	75	125	<700
DBO ₅	mg/L	50.568	30	50	<200
Fenoles ²	mg/L	2410 - 4000	0,05	0,05	<0,5
Cl ⁻	mg/L	1.627	300	300	-
SO ₄ ⁻²	mg/L	0,0	250	400	-
OH ⁻	mg/L	2.651,5	-	-	-
NO ₃ ⁻		-	10	10	-
Na ⁺	mg/L	13.500	250	250	-
K ⁺		-		-	-
Ca ⁺²	mg/L	40,4	-	-	-
Mg ⁺²	mg/L	120,00	-	100	-
RAS		241	4	12	-

² Según datos recopilados en los trabajos de Gerbaldo (Gerbaldo et al, 2019) y Garrido Fernández) (Garrido Fernández, 1983)

3.2. Ensayo de Biorremediación

3.2.1. Evolución del pH

Como se muestra en los gráficos de las Figuras 2 y 3, en ambos tratamientos de aguas de lejías al 50% se observó un decrecimiento de los valores promedio del pH, producto de la actividad microbiana, respecto al control (sin bioestimulación). Se puede ver que las tendencias de valores promedio de cada tratamiento se despegan rápidamente de la tendencia del Control 1 y se mantienen distantes hasta las 200 horas de ensayo, a partir del cual el control comienza aproximarse a los valores de los tratamientos ensayados.

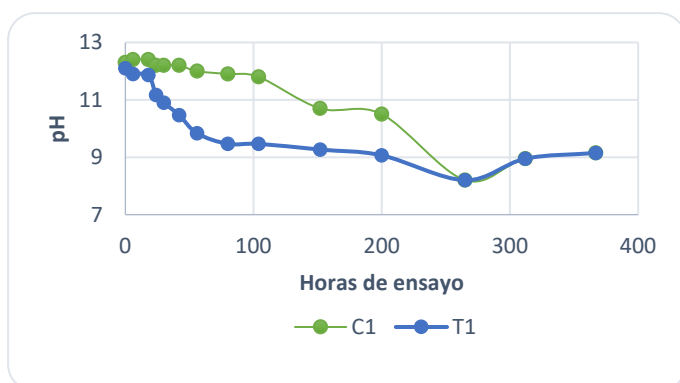


Figura 3: Evolución del pH en aguas de lejías al 50% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1) y de aguas al 50% sin bioestimulación de microorganismos (C1)

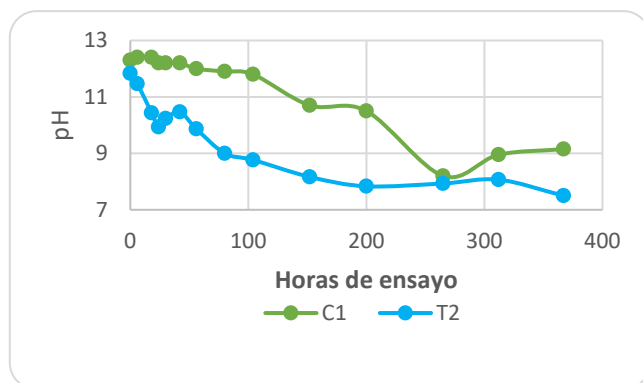


Figura 2: Evolución del pH en aguas de lejías al 50% con bioestimulación de microorganismos halotolerantes (T2) y de aguas al 50% sin bioestimulación de microorganismos (C1)

En la tabla 15 se puede ver el detalle de estas tendencias (ver Anexo IV). Para el tratamiento con microorganismos nativos (T1), el decrecimiento se mantuvo casi todo el ensayo registrando el pH promedio más bajo (8,95) a las 312 horas. Sin embargo, tras ese tiempo el parámetro experimenta un pequeño aumento llegando a las 9,15 unidades al final del ensayo.

Esto no ocurre para T2, donde se probaron los microorganismos halotolerantes. Después de una fuerte caída del pH (durante las primeras 24 horas) se experimentó un pequeño aumento durante las 30 y 42 horas de ensayo, a partir del cual el comportamiento del pH vuelve a ser decreciente hasta alcanzar un valor promedio final casi cercano a la neutralidad.

En promedio, el T1 logró una reducción de un pH inicial de 12,1 a uno final de 9,15, mientras que el T2 pasó de un valor promedio de 11,83 a 7,5 al finalizar el ensayo. El control por su parte, solo logró una reducción de 12,3 a 9,15

Comparativamente, el T2 arrojó mejores resultados que el T1. La caída del parámetro fue más rápida y alcanzó valores más óptimos en términos de tratamiento de efluentes. Sin embargo, el T1 no dejó de ser efectivo ya que al término de las 265 horas de ensayo se obtuvo un valor por debajo del valor máximo permitido por las tres normativas estudiadas.

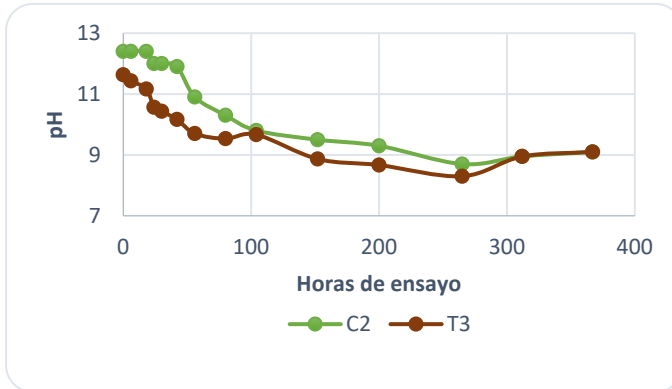


Figura 4: Evolución del pH en aguas de lejjás al 25% con bioestimulación (T3) y de aguas al 25% sin bioestimulación de microorganismos (C2)

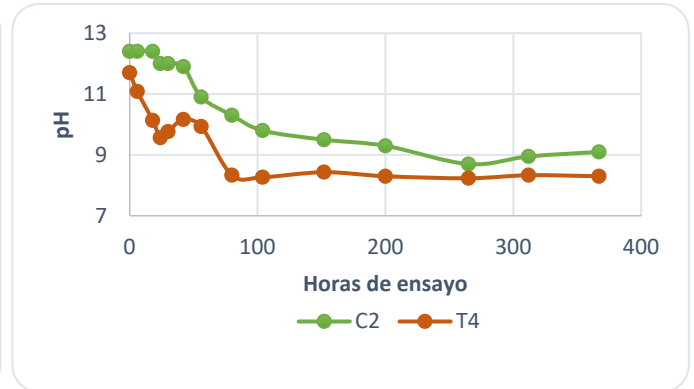


Figura 5: Evolución del pH en aguas de lejjás al 25% con bioestimulación de microorganismos halotolerantes(T4) y de aguas al 25% sin bioestimulación de microorganismos (C2)

Para los tratamientos al 25% de aguas de lejjás, se observó que la tendencia de valores promedio de pH para los microorganismos nativos y halotolerantes fueron decrecientes, a lo largo de todo el ensayo (Figura 4 y Figura 5)

Además, la curva de valores promedios para T4 se separó más rápidamente del control C2 en comparación con la curva T3 respecto al mismo control durante primeras horas del ensayo. Este comportamiento también fue similar en los tratamientos al 50% de lejjás (Figura 4 y Figura 5). De esta manera para las primeras 100 horas de ensayo el T4 arrojó valores promedios más bajos que el T3. En ambos casos la tendencia de los valores promedios del control C₂ parece alcanzar los valores registrados en las tendencias del T3 y T4 después de las primeras 100 horas. Esto no ocurrió en el T1 y T2 donde las diferencias en las tendencias de valores promedios respecto al control se mantenían hasta las 200 horas de ensayo.

La tendencia decreciente fue continua y sin picos de alza a considerar para los microorganismos nativos (T3) hasta las 312 horas de ensayo, donde al igual que los tratamientos al 50% de lejjás, se alcanzó el valor promedio mínimo de pH. Para la última medición este parámetro experimentó un incremento llegando a las 9,10 unidades de pH al final del ensayo. Este valor final alcanzado coincidió con el valor final del C₂.

Para los halotolerantes (T4) se observó que luego de una fuerte reducción (que alcanzó un pH promedio 9,77 a las 30 horas de ensayo) el parámetro logró un pequeño aumento a las 42 horas de ensayo, para después mantener una tendencia decreciente que generó un pH promedio final de 8,30

En promedio, el T3 logró una reducción de un pH inicial de 11,63 a uno final de 9,10, mientras que el T4 pasó de un valor promedio de 11,7 a 8,3 al finalizar el ensayo. El control por su parte, solo obtuvo una reducción de 12,4 a 9,10

En la figura 6 y 7, se puede apreciar que los tratamientos con microorganismo halotolerantes fueron quienes registraron los valores promedios más bajos respecto a los nativos y al control correspondiente, a lo largo de todo el ensayo. Esto ocurrió tanto en los tratamientos

al 50 y 25% de aguas de lejjas. También son los tratamientos que mantienen los valores más distantes hacia el control a lo largo de toda la tendencia de valores.

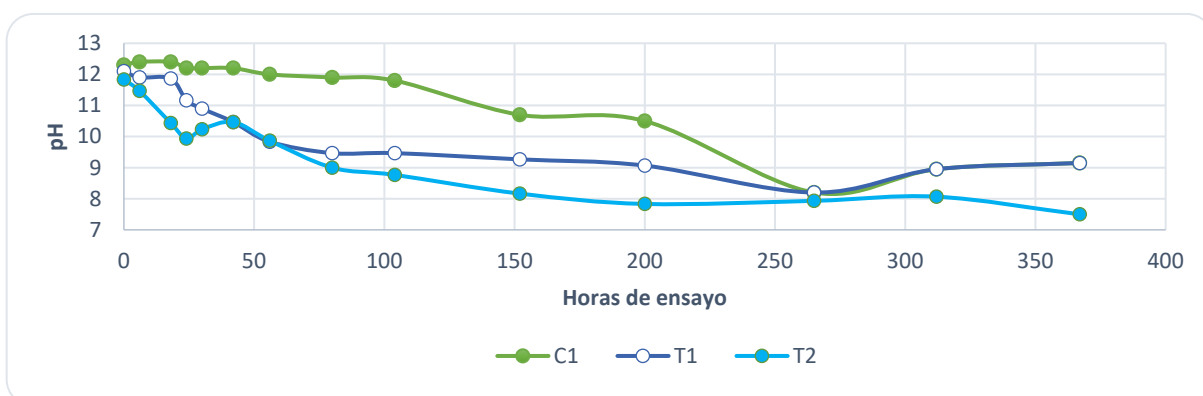


Figura 6: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejjas al 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T3), halotolerantes (T4) y el control sin bioestimulación (C2).

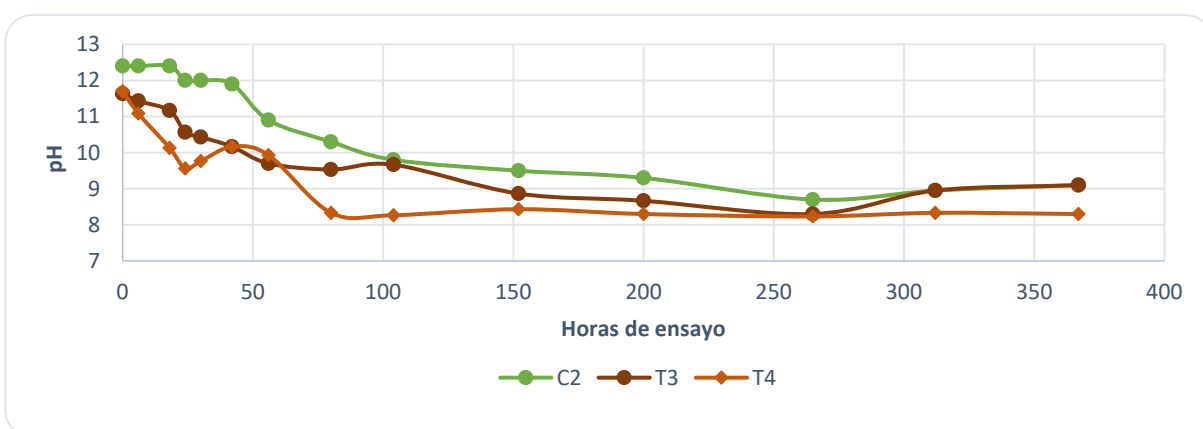


Figura 7: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejjas al 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T3), halotolerantes (T4) y el control sin bioestimulación (C2).

Si integramos todas estas tendencias de valores promedios para T1, T2, T3 y T4 en un gráfico (Figura 8), podemos visualizar que los tratamientos con microorganismos halotolerantes siguen siendo los que registraron valores más bajos de pH en la mayor parte del rango temporal del ensayo. Además, que se advierte que la bioestimulación de microorganismos halotolerantes en lejjas al 50%, es quien mostró la secuencia de valores más bajos a partir de las 150 horas de ensayo. Según el ADEVA y la posterior prueba de Tukey (Tabla 6), es posible afirmar que al final del ensayo (a los 14 días de biorremediación) los tratamientos mediados por microorganismos halotolerantes son los que obtienen mejores resultados en la de reducción del pH ya que no solo son los que mostraron los valores más chicos, sino también que sus medias parecen tener diferencias significativas con el resto de las medias de los tratamientos ensayados ($\alpha=0,05$). Por otro lado, los tratamientos mediados por microorganismos nativos parecen no tener diferencias con el control respectivo. Los mejores resultados que observamos de los tratamientos con halotolerantes respecto al resto, probablemente se deba a las condiciones de salinidad del efluente que proporciona condiciones ambientales extremas

para los cuales los halotolerantes tienen mejores mecanismos de defensa y de adaptación que los nativos.

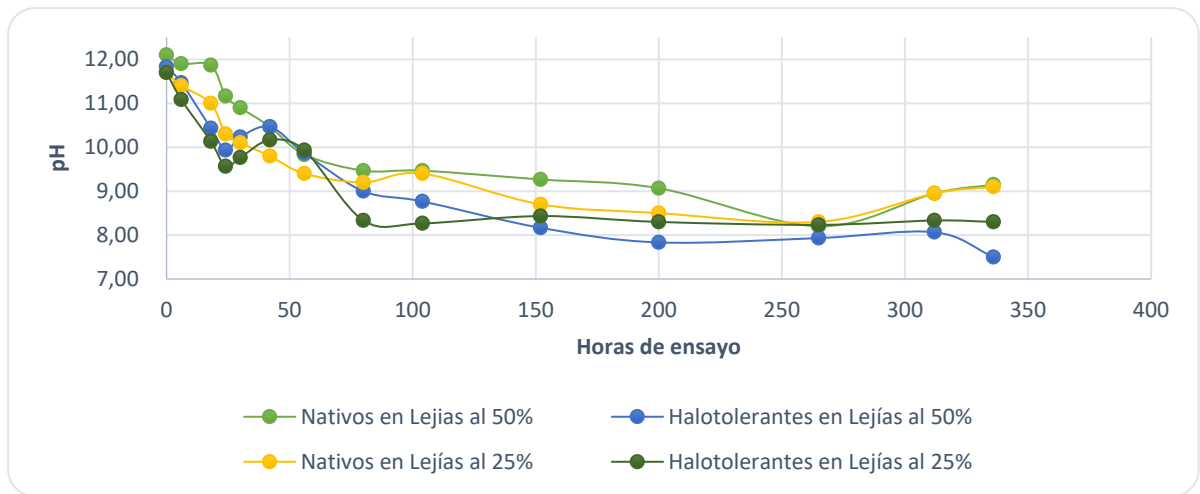


Figura 8: Curvas de evolución del pH promedio en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4).

Tabla 6: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para los valores medios de pH obtenidos al final del ensayo (día 14) de los tratamientos estudiados

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	18	0,95	0,93	1,90

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	6,57	5	1,31	47,78	<0,0001
Tratamiento	6,57	5	1,31	47,78	<0,0001
Error	0,33	12	0,03		
Total	6,90	17			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,45480

Error: 0,0275 df: 12

Tratamiento	Means	n	S.E.	
T1	9,15	3	0,10	A
C1	9,15	3	0,10	A
C2	9,10	3	0,10	A
T3	9,10	3	0,10	A
T4	8,50	3	0,10	B
T2	7,50	3	0,10	C

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)

3.2.2. Evolución de la CE

Para el análisis de resultado del comportamiento de la Conductividad Eléctrica, se tomaron los promedios de cada tratamiento para cada tiempo medido, y se construyó su respectiva curva de evolución. También se comparó el promedio de cada tratamiento con su respectivo control al final del ensayo, para encontrar diferencias significativas. En la siguiente tabla (Tabla 7) se exhiben los valores de CE expresados en milisiemens por cm. Es importante remarcar que la dilución al 50 y al 25%, tal y como se plantean en los tratamientos, supone una reducción del mismo porcentaje de la CE por lo que se tratará de realizar un análisis

comparativo a partir de la CE medida en el tiempo 0 del experimento y no de la CE de la que parte el efluente antes del tratamiento.

Respecto a los tratamientos al 50% de aguas de lejías se observa que solo el T1 exhibió una reducción del valor promedio del parámetro cercano al 29%, ya que el T2 al final del experimento mostró un valor promedio superior al valor promedio de partida en tiempo 0. Posiblemente esto se deba a la evaporación de la solución en los erlenmeyers donde se experimentaban las repeticiones de dicho tratamiento; al evaporarse agua se aumenta la concentración de sales para igual contenido de sales. Otra explicación de este comportamiento, es que haya existido una liberación de sales fijadas desde los microorganismos halotolerantes producto de su muerte, ya que hasta las 80 horas de ensayo la tendencia era decreciente, a partir del cual el parámetro aumentó (incluso por encima del valor promedio medido en el tiempo 0).

Tabla 7 Evolución de los valores promedio de la CE (en ms/cm) durante 367 horas de ensayo para los tratamientos con bioestimulación al 50% y 25% de aguas de lejías de microorganismos nativos y halotolerantes

Horas de ensayo	Lejías al 50%			Lejías al 25%		
	C ₁	Media T1	Media T2	C ₂	Media T3	Media T4
0	36,64	33,94	34,10	22,16	18,01	19,87
24	30,96	28,18	31,40	17,99	17,12	15,55
42	29,42	25,65	28,98	14,89	14,84	17,79
56	28,49	23,95	29,40	13,82	14,33	16,60
80	27,62	23,85	29,83	13,10	15,41	17,56
152	26,80	27,02	38,48	12,91	16,21	21,80
200	23,64	24,92	46,64	13,00	14,17	19,74
265	25,45	25,86	43,36	17,24	16,22	18,65
321	24,47	24,47	46,50	16,41	15,12	21,07
336	23,94	23,94	36,85	15,35	14,53	18,53
% Reducción	35%	29%	-8%	31%	19%	7%

A pesar de que para T1 se obtuvieron buenos resultados, el control presentó una reducción superior cercana al 35%. En todos los casos (C1, T1 y T2) el valor final de CE estuvo muy por encima de los valores permitidos máximos para las legislaciones consideradas en este trabajo.

Para los tratamientos al 25% de aguas de lejías, esta reducción fue menor, cercana al 31% para el control, 19% para el T3 y 7% para el T4. A diferencia de lo que se mostró en los tratamientos al 50% de lejías, el tratamiento con microorganismos halotolerantes bioestimulados (T4) si presentó una reducción respecto a su valor promedio inicial, sin embargo, está lejos de la reducción detectada para el control (31%). Al igual que en los tratamientos al 50% de lejías, los tratamientos con bioestimulación de microorganismos nativos y halotolerantes al 25% de lejías, no obtuvieron mejores resultados que el control respectivo. Esto puede explicarse por el hecho de que la bioestimulación implica el agregado de nuevas sales, y por tanto el nivel de salinidad con la que empiezan los tratamientos

bioestimulados es superior a los controles, haciendo que la reducción sea un poco más difícil. Sin embargo, en ambos grupos de tratamientos la tendencia fue decreciente.

En la figura 9 se muestran las curvas de evolución de la CE para todos los tratamientos y los dos controles de cada grupo. Se observa que los valores promedio de los tratamientos al 25% estuvieron por debajo a los de las lejías al 50%, debido al efecto de dilución del efluente. En ambos casos, podemos ver que la bioestimulación de halotolerantes generó valores promedio mayores que los nativos y el control respectivo, mientras estos mostraron tendencias más o menos similares a lo largo de todo el ensayo. Al final del ensayo fueron los controles de ambos grupos quienes arrojaron los valores promedio más bajos de CE

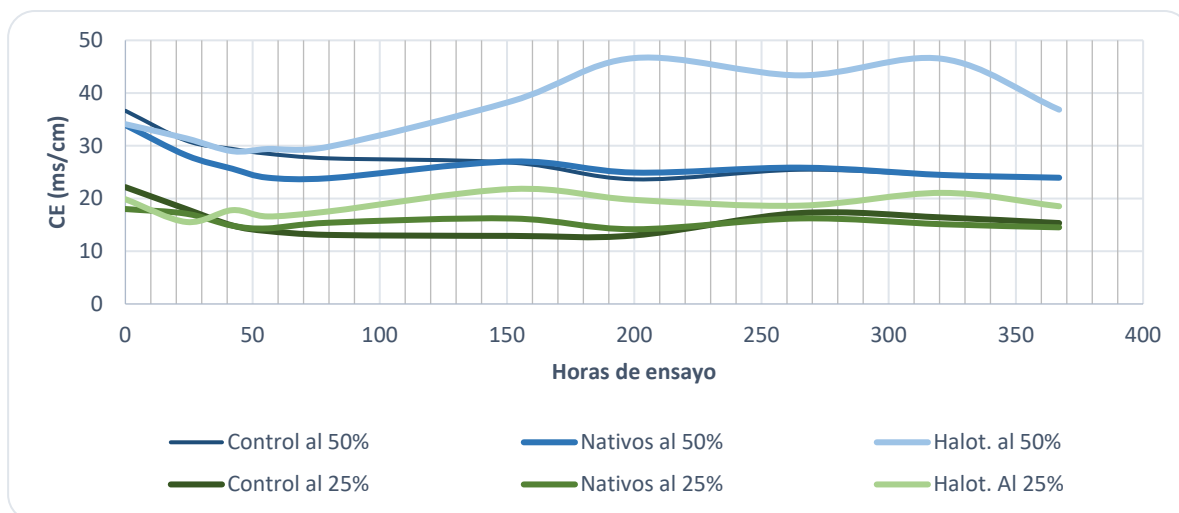


Figura 9: : Curvas de evolución de la CE promedio (en ms/cm²) en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2).

Según el ADEVA y la posterior prueba de Tukey (Tabla 8), es posible afirmar que al final del ensayo (a los 14 días de biorremediación) los tratamientos no generan mejores resultados que cada control respectivo. Al parecer el C1 y el T1 no parecen tener diferencias significativas ($\alpha=0,05$) al igual que C2 y T3. Mientras que T2 y T4 (ambos tratamientos con microorganismos halotolerantes) presentan diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Tabla 8 Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)

Analysis of variance table (Partial SS)					
S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	1020,00	5	204,00	319,14	<0,0001
Tratamiento	1020,00	5	204,00	319,14	<0,0001
Error	7,67	12	0,64		
Total	1027,67	17			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=2,19271

Error: 0,6392 df: 12

Tratamiento	Means	n	S.E.	
T2	36,85	3	0,46	A
T1	23,94	3	0,46	B
C1	23,94	3	0,46	B
T4	18,53	3	0,46	C
C2	15,35	3	0,46	D
T3	14,53	3	0,46	D

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$)

3.2.3. Evolución de la DQO y DBO₅

Por su parte los resultados de DQO se presentan en el gráfico de la figura 10 como porcentajes de reducción de cada tratamiento y controles, respecto al valor inicial medido de la lejía sin tratamiento. Se observa que todos los tratamientos lograron una reducción cercana al 98 % al final del experimento, lo cual coincide con la actividad microbiana encontrada en los análisis microbiológicos y evidenciada en parámetros como el pH, donde también se registró una reducción de parámetros al final del ensayo. Respecto a cada tratamiento, el T3 comenzó con valores por encima de su respectivo control (C2) hasta las 192 horas de ensayo, a partir del cual su curva se posicionó por debajo. Incluso se notó un punto que pareciera atípico a las 96 horas (día 4) marcando un pico muy alto de reducción que decrece con igual intensidad para las 192 horas (los valores atípicos son comunes en sistemas biológicos). El T1 también inició su curva de reducción porcentual por encima del control (C1), pero esta tendencia se mantuvo durante una primera parte del ensayo (al igual que el T3), ya que a partir de las 150 horas (aproximadamente) comienza a ubicarse por debajo del control hasta el final del ensayo. Por su parte el T2 mostró valores por debajo de su control (C1) y por debajo de todos los tratamientos estudiados durante todo el periodo de ensayo. Para este tratamiento, la reducción de la DQO fue lenta durante las primeras horas, pero a partir de las 192 horas aumentó de forma considerable y logró valores similares al resto de los tratamientos al final del ensayo. Por último, el T4 fue quien arrojó la curva con mejor desempeño ya que mantuvo valores de reducción de la DQO por encima de su control, y a partir de las 150 horas (aproximadamente), valores por encima de todos los tratamientos. Sin embargo, al final del ensayo logra una reducción igual que sus pares.

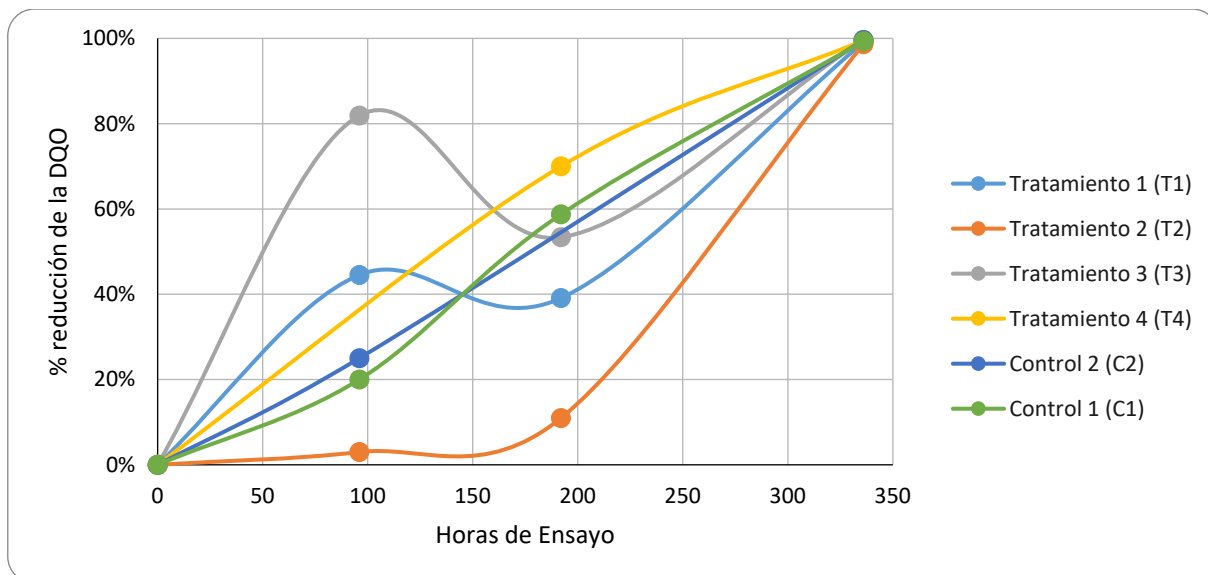


Figura 10: Curvas de reducción promedio (%) de la DQO a lo largo de 30 días de ensayo en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2).

Estos resultados son coherentes con los encontrados para la DBO₅. En la tabla siguiente (Tabla 8) se presentan los valores finales de DBO₅ para cada tratamiento, medidos en muestras correspondientes a las 367 horas finales del ensayo. Se puede ver que, en todos los tratamientos la DQO₅ se redujo el 99,9 % comparado con el valor inicial medido en la caracterización del efluente (presentada en el apartado 3.1 de este trabajo). Estos resultados también son coherentes con el alto nivel de biodegradabilidad del efluente observada en el

apartado 3.1. El alto contenido de materia orgánica oxidable en relación al total de materiales oxidables hace posible que los microorganismos sean capaces de reducir la DQO a niveles muy bajos. En relación a esto, es interesante mencionar que a pesar de que el índice de biodegradabilidad está alrededor de 0,74 la DQO se redujo casi en su totalidad, posiblemente debido al hecho de que algunos microorganismos hayan oxidado compuestos inorgánicos. Sin embargo, este aspecto debería ser estudiado con mayor profundidad en estudios que hagan foco en estos parámetros.

Tabla 9: DBO₅ finales para cada tratamiento considerado en el ensayo, respecto al valor inicial encontrado según caracterización del efluente previo al ensayo

Tratamientos	DBO ₅ en mg/L
Caracterización Inicial	50.568
T1: Bioestimulación de Microorganismos nativos al 50% de aguas de lejías	19,20 ± 2,8
T2: Bioestimulación de Microorganismos halotolerantes al 50% de aguas de lejías	29,20 ± 7,6
T3: Bioestimulación de Microorganismos nativos al 25% de aguas de lejías	19,65 ± 3,9
T4: Bioestimulación de Microorganismos halotolerantes al 25% de aguas de lejías.	24,95 ± 6,15

Por otro lado, el ADEVA y la prueba de Tukey para las medias de la DBO₅ obtenidas al finalizar el ensayo para cada tratamiento considerado, no encontraron diferencias significativas (Tabla 10).

Tabla 10: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para la DBO₅ (en mg/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
DBO (mg/L)	12	0,46	0,26	23,46

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	202,97	3	67,66	2,27	0,1570
Tratamiento	202,97	3	67,66	2,27	0,1570
Error	238,05	8	29,76		
Total	441,02	11			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=14,26305

Error: 29,7562 df: 8

Tratamiento	Means	n	S.E.
T2	29,20	3	3,15 A
T4	24,95	3	3,15 A
T3	19,65	3	3,15 A
T1	19,20	3	3,15 A

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

3.2.4. Evolución de la concentración de azúcares

La figura 11 muestra las curvas de evolución de la concentración media de azúcares reductores a lo largo de periodo de ensayo. En la misma se observa que todos los tratamientos experimentaron una fuerte reducción de la concentración de azúcares, logrando al final del

experimento una concentración por debajo de los 5 g/L. Esto se explica por el efecto de la bioestimulación, que parte de un agregado de mezcla nutritiva (con glucosa como fuente de carbono y otras sales) para estimular el metabolismo de los microorganismos y proporcionar un empuje a la actividad depuradora de los mismos. Estos resultados son coincidentes con los resultados de la DQO y del pH, ambos con tendencias decrecientes debido a la actividad microbiana. En este sentido, podemos decir que las tendencias no marcaron un tratamiento aparentemente más efectivo que el resto; los tratamientos T1, T3 y T4 mantuvieron comportamientos similares, mientras que el tratamiento T2 si exhibió una tendencia claramente distante del resto, aunque es posible que se deba a un error en la fórmula de la solución nutritiva, ya que parte de valores iniciales de 20 g/L a diferencia del resto que parten de 15 g/L. Respecto a los controles, en la figura 12 no es posible apreciar la evolución de la curva, pero si las aislamos y las graficamos en un nuevo grafico (Figura 12) se aprecia que ambos controles mostraron tendencias decrecientes similares.

A pesar de que los tratamientos mantuvieron tendencias similares, se puede notar que el T4 y T3 lograron mejores resultados al corto plazo, ya que para las 150 horas de ensayo las concentraciones alcanzaron valores muy cercanos al valor conseguido al final del ensayo. Al término del ensayo, T4 arrojó la menor concentración de azúcares (1,2 g/L), seguido de T1 y T2 (2,2 g/L) y por último T3 (3,6 g/L). Es interesante mencionar que a pesar de que el tratamiento T2 partió de una concentración inicial superior, al final del ensayo logró mejores resultados que T3, que comenzó el ensayo desde una concentración menor.

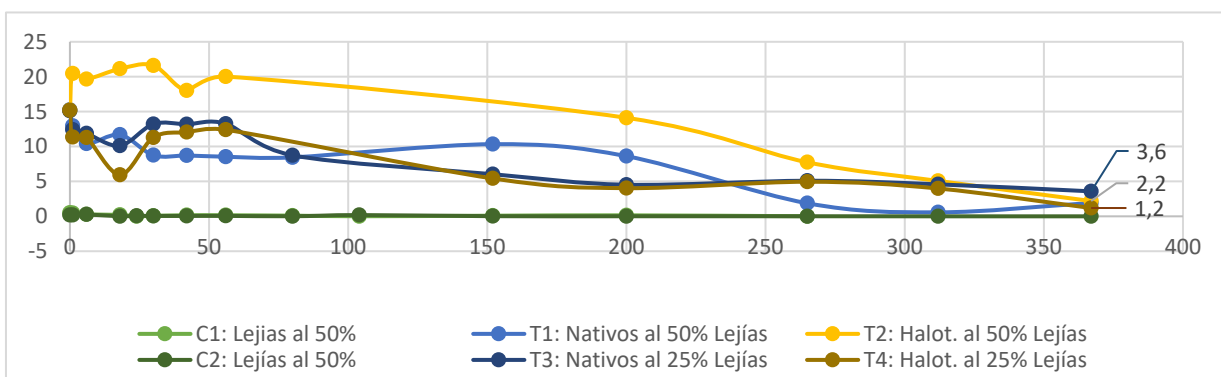


Figura 11: Curvas de tendencia de la concentración de glucosa (en g/L) a lo largo de 367 horas de ensayo en aguas de lejías al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3), halotolerantes (T2 y T4) y sus respectivos controles (C1 y C2)

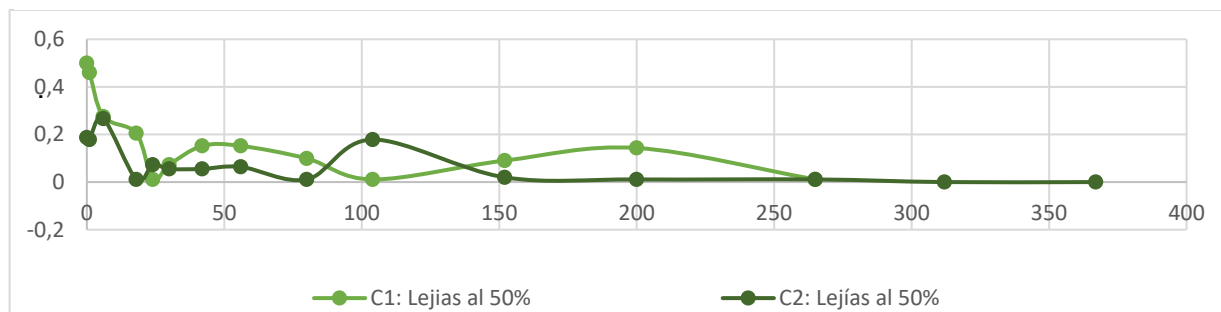


Figura 12: Curvas de tendencia de la concentración de glucosa (en g/L) a lo largo de 367 horas de ensayo en aguas de lejías para los controles C1 y C2.

Según el ADEVA y la prueba de Tukey (Tabla 11), todos los tratamientos parecieron tener el mismo efecto en la reducción del contenido de azúcares reductores al finalizar el ensayo (336 horas) ya que no mostraron diferencias significativas entre sus medias para un α de 0,05.

No obstante el T3 es el único que mostró diferencias con su control (C2), por lo que podemos asumir que es quien registra el mayor valor de azúcares reductores al final del ensayo. Respecto a los controles no se encontraron diferencias significativas entre sus medias. Probablemente los tratamientos T1, T2 y T4 logren los mismos resultados que los controles, lo cual es positivo porque hablaría de una gran reducción de azúcares que llega a niveles similares a los controles quienes partieron de concentraciones de azúcares muchísimo más bajas, al no proporcionarles la mezcla nutritiva al inicio de la experiencia (que entre sus ingredientes contenía el agregado de 15 g/L de glucosa)

Tabla 11: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para azúcares reductores (en g/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Azúcares (gr/L)	18	0,60	0,44	84,80

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	28,54	5	5,71	3,63	0,0313
Tratamiento	28,54	5	5,71	3,63	0,0313
Error	18,87	12	1,57		
Total	47,41	17			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=3,43948

Error: 1,5728 df: 12

Tratamiento	Means	n	S.E.
T3	3,58	3	0,72 A
T2	2,19	3	0,72 A B
T1	1,91	3	0,72 A B
T4	1,19	3	0,72 A B
C1	0,01	3	0,72 B
C2	0,00	3	0,72 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

3.2.5. Evolución de la concentración de polifenoles

Con respecto a los polifenoles, en la Tabla 12 se muestran las concentraciones promedio finales de polifenoles en mg/l obtenidas de tres muestras tomadas al final del ensayo para cada tratamiento considerado.

Estos valores se los comparó con las concentraciones de polifenoles para aguas de lejjás sin tratamiento, según bibliografía consultada.

Tabla 12: Concentración media final de polifenoles (en mg/L) para cada tratamiento al 50% y 25% con bioestimulación de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4)

Tratamiento	mg/L
T1	4,653 ±1,07
T2	4,802 ±0,19
T3	2,001 ±0,47
T4	2,908 ±0,38

De esta comparación se puede resaltar que todos los tratamientos obtuvieron un buen rendimiento en la degradación de este compuesto, ya que los valores finales de su concentración cayeron abruptamente luego de los tratamientos aplicados. Para los tratamientos al 50% de lejías, estos valores finales fueron casi dos unidades más altas que los tratamientos al 25% de lejías, lo cual se explica por el factor de dilución que implica el propio tratamiento; al diluir una solución sin cambios en el balance de masas, una misma concentración decrece porque habrá igual masa en un volumen superior de solución. Dentro de cada grupo de tratamiento, se puede ver también una diferencia ligada a la actividad de los microorganismos. Tanto las lejías al 50% como al 25% que fueron tratadas con microorganismos nativos arrojaron valores finales de concentración promedio un poco más bajos que los respectivos tratamientos mediados con microorganismos halotolerantes

Sin embargo, esta diferencia es muy pequeña y no significativa (Tabla 13), por lo que los resultados obtenidos no proporcionan evidencia suficiente como para sospechar que los microorganismos halotolerantes sea malos descomponedores respecto a los nativos, ya que en ambos casos se logró reducir la concentración de polifenoles desde valores cercanos a los 2410 – 4000 mg/l (según bibliografía consultada) a valores que no superan la decena de mg/l.

Tabla 13: Salida ADEVA y prueba de Tukey del software Infostat para la concentración de polifenoles (en mg/L) de los tratamientos estudiados al final del ensayo (día 14)

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Pol. en mg/L	12	0,84	0,79	17,36

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	16,77	3	5,59	14,39	0,0014
Tratamiento	16,77	3	5,59	14,39	0,0014
Error	3,11	8	0,39		
Total	19,88	11			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=1,62955

Error: 0,3884 df: 8

Tratamiento	Means	n	S.E.
T2	4,80	3	0,36 A
T1	4,65	3	0,36 A
T4	2,91	3	0,36 B
T3	2,00	3	0,36 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

3.2.6. Monitoreo Microbiológico

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran las curvas de crecimiento para cada grupo de organismos considerados en la metodología y para cada tratamiento estudiado.

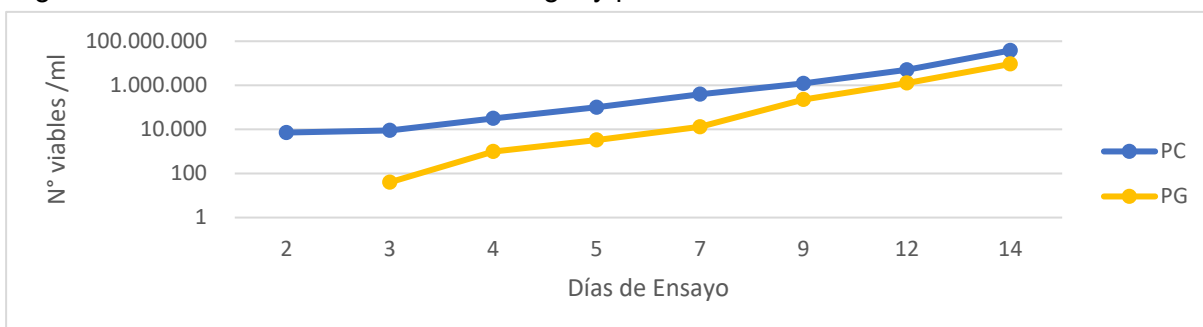


Figura 13: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG, expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos nativos bioestimulados al 50% de lejías

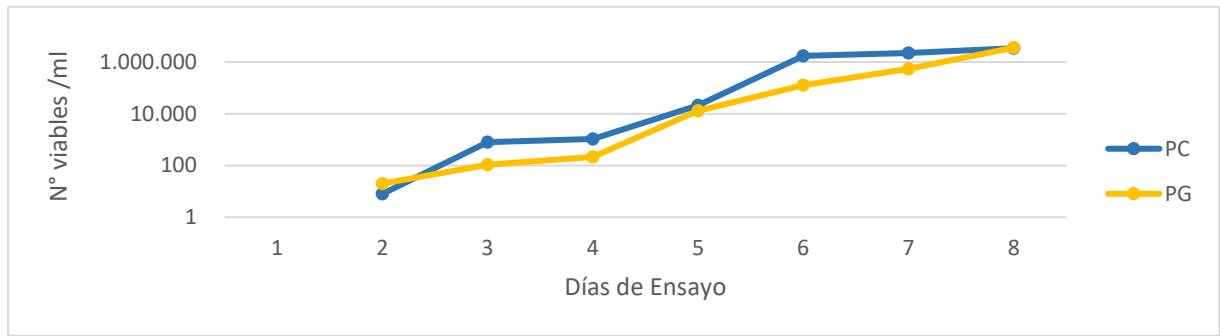


Figura 14: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG), expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos nativos bioestimulados al 25% de lejjas

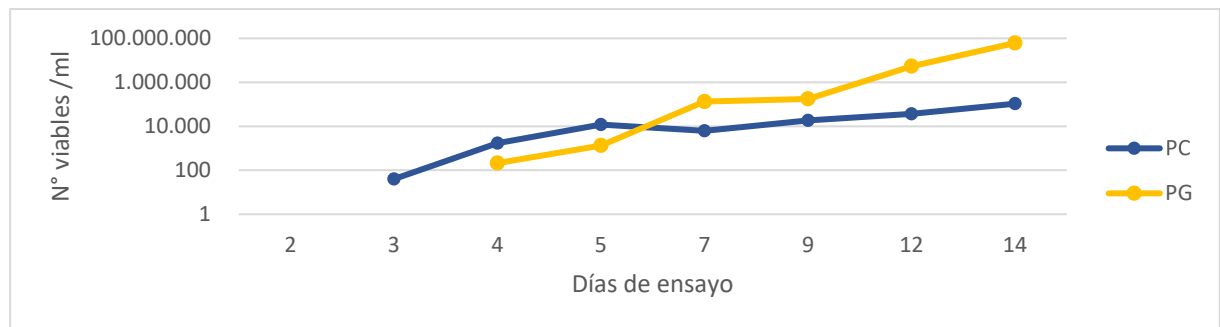


Figura 16: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG), expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos halotolerantes bioestimulados al 50% de lejjas.

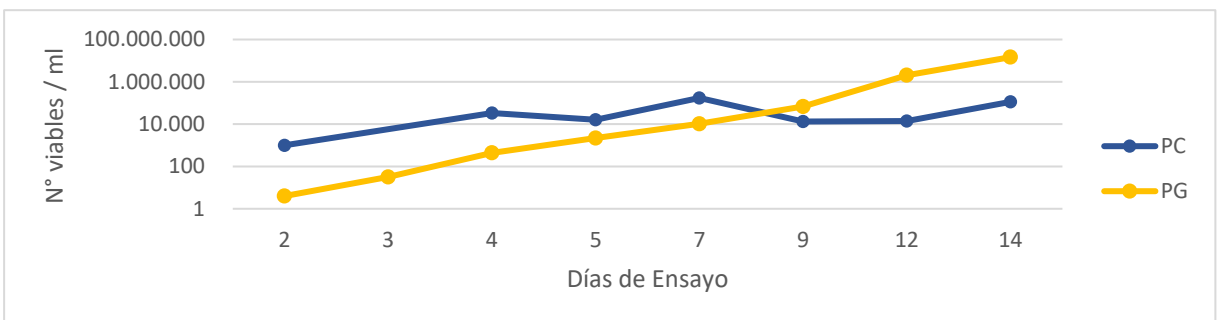


Figura 15: Curvas de crecimiento poblacional de microorganismos mesófilos aeróbicos (PC) y de hongos y levaduras (PG), expresados en UFC por ml de muestras correspondiente al tratamiento de microorganismos halotolerantes bioestimulados al 25% de lejjas.

Para los tratamientos de microorganismos nativos tanto al 50 como al 25% de lejjas, se pueden ver que las tendencias del crecimiento microbiano fueron similares, aunque al término del ensayo los microorganismos que crecieron al 25% de lejjas (T3) alcanzaron una población máxima menor que las que crecieron al 50% del efluente (T1) (Figura 13 y 14). Esto está relacionado con el efecto de dilución, que reduce la carga microbiana original y por tanto la base de microorganismos activos a partir de la cual se inicia el crecimiento (esto también se observa en las curvas correspondientes a los microorganismos halotolerantes). En ambos tratamientos (T1 y T3) las curvas de crecimiento tuvieron pendientes positivas tanto para los microorganismos mesófilos aeróbicos como para la de hongos y levaduras. A lo largo de todo el ensayo, fueron las bacterias mesófilas quienes mostraron valores más altos de N° microorganismos viables /ml de efluente, sin embargo, esto no limitó el crecimiento de hongos y levaduras cuyas poblaciones se mantuvieron en alza (aunque en menor medida) hasta el final de la experiencia (Figura 13 y 14)

Con respecto a los microorganismos que crecieron en los tratamientos T2 y T4 (Figura 15 y 16), en ambos casos se obtuvieron curvas de crecimiento que se mantuvieron en incremento continuo durante los 14 días de ensayo (tanto en bacterias mesófilas como hongos y levaduras). Asimismo, las curvas de crecimiento de las bacterias mesófilas de cada tratamiento solo se mantuvieron por encima de las curvas de hongos y levaduras durante una primera parte de la Biorremediación estudiada, ya que las mismas se cruzan en los días 6, para T2 y 8 para el T4. Al igual que en T4, las bacterias mesófilas aeróbicas del T2 parecen tener el mayor crecimiento microbiano respecto al grupo de hongos levaduras durante la primera parte del ensayo. Superando el día 6 (y en el caso del T4 el día 8) la curva de las bacterias mesófilas cae por debajo de la curva de crecimiento correspondiente a hongos y levaduras, y este último comienza a separarse cada vez más hasta el final del ensayo. Al término de los 14 días, los valores de UFC/ml fueron al menos 100 veces más grandes para los hongos y levaduras que para las bacterias mesófilas aeróbicas

3.2.1. Discusión General de los resultados según las normativas provinciales que regulan la descarga al dominio público de efluentes industriales

En la tabla 13 se presentan los valores finales de cada tratamiento por cada parámetro considerado y se los compara con los valores máximos permitidos de cada normativa que regula la descarga de efluentes industriales al dominio público en las provincias enfocadas en este trabajo. Se puede ver que los mejores resultados se obtuvieron para la DBO₅, donde todos los valores finales de los tratamientos ensayados se ajustan a las normativas. Sin embargo, esto no ocurrió para la DQO donde ninguno de los tratamientos presentó valores finales por debajo de alguna normativa considerada. Esto implica que si bien la descomposición de materia orgánica fue positiva, ya que se logró una reducción importante de la DBO₅, probablemente todavía exista una cantidad importante de compuestos inorgánicos que no pudieron ser oxidados en ninguno de los tratamientos y que mantuvieron una DQO elevada al final del ensayo. Por su parte la CE y la concentración de polifenoles, tampoco presentó tratamientos cuyos valores finales puedan ser aceptados por alguna de las normativas, a pesar de que en ambos parámetros lograron buenos niveles de reducción. Por último, en el caso del pH, solo el T2 mostró valores dentro del rango permitido en cada una de las normativas, por lo que podemos decir que es el más efectivo para este parámetro. El T1 solo podría ser permitido por la normativa de La Rioja, mientras que para los T3 y T4 sus valores finales de pH cumplieron las normativas correspondientes a San Juan y La Rioja, no así para Mendoza. Considerando los valores máximos permitidos en cada normativa, es posible describir a la Resolución 52/20 DGI (correspondiente a la provincia de Mendoza) como la más exigente, y es la que se tomará como referencia para analizar las condiciones finales del efluente tratado. En este sentido se observa que solo el T2, y solo para el parámetro pH, presentó valores finales dentro del rango permitido por la normativa más exigente, el resto de los parámetros quedaron por encima de los valores máximos permitidos. Esto describe que, aunque la depuración de las aguas de lejías haya tenido buenos resultados, la misma no alcanzó para lograr las condiciones de descarga al dominio público establecidas en las normativas consideradas.

Tabla 14 Comparación de Valores post tratamiento de los parámetros de contaminación físico químico considerados en el ensayo, con los valores máximos permitidos de cada normativa correspondiente a la provincia de Mendoza, San Juan y Mendoza

Parámetro	Tratamientos				Max. Permitido			Cumplimiento
	T1	T2	T3	T4	(1) Resolución 52/20 DGI (Mza)	(2) Decreto 2107/2006 (S. Juan)	(3) Decreto Reglamentario 773/93 (La Rioja)	
pH	9,15	7,50	8,67	8,3	6,5 - 8,5	6,5 - 9	5,5 - 10	Solo Cumple T2 en (1), (2) y (3)
CE (ms/cm)	23,94	36,85	14,53	18,53	-	1,4	< 3	Ningún tratamiento Cumple las normativas
DQO (mg/L)	615	835	203	342	30	50	< 200	Ningún tratamiento Cumple las normativas
DBO ₅ (mg/L)	19,20	29,2	19,65	24,95	30	50	< 200	Todos los tratamientos cumplen todas las normativas
Polifenoles (mg/L)	4,65	4,80	2,00	2,91	0,05	0,05	< 0,5	Ningún tratamiento Cumple las normativas

4. CONCLUSIONES

La caracterización inicial del efluente refuerza la descripción inicial planteada en el marco teórico de este trabajo. Las aguas de lejías se tratan de efluentes muy alcalinos con alta conductividad eléctrica y una gran carga orgánica, reflejada en valores de DQO y DBO₅ muy elevados. Además, se puede apreciar que tienen una carga iónica muy grande, que supera los valores máximos permitidos para cloruros, sodio y magnesio (Cl⁻, Na⁺, Mg⁺²)

Respecto al ensayo de bioestimulación, los 4 tratamientos estudiados generaron una reducción de casi todos los parámetros de contaminación considerados (Tabla 14). Los tratamientos demostraron ser eficientes en la reducción del pH ya que el mismo se redujo en todos ellos después de 14 días de ensayo. Entre estos, los halotolerantes demostraron ser los de mejor desempeño en la reducción de este parámetro (especialmente los halotolerantes al 50% de aguas de lejías)

A diferencia del pH, en la CE ninguno de los tratamientos logró valores dentro de los permitidos por la normativa más exigente. Sin embargo, es notable destacar que todos, excepto los halotolerantes al 50% de lejías, registraron una reducción considerable de entre el 7 y 35% al final del ensayo (Tabla 14). En términos de descontaminación, tres de los cuatro tratamientos ensayados arrojaron resultados positivos que nos hacen pensar que la respiración aeróbica en aguas de lejías a cargo de microorganismos previamente bioestimulados, ayudó a reducir la CE de estos residuos líquidos altamente salinos. En este sentido el tratamiento de mejor desempeño fueron los microorganismos nativos al 50% de aguas de lejías, aunque curiosamente no logró superar la reducción del 35% que se observó en los controles. Según los datos recolectados, no existen indicios para pensar que los halotolerantes tengan mejor

desempeño en la reducción de este parámetro respecto a los microorganismos nativos, aunque esta comparación merece un estudio más profundo y focalizado en la CE.

La DQO y la DBO₅ también registraron fuertes caídas al final del ensayo, demostrando tener un buen desempeño en la reducción de ambos parámetros, a pesar de que ninguno de los tratamientos logró reducirlos al máximo valor permitido por la normativa más exigente. La experiencia no arrojó datos suficientes que puedan argumentar un mejor desempeño en la reducción de la DBO₅ por parte de alguno de los tratamientos respecto al resto, pero debido a que todos lograron un porcentaje de reducción bastante aceptable (alrededor del 99%) se puede concluir que cualquiera de los tratamientos ensayados tiene buenos resultados para este parámetro.

Los seguimientos en las concentraciones de azúcares reductores mostraron curvas decrecientes a lo largo de todo el periodo de ensayo, indicando un crecimiento microbiano cuyas poblaciones hicieron uso de estos azúcares como principal fuente de carbono (Figura 11). Al final del ensayo casi todos los tratamientos obtuvieron buenos rendimientos (excepto el T3) y parecidos a los controles. Esto es positivo ya que indica que la reducción de azúcares reductores en los tratamientos a los que se les agregó glucosa (como uno de los componentes de la mezcla nutritiva) tuvieron niveles de azúcares similares a los controles (a quienes no se les agregó glucosa). Este comportamiento indica que la bioestimulación de los tratamientos a partir del agregado de una mezcla nutritiva, sirvió para promover un rápido crecimiento de las poblaciones nativas y halotolerantes ensayadas que aceleró el consumo de las fuentes de carbono más accesibles y, que en la medida en que disminuía su disponibilidad, daban lugar a un escenario de mayor competencia entre los individuos de la comunidad microbiana por los recursos del ambiente. Es probable que como producto de esta competencia algunos microorganismos dejaran de tener acceso al azúcar y optaran por utilizar compuestos más difíciles de degradar como principal fuente de carbono de su metabolismo. Esto explicaría el hecho de que la concentración de polifenoles haya disminuido drásticamente en todos los tratamientos bioestimulados al final del ensayo. Respecto a esto ninguno de los tratamientos logró concentraciones de polifenoles por debajo de la normativa más exigente, estando más cerca de este hito el tratamiento con bioestimulación de microorganismos nativos al 25%. A pesar de esto, la caída en la concentración de polifenoles fue más que satisfactoria respecto a los valores iniciales encontrados en la revisión bibliográfica para este trabajo. Al igual que en la DBO₅, no se pudo identificar un tratamiento con mejor desempeño, aunque todos logran una buena reducción en la concentración de polifenoles. Esto es útil para los sistemas de tratamientos que busquen la descontaminación de este tipo de efluentes.

Por otro lado, el monitoreo microbiológico dio indicios de que los resultados obtenidos fueron consecuencia de la actividad microbiana involucrada en cada tratamiento. En los microorganismos halotolerantes, el crecimiento de hongos y levaduras parece desacelerar el crecimiento de las bacterias mesófilas, por lo que durante la primera semana la mayor parte de la Biorremediación estaría a cargo de este grupo de microorganismo. Para la segunda semana de ensayo, el crecimiento de hongos y levaduras fue tomando protagonismo y sus poblaciones crecieron por encima de las bacterias. Esto último nos señala que, durante esta segunda etapa, es el grupo de hongos y levaduras quien (en mayor medida) se hizo cargo de la degradación restante observada en los tratamientos T3 y T4. Estas afirmaciones se extrajeron de un monitoreo de tipo exploratorio, y deberían estudiarse en mayor profundidad en trabajos que hagan énfasis en la actividad metabólica de los distintos grupos de

microorganismos que participan en la Biorremediación de aguas de lejías de la industria aceitunera.

El trabajo generó evidencias para afirmar que la bioestimulación de microorganismos nativos y halotolerantes tienen potencial para la descontaminación de aguas de lejías provenientes de la industria aceitunera. En casi todos los tratamientos, todos los parámetros considerados se redujeron a valores muy distantes respecto a sus valores iniciales, producto de la respiración aeróbica de los microorganismos involucrados. Sin embargo, solo en el pH hubo tratamientos que generaron valores finales que se ajustan a las normativas que legislan el vuelco al dominio público de efluentes industriales para las provincias de Mendoza, San Juan y La Rioja. Esto indica, que ninguno de los tratamientos estudiados genera un efluente tratado en condiciones de ser vertido a acequias o cauces del dominio público sin consecuencias ambientales. Por otro lado, si bien casi todos los tratamientos lograron reducir la CE (excepto los halotolerantes al 50%) los valores finales siguen siendo altos por lo que su re uso como aguas de riego tampoco sería recomendable, ya que generaría problemas de salinización de suelos y afectaría el crecimiento y desarrollo de los vegetales. Sin embargo, los tratamientos resultaron efectivos para la reducción del pH y de la carga orgánica, incluido los polifenoles. Podemos afirmar que el tratamiento de mejor desempeño en la descontaminación de efluentes de lejías pareció ser la bioestimulación de microorganismos nativos al 25% de aguas de lejías, ya que mostraron buenos niveles de reducción del pH y CE, en tanto que en el resto de los parámetros no tuvo diferencias con los demás los tratamientos. Así mismo la reducción de la DQO, DBO₅, concentraciones de azúcares y polifenoles fue más que positiva en todos los tratamientos. Al reducir la carga de estos compuestos, las aguas de lejías mantendrían un gradiente de concentración óptimo para el movimiento de moléculas orgánicas (como oleuropeínas) desde el interior de las aceitunas, por lo que los efluentes tratados estarían en condiciones de ser reutilizados en el propio desamarizado de aceitunas (sin que esto afecte la calidad del proceso) promoviendo el re uso de aguas de lejías por más ciclos que el descrito por Maldonado (Maldonado 2015). Esta recirculación de un residuo, que por lo general es vertido al dominio público, acercaría a las fábricas de la industria a un modelo de producción más acorde al modelo de economía circular, generando beneficios inmediatos en términos de gestión del recurso hídrico y también económicos al disminuir el costo del agua y agregados como hidróxido de sodio.

5. BIBLIOGRAFÍA

ARANCIBIA A., VERÓNICA Y TAPIA C., FRANCISCO (2008) “Elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano [en línea]”. La Serena: Informativo INIA Intihuasi. N°. 33. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4380> (Consultado: 30 agosto 2022).

ÁVILA N., RAMONA; CHIRINOS, MARLUY; HERNÁNDEZ M., RÓMULO; RIVAS P., BERNARDA (2012). “*Contenido de azúcares totales, reductores y o reductores en Agave cocui Trelease*”. Multiciencias, vol. 12, núm. 2, pp. 129-135.

ARGENTINA PRODUCTIVA 2030 (2022) “Olivicultura en Argentina. Aprendiendo de la experiencia internacional: políticas públicas para el desarrollo sostenible del sector” Documento N° 26. Ministerio de Desarrollo Productivo. Gobierno de la Republica Argentina.

BARRERA O. O. (2018) “Factores claves en procesos de Biorremediación para la depuración de aguas residuales. Una revisión” *Rev. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. Vol. 22. N° 2. Pag.: 573- 585

BORGO E. (2013) “Diagnóstico sobre los efluentes generados y vertidos en la industria Olivícola en empresas del Gran Mendoza – Sector Aceitunas verdes en conservas”. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

CALIDAD DEL AGUA (2018) En D. Cónsoli (Comp.), *Recurso Agua* (pp. 1-45). Cátedra de Hidrología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo)

CAMARGO J.A Y ALONSO A. (2007) “Contaminacion por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medio ambientales , criterios de calidad del agua e implicaciones en el cambio climático” *Revista Ecosistemas*. Vol. 2 N°16. Pág. 98 – 110

CARCIOFI; GUEVARA LYNCH.; CAPPELLETTI, L; MASPI, N; Y LÓPEZ, S. (2021). “Economías regionales: red de actores, procesos de producción y espacios para agregar valor.” Documentos de Trabajo del CCE N° 10, junio, Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.

CAMPOS PARDO V. (1997) “Microorganismos de ambientes extremos: salar de atacama, Chile” *El altiplano. Ciencia conciencia de los Andes. Actas del II simposio internacional de Estudios Altiplanicos*. Pág. : 143-147. Universidad de Chile

COELHO CASTRO F. Y DOS SANTOS A.M (2019) “Salinity of the soil and the risk of desertification in the semi arid region” *Revista Mercator* Vol 19. Pag.: 1 - 14

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (2015) “Estudio Internacional sobre los costos de producción del aceite de oliva: resultados, conclusiones y recomendaciones”.

DECRETO 2107/2006 Fija los parámetros límites admisibles para el vertido de efluentes a los cauces de agua e infiltración en suelo. San Juan, 29 de Diciembre de 2006

DÍAZ M.P. (2002) “Uso de consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos” *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol IV. N° 1. Pág.: 36-42

DUEK A.E. (2016) “El agua en las industrias alimenticias de Mendoza (Argentina): estimación de los requerimientos hídricos y la potencialidad de reúso agrícola” Instituto Nacional del Agua (INA). *Rev. Ambiente & Agua*. (ISSN:1980-993X DOI). Vol.: 2 N°2. Pag.: 279-290

FAO (1992) “Tratamiento y usos de aguas residuales en la agricultura – FAO reigo y drenaje”. Documento 47. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO)

FERNÁNDEZ LLANO (2001) “Efluentes Líquidos del procesamiento de las aceitunas verdes en fresco. Situación en la Provincia de Mendoza” *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Vol. 5. Pag.: 01.19 – 01.25

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. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20a1.pdf?sequence=1>

FERNÁNDEZ X., SANTOS ORTIZ, RODRIGUEZ PADILLA, FERNANDEZ CÁDERNAS (1997) “Incidencias Ambientales y Medidas correctoras en sectores agroalimentarios”. Junta Andaluza, Consejería del Medio Ambiente. Capítulo VI: Sector del Aderezo aceitunero.

FOSTER M. & WHITEMAN R. (s.f.) “Bioaugmentation Aids Wastewater Systems” *Advanced BioTech*. Recuperado de <https://www.adbio.com/wastewater-treatment-bioaugmentation/>

GAMBA K. y PEDRAZA A. (2018) “Evaluación de estrategias de Biorremediación para el tratamiento de aguas residuales industriales contaminadas con aceites usados” *Ingeniería*. Vol. 2 Num. 2. Pag.: 18-30

GERBALDO, M. VÉRONICA.; LABUKCAS, DIANA O ; ÁLVAREZ, DOLORES M.; MENDIETA, SILVIA N. Y CRIVELLO, MÓNICA E. (2019) “Acondicionamiento de las aguas residuales de la industria olivícola de Córdoba”. *Contaminación Atmosférica e Hídrica en Argentina* Tomo V. Pag. 675 - 882

HERNÁNDEZ MUÑOZ A. (2000) “Manual de depuración Uralita. Sistemas de depuración de aguas residuales en núcleos de hasta 20000 habitantes.” Thomson Editores Spain Paraninfo SA.

HONORABLE TRIBUNAL ADMINISTRATIVO DEL DEPARTAMENTO GENERAL DE IRRIGACIÓN. Resolución 627/200- Modificación de la Res. 778/96 Reúso Agrícola.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSO (2020). Censo Nacional Agropecuario 2018. Ministerio de Economía. Presidencia de la República Argentina. Pág.: 84. Recuperado de: https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/economia/cna2018_resultados_preliminares_agricultura.pdf

IVARS D. J (2021) “Vertidos industriales y racionalidad instrumental: el caso del canal pescara en Mendoza” *Revista GeoPantanal*. N° 30. Pag.: 15-35.

KUBITZA F. (23 de enero del 2017) “El parámetro de calidad de agua a menudo ignorado: pH” *Global Seafoods Alliance*. Recuperado 11/3/2023 : <https://www.globalseafood.org/advocate/el-parametro-de-calidad-del-agua-a-menudo-ignorado-ph/>

LABORATORIO BRITANIA (2015) REF B0211206 “Recuento en Placa Agar”. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Recuperado de: www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707e324c182.pdf

LABORATORIO BRITANIA (2015) REF B0216606 “Recuento Papa Glucosado Agar”. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Recuperado de: www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707ad8180cb.pdf

LUGONES B. (2018) “Biorremediación de efluentes provenientes de las industrias de aceitunas maquinadas” [Tesina de grado, Universidad Nacional de Cuyo]. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/11243/tesis-irnr-lugones-florencia-beln.pdf

MADIGAN, H. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H, STAHL, D. A., (2015). *Biología de los microorganismos*. Ed. Pearson Educación S. A. Madris, España.

MALDONADO M. (2011) "Proceso de desamarizado de las aceitunas" *Aceite: suplemento mensual del sector olivícola*. ISSN 2254-0075, N° 6, 2011, págs. 168-172.

MALDONADO M. (2015) "El reúso de Lejías, una alternativa para disminuir la contaminación en aguas residuales en la elaboración de aceitunas verdes de la variedad Arauco" *La alimentación Latinoamericana* N° 328. Pag.: 56 – 52.

MALDONADO, M., BAIGORI, M., AFFRANCHINO, G. 2022. 'Biodegradation of organic compounds and decrease in electrical conductivity by native consortium in effluents from the olive industry', *International journal of recycling organic waste in agriculture*, 11(2), PP. 177-187. DOI: 10.30486/IJROWA.2021.1904679.1105

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.

MARIS DA SILVA, S. (2018) "Contaminación y saneamiento ambiental" Material didáctico 2018. Cátedra de contaminación y Sanemiento Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

MORENO S.M. (2020) "Dinámica de los polifenoles procedentes de aguas residuales de la industria vinícola durante el proceso de digestión" [Tesina de grado, Universidad Politécnica de Cataluña]. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/334571/memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PUCHAICELA GARCÍA (2021) "Evaluación de un consorcio de microorganismos halófilos para la recuperación de suelos salinos de Chone" [Tesina de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador]

SÁNCHEZ P. (2012). Análisis Tecnológico sectorial. Cuadros de situación Tecnológica. Complejo Productivo Olivarero. Centro Interdisciplinario de Estudios en Ciencia, Tecnología e Innovación (CIECTI). Pag.: 21

SASAL, M., JUAREZ J., LADUX J., (03 de Julio de 2015). "Impacto ambiental de la Producción de aceitunas en La Rioja: Hacia la implementación de acciones de producción más limpia". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Inti.gob.ar. Recuperado de: <https://inta.gob.ar/documentos/impacto-ambiental-de-la-produccion-de-aceituna-en-la-rioja-hacia-la-implementacion-de-acciones-de-produccion-mas-limpia>

TARTABULL PUÑALES, T., & BETANCOURT AGUILARM, C. (2016). "La calidad del agua para el riego. Principales indicadores de medida y procesos que la impactan" *Revista Científica Agroecosistemas* 4 (1). pp. 47-61. Recuperado de <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/ras>

VALENCIA AVILÉS E., FIGUEROA I., SOSA MARTÍNEZ E., BARTOLOMÉ CAMACHO M., MARTÍNEZ FLORES H.E., GARCÍA-PÉREZ M. (2017) "Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas". *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. N° 16 Pag.:15 -19

VALDERRAMA CHÁVEZ, C. (2019) "Comparación de la eficiencia de remoción de diésel en suelos sometidos a procesos de bioaumentación, bioestimulación y atenuación natural". [Tesina de grado, Universidad del Valle]. <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/17813>

VALDEZ GUSTÉLUM K. (2014) "Estudio de la reducción de compuestos orgánicos en agua residual salina mediante microorganismos halotolerantes" [Tesis de Maestría, CIDETEQ]. <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/330/1/Estudio%20de%20la%2>

[Oreducci%C3%B3n%20de%20compuestos%20org%C3%A1nicos%20en%20agua%20residual%20salina%20mediante%20microorganismos%20halotolerantes.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/11243/tesis-imnr-lugones-florenia-beln.pdf)

VALSECCHI PUNZI J. (2020) "Degradación de efluentes líquidos provenientes del maquinado de aceitunas mediante la oxidación biológica llevada a cabo con la utilización de microorganismos nativos del efluente" [Tesis de Grado. Universidad Nacional de Cuyo]. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/11243/tesis-imnr-lugones-florenia-beln.pdf

WAINSTEIN, P. 1969. Clasificación de las aguas de riego de Mendoza. Informe científico y técnico N°15. Instituto de Suelos y Riego. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

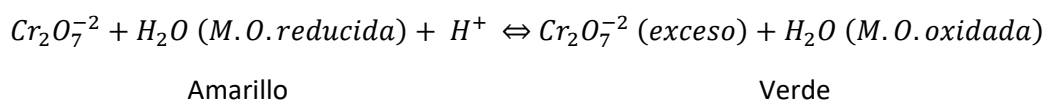
6. ANEXOS

6.1. Anexo I: Procedimientos de Laboratorio para la caracterización del Efluente

6.1.1. Determinación de la DQO (APHA 1992)

Principios: se somete a reflujo una muestra en una solución ácida fuerte con un exceso de dicromato potásico. Después de la digestión, el dicromato no reducido que queda se determina con sulfato ferroso amónico, sal de Mohr $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia orgánica oxidable en términos de equivalente de oxígeno.

Ecuación N°1



El exceso de dicromato se valora con Fe^{2+} utilizando como indicador fenantrolina o ferroína, dando lugar a un complejo de color marrón/rojizo que indica el punto final de la valoración

Materiales:

- tubos de digestión,
- calentador de bloques a 150 °C
- bureta,
- pipetas,
- dosificador de agua destilada,
- agitador magnético para mezclar completamente.

Reactivos:

- solución de dicromato potásico 0,0167 M,
- ácido sulfúrico,
- solución indicadora de ferroína,
- solución de sulfato ferroso amónico para titulación 0,10 M.

Procedimiento:

- 1 Llevar la muestra a ebullición con reflujo en presencia de sulfato de mercurio para evitar la interferencia de los cloruros, colocando los tubos en el digestor de bloques a 150 °C durante dos horas.
- 2 Dejar enfriar a temperatura ambiente, quitar los tapones y añadir dos gotas de ferroína.
- 3 Agitar rápidamente con un agitador magnético mientras se titula con sal de Mohr 0,01 N. El punto final es un marcado cambio de color del azul verdoso al marrón rojizo.
- 4 De la misma forma, someter a reflujo y titular dos blancos que contengan los reactivos y un volumen de agua destilada igual al de la muestra.

Cálculos:

Ecuación N°2

$$DQO \left(en \frac{mg O_2}{l} \right) = \frac{(A - B) * N * 8000 * F}{Vol. de muestra (ml)}$$

Donde:

- A = ml de valorante gastados para el blanco,
- B = ml de valorante gastados para la muestra,
- F = factor de dilución de la muestra, y
- N (normalidad del valorante)³

6.1.2. Determinación de la DBO₅ (APHA 1992)

Principio: 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.

³ $N = \frac{Vol. dicromato (ml) * 0,1}{Vol. sal consumido}$

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.

Cálculo

Ecuación N°3

$$\text{DBO}_5 \left(\text{en } \frac{\text{mg } \text{O}_2}{\text{l}} \right) = \frac{(D_1 - D_2)}{P}$$

Donde:

D_1 = mg/l del OD de la muestra diluida inmediatamente después de su preparación,

D_2 = mg/l de OD de la muestra diluida después de 5 días de incubación a 20°C

P = Fracción volumétrica decimal de la muestra utilizada

6.1.3. Determinación de sólidos Solubles totales, Solidos suspendidos fijos y Solidos Solubles volátiles (APHA, 1992)

Principio: se filtra una muestra bien mezclada con un filtro estándar 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,
- Horno de secado, para operaciones a 180 ± 2 °C.

Procedimiento:

a) Sólidos suspendidos totales

Preparación del disco de filtrado de fibra de vidrio:

- 1) Insertar el disco de filtrado de fibra de vidrio en el aparato de filtrado.
- 2) Hacer vacío y lavar el disco con tres volúmenes sucesivos de 20 ml de agua destilada.
- 3) Continuar succionando hasta eliminar todo vestigio de agua, y retirar el agua de lavado.
- 4) Trasladar el filtro a una plancheta de aluminio o acero inoxidable. Alternativamente, separar el crisol y la combinación de filtro si se está utilizando un crisol de Gooch.
- 5) Secar en horno a 103- 105 °C durante una hora. Si se van a medir sólidos volátiles, incinerar a 550 ± 50 °C en horno de mufla, enfriar en desecador para equilibrar la temperatura y pesar.
- 6) Repetir el ciclo de secado o incineración, enfriamiento, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor de 0,5 mg entre pesadas sucesivas.
- 7) Conservar en desecador hasta que se necesite. Pesar inmediatamente antes de usar.

Análisis de la muestra:

- 1) Montar el aparato de filtrado y el filtro e iniciar la succión.
- 2) Filtrar un volumen medido de muestra bien mezclada por el filtro de fibra de vidrio. Lavar con tres volúmenes sucesivos de 10 ml de agua destilada.
- 3) Continuar succionando durante unos tres minutos después de terminar el filtrado.
- 4) Separar cuidadosamente el filtro del aparato y proceder como en 4).
- 5) Secar en horno a 103- 105 °C durante una hora, enfriar en un desecador para equilibrar la temperatura y pesar.

- 6) Repetir el ciclo de secado, enfriamiento, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor del 4% del peso previo o menor de 0,5 mg (escoger la menor de ambas).

Cálculo:

Ecuación N°4

$$\text{Sólidos en Suspensión (en } \frac{mg}{l} \text{)} = \frac{(A - B) * 1000 \text{ ml}}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde:

A = Suma entre el Peso del filtro y el residuo seco en mg

B = Peso del filtro en mg

b) Sólidos Fijos y Volátiles

Procedimiento:

- 1) Incinerar el residuo producido en la determinación de sólidos disueltos totales a peso constante, en un horno de mufla a temperatura de 550 ± 50 °C, entre 15 a 20 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.
- 4) Repetir el ciclo de incineración, enfriado, desecación y pesado hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor del 4% del peso previo.

Cálculo:

Ecuación N°5

$$\text{Sólidos en Suspendidos Volátiles (en } \frac{mg}{l} \text{)} = \frac{(A - B) * 1000 \text{ ml}}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Ecuación N° 6

$$\text{Sólidos en Suspendidos Volátiles (en } \frac{mg}{l} \text{)} = \frac{(B - C) * 1000 \text{ ml}}{\text{vol. de muestra (ml)}}$$

Donde:

A = Suma entre el Peso del residuo y la placa antes de la incineración en mg

B = Suma entre el Peso del residuo y la placa después de la incineración en mg

C= Peso de la placa o filtro en mg

6.1.4. Determinación de 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) o de un peso (mg/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

Cálculo:

Ecuación N°7

$$\text{Sólidos suspendidos (en } \frac{mg}{l} \text{)} = \text{Sólidos totales en suspensión (} \frac{mg}{l} \text{)} - \text{Sólidos no Sedimentables (} \frac{mg}{l} \text{)}$$

6.1.5. Determinación de Cloruros (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.
- 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:
 - o Ácido sulfúrico, H₂SO₄ 1 + 1,
 - o Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ al 30%
 - o 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.
 - I. 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.
 - II. Ajustar el aparato al rango deseado de mV o unidades de pH. Poner en marcha el agitador.
 - III. Añadir titulante de AgNO₃ patrón, registrando la lectura de la escala tras cada adición.
 - IV. 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:
 - I. 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.
 - II. 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.
 - III. 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.
 - IV. Completar la determinación titulando.

Cálculos:

Ecuación N°8

$$\text{Cloruros (en } \frac{\text{mg}}{\text{l}}) = \frac{(A - B) * N * 35,450}{\text{Vol. Muestra (ml)}}$$

Donde:

A = ml AgNO₃,

B = ml blanco, y

N = normalidad del titulante

6.1.6. Determinación de Sulfatos (APHA, 1992)

Principio: Se determinan por el método gravimétrico con combustión de residuos. Este método se basa en la precipitación del sulfato en una solución de ácido clorhídrico (HCl), como sulfato de bario (BaSO_4) por adición de cloruro de bario (BaCl_2). La precipitación se realiza cerca de la temperatura de ebullición y, tras un período de digestión, el precipitado se filtra, se lava con agua hasta eliminar Cl^- , se somete a combustión o seca y se pesa como BaSO_4 .

Materiales:

- Baño de vapor.
- Horno de secado, provisto de control termostático.
- Mufla, con indicador de temperatura.
- Desecador.
- Balanza analítica, capaz de pesar 0,1 mg.
- Filtro: Utilícese uno de los siguientes:
 - o Papel de filtro, lavado al ácido, sin cenizas, de acabado duro, con suficiente retención para precipitados finos.
 - o Filtro de membrana, con tamaño de poro alrededor de 0,45 μm .
- Aparato de filtración, apropiado para el tipo de filtro seleccionado. (Recúbrase el soporte del filtro de membrana con silicona líquida para evitar que él precipitado se adhiera.)
- Solución de indicador rojo de metilo
- Ácido clorhídrico, HCl 1+1
- Solución de cloruro de bario
- Reactivo de nitrato de plata ácido
- Silicona Líquida

Procedimiento

- 1) Eliminación de sílice: Si la concentración de sílice supera 25 mg/l, evapórese la muestra hasta casi sequedad en una cápsula de platino sobre baño de vapor. Añádase 1 ml HCl, inclínese y gírese la cápsula hasta que el contacto del ácido con el residuo sea total. Continúese evaporando a sequedad. Complétese el secado en un horno a 180 °C y, si hubiera materia orgánica presente, carbonícese a la llama de un mechero. Humedézcase el residuo con 2 ml de agua destilada y 1 ml HCl, y evapórese a sequedad sobre baño de vapor. Añádase 2 ml HCl, recójase el residuo soluble con agua caliente y fíltrese. Lávese la sílice insoluble con varias porciones pequeñas de agua destilada caliente. Combínese filtrado y lavados. Deséchese el residuo.
- 2) Precipitación de sulfato de bario: Ajustese el volumen de la muestra clarificada para que contenga aproximadamente 50 mg SO_4^{2-} en un volumen de 250 ml. Se pueden tolerar concentraciones menores de SO_4^{2-} , cuando sea imposible concentrar la muestra al nivel óptimo, pero en esos casos límitese el volumen total a 150 ml.
- 3) Ajustese el pH con HCl a 4,5-5,0 utilizando un medidor de pH o el color naranja del indicador rojo de metilo. Añádase de 1 a 2 ml HCl. Caliéntese a ebullición y añádase lentamente, con agitación, solución templada de BaCl_2 hasta precipitación completa aparente; añádase entonces unos 2 ml de exceso. Si el precipitado es pequeño, añádase un total de 5 ml de solución de BaCl_2 . Digiérase el precipitado a 80-90 °C, preferiblemente toda una noche, pero no menos de 2 horas.

- 4) Filtración y pesada: Mézclase una pequeña cantidad de pulpa de papel de filtro sin cenizas con el BaSO₄, transfírase cuantitativamente a un filtro y fíltrese a temperatura ambiente. La pulpa ayuda a la filtración y reduce la tendencia del precipitado a deslizarse. Lávese él precipitado con pequeñas porciones de agua destilada templada hasta que los lavados estén libres de Cl⁻ comprobado mediante pruebas con reactivo AgNO₃-HNO₃. Póngase el filtro y precipitado en un crisol de platino tarado y llévese a ignición a 800 °C durante 1 hora. No dejar que se inflame el papel de filtro. Enfríese en desecador y pése.

Cálculos

Ecuación N°9

$$\text{Sulfatos} \left(\text{en } \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{\text{mg BaSO}_4 * 411,6}{\text{Vol. Muestra (ml)}}$$

6.1.7. Determinación de Nitratos (Perdomo y col., 2012)

Principio: Se determinaron por el método de sulfato de brucina. 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
- 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 98,3% 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:

Ecuación N°10

$$\text{Nitratos} \left(\text{en } \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{A - N}{m}$$

Donde:

A = Absorbancia de la Muestra

B = Intercepto de la curva de calibración

N = Pendiente de la curva de calibración

6.1.8. Determinación de Sodio, Potasio, Calcio y Magnesio

Principio: La determinación del Sodio, Potasio, Calcio y Magnesio se hizo por espectrofotometría mediante el método directo de llama de aire – acetileno. 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, las de sodio a una longitud de onda de 589 nm, las de Calcio a 423 nm y las de Magnesio a 285 nm . Se pulveriza la muestra en una llama de gas y la excitación se realiza en condiciones controladas y reproducibles. La línea espectral buscada se aísla utilizando filtros de interferencia o por medio de una disposición adecuada de la ranura en los dispositivos de dispersión de luz, tales como prismas o rejillas. La intensidad de la luz se mide por un potenciómetro con fototubos u otro circuito apropiado. El método se basa en que la intensidad de la luz a la longitud de onda correspondiente para cada elemento, es aproximadamente proporcional a la concentración del mismo.

Materiales:

- Espectrómetro de absorción atómica
- 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.

La concentración de los metales se calcula utilizando la curva de calibración apropiada. Alternativamente se puede 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.

Cálculos:

Ecuación N°11

$$Cation \left(en \frac{mg}{l} \right) = \frac{A - N}{m}$$

Donde:

A = Absorbancia de la Muestra

B = Intercepción de la curva de calibración
N = Pendiente de la curva de calibración

Construcción de Curvas de Calibración

SODIO: Se prepararon 5 niveles de concentración correspondientes a 0,80; 1,0; 1,20; 1,40 1,60 g/L. Para la medición de cada concentración se tomaron alícuotas de 100 μ L a partir de los patrones preparados y una alícuota de 10,00 ml de diluyente concentrado, y se midieron su intensidad en el fotómetro de llama. Estos valores se graficaron y se construyó la curva de calibración estándar para Sodio.

POTASIO: Se prepararon 5 niveles de concentración correspondientes a concentraciones de 0,5; 1; 1,5 y 2 mg/L, respectivamente. Para la medición de cada concentración se tomaron alícuotas de 100 μ L a partir de los patrones preparados y una alícuota de 10,00 ml de diluyente concentrado, y se midieron su intensidad en el fotómetro de llama. Estos valores se graficaron y se construyó la curva de calibración estándar para Potasio.

CALCIO: Se prepararon 5 niveles de concentración correspondientes a 1, 2, 3, 4, 5 mg/L respectivamente. Para la medición de cada concentración se tomaron alícuotas de 100 μ L a partir de los patrones preparados y una alícuota de 10,00 ml de diluyente concentrado, y se midieron su intensidad en el fotómetro de llama. Estos valores se graficaron y se construyó la curva de calibración estándar para Calcio.

MAGNESIO: Se prepararon 5 niveles de concentración correspondientes a concentraciones de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/L respectivamente. Para la medición de cada concentración se tomaron alícuotas de 100 μ L a partir de los patrones preparados y una alícuota de 10,00 ml de diluyente concentrado, y se midieron su intensidad en el fotómetro de llama. Estos valores se graficaron y se construyó la curva de calibración estándar para Magnesio.

6.2. Anexo II: Procedimiento de Laboratorio para la determinación de parámetros medidos en el ensayo

6.2.1. Determinación de la DQO y DBO₅

Consultar apartado [6.1.1](#) y [6.1.2](#) del Anexo I

6.2.2. Determinación de azúcares reductores (Ávila y col., 2012)

Principio: según el método del ácido dinitrosalicílico (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.
- Ácido clorhídrico 1M,
- Agua bidestilada,
- Ácido dinitrosalicílico.

Procedimiento

- 1) Colocar 500 µl de la muestra, previamente centrifugada 10 minutos a 10.000 rpm, en un tubo eppendorf.
- 2) Agregar 50 µl 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 µl de agua bidestilada.

6.2.3. Determinación de polifenoles (Fernández y col., s.f.)

Principio: 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.

Materiales:

- Espectrofotómetro UV-Visible,
- Balanza analítica,
- Centrifuga,
- 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 centrifuga,
- Cubetas de plástico de 3 ml para espectrofotometría visible.
- 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:
 - a. 100 µl de la muestra previamente diluida,
 - b. 8 ml de agua destilada,
 - c. 500 µl del Reactivo de Folin- Ciocalteu,
 - d. 1,5 ml de carbonato de sodio.
- 3) Esperar unos minutos y llevar a estufa por 30 minutos.
- 4) Agitar para homogeneizar.

5) Leer absorbancia a 765 nm

6.3. Anexo III: Procedimiento para el Monitoreo Microbiológico

6.3.1. Preparación de las Diluciones

Principio: Al tratarse de muestras con cargas microbianas muy grandes, es necesario reducirla mediante su dilución seriada en agua estéril. Las diluciones son decimales, de tal manera que en cada dilución solo haya una décima parte de la dilución que le precede, tal y como se esquematiza en la figura 18.

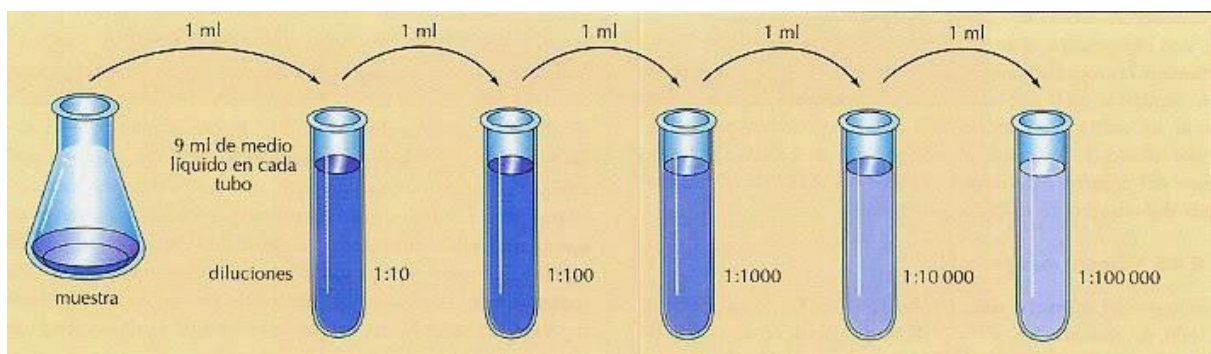


Figura 17: Técnica para la preparación de diluciones seriadas

Fuente: Manual de prácticas de Microbiología Básica 2016

Materiales:

- Cámara de flujo laminar o mechero Bunsen,
- Muestra del efluente,
- Medios de cultivo PC Y PG, estériles.
- 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

Procedimiento

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

6.3.2. Siembra por vertido en placa (Pour Plate)

Materiales

- Cámara de flujo laminar o mechero Bunsen
- Pipeta automática de 0,1 ml con puntas descartables estériles
- Cajas de Petri estériles.
- Medios de cultivos PCA y PG estériles.
- Estufa de incubación.

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 37 °C durante 48 horas para recuento total de bacterias aerobias y mesofilas (PCA), y a temperatura ambiente controlada (20- 22 °C) durante 5 días para el crecimiento de hongos y levaduras (PG)

Luego de la incubación se realizó el recuento de colonias (UFC) en aquellas cajas Petri que presentaran un numero de colonias visibles de entre 30 y 300

Cálculos

Ecuación N°12

$$N^{\circ} \text{ de microorganismos viables (en } \frac{UFC}{ml} \text{)} = \frac{\text{Colonias contadas (UFC)} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de Siembra (ml)}}$$

6.1. Anexo IV: Tablas complementarias

Tabla 17: Evolución de los valores promedios de pH durante 336 horas de ensayo para los tratamientos aeróbicos con bioestimulación al 50% y 25% de aguas de lejías a cargo de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4)

Horas de ensayo	Tratamientos					
	Lejías al 50%			Lejías al 25%		
	C ₁	T1	T2	C ₂	T3	T4
0	12,3 ± 0,0	12,1 ± 0,0	11,8 ± 0,06	12,4 ± 0,0	11,6 ± 0,31	11,8 ± 0,06
6	12,4 ± 0,0	11,9 ± 0,0	11,5 ± 0,10	12,4 ± 0,06	11,4 ± 0,06	11,2 ± 0,10
18	12,4 ± 0,20	11,9 ± 0,06	10,5 ± 0,17	12,4 ± 0,06	11,2 ± 0,15	10,3 ± 0,15
24	12,2 ± 0,20	11,2 ± 0,06	9,9 ± 0,06	12 ± 0,15	10,6 ± 0,31	9,7 ± 0,2

30	12,2 ± 0,10	10,9 ± 0,0	10,2 ± 0,17	12 ± 0,17	10,4 ± 0,42	9,9 ± 0,3
42	12,2 ± 0,10	10,5 ± 0,06	10,5 ± 0,17	11,9 ± 0,21	10,8 ± 0,55	10,4 ± 0,1
56	12,0 ± 0,17	9,8 ± 0,06	9,9 ± 0,17	10,9 ± 0,10	9,7 ± 0,52	10,2 ± 0,15
80	11,9 ± 0,17	9,5 ± 0,06	9,0 ± 0,26	10,3 ± 0,25	9,5 ± 0,49	7,9 ± 0,32
104	11,8 ± 0,17	9,5 ± 0,06	8,8 ± 0,06	9,8 ± 0,15	9,7 ± 0,38	8,3 ± 0,15
152	10,7 ± 0,17	9,3 ± 0,15	8,2 ± 0,20	9,5 ± 0,23	8,9 ± 0,57	8,5 ± 0,12
200	10,5 ± 0,26	9,1 ± 0,91	7,8 ± 0,20	9,3 ± 0,23	8,7 ± 0,0	7,2 ± 0,15
265	8,2 ± 0,26	8,2 ± 0,10	7,9 ± 0,17	8,7 ± 0,42	8,3 ± 0,10	8,3 ± 0,12
312	8,95 ± 0,06	8,9 ± 0,05	8,1 ± 0,21	9,0 ± 0,05	8,9 ± 0,05	8,5 ± 0,12
336	9,15 ± 0,03	9,1 ± 0,05	7,5 ± 0,10	9,1 ± 0,06	9,1 ± 0,20	8,4 ± 0,12

Tabla 18 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los controles al inicio y al final del ensayo

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	1,00	1,00	0,17

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	14,92	1	14,92	47100,84	<0,0001
Tratamiento	14,92	1	14,92	47100,84	<0,0001
Error	1,3E-03	4	3,2E-04		
Total	14,92	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,04034

Error: 0,0003 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

Cl inicial 12,30 3 0,01 A

Cl final 9,15 3 0,01 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	1,00	1,00	0,38

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	16,67	1	16,67	10000,00	<0,0001
Tratamiento	16,67	1	16,67	10000,00	<0,0001
Error	0,01	4	1,7E-03		
Total	16,67	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,09255

Error: 0,0017 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

C2 inicial 12,40 3 0,02 A

C2 final 9,07 3 0,02 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Tabla 19 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los tratamientos al 50% de lejías al inicio y al final del ensayo

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	1,00	1,00	0,33

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	13,05	1	13,05	10443,00	<0,0001
Tratamiento	13,05	1	13,05	10443,00	<0,0001
Error	5,0E-03	4	1,2E-03		
Total	13,06	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,08015

Error: 0,0012 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

T1 inicial 12,10 3 0,02 A

T1 final 9,15 3 0,02 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	1,00	1,00	0,84

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	28,17	1	28,17	4225,00	<0,0001
Tratamiento	28,17	1	28,17	4225,00	<0,0001
Error	0,03	4	0,01		
Total	28,19	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,18510

Error: 0,0067 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

T2 inicial 11,83 3 0,05 A

T2 final 7,50 3 0,05 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Tabla 20 Análisis de varianza y prueba de Tukey para los tratamientos al 25% de lejías al inicio y al final del ensayo

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	0,97	0,97	2,49

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	9,63	1	9,63	144,40	0,0003
Tratamiento	9,63	1	9,63	144,40	0,0003
Error	0,27	4	0,07		
Total	9,89	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,58533

Error: 0,0667 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

T3 inicial 11,63 3 0,15 A

T3 final 9,10 3 0,15 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
PH	6	1,00	1,00	0,90

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model	18,03	1	18,03	2163,20	<0,0001
Tratamiento	18,03	1	18,03	2163,20	<0,0001
Error	0,03	4	0,01		
Total	18,06	5			

Test:Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,20694

Error: 0,0083 df: 4

Tratamiento Means n S.E.

T4 inicial 11,83 3 0,05 A

T4 final 8,37 3 0,05 B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Tabla 21: Evolución de los valores promedios de CE durante 336 horas de ensayo para los tratamientos aeróbicos con bioestimulación al 50% y 25% de aguas de lejías a cargo de microorganismos nativos (T1 y T3) y halotolerantes (T2 y T4)

Horas de ensayo	Tratamientos					
	Lejías al 50%			Lejías al 25%		
	C ₁	T1	T2	C ₂	T3	T4
0	36,64 ±0,66	33,94 ±0,61	34,10 ±0,26	22,16 ±0,25	18,01 ±1,89	19,87 ±0,24
24	30,96 ±0,20	28,18 ±0,54	31,40 ±0,70	17,99 ±0,50	17,12 ±0,62	15,55 ±0,25
42	29,42 ±0,37	25,65 ±0,48	28,98 ±1,35	14,89 ±0,34	14,84 ±1,33	17,79 ±0,22
56	28,49 ±0,32	23,95 ±1,19	29,40 ±0,09	13,82 ±0,47	14,33 ±0,89	16,60 ±0,31
80	27,62 ±0,25	23,85 ±0,99	29,83 ±0,26	13,10 ±0,37	15,41 ±1,28	17,56 ±0,12
152	26,80 ±0,35	27,02 ±0,87	38,48 ±0,19	12,91 ±0,28	16,21 ±1,48	21,80 ±0,16
200	23,64 ±0,41	24,92 ±0,16	46,64 ±0,42	13,00 ±0,20	14,17 ±0,96	19,74 ±0,13
265	25,45 ±0,21	25,86 ±1,87	43,36 ±0,65	17,24 ±0,22	16,22 ±1,64	18,65 ±0,09
321	24,47 ±0,47	24,47 ±1,07	46,50 ±0,58	16,41 ±0,16	15,12 ±1,48	21,07 ±0,22
336	23,94 ±0,50	23,94 ±0,86	36,85 ±0,23	15,35 ±0,12	14,53 ±0,94	18,53 ±0,12

