



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Biodiversidad y Biología experimental

# Tratamiento fúngico de efluente de alto contenido orgánico – Estudio de caso

Autora: Carolina Magalí Marras  
Director: Dr. Raúl F. Itria  
Codirector: Dr. Leonardo M. Majul



*TESIS DE LICENCIATURA – AGOSTO 2023*

## Resumen

La presente tesis se centra en el estudio y tratamiento del efluente resultante de un proceso novedoso de concentración de bilis bovina para la obtención de ácidos biliares. La bilis es considerada un subproducto obtenido del faenado de reses que se utiliza en diversas industrias para obtener ácidos biliares, como el ácido cólico. Estos ácidos tienen principalmente aplicaciones en la industria farmacéutica. Debido a que estos principios activos de interés se encuentran en bajas concentraciones es necesario concentrarlos para que su transporte a las industrias sea económicamente viable. Sin embargo, los métodos tradicionales de concentración son energéticamente costosos y por lo tanto con un pasivo ambiental alto. En el Laboratorio de Productos Naturales de Instituto Nacional de tecnología Industrial (INTI) se desarrolló y patentó un método de concentración química de bajo costo energético, pero que genera un efluente de alta carga orgánica, elevada salinidad y un pH bajo, lo que lo hace difícil de tratar utilizando métodos convencionales. Reconociendo el potencial degradador de los hongos, en el presente trabajo se propone un enfoque que involucra el tratamiento fúngico para este efluente. En este trabajo se pusieron a punto las técnicas clave para el resto de los análisis de materia orgánica como la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). En un principio se trató el efluente mediante de filtración para mejorar su tratabilidad biológica alcanzando una reducción de 54 % (DBO). Luego se realizó una selección de cepas para el tratamiento fúngico a partir de 20 cepas, de las cuales *Pycnoporus sanguineus* (CM2), *Paecilomyces variotii* (CM1), *Trametes* sp. (CM7) y *Coriolus antarcticus* (BAFC 266) mostraron crecimiento en medio agarizado conteniendo el efluente. Estas 4 cepas se analizaron en cuanto a su nivel de tolerancia al efluente crudo mediante la determinación de la concentración efectiva 50 (CE50). De este análisis se seleccionaron las cepas de *P. variotii* y *P. sanguineus* como las 2 con mayor CE50. Luego se evaluó el crecimiento y capacidad de degradar la materia orgánica en el efluente, tanto crudo como filtrado y con el agregado de una fuente de nitrógeno. Únicamente la cepa *P. variotii* creció en el efluente previamente filtrado sin agregado de nitrógeno. En estas condiciones se evaluó también el crecimiento libre e inmovilizado siendo el de mayor eficiencia el primero. El análisis de materia orgánica según la DBO del efluente crudo tratado con hongos presentó un menor contenido de materia orgánica que el efluente crudo sin inocular (control). El análisis de materia orgánica por DQO no fue certero debido a interferencias asociadas a la composición del efluente, principalmente por la presencia de cloruro, lo cual llevó a una subestimación del contenido de materia orgánica. Todos

estos análisis parecen indicar que el tratamiento por filtración seguida de crecimiento fúngico modificó el contenido de materia orgánica en el efluente, a pesar de las dificultades encontradas en las mediciones. Se hicieron pruebas preliminares de tratabilidad biológica utilizando barros activados en las que se obtuvo una mayor tasa de remoción de materia orgánica en el efluente tratado (123,4 O<sub>2</sub>/L.h) que en el efluente crudo (91,2 O<sub>2</sub>/L.h).

## Abstract

This thesis centers on the study and treatment of wastewater produced by an innovative concentration treatment of bovine bile to obtain bile acids. It's a subproduct of the harvesting of cattle that is utilized in diverse industries in order to obtain bile acids, such as colic acid. These acids are mainly used in the pharmaceutical industry. As the active ingredients of interest are found in low concentrations, it is necessary to concentrate the acid so that transportation is economically viable. Traditional methods of concentration are energetically costly, which carries a high passive environmental impact. The Laboratory of Natural Products in the National Institute of Industrial Technology (INTI in Spanish) developed and patented a chemical concentration method with a low energetic cost, but it generates an effluent with high organic matter content, high salinity and low pH, which makes it hard to treat using traditional methods. Recognizing the degradation potential of fungi, this work focuses on involving fungal treatment for this effluent. The key methods for the analysis of organic matter such as the chemical oxygen demand (COD) and the biochemical oxygen demand (BOD) were fine-tuned in this work. As a first step, the effluent was treated with a physiochemical filtration in order to increase its biological treatability, achieving a decrease in the organic matter content (BOD) of 54 %. Afterwards, there was a screening of 20 fungal species to select the strains that showed growth in the presence of the raw effluent. 4 were selected, *Pycnoporus sanguineus* (CM2), *Paecilomyces variotii* (CM1), *Trametes* sp. (CM7) and *Coriolus antarcticus* (BAFC 266). These 4 strains were analyzed for their level of tolerance to the raw effluent, using the effective concentration 50 (EC50) as an indicator. From this analysis *P. sanguineus* and *P. variotii* as the 2 with higher EC50. Then the capacity for growth and degradation of organic matter was evaluated, both with the raw and filtrated effluent and addition of a source of nitrogen. Only *P. variotii* showed growth and only in the filtrated effluent without the added source of nitrogen. These conditions were also used to evaluate the efficiency of free growth and immobilized fungi, proving the first more efficient. The BOD organic matter content analysis of the non-filtrated effluent treated with fungi showed a lower organic matter content than the raw effluent (control). The COD organic matter content analysis was not accurate due to interference associated with the composition of the effluent, mainly the presence of chloride, which lead to a sub estimation of the organic matter content. All these analyses seem to indicate that the filtration and fungal treatments modify the organic matter content of the effluent, regardless of the difficulties encountered. Preliminary tests of biological treatability using activated sludge

were done, finding a higher organic matter removal rate in the filtrated effluent (123.4 O<sub>2</sub>/L.h) than in the raw effluent (91.2 O<sub>2</sub>/L.h)

## Agradecimientos

Gracias a la Dra. Fazio por la identificación del hongo *P. variotii* usando microscopía óptica y claves dicotómicas.

Gracias al Dr. Galvagno por el equipamiento prestado.

Gracias a la gente del Laboratorio 8, por toda la paciencia, apoyo y ayuda que me brindaron.

Gracias a Marisa Martínez por la ayuda con toda la parte de química que tuve que hacer en esta tesis.

Gracias a Raúl y Leo que me guiaron con este trabajo, que me ayudaron con las frustraciones cuando los resultados no eran los esperados.

Gracias a mi abuela, Pili, por el apoyo y amor todos estos años.

Gracias a mis padres, María Inés y Adrián, por la paciencia y soporte estos 9 años de carrera, incluso cuando parecía que no terminaba jamás.

Gracias a mis amigas, Carolina y Sofía, que me escucharon todo lo que necesitaba liberar durante este proceso.

## Índice

Glosario .....	9
1. Introducción .....	12
1.2. Metodología para el estudio de efluentes .....	15
1.2.1. Caracterización espectrofotométrica.....	16
1.2.2. Titulación Potenciométrica .....	16
1.2.3. Determinación de materia orgánica .....	16
1.2.3.1. Demanda química de oxígeno (DQO).....	17
1.2.3.2. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) .....	18
1.2.4. Ensayos de tratabilidad biológica de efluentes.....	20
1.3. Tratamiento de efluentes.....	20
1.3.1. Niveles primario, secundario y terciario de tratamiento .....	20
1.3.1.1. Métodos fisicoquímicos .....	21
1.3.1.2. Métodos biológicos .....	22
1.4. Efluente del proceso de concentración de bilis .....	24
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Hipótesis.....	27
2. Materiales y métodos .....	28
2.1 Efluente de la concentración de la bilis bovina.....	28
2.1.1 Reconstitución de la bilis bovina .....	28
2.1.2. Concentración química de la bilis bovina/generación del efluente.....	28
2.2. Caracterización espectrofotométrica.....	29
2.3. Titulación potenciométrica .....	29

2.4. Determinación de materia orgánica .....	30
2.4.1. Demanda química de oxígeno .....	30
2.4.2. Demanda bioquímica de oxígeno.....	30
2.4.2.1. Preparación de inóculos.....	31
2.4.2.2. Efectividad del inóculo .....	31
2.4.2.3. Actividad metabólica del inóculo .....	31
2.5. Inóculos microbianos .....	32
2.5.1. Agua superficial .....	32
2.5.2. Barros activados .....	32
2.5.2.1. Cultivo de barros activados.....	32
2.5.2.2. Estimación de biomasa del barro activado .....	34
2.5.2.3. Parámetros de control del barro.....	34
2.5.2.3.1. pH .....	35
2.5.2.3.2. Color .....	35
2.5.2.3.3. Índice volumétrico del lodo (IVL) .....	35
2.5.2.3.4. Fermentadores.....	35
2.6. Ensayos de tratabilidad de efluentes .....	36
2.6.1. Tratamiento fisicoquímico .....	36
2.6.2. Tratamientos biológicos .....	37
2.6.2.1. Barros activados .....	37
2.6.2.2. Tratamientos fúngicos.....	37
2.6.2.2.1. Relevamiento de cepas .....	37
2.6.2.2.2. Selección de cepas tolerantes al efluente.....	38
2.6.2.2.3. Evaluación de cepas fúngicas en medio líquido conteniendo el efluente y su agregado de fuentes de nitrógeno.....	39
2.6.2.2.4. Tratamiento del efluente con la cepa seleccionada .....	40

3. Resultados y discusión .....	42
3.1 Puesta a punto de métodos de estimación de materia orgánica .....	42
3.1.1. Demanda química de oxígeno .....	42
3.1.2. Demanda bioquímica oxígeno.....	43
3.2. Caracterización del efluente crudo .....	48
3.2.1. Espectrofotometría .....	48
3.2.2. Contenido de materia orgánica.....	49
3.3. Titulación.....	50
3.4. Ensayos de tratabilidad .....	50
3.4.1. Tratamiento fisicoquímico .....	50
3.4.1.1. Espectrofotometría .....	50
3.4.1.2. Contenido de materia orgánica.....	52
3.4.1.2.1. DBO .....	52
3.4.1.2.2. DQO .....	53
3.4.2. Tratamiento biológico .....	55
3.4.2.1. Relevamiento de cepas .....	55
3.4.2.2. Selección de cepas tolerantes al efluente.....	55
3.4.2.3. Evaluación de cepas fúngicas en medio líquido conteniendo el efluente y su agregado de fuentes de nitrógeno.....	58
3.4.2.4. Tratamiento con la cepa seleccionada.....	61
3.5. Estudio preliminar para el análisis de la tratabilidad biológica .....	66
4. Conclusiones.....	69
4.1. Perspectivas .....	71
5. Anexo.....	73
6. Bibliografía .....	74

## Glosario

**Alóctono:** de origen externo al sistema de estudio.

**Alimento / Microorganismos (Food to Microorganisms ratio F/M):** parámetro usado para determinar la carga de alimento en el barro activado. Tasa que indica la relación de alimento por peso seco de los microorganismos del sistema.

**Autóctono:** propio del sistema de estudio.

**Barros activados:** comunidad de microorganismos, formada por bacterias, protistas, hongos e invertebrados microscópicos multicelulares, capaces de remover materia orgánica de efluentes líquidos. Estos se encuentran en forma de aglutinada en pequeñas partículas (flóculos). Dada su naturaleza de crecimiento en forma de flóculos, se deben mantener en agitación y con inyección de aire para mantener tanto la biomasa en suspensión como el tenor de oxígeno disuelto. Al cesar la agitación los flóculos decantan, permitiendo la separación de la fase líquida que constituye el efluente tratado.

**Barro activado joven:** un barro joven tiene microorganismos que consumen mucho oxígeno y alimento, pero que no flocculan o aglutinan de manera adecuada. Requieren una alta cantidad de oxígeno y se caracterizan por presentar una alta cantidad de sólidos suspendidos. Un reactor con un barro joven se caracteriza por poseer poco oxígeno disuelto.

**Barro activado viejo:** un barro viejo tiene una baja actividad metabólica, con poca demanda de oxígeno y alimento. Es un barro cuyos flóculos tienen un aspecto de “cabeza de alfiler” (pin point floc) en el sobrenadante y en el cual que los flóculos más grandes sedimentan muy rápidamente. Requieren una baja cantidad de oxígeno y sus sólidos se compactan al decantar. Un reactor con un barro viejo tiene un alto nivel de oxígeno disuelto.

**Carbono orgánico total (COT):** metodología utilizada para medir todo el carbono orgánico presente en una muestra. La metodología consiste de una oxidación fuerte química o física. Útil a concentraciones bajas de materia orgánica.

**Concentración efectiva 50 (CE50):** parámetro utilizado para medir la toxicidad de un compuesto o sustancia. Indica cual es la concentración del compuesto o sustancia a la cual el 50 % de la población sobre la que se está probando la toxicidad muestra una respuesta o efecto.

**Demanda bioquímica de oxígeno (DBO):** parámetro de polución orgánica más utilizado y aplicable a aguas residuales. Estima la materia orgánica biológicamente oxidable que contiene la muestra.

**Demanda química de oxígeno (DQO):** ensayo que estima la materia orgánica químicamente oxidable. La DQO suele ser mayor que la DBO.

**Edad del barro activado:** es un parámetro con el que se controla el nivel de actividad metabólica, gasto de oxígeno y alimento, del barro activado. Este método se basa en determinaciones de la biomasa microbiana para calcular el tiempo de retención celular en un biorreactor.

**Lagunas de tratamiento:** sistema de tratamiento de aguas residuales bioquímico que simula un cuerpo de agua de superficie extensa con poca profundidad.

**Lecho de barros anaeróbicos de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés “Upflow Anaerobic Sludge Blanket”):** tipo de reactor anaeróbico usado para el tratamiento de aguas residuales de alta carga orgánica.

**Materia orgánica:** compuestos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, junto con nitrógeno, azufre, fósforo y hierro en algunos casos.

**Oxígeno consumido u oxidabilidad:** el oxígeno consumido es una medida de la reacción de oxidación de sustancias. La oxidabilidad es una medida aproximada de la cantidad de materia orgánica existente en el agua. Como oxidante suele utilizarse el permanganato de potasio en un medio ácido.

**Patrón primario:** reactivo de elevada pureza que sirve como material de referencia en valoraciones volumétricas. Dentro de los requisitos más importantes de un patrón primario se encuentran los siguientes: a) alto grado de pureza (>99.9 %); b) estabilidad a temperatura ambiente, sin cambiar su composición con el secado o con el aumento de temperatura; c) ausencia de agua de hidratación, para que la composición del sólido no cambie con las

variaciones de humedad; d) no absorber CO<sub>2</sub> de la atmósfera; e) masa molar razonablemente grande para minimizar el error relativo al pesar el patrón.

**Sedimentabilidad:** es la capacidad de la biomasa en forma de flóculos que constituye el barro activado para decantar y separarse del líquido tratado.

**Tiempo de retención celular:** es el tiempo en el cual una célula se mantiene en el biorreactor desde su ingreso hasta su salida.

**Tratabilidad:** refiere a la capacidad de un efluente o residuo para ser tratado de forma efectiva para cumplir con los estándares de calidad o vuelco. Estos estándares suelen ser legales.

## 1. Introducción

Los cuerpos de agua albergan naturalmente materia orgánica, ya que ésta constituye la base de las cadenas tróficas que sustentan la vida acuática. No obstante, un exceso de esta materia puede generar efectos adversos, como la reducción de la penetración de la luz en la columna de agua, afectando así las cadenas tróficas. Esta materia puede originarse en el ambiente terrestre (alóctona) o en el acuático (autóctona) (U.S. Geological Survey, s. f.).

Generalmente, la concentración de materia orgánica en los cuerpos de agua es baja. En las aguas marinas, se espera un contenido de carbono orgánico total (COT) de alrededor de 1 mg/L, aunque en aguas superficiales puede variar entre 5 y 6 mg/L, llegando incluso a superar los 30 mg/L en lagos eutrofizados (Vidal, 2003). La introducción excesiva de materia orgánica puede alterar las cadenas tróficas acuáticas (U.S. Geological Survey, s. f.). Por consiguiente, es crucial controlar la concentración de materia orgánica al desechar efluentes industriales.

En este contexto, la ley establece límites para la descarga de materia orgánica, en términos de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), considerando el tipo de cuerpo de agua. Para verter en sistemas de alcantarillado, la DBO no debe exceder 200 mg O<sub>2</sub> /L, mientras que, en cuerpos de agua y sistemas pluviales, el límite se reduce a 30 mg O<sub>2</sub> /L (Boletín Oficial de la República Argentina, 2017).

La presencia elevada de materia orgánica en cuerpos de agua puede conllevar diversos problemas ambientales, como hipoxia o anoxia en el agua, proliferación de microorganismos tóxicos, eutrofización y aumento de la turbidez. Sectores industriales como el de la producción de pulpa y papel, curtiembres, usinas lácteas, destilerías y farmacéuticas, entre otros, suelen generar efluentes con alta carga orgánica (Gupta and Singh, 2019).

Cumplir con los límites legales, entre ellos los de carga orgánica, es esencial para poder descargar estos efluentes al ambiente. No cumplir con estos estándares puede conducir a la anoxia del cuerpo de agua, resultando en la mortandad de la vida acuática, la eutrofización y una merma en la calidad del agua (figuras 1 a 4), incluso volviéndola inapropiada para el consumo (Bala et al., 2015).



Figura 1. Mortandad de peces en el Río Salí (Tucumán) por contaminación con desechos de alta carga orgánica de los ingenios azucareros (Corresponsal LID, 2020).



Figura 2. Ejemplo del efecto de la anoxia en un cuerpo de agua (20 minutos ,2019).



Figura 3. Ejemplo de floración de algas tóxicas en Estados Unidos (Geist, M., E., 2018).

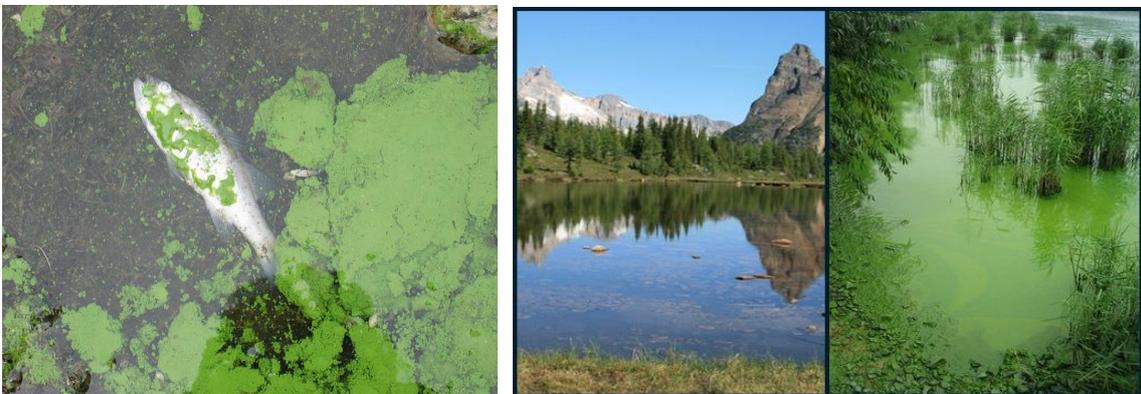


Figura 4. Izq: Ejemplo del efecto de la eutrofización de cuerpos de agua en los peces (*Causes, Effects and Solutions to Ecological Problem of Eutrophication* (s.f)). Der: Comparación entre un lago oligotrófico y un lago eutrófico (Mack, J. (s.f)).

Con el fin de reducir la carga orgánica en los efluentes, es común emplear tratamientos biológicos. Para efluentes con una DQO de hasta 1000 mg O<sub>2</sub>/L, los tratamientos aeróbicos como

las lagunas de estabilización son los más utilizados. Para cargas entre 4000 y 10.000 mg O<sub>2</sub>/L, se recurre a tratamientos aeróbicos de lodos activados, mientras que para cargas mayores a 10.000 mg O<sub>2</sub>/L se emplean sistemas de tratamiento anaeróbico, como el lecho fluido (UASB) (Anijiofor Sandra et al., 2017). Sin embargo, altas cargas orgánicas pueden afectar el desempeño del tratamiento debido a perturbaciones en la comunidad microbiana (Bhattacharya et al., 2017).

La degradación fúngica, enfocada en hongos saprófitos y su habilidad de descomponer materia orgánica, resulta relevante en este contexto. Algunos hongos poseen la capacidad de detoxificar sustratos, permitiéndoles crecer en condiciones adversas para otros organismos (Anastasi et al., 2013; Deshmukh et al., 2016).

En base a estos antecedentes, se propone emplear la capacidad degradativa de hongos en el tratamiento de efluentes con elevada carga orgánica, ya sea para reducir la materia orgánica o como complemento a sistemas convencionales. Para ello, en esta tesis se aborda la puesta a punto de técnicas para el estudio de efluentes de elevada carga orgánica, la caracterización del efluente de estudio y se evalúa la factibilidad de tratamiento mediante cepas fúngicas seleccionadas en conjunto con tratamientos convencionales, utilizando como modelo un efluente proveniente de un proceso novedoso de concentración de bilis bovina. Éste, debido a su alta carga orgánica y bajo pH no es susceptible de tratamiento mediante métodos convencionales tales como barros activados.

## 1.2. Metodología para el estudio de efluentes

Los efluentes industriales suelen ser mezclas complejas de diversos compuestos, lo que hace necesario el uso de parámetros generales para su análisis. Estos parámetros evalúan las propiedades fisicoquímicas y la concentración de compuestos inorgánicos (metales y no metales) así como el contenido de materia orgánica, dependiendo de la naturaleza del efluente en cuestión (Sánchez Rojas y Ojeda, 2005). A continuación, se detallan los métodos empleados en este estudio.

### 1.2.1. Caracterización espectrofotométrica

La presencia de compuestos aromáticos y sus derivados, hidroxilados, amino y/o nitrogenados, en su mayoría solubles en agua a bajas concentraciones, hace de la espectrofotometría UV-Vis una técnica analítica valiosa y necesaria para llevar a cabo caracterizaciones rápidas de efluentes. La espectrometría UV-Vis se utilizó para obtener información sobre los espectros de absorción de las muestras. Aunque esta técnica no permite identificar los compuestos presentes en el efluente, sí proporciona información sobre la absorbancia promedio de las moléculas en la muestra (Iocoli et al., 2017). Esto permite aproximarse a si hubo remoción de compuestos entre diferentes tratamientos.

El análisis espectrofotométrico UV de aguas residuales industriales puede ser desafiante debido a la potencial presencia de compuestos no absorbentes y a la diversidad en la composición de los efluentes liberados por distintas industrias. Sin embargo, debido a la naturaleza compleja de estos efluentes industriales, es común que los compuestos no absorbentes estén acompañados de otras sustancias absorbentes, lo que conduce a espectros UV complejos en la mayoría de los efluentes industriales no tratados (Burgess and Thomas, 2007).

### 1.2.2. Titulación Potenciométrica

En el caso de efluentes con pH extremos, se necesita determinar el título del mismo de manera tal de poder calcular el ácido o base necesario para neutralizar el efluente. Para titular se adiciona por goteo un volumen conocido de una base o ácido fuerte, según si la sustancia a titular es ácida o básica respectivamente, hasta alcanzar un pH 7. Conociendo el volumen necesario para neutralizar la muestra es posible calcular la concentración de ácido o base que contiene la muestra. La presencia de color en el efluente estudiado dificulta la utilización de indicadores de pH, por lo que se utiliza un electrodo sensible al pH.

### 1.2.3. Determinación de materia orgánica

La materia orgánica puede estimarse de diversas formas, ya sea directamente mediante la medición del carbono orgánico total (COT) o indirectamente mediante la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO).



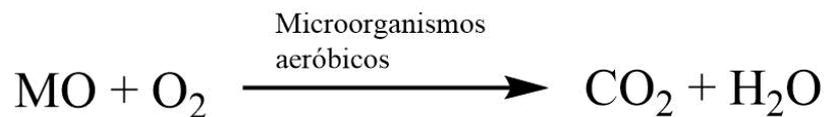
interviniendo en su función como catalizador, evitando así la reducción del cromo. Esto lleva a una subestimación en la determinación de la materia orgánica (APHA, 2023)

Este tipo de interferencia se puede reducir con la adición de sulfato de mercurio ( $\text{HgSO}_4$ ) previo al procedimiento. Esta modificación es aplicable hasta una concentración de 2000 mg de cloruros/L. De ser mayor la concentración de cloruros, se utiliza otro procedimiento, como una medición de bajo rango (Fernández Sturla, et al. 2007) o cambiar la técnica de medición de materia orgánica por la medición de carbono orgánico total (COT).

### 1.2.3.2. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

La determinación bioquímica de materia orgánica puede ser utilizada para estimar diversos parámetros, como el contenido de materia orgánica biodegradable, la biodegradabilidad de productos, efluentes industriales y domésticos, y la tratabilidad biológica. La estimación de la DBO se obtiene al exponer una muestra a una comunidad de microorganismos que, a lo largo del proceso, degradan la materia orgánica biodegradable presente de manera aeróbica. En otras palabras, estos microorganismos consumen oxígeno para convertir la materia en dióxido de carbono y agua. Este proceso metabólico puede ser monitorizado midiendo la concentración de oxígeno en el medio, en un sistema cerrado, y calculando la concentración de materia orgánica degradada mediante cálculos estequiométricos (Reacción 2).

La medición de la DBO se logra al determinar la cantidad de oxígeno que los microorganismos demandan cuando utilizan la materia orgánica como fuente de nutrientes en condiciones de laboratorio, en un sistema cerrado, durante un período de 5 días a 20 °C. El contenido de materia orgánica se calcula a través de estequiometría.



Reacción 2. Representación de la degradación de la materia orgánica por respiración aeróbica.

De esta manera, es posible establecer una relación proporcional entre el consumo de oxígeno y la cantidad de materia orgánica presente en el cuerpo de agua bajo evaluación (Metcalf, 1981).

Existen varias formas de medir la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), como la DBO de 5 días (5-d-DBO) y la DBO última (UDBO), una extensión de la 5-d-DBO. También se emplean mediciones respirométricas, que miden directamente el oxígeno consumido por microorganismos en un recipiente herméticamente cerrado con temperatura y agitación constante (APHA, 2023). En este estudio, se utilizó el método de la 5-d-DBO.

Para medir la DBO, se empleó el método de dilución, que implica diluir la muestra a diferentes concentraciones con agua libre de materia orgánica. Estas diluciones se efectúan para que alguna lectura de oxígeno disuelto caiga dentro del rango de 2 ppm de oxígeno consumido y un excedente de 1 ppm de oxígeno. Si esto no se cumple, los cálculos de DBO no son confiables y solo se puede informar si la materia orgánica en el efluente es mayor o menor a la medida.

Existen métodos químicos y electroquímicos para medir el oxígeno disuelto en el agua. En esta investigación, se utilizó un sistema de electrodo con una membrana permeable al oxígeno disuelto. Otros métodos de medición incluyen el método iodométrico o método de Winkler y la medición con sensor óptico (APHA, 2023).

La DBO a los 5 días es el parámetro de contaminación orgánica más utilizado y aplicable a aguas residuales y superficiales (Metcalf, 1981). Representa una estimación indirecta del grado de contaminación orgánica de los cuerpos de agua (APHA, 2023).

Sin embargo, determinar la materia orgánica disuelta mediante el método de la 5-d-DBO presenta desafíos. Requiere una fuente rica en microorganismos activos y aclimatados como inóculo, pretratamiento en caso de residuos tóxicos y para reducir la influencia de organismos nitrificantes, un periodo prolongado para obtener resultados y la medición se limita a los productos orgánicos biodegradables (Metcalf, 1981).

Los parámetros de DBO y DQO están directamente relacionados, permitiendo estimar uno a partir de la medición del otro, siempre que se conozca la relación entre ambos (Metcalf, 1981).

Para la DBO, es esencial contar con una fuente de inóculo de microorganismos heterótrofos. Estos inóculos pueden provenir tanto de cursos de agua receptores de efluentes (por ejemplo, aguas superficiales de ríos y lagunas) como de efluentes de plantas de tratamiento biológico y aguas residuales domésticas. También existen fuentes comerciales de microorganismos como

inóculos disponibles, aunque los inóculos más utilizados son los mencionados anteriormente (APHA, 2023).

#### 1.2.4. Ensayos de tratabilidad biológica de efluentes

Si bien no existen metodologías estandarizadas, los ensayos de tratabilidad biológica son procedimientos de laboratorio diseñados para evaluar la capacidad de los microorganismos presentes en, por ejemplo, barros activados, para descomponer y eliminar la materia orgánica y otros contaminantes presentes en un efluente. Este ensayo se basa en el principio de tratamiento biológico, en el cual los microorganismos heterótrofos utilizan la materia orgánica del efluente como fuente de alimento, degradándola en componentes más simples como agua, dióxido de carbono y biomasa. El ensayo implica simular las condiciones de una planta de tratamiento a pequeña escala para determinar cómo los microorganismos responden al efluente, lo que proporciona información valiosa para diseñar y optimizar procesos de tratamiento a mayor escala (Molina et al., 2003; Perea Mora, 2012). El contenido de materia orgánica es determinado a través de las técnicas de determinación de materia orgánica, como DBO o DQO.

### 1.3. Tratamiento de efluentes

Las corrientes contaminadas o efluentes generados por actividades industriales y domésticas ejercen un impacto ambiental significativo si se descargan sin previo tratamiento. Por lo tanto, es crucial someterlos a procesos de depuración. Los métodos de tratamiento abarcan aspectos químicos, físicos y biológicos, siendo estos últimos los más preferibles debido a su menor demanda energética y condiciones operativas más benignas. A continuación, se enumeran algunos de los enfoques de tratamiento ampliamente empleados (Trelles, 1979; Robinson et al., 2001; Casserly y Erijman, 2003).

#### 1.3.1. Niveles primario, secundario y terciario de tratamiento

Los efluentes industriales y domiciliarios pueden tratarse con tres tipos de tratamiento, los tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Los tratamientos primarios se refieren a la remoción física de aceites, grasas y grandes partículas a través de métodos fisicoquímicos. Los tratamientos secundarios utilizan la habilidad de microorganismos de reducir la cantidad de

materia orgánica en el efluente. Los tratamientos terciarios se suelen utilizar en conjunto con los tratamientos secundarios para mejorar la calidad del efluente tratado. Un tratamiento terciario comúnmente usado es la filtración, la cual se muestra efectiva en la reducción de sólidos suspendidos y DBO (Quach-Cu, et. al, 2018).

Los tratamientos primarios eliminan partículas de gran tamaño que están presentes en los efluentes, las cuales pueden bloquear y/o tapar conductos y bombas. Estas partículas pueden ser retiradas del efluente a través de tratamientos de coagulación y/o floculación, entre otros. En el caso de la remoción de sólidos por medio de sedimentación, esta tiene lugar en tanques de sedimentación en los cuales el efluente mezclado con los barros activados y se remueve lo acumulado en el fondo y en la superficie. Algunos coagulantes usados para reducir la carga de contaminantes orgánicos e inorgánicos son el sulfato de aluminio, el cloruro de hierro, el sulfato de hierro y el hidróxido de calcio. Cada uno de estos coagulantes tiene un rango de pH en un cual es efectivo, por lo que se debe controlar este parámetro para hacer su uso (Pal, 2017).

Los tratamientos secundarios o biológicos se utilizan para reducir aún más los restos de materia orgánica e inorgánica que puedan estar presentes en el efluente luego de un tratamiento primario. Dado que estos tratamientos utilizan microorganismos su eficiencia depende de la biodegradabilidad de los contaminantes presentes en el efluente. El tratamiento biológico puede ser aeróbico, facultativo, anaeróbico o una combinación de estas. La comunidad microbiana que realiza la degradación está compuesta por bacterias, hongos, protozoos, rotíferos y nematodos (Pal, 2017).

Los tratamientos terciarios se refieren a operaciones o tratamientos que son adicionados luego del tratamiento biológico. Estos pueden variar desde un tratamiento simple como la adición de un filtro a tratamientos complejos para eliminar materia orgánica, sólidos suspendidos, nitrógeno o fósforo. (Sonune and Ghate, 2004).

#### *1.3.1.1. Métodos fisicoquímicos*

Adsorción: La adsorción es un método de tratamiento de efluentes que se basa en la capacidad de ciertos materiales de retener partículas que están suspendidas en el líquido sobre su superficie. Algunos materiales usados para este tipo de tratamientos son el carbón activado, la zeolita, arcilla y alúmina activada. El tipo de material y la disponibilidad de superficie libre

determina durante cuánto tiempo será efectiva la adsorción. Es un método que no es muy utilizado debido a su baja efectividad, altos costos de producción y a que únicamente retiene a los contaminantes (Pal, 2017).

Separación por membrana: son métodos que se basan en pasar una corriente contaminada a través de una membrana semipermeable. Dado que es posible modificar y diseñar membranas en base a las características del efluente a tratar, este es un método altamente eficiente. Una desventaja de esta técnica son los altos costos de producción, la saturación y obstrucción de las membranas durante el filtrado, y la eliminación del contaminante concentrado que queda retenido (Pal, 2017).

Intercambio iónico: es un método que se utiliza para remover moléculas cargadas, utilizando un ion de carga opuesta para atraerlas. Es un método muy dependiente de los contaminantes presentes en el efluente (Pal, 2017).

Coagulación: mediante la adición de sustancias coagulantes es posible causar la agregación de la materia suspendida en el líquido a tratar. Luego de esta coagulación se separan los flóculos formados del líquido a través de sedimentación o filtración. Las desventajas de este método son la toxicidad de muchos de los coagulantes usados, el alto costo, la generación de grandes cantidades de material coagulado y la dificultad al determinar la dosis adecuada de coagulante a utilizar (Robinson et al., 2001; Pal, 2017).

#### *1.3.1.2. Métodos biológicos*

Cámara séptica: es un método anaeróbico que se basa en la retención de líquidos en una cámara pobre en oxígeno, lo cual favorece el metabolismo fermentativo. El tratamiento es llevado a cabo por una población de microorganismos autóctonos al líquido a tratar. A pesar de tener baja eficiencia, son sistemas de bajo costo y aún muy usado en zonas sin redes cloacales (Trelles, 1979).

Lechos o filtros de contacto: son tanques llenos de material de superficie rugosa, como grava, en lo que se vuelca rápidamente el líquido a tratar y permanece en contacto con el material por varias horas. Gracias a la superficie rugosa, se desarrolla una "película" de microorganismos que activamente purifican el líquido. Luego se vacía el contenedor y el material se expone al aire, permitiendo el metabolismo aeróbico. Sus principales limitantes son el prolongado período de

reposo necesario antes de poder utilizarlo nuevamente, la probabilidad alta de obstrucciones y el bajo volumen de líquido que puede tratar en cada ciclo (Metcalf, 1981).

Lechos percoladores: están constituidos por una masa de soportes plásticos sobre los cuales crece una película microbiana. El líquido a tratar se distribuye a través de aspersores, de forma de no inundar los soportes. Las sustancias orgánicas se adhieren por adherencia mecánica al *biofilm* y luego son digeridas por los microorganismos, depurando así el líquido (Trelles, 1979).

Lagunas de tratamiento: son depósitos de agua de gran extensión superficial, con profundidades variables atado al tipo de metabolismo que se busca favorecer (aeróbico, facultativo o anaeróbico). Son de bajo costo de inversión, operación y mantenimiento, siendo muy eficientes en la degradación de efluentes de poca complejidad. Se suelen utilizar en zonas donde la utilización de grandes extensiones de terreno no es una limitación (Itria, 2016).

Barros activados: es un método de tratamiento de efluentes en el cual se cultivan microorganismos en suspensión en biorreactores, en condiciones aeróbicas. Los microorganismos se alimentan del efluente a tratar y al crecer se agregan en forma de flóculos. Estos se mantienen en suspensión gracias a la aireación del biorreactor durante el tiempo que dura el tratamiento. Este proceso ocurre en un reactor biológico aeróbico (cultivo en agitación) y luego se pasa a un clarificador por gravedad para separar los sólidos del líquido tratado. Los flóculos decantan y son reciclados al primer biorreactor (Itria, 2016).

Para reducir la carga orgánica de los efluentes suelen emplearse tratamientos biológicos. En el caso de efluentes que contengan una DQO de hasta 1000 mg O<sub>2</sub>/L, los tratamientos biológicos más utilizados son tratamientos aeróbicos, como lagunas de tratamiento. Para efluentes con una carga entre 4000 y 10.000 mg O<sub>2</sub>/L suelen usarse tratamientos aeróbicos de barros activados. En el caso de efluentes con cargas superiores a los 10.000 mg O<sub>2</sub>/L (ej.: efluentes generados por la industria maltera, usina láctea, etc.) se utilizan sistemas de tratamiento anaeróbico, ya que de esta manera se puede sortear el impedimento que implica la alta demanda de oxígeno para un proceso aeróbico. Entre este tipo de tratamientos se encuentran los de lecho fluido (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* o UASB) (Anijiofor Sandra et al., 2017). Sin embargo, si la carga orgánica es muy elevada, esto puede llevar a reducir el desempeño del tratamiento, debido a una disrupción de la estructura de la comunidad microbiana (Bhattacharya et al., 2017).

Degradación fúngica: los hongos son capaces de crecer en un gran rango de ambientes y aquellos que se nutren de forma heterótrofa desarrollaron diferentes estrategias metabólicas. Entre estas estrategias, se destaca la desarrollada por hongos saprófitos, es decir, hongos que se nutren de materia orgánica que no proviene de un ser vivo, tal como restos lignocelulósicos.

Algunos de los hongos son capaces de detoxificar sustratos utilizando parte de sus metabolitos, lo cual les permite crecer en condiciones que serían letales para otros organismos (Anastasi et al., 2013; Deshmukh et al., 2016). Entre los sustratos que pueden usar los hongos está la madera. Uno de los grupos de hongos que se destacan por su explotación son los hongos de pudrición blanca (HCPBs o WRF por sus siglas en inglés) (Rayner and Boddy, 1988). Estos hongos son capaces de degradar los compuestos presentes en la pared celular vegetal, la cual está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Este último compuesto tiene funciones físicas importantes para la pared vegetal, tales como dar rigidez e hidrofobicidad, sino que también bloquea el acceso a los carbohidratos que forman la pared (Taiz and Zeiger, 2006). La lignina es un compuesto con una estructura compleja formada por la unión de varios anillos aromáticos, organizándose de formas altamente heterogéneas (Kubicek et al., 2012).

Dada la heterogeneidad de esta molécula, los WRFs desarrollaron enzimas oxidasas de baja especificidad, como las peroxidasas y lacasas. Gracias a esta baja especificidad, estas enzimas son capaces de degradar una gran variedad de compuestos, lo que hace que los hongos productores de enzimas ligninolíticas sean potencialmente aplicables a la micorremediación (Majul, 2020).

#### 1.4. Efluente del proceso de concentración de bilis

La bilis bovina, un subproducto derivado de la faena de reses, tiene aplicaciones clave como la obtención de sales biliares como el ácido cólico. Estos ácidos biliares encuentran uso en diversas industrias, como la farmoquímica, el procesamiento de subproductos animales, la fabricación de productos de bilis bovina concentrada, y en los campos médico y veterinario. No obstante, para obtener ácidos biliares a partir de la bilis bovina, es esencial concentrarla, ya que de lo contrario sería inviable desde el punto de vista económico. Sin embargo, los métodos tradicionales para la concentración de bilis son intensivos en energía y costosos. En respuesta a esta problemática, el Laboratorio de Productos Naturales, dentro de su División de Ingredientes Activos y Biorrefinería del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) ha concebido y

patentado un método químico de concentración que se destaca por su velocidad y eficiencia energética, además de su enfoque en reducir los costos y el impacto ambiental (Bartoloni, et al., 2016).

Este nuevo enfoque de concentración de bilis bovina ha demostrado ser altamente eficaz (con una eficiencia superior al 90 %) y rentable, al evitar el uso prolongado de calor, como se muestra en la figura 5. No obstante, conlleva la generación de un efluente que presenta desafíos considerables ya que contiene una carga orgánica elevada (DQO: 60.000 mg O<sub>2</sub>/L y DBO: 40.000 mg O<sub>2</sub>/L), altos niveles de sales y un pH bajo (pH≈1-2) (Martinez, et al., 2018). Dado que este efluente no es susceptible de tratamiento mediante las tecnologías actuales y su vertido directo al medio ambiente no es viable, se plantea una dificultad significativa en la implementación de la patente.

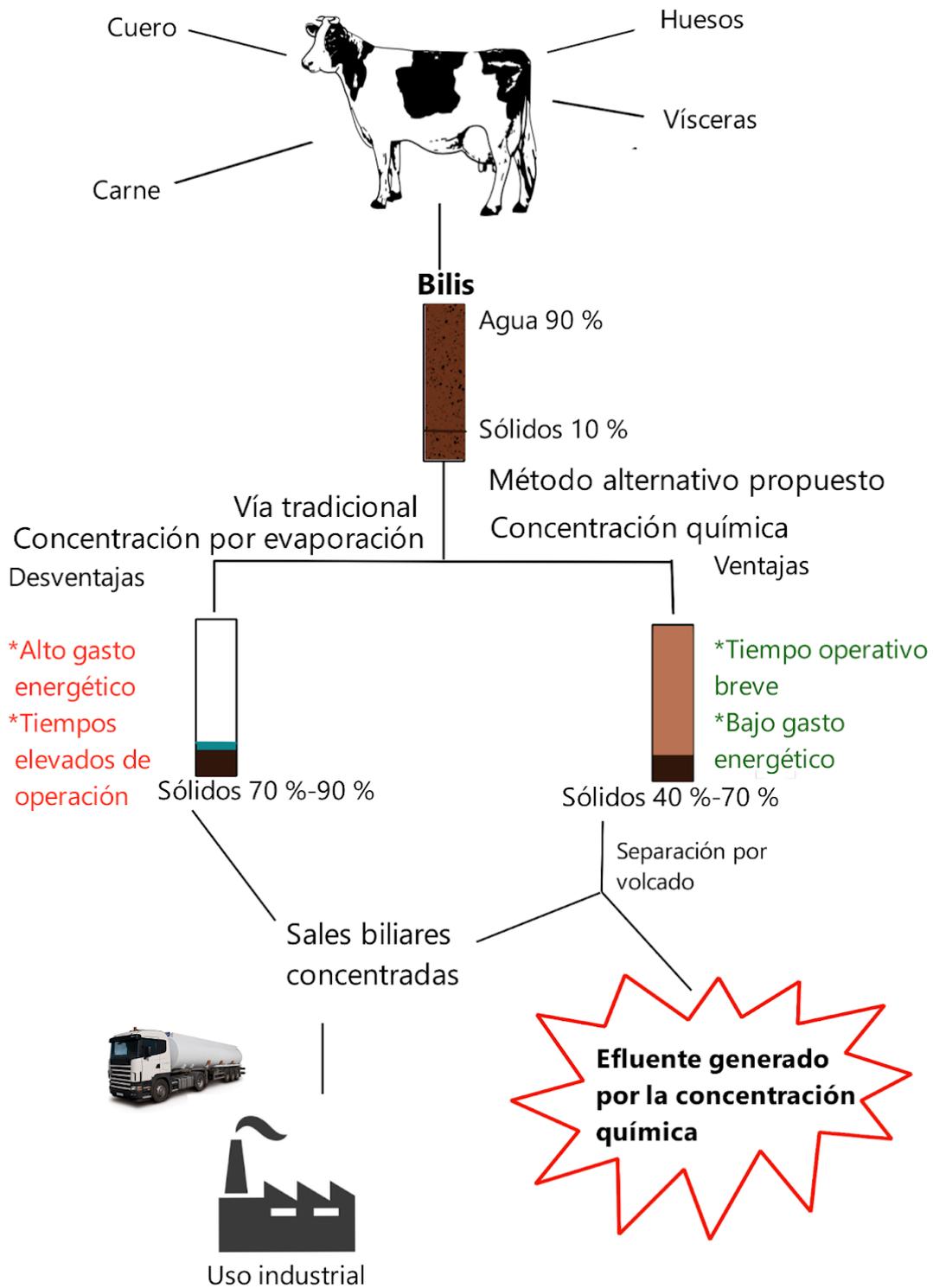


Figura 5. Esquema comparativo del método tradicional de obtención de sales biliares y el método desarrollado por el INTI.

## Objetivo general

Estudiar la factibilidad de un tratamiento fúngico para disminuir el contenido de materia orgánica en el efluente de estudio.

## Objetivos específicos

- Realizar la prospección de distintas especies fúngicas que sean capaces de utilizar el efluente de estudio como fuente de carbono.
- Determinar la CE50 del efluente para las diferentes cepas de hongos.
- Evaluar el crecimiento de cepas de hongos causantes de pudrición blanca y de cepas de hongos ambientales en medios líquidos conteniendo el efluente.
- Evaluar la disminución de la concentración de materia orgánica del efluente luego de su tratamiento mediante filtración fisicoquímica y/o el crecimiento de cepas de hongos.

## Hipótesis

Los hongos son capaces de modificar medios conteniendo efluentes resultantes de la concentración de bilis, disminuyendo su carga orgánica.

## Hipótesis específicas

- Las cepas de hongos de pudrición blanca son capaces de utilizar el efluente de estudio como fuente de carbono y crecer en el medio.
- Se determina un CE50 diferente para diferentes cepas de hongos.
- Las cepas evaluadas son capaces de crecer en el medio líquido conteniendo el efluente en concentración del 100 % y utilizarlo como fuente de carbono.
- La concentración de materia orgánica del efluente es menor luego del tratamiento con hongos y el tratamiento fisicoquímico, que únicamente con el tratamiento fisicoquímico o sin tratamiento alguno.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Efluente de la concentración de la bilis bovina

El efluente producto de la obtención de ácidos cólicos a partir de bilis bovina se generó siguiendo la metodología patentada por INTI. Con el fin de no violar las normas de protección a la propiedad intelectual se describe la metodología al nivel de detalle permitido por la institución.

El INTI proveyó la bilis en forma concentrada por evaporación, por lo que fue necesario reconstruirla y luego aplicar la metodología desarrollada por ellos.

Dada la cantidad de efluente utilizado, este se produjo en 2 lotes. Se compararon los efluentes generados para garantizar que no tuvieran grandes diferencias en los parámetros clave. Esto se realizó con mediciones de DBO, DQO, pH y espectrometría UV-Vis.

#### 2.1.1 Reconstitución de la bilis bovina

La bilis concentrada se calentó a 80 °C en un baño termostatzado y se diluyó con agua destilada hasta alcanzar su concentración original. Para esto, mediante la técnica de residuo total por evaporación (APHA, 2023) se verificó que los sólidos alcanzaran un 9 % expresados como materia sólida seca.

#### 2.1.2. Concentración química de la bilis bovina/generación del efluente

Se colocaron 2 L de la bilis reconstituida en el reactor, con paletas mezcladoras con una velocidad aproximada de mezcla de 300 rpm (figura 6). Para llevar a cabo la reacción, se adicionaron soluciones salinas y ácidas por goteo hasta alcanzar pH de 2. Se dejó decantar hasta el día siguiente. Se separaron la fase líquida (efluente) y la bilis concentrada.



Figura 6. Biorreactor usado para el proceso de concentración química de la bilis bovina.

## 2.2. Caracterización espectrofotométrica

La absorbancia de las muestras de efluente se midió entre las longitudes de onda de 800 nm y 200 nm, y las unidades de absorbancia de 0,00 a 3,99; usando un espectrofotómetro de marca Shimadzu, modelo UVMini-1240.

## 2.3. Titulación potenciométrica

La primera etapa de acondicionamiento del efluente consistió en su neutralización y filtración fisicoquímica. Para neutralizar el efluente se realizó previamente una titulación potenciométrica, agregando un volumen conocido de NaOH 0,5 M hasta obtener un pH de 7. Esto permitió calcular la concentración de HCl en el líquido y estimar la cantidad de óxido de calcio (CaO) que se debe agregar para alcanzar un pH de 7. Este cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula.

$$C_{NaOH} * V_{NaOH} = C_{HCl} * V_{Efluente}$$

Fórmula 1. Fórmula de dilución

Siendo:

$C_{NaOH}$ : Concentración de NaOH usado

$V_{\text{NaOH}}$ : Volumen de NaOH usado

$C_{\text{HCl}}$ : Concentración de HCl en el efluente

$V_{\text{Efluente}}$ : Volumen de efluente titulado

## 2.4. Determinación de materia orgánica

### 2.4.1. Demanda química de oxígeno

Se utilizó el método de reflujo cerrado (APHA, 2023) para lo que se utilizaron tubos de digestión con sello de teflón, preparados con 1,5 mL de solución de digestión de alto rango ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  10,216 gr/L;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  167 mL/L y  $\text{HgSO}_4$  33,3 gr/L) y 3,5 mL de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  10,15 gr/L. A estos se le agregaron 2,5 mL de la muestra a medir e incubaron durante 2 h a 150 °C. Luego se enfriaron a temperatura ambiente para evitar la presencia de sales en suspensión.

Se realizó una curva de calibración usando ftalato de potasio (KHP), el cual fue previamente secado a 110 °C y pulverizado. Se usaron concentraciones de 47,6 hasta 901,2 mg/L de KHP. Luego de la digestión de las muestras, la DQO se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 600 nm usando un espectrofotómetro.

### 2.4.2. Demanda bioquímica de oxígeno

Para determinar la DBO se utilizó el método de dilución (APHA, 2023). El agua de dilución utilizada se preparó agregando 1 mL de cada solución listada a continuación por cada litro de agua destilada:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8,5 gr/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  21,78 gr/L;  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  33,4 gr/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,7 gr/L (buffer fosfato);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22,5 gr/L (solución de sulfato de magnesio);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  36,4 gr/L (solución de cloruro de calcio);  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.25 gr/L (solución de cloruro férrico). El agua así preparada se mantuvo a 20 °C en incubadora hasta alcanzar el equilibrio, con un oxígeno disuelto entre 8 y 9 mg/L. Como “semilla biológica” se utilizó un volumen determinado por litro de agua de río y/o de sobrenadante de una planta piloto de barros activados (ver: *inóculos microbianos*). Las muestras fueron diluidas con el agua de dilución preparada y sembrada en frascos de 300 mL con cierre de tapón esmerilado. Los frascos sellados se incubaron a 20 °C, de forma estática durante 5 días y en oscuridad. Luego se midió el oxígeno disuelto reemplazando la tapa esmerilada por un sensor de oxígeno (AquaCombo). Como control funcional del inóculo

se utilizó una solución de glucosa 150 mg/L y ácido glutámico 150 mg/L (APHA, 2023). La preparación de la solución se realizó secando glucosa y ácido glutámico a 103 °C hasta peso constante. Para facilitar la disolución del ácido glutámico se utilizó agua en ebullición. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se adicionó la glucosa para evitar su caramelización.

#### *2.4.2.1. Preparación de inóculos*

Los inóculos provenientes de aguas superficiales fueron mantenidos en aireación durante 1 semana a 20 °C y luego se verificó su efectividad y su actividad metabólica, como se detalla más adelante. De la misma manera se procedió con el inóculo proveniente de la planta a escala de laboratorio de barros activados. Este inóculo se obtuvo tomando entre 500 y 600 mL del sobrenadante de la decantación de barros activados, el cual luego se filtró con algodón y se colocó en un recipiente de vidrio. Luego se incubó a 20 °C durante 1 semana para permitir que la comunidad de microorganismos proveniente de los barros activados se estabilice frente a las nuevas condiciones.

#### *2.4.2.2. Efectividad del inóculo*

Esta prueba verifica que los inóculos a utilizar se encuentren activos, determinando su tasa de respiración. Para esto se colocaron en las botellas con cierre esmerilado distintos porcentajes de inóculo (2,5%, 5%, 10%, 25% y 50%) en el agua de dilución previamente descrita y se incubaron a 20°C por 5 días. Luego se midió cuánto oxígeno fue consumido con una sonda medidora de oxígeno.

#### *2.4.2.3. Actividad metabólica del inóculo*

Para evaluar la actividad metabólica de los inóculos se incubaron porcentajes de inóculo (0,1 %, 0,05 %, 0,025 % y 0,01 %) en agua de dilución y una solución patrón de glucosa (15 %) y ácido glutámico (15 %) al 2 %, durante 5 días a 20 °C. Se midió el consumo de oxígeno en presencia de la solución patrón.

## 2.5. Inóculos microbianos

### 2.5.1. Agua superficial

Tanto para utilizar como inóculo o semilla para la determinación de DBO como para incrementar la biodiversidad de barros activados se tomaron muestras de distintos cuerpos de agua durante el desarrollo de la tesis: del lago de Regatas (CABA), Río de la Plata (CABA), Río Uruguay y Río Paraná (Prov. de Entre Ríos).

### 2.5.2. Barros activados

Los barros activados utilizados en esta tesis se cultivaron a partir de flóculos preservados a 4 °C provenientes de la planta de tratamiento de un centro comercial de la zona oeste del Gran Buenos Aires, utilizado en trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Micología Experimental. Este inóculo se enriqueció con barros activados provenientes de una planta de tratamiento de la industria textil, provistos gentilmente por la Dra. Eva Figuerola. A su vez, se utilizaron barros activados provenientes del Laboratorio de Biología del Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas del INTI, provistos gentilmente por la Lic. Mariana Papa. Los barros fueron alimentados periódicamente con un efluente sintético. Este efluente, por su carga orgánica, simula la composición de aguas residuales domésticas. Además, aporta los nutrientes y micronutrientes necesarios para el adecuado mantenimiento de los barros. Está compuesto por peptona de carne 32 gr/L, extracto de levadura 22 gr/L, urea 6 gr/L, NaCl 1,8 gr/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,8 gr/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,4 gr/L, y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,6 gr/L. La formulación descrita corresponde a una solución madre de una concentración 200 veces mayor a la de trabajo (ISO Standard, 1992).

#### 2.5.2.1. Cultivo de barros activados

Para el cultivo se utilizaron como reactores ampollas de decantación de 2000 mL y 500 mL, con inyección de aire comprimido para airear y mantener los flóculos en suspensión. Se realizó diariamente la alimentación de los barros, para lo cual se detuvo la aireación y dejaron decantar los barros durante al menos 30 minutos descartando al menos el 50 % del sobrenadante por una solución conteniendo 25 mL de efluente sintético y se llevó a volumen original con agua declorada (ISO Standard, 1992), como se muestra en la figura 7.

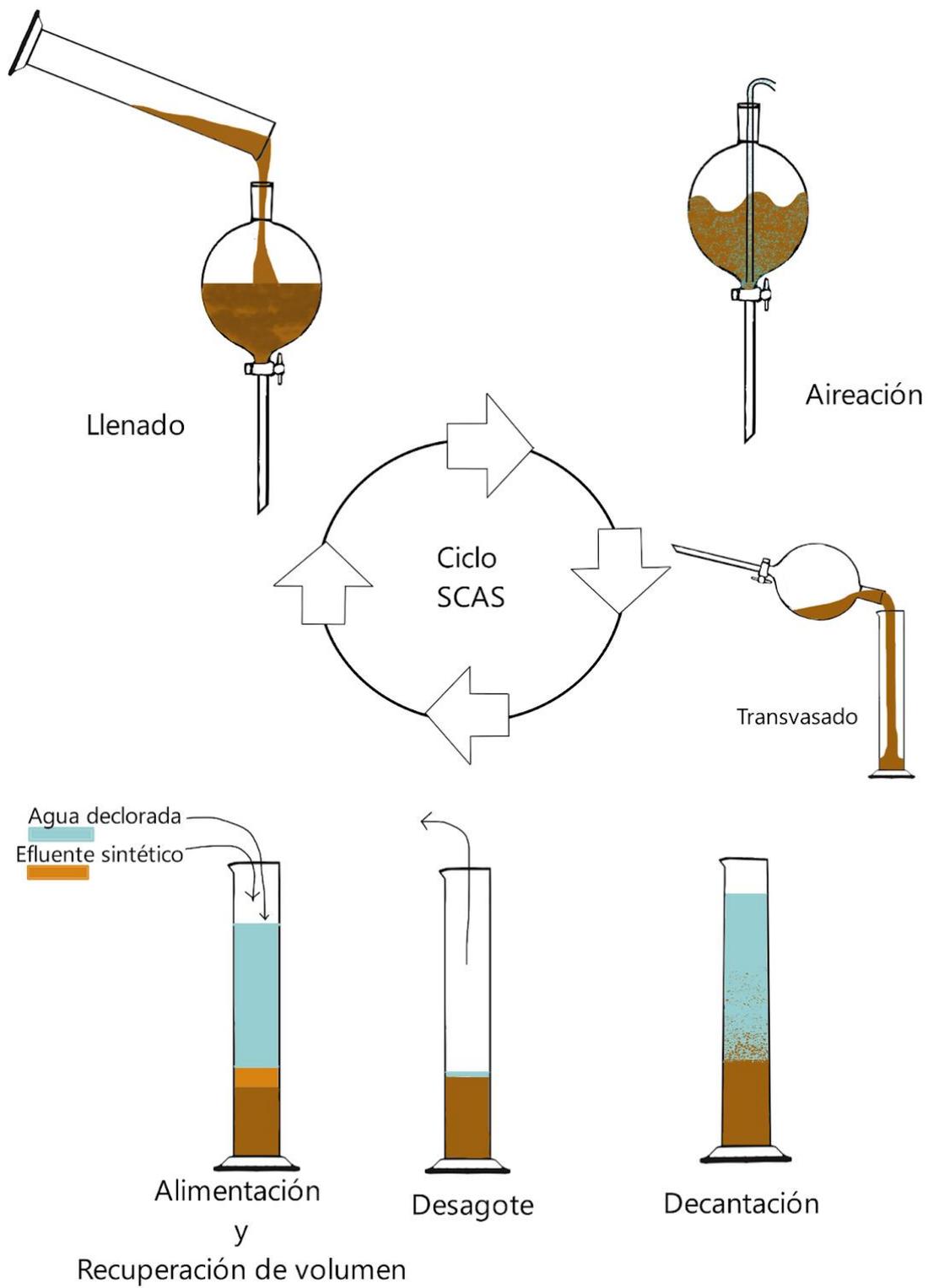


Figura 7. Esquema mostrando el ciclo seguido para el mantenimiento del barro activado.

Durante las etapas de aclimatación del barro el sistema fue llevado a volumen usando aguas superficiales mencionadas anteriormente con el fin de aumentar la biodiversidad. Una vez alcanzada una concentración de 1 gr/L de barro, se continuó con el esquema de alimentación llevando a volumen con agua corriente declorada. Los biorreactores fueron mantenidos a 20 °C en oscuridad en una cámara de cultivo.

#### *2.5.2.2. Estimación de biomasa del barro activado*

La biomasa de los barros activados se estimó semanalmente mediante el método modificado de sólidos totales en suspensión o SST (APHA, 2023). Para esto, se filtraron entre 5 y 15 mL con papel de filtro Whatman Nro 40 y secó en estufa a 80 °C hasta alcanzar peso constante. Otro parámetro usado en las estimaciones de biomasa del barro activado son los sólidos en suspensión volátiles o SSV. Estos se utilizan para determinar la cantidad de materia orgánica que contiene una muestra, a diferencia de los SST que miden todos los sólidos presentes. Se refiere como sólidos volátiles a todo sólidos que se volatiliza a altas temperaturas (APHA, 2023).

Los SSV se miden a partir de los SST. El filtrado de los barros se realizó con filtros Whatman® de microfibra de vidrio, grado GF/F, tarados. Una vez secado alcanzado peso constante en estufa a 80 °C se colocó en filtro en crisoles o recipientes resistentes a las altas temperaturas y se incineraron las muestras en una mufla a 500 °C por 15 minutos (APHA, 2023). Se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente dentro de la mufla. Se pesaron nuevamente los filtros, siendo el peso actual los sólidos suspendidos fijos o SSF, siendo estos últimos los sólidos no orgánicos del barro. Los SSV se calculan con la siguiente fórmula:

$$SST - SSF = SSV$$

Fórmula 2. Cálculo usado.

#### *2.5.2.3. Parámetros de control del barro*

A fin de garantizar el correcto funcionamiento de la planta a escala de laboratorio de barros activados, se realizaron comprobaciones periódicas de diversos parámetros.

#### 2.5.2.3.1. pH

Permite estimar rápidamente si las condiciones son las propicias para los microorganismos deseados. El pH óptimo para tratamientos biológicos, por ejemplo, barros activados, se encuentra entre 6,5 y 8 (Baldwin and Campbell, 2001). Para monitorear este parámetro de manera rápida se utilizaron tiras de pH (Merck GmbH, Darmstadt). En el caso de requerir determinaciones más precisas se utilizó el método potenciométrico.

#### 2.5.2.3.2. Color

Permite estimar el estado del barro. Un color marrón claro muestra que está bien oxigenado y que los microorganismos que lo componen son de naturaleza aeróbica (Operations Manual: Package Treatment Plants, 2013).

#### 2.5.2.3.3. Índice volumétrico del lodo (IVL)

Permite estimar la edad de los barros activados. Mide el volumen que ocupa 1 g de sólidos suspendidos luego de 30 minutos de decantación. Este es un parámetro empírico muy útil a la hora de monitorear al barro activado.

$$\frac{\text{vol. de los sólidos luego de 30 minutos de decantación en 1 litro (mL)}}{\text{Concentración del lodo (gr/L)}}$$

Fórmula 3. Fórmula usada para calcular el IVL.

Un barro con un IVL dentro del rango entre 80 y 120 es considerado como un barro de edad adecuada para su uso en ensayos de biotratabilidad. Un IVL inferior a 80 indica un barro avejentado y un IVL superior a 120, un barro joven y abultado (ISO Standard, 1992).

#### 2.5.2.3.4. Fermentadores

Los fermentadores/ biorreactores consistieron en ampollas de decantación de 500 y 2000 mL a 20 °C (figura 8). Los barros fueron mantenidos en suspensión mediante la aireación con capilares (pipetas Pasteur) utilizando aireador de membrana y con un caudal de aire aproximado de 1 L/min.



Figura 8. Biorreactores usados para el mantenimiento de los barros activados. En la ampolla pequeña se mantuvo el barro donado por el INTI y en la ampolla de mayor volumen se mantuvo el barro activado propio.

## 2.6. Ensayos de tratabilidad de efluentes

### 2.6.1. Tratamiento fisicoquímico

En primer lugar, se neutralizó el efluente crudo utilizando la masa de CaO calculada a partir de la titulación potenciométrica. Esta neutralización se realizó en lote, mezclando hasta alcanzar un pH de 7. Luego se realizó una filtración al vacío con un dispositivo como el que muestra la figura 9. Éste consistió en un embudo tipo Büchner de 7,5 cm de diámetro y 4,5 cm de alto. En la base del embudo se colocó un cartón de profundidad Cas 40 y se empaquetó a modo de columna de filtración una cantidad de tierra de diatomeas (Celite® 545, tamaño de partícula 0,02 - 0,1 mm) húmeda de manera tal que ocupara el 70 % del volumen del embudo.



Figura 9. Dispositivo para el tratamiento fisicoquímico del efluente.

El efluente resultante de este tratamiento será referido como efluente filtrado.

## 2.6.2. Tratamientos biológicos

### 2.6.2.1. *Barros activados*

En primer lugar, se adaptó gradualmente el barro al efluente a tratar agregando de forma incremental 50 mL del efluente filtrado a tratar durante 4 días (200 mL final). Una vez adaptado el barro se mezclaron 600 ml del barro activado, 200 mL del efluente a tratar, 37,5 mL de efluente sintético y se llevó todo a un volumen de 1500 mL con agua. Se retiraron alícuotas de 150 mL a los tiempos 0, 10, 30, 60, 180, 300 y 420 min la cual fue centrifugada para separar los flóculos del barro como pellet y el líquido como sobrenadante.

Posteriormente se dispusieron probetas de 250 mL como reactores en las que se colocaron 20 mL del efluente a estudiar y 45 mL barros activados, completando a un volumen final de 150 mL. La relación DQO/SST fue de aproximadamente de 1 a 1 (por cada gramo de DQO, 1 g de SST).

Se determinaron los sólidos en suspensión totales (SST) y DQO a distintos tiempos durante 24 horas. El sistema fue mantenido en incubadora y en oscuridad a 20 °C.

### 2.6.2.2. *Tratamientos fúngicos*

#### 2.6.2.2.1. *Relevamiento de cepas*

Se realizó una prospección de cepas fúngicas capaces de crecer en medio agarizado conteniendo al efluente crudo como única fuente de carbono. Para esto se cultivaron las cepas pertenecientes al cepario BAFC (Colección de cultivos de la Facultad de Ciencias exactas de la Universidad de Buenos Aires) y CM (personal de la tesista) listadas en la tabla 1, en placas de Petri de 2,75 cm de radio conteniendo una solución del 50% del efluente crudo neutralizado con NaOH y agar al 2 %. Se incubaron las placas hasta que se vio evidencia clara de las cepas capaces de crecer en este medio, controlando diariamente. Se seleccionaron las cepas que mostraran algún tipo de desarrollo de micelio.

Tabla 1. Organismos usados en la prospección inicial. BAFC: colección de cultivos de FCEN-UBA. CM: Colección personal de la tesista. VKM F: colección de cultivos de la Academia Rusa de Ciencias. E47: cepa proveniente de la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.

Organismo	Origen	Familia (taxón)	Grupo ecofisiológico
<i>Coriolus antarcticus</i>	BAFC 266	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Paecilomyces variotii</i>	CM1	Trychocomaceae	<i>Oportunista</i>
<i>Earliella scabrosa</i>	CM3	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Fomes sclerodermus</i>	BAFC 3121	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Ganoderma lucidum</i>	E47	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Ganoderma sp.</i>	CM4	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Gymnopus luxurians</i>	BAFC 2013	Marasmiaceae	Descomposición de hojarasca
<i>Hypholoma puiggarii</i>	CM5.	Strophariaceae	Descomposición de hojarasca
<i>Lentinus sp.</i>	CM6	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Phlebia uda</i>	BAFC 4689	Meruliaceae	Pudrición blanca
<i>Peniophora laxitexta</i>	BAFC 4687	Peniophoraceae	Pudrición blanca
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	VKM F-1767	Phanerochaetaceae	Pudrición blanca
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	CM2	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>P. sanguineus</i>	BAFC 2126	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Trametes sp.</i>	CM7	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>T. trogii</i>	BAFC 463	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>T. versicolor</i>	BAFC 2234	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>T. versicolor</i>	BAFC 4272	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>T. villosa</i>	CM8	Polyporaceae	Pudrición blanca
<i>Xerocomellus chrysenterion</i>	BAFC 1760	Boletaceae	Descomposición de hojarasca

#### 2.6.2.2.2. Selección de cepas tolerantes al efluente

En una segunda etapa de selección se evaluó la tolerancia de las cepas previamente seleccionadas utilizando como indicador la concentración a la cual se inhibe al 50 % el

crecimiento (CE50). Para esto, se cultivaron las cepas en placas de Petri en concentraciones decrecientes del efluente crudo a pH 7 en una serie de diluciones (50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0 %). Se utilizó como estimador de biomasa al radio de crecimiento de la colonia. Una vez que el control (agar - agua) alcanzara el borde de la caja se consideró la finalización del ensayo, midiendo el radio de crecimiento del resto de las concentraciones. En el caso de que el radio de alguna de las concentraciones resultara igual que el del control esto implica que no hay inhibición a esa dilución. Radios menores al del control implican una inhibición debida a la presencia del efluente. Se realizaron todos los tratamientos por triplicado.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$100 - ((\text{radio de crecimiento} * 100) / \text{radio de la caja de Petri}) = \text{Porcentaje de inhibición}$$

Fórmula 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento.

#### 2.6.2.2.3. Evaluación de cepas fúngicas en medio líquido conteniendo el efluente y con agregado de fuentes de nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de las cepas seleccionadas respecto a su crecimiento en medio líquido conteniendo el efluente y suplementado con nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fuente de nitrógeno. Para esto se realizaron cultivos líquidos en Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 25 mL de 1) el efluente crudo neutralizado con NaOH (Cru) ó 2) el efluente filtrado (Fil). Se incluyó como tratamiento el agregado de  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) en una relación carbono-nitrógeno 2:1. El contenido de carbono fue determinado utilizando las determinaciones de DBO realizadas sobre el efluente crudo y filtrado. Los Erlenmeyers con las soluciones se esterilizaron por autoclave a 121 °C durante 15 min. Luego se inocularon con 1 cubo de 0,25 mm<sup>2</sup> de colonias en fase de crecimiento activo. Los cultivos se incubaron a 28 °C, en agitación a 120 RPM y durante 15 días. Se realizaron los tratamientos se realizaron por triplicado y se utilizaron controles con efluente crudo y filtrado, con o sin agregado de fuente de nitrógeno, pero sin inocular con los hongos. Una vez finalizado el tiempo de incubación se cosecharon los cultivos y filtraron aquellos tratamientos en los que se observó crecimiento. Para esto se utilizó un filtro de papel y un embudo tipo Büchner. Tanto el sobrenadante como los filtros con los *pellets* se guardaron a -20 °C. A partir del sobrenadante se realizaron determinaciones de DBO, DQO y pH. En la tabla 2 se muestran las abreviaturas usadas para referirse a cada tratamiento.

Tabla 2. Abreviaturas de los tratamientos de efluentes

Hongo	Efluente crudo		Efluente filtrado	
	con agregado de NaNO <sub>3</sub>	sin agregado de NaNO <sub>3</sub>	con agregado de NaNO <sub>3</sub>	sin agregado de NaNO <sub>3</sub>
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	PS - Cru - N2	PS - Cru - -	PS - Fil - N2	PS - Fil - -
<i>Paecilomyces variotii</i>	PV - Cru - N2	PV - Cru - -	PV - Fil - N2	PV - Fil - -
Sin hongo (blanco)	C - Cru - N2	C - Cru - -	C - Fil - N2	C - Fil - -

#### 2.6.2.2.4. Tratamiento del efluente con la cepa seleccionada

Se evaluó el tratamiento del efluente utilizando la cepa seleccionada con diferentes formas de inóculo. Para esto se utilizaron Erlenmeyers de 125 mL conteniendo 25 mL del efluente crudo o filtrado, esterilizado con autoclave a 121 °C durante 15 min e inoculando con diferentes condiciones de inóculo:

- 1) con cubos de agar de la cepa en crecimiento exponencial,
- 2) a partir de 87,75 mg de cultivos en crecimiento exponencial previamente crecidos en medio malta 12,7 g/L, glucosa 10 g/L (MG) (ver anexo curva de crecimiento),
- 3) con cubos de agar de cepas en crecimiento exponencial y con el agregado de 10 esponjas de poliuretano de 1 cm<sup>3</sup>.

Los cultivos se realizaron en agitación y a 28 °C durante 10 días. Se realizó cada tratamiento y control por triplicado. Se usaron como controles Erlenmeyers no inoculados conteniendo el efluente crudo y filtrado. Los cultivos se cosecharon y su contenido se trasvasó a tubos de 50 mL, los que se centrifugaron por 10 min a 4000 RPM. Luego se separó cuidadosamente el sobrenadante el cual se guardó a -20 °C para posteriores análisis de contenido de materia orgánica. El *pellet* fue resuspendido con agua destilada y luego filtrado al vacío con papel de filtro utilizando embudos tipo Büchner y Kitasato. Luego los *pellets* se secaron a 80 °C hasta peso constante y se pesaron para determinar la biomasa de los cultivos.

#### HACER APARTADO ESTADISTICO.

En cuanto los resultados de la sección 2.6.2.2.2 se graficó el porcentaje de inhibición calculado con la fórmula 4 en función del logaritmo en base 10 del porcentaje de efluente en el medio. Se

estimó el CE50 ajustando los resultados al modelo “*log (inhibitor) vs. response - Variable slope (four parameters)*” incluido en el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Se analizaron los resultados de los ensayos correspondientes a las secciones 2.6.2.2.3. y 2.6.2.2.4 utilizando ANOVA de una dirección y comparaciones múltiples con la prueba de Tuckey, incluidos en el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Se consideró significancia a un p-valor menor a 0,05.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Puesta a punto de métodos de estimación de materia orgánica

##### 3.1.1. Demanda química de oxígeno

Si bien esta es una técnica de uso común en laboratorios de estudios ambientales, es la primera vez que se utiliza en el Laboratorio de Micología Experimental, por lo que fue necesaria su puesta a punto.

Para esto fue necesario verificar que las soluciones de trabajo se comportaran de la manera esperada, sobre todo teniendo en cuenta la calidad del agua tipo III y tipo II disponible en la FCEN – UBA.

A continuación, se muestra la curva de calibración obtenida utilizando el patrón de ftalato.

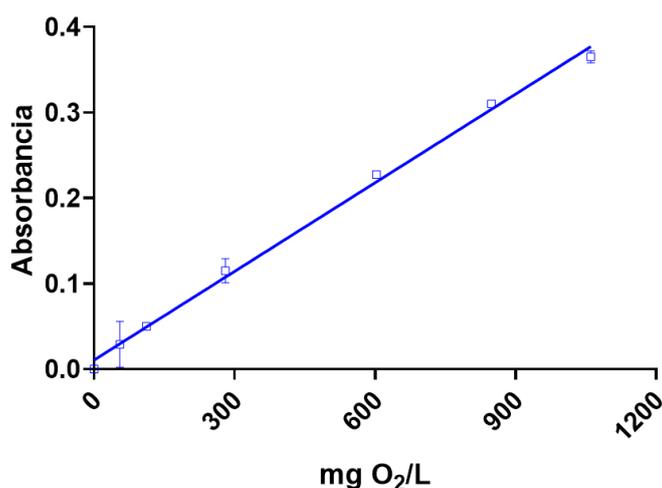


Figura 10. Curva de calibración de DQO.  $R^2$ : 0,9927, con una regresión lineal según la siguiente expresión  $Abs = 0,0003456 \times mgO_2/L + 0,01055$ .

En la figura 10 se muestra que se logró obtener una calibración adecuada de la técnica de DQO ( $R^2$ :0,993). Esto valida el instrumental usado y permite la aplicación del método.

### 3.1.2. Demanda bioquímica oxígeno

Como en el caso anterior, esta metodología no estaba desarrollada en el laboratorio. En este caso, además de la calidad del agua, otros factores a tener en cuenta fueron la fuente de inóculo y las condiciones ambientales.

Respecto al inóculo se hicieron pruebas para determinar la menor cantidad de “semilla biológica” que presente el consumo adecuado de oxígeno frente a la solución patrón de glucosa – glutámico.

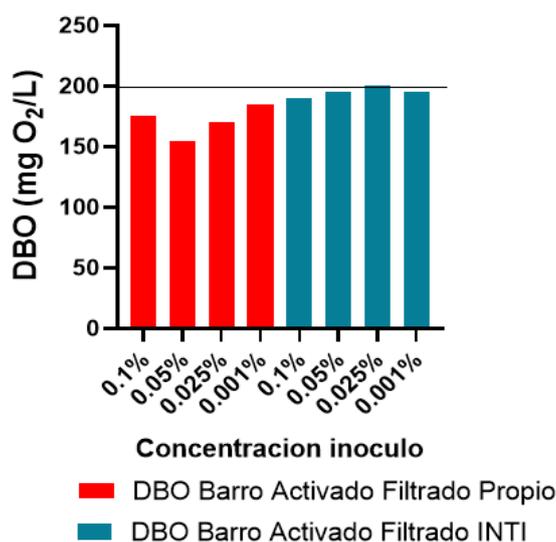


Figura 11. DBO registrada en el control metabólico con solución patrón de glucosa – glutámico. para distintas concentraciones de inóculo provenientes de diferentes fuentes.

Como se observa en la figura 11, se compararon los inóculos obtenidos de los barros activados mantenidos en el laboratorio, barro propio y barro INTI. El inóculo seleccionado fue el inóculo proveniente del barro activado INTI a una proporción del 0,025 %.

Al cabo de unos 8 meses de operación de la planta de barros activados, el inóculo obtenido para la DBO mostró una disminución en su desempeño, muy por debajo del valor de DBO  $204 \pm 10,4$  mgO<sub>2</sub>/L de los ensayos interlaboratorio utilizados como guía (APHA, 2023). Se realizaron controles de funcionales con aguas superficiales obtenidas del río Paraná, como se observa en la figura 12. En esta ocasión si bien no se obtuvieron los valores deseados, se observó un mejor desempeño de este último inóculo, en una proporción del 0,025 %.

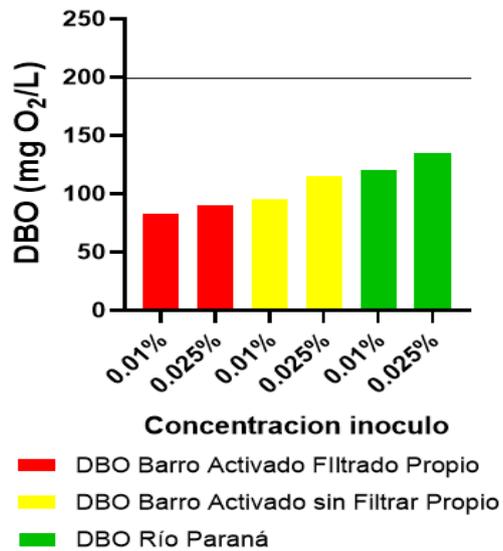


Figura 12. La evaluación de concentraciones de inóculo para la determinación de la DBO fue realizada nuevamente debido a variaciones en las determinaciones control a los 8 meses. La línea negra indica la DBO ideal de 200 mg O<sub>2</sub>/L.

Del análisis de los parámetros de control del barro se pudo observar una disminución de los SST y desviaciones de la sedimentabilidad para el período mencionado (figura 13). Estas observaciones coinciden con el inicio de purgas semanales de los barros para mantener los valores de sólidos totales en el sistema (Figura 13, a).

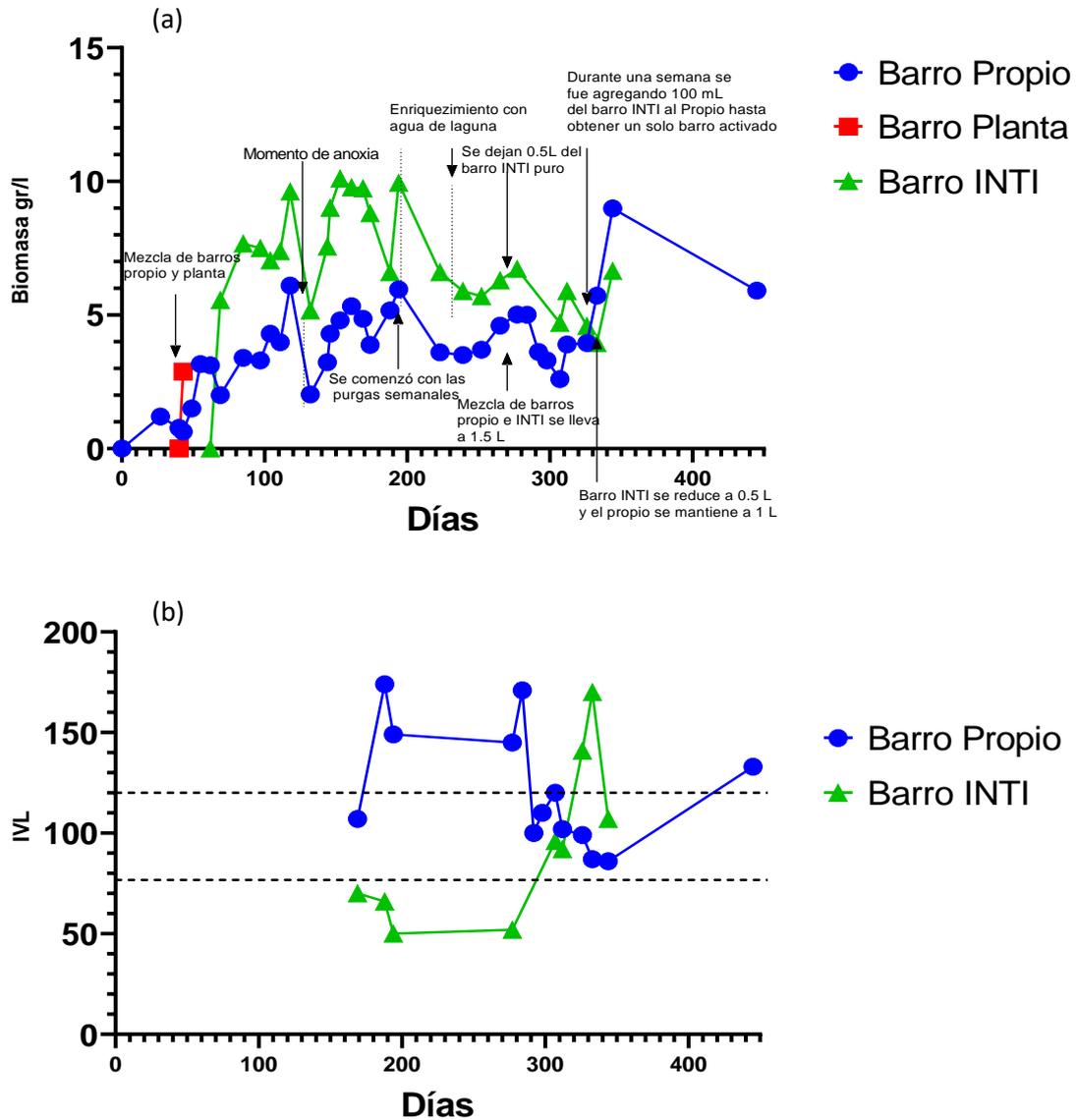


Figura 13. Gráfico (a): Cambios en la biomasa de los barros activados a lo largo del tiempo. Gráfico (b): Cambios en el IVL a lo largo del tiempo de incubación de los barros activados. Las líneas punteadas marcan los límites usados para indicar un barro de edad adecuada para su uso como inóculo de DBO ( $80 < IVL < 120$ ).

Al inicio de la operación de los biorreactores, se observó diversidad de protistas y metazoos (figura 14), sin embargo, esta variedad fue disminuyendo con el tiempo, lo que puede explicarse por la continua alimentación del sistema con efluente sintético. También la ocurrencia de eventos fortuitos (i. e.: cortes de energía) pudo haber contribuido a la disminución de la diversidad por falta de aireación, manifestada en que la población de microorganismos quedó principalmente compuesta por bacterias (figura 15).

Para facilitar el mantenimiento, al año de incubación se mezclaron los barros INTI y propios en un solo barro propio.

En la figura 13 b se muestra la evolución del parámetro IVL a lo largo del tiempo de incubación. Se observa que durante la mayor parte del tiempo los barros presentaron un IVL que quedó por fuera de los límites marcados empíricamente. Por arriba de un IVL de 120, se califica que el barro está abultado o es de edad joven, lo que indica que los flóculos tienen poca biomasa y ocupan mucho espacio. Por debajo de un IVL de 80, se considera un barro viejo, con flóculos compactos, pero con mucha biomasa. Esto puede haberse debido a una alimentación repetitiva, únicamente con efluente sintético estéril, a la falta de control de la temperatura del barro, pasando por momentos de altas temperaturas durante el verano. Estas temperaturas altas disminuyen la capacidad de dilución de los gases, por lo cual los microorganismos tienen menos disponibilidad de oxígeno (Kulkarni, 2016).

Hay una coincidencia durante el período de mal desempeño del inóculo para DBO, la baja densidad de biomasa y gran variación en el parámetro IVL de los barros. Alrededor de los 250 días es cuando se observa un “valle” en el gráfico de biomasa (Fig. 13a) y en el IVL (Fig. 13b) se observa que el barro propio estaba abultado, mientras que el de INTI estaba viejo. Normalmente cuando un barro es viejo, hay una prevalencia de microorganismos como rotíferos, ciliados sésiles (*Vorticella* sp.) y bacterias con tendencia a la agregación, formando flóculos. En el caso de los barros usados, a los días que se detectó el mal desempeño, la biodiversidad se había reducido a bacterias y ciliados sésiles (*Vorticella* sp.), como se ve en la figura 15., que no presentan un metabolismo de la materia orgánica lo suficientemente eficaz para el correcto desarrollo del ensayo de DBO.

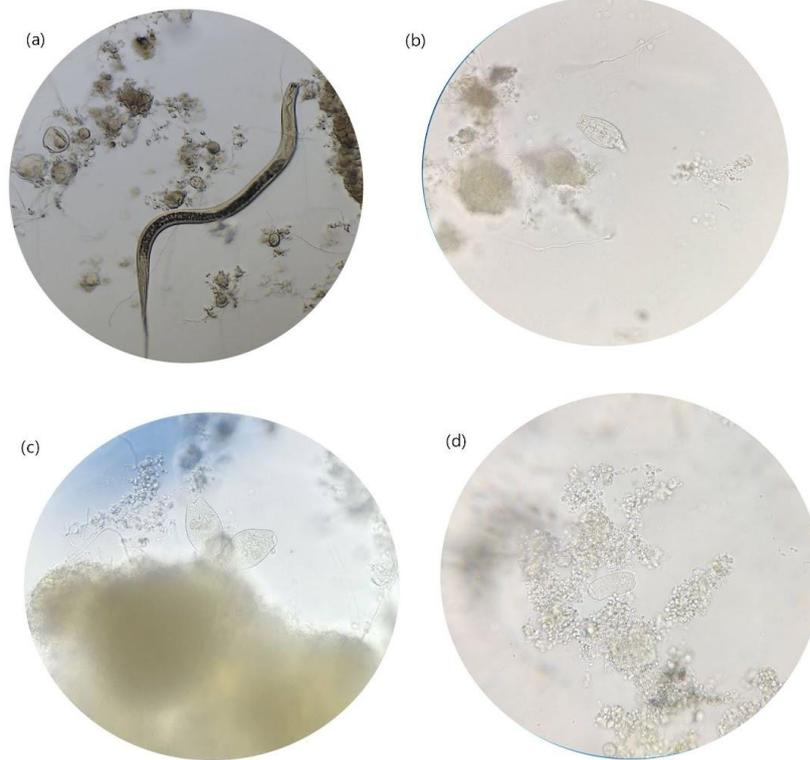


Figura 14. Imágenes de microscopía de la comunidad de microorganismos encontrada en el barro previo al evento de anoxia. (Aumento 400x). Se observan, nematodos (a), rotíferos (b), organismos del género *Vorticella* (c) y un detalle de uno de los flóculos (d).

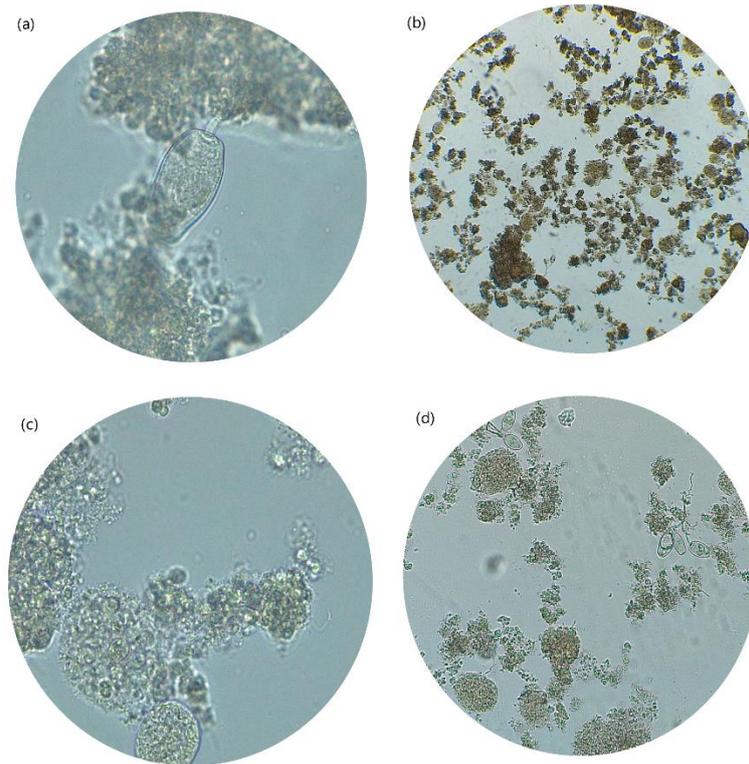


Figura 15. Imágenes de microscopía de la comunidad de microorganismos encontrada en el barro un mes después del evento de anoxia. Se observan ciliados sésiles (a) y un detalle de los flóculos (c) ambas a aumento de 400x. En las fotos de la derecha se observan microorganismos del género *Vorticella* (d) y una vista general de los flóculos (b) a un aumento de 100x.

## 3.2. Caracterización del efluente crudo

### 3.2.1. Espectrofotometría

Para controlar el proceso de reconstitución del efluente en nuestro laboratorio se realizaron análisis de espectro UV-Vis, DBO, DQO y pH.

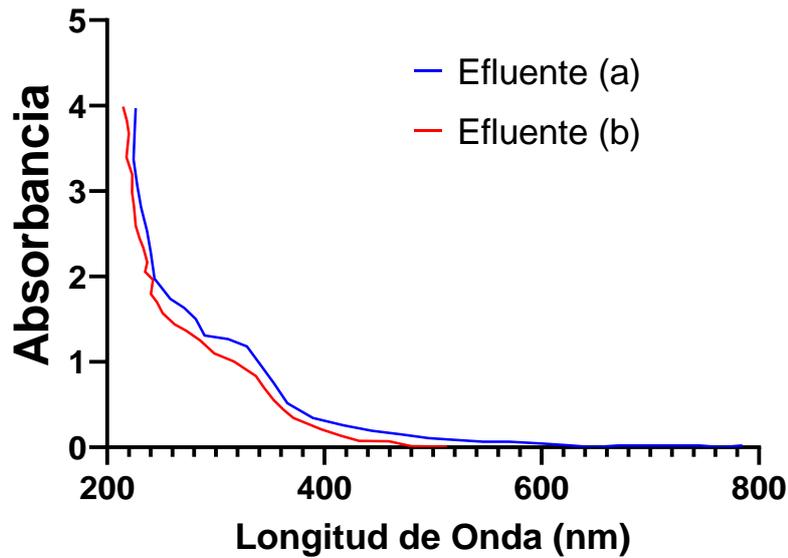


Figura 16. Espectro UV-Vis del efluente reconstituido en el INTI (a) y en el Laboratorio de Micología Experimental (b). Las muestras de ambos efluentes fueron diluidas 1/10 para obtener un perfil de absorbancia que abarque todas las longitudes de onda sin saturar.

En la figura 16 se compararon las curvas obtenidas por espectrofotometría y se calcularon las áreas bajo ambas curvas. Los efluentes muestran un comportamiento espectrofotométrico similar, teniendo el efluente (a) un área bajo la curva de 254 y el efluente (b) de 225.

### 3.2.2. Contenido de materia orgánica

Se determinó la DBO, DQO y pH tanto del efluente crudo (a) (efluente generado en el INTI), como del efluente crudo (b) (efluente generado en el Laboratorio de Micología Experimental). El efluente crudo (a) llegó a tener una medición de DBO de 76000 mg O<sub>2</sub> / L, una DQO de 19.000 ± 12.000 mg O<sub>2</sub> / L y un pH menor a 1. El efluente crudo (b) obtuvo una DBO de 63.000 mg O<sub>2</sub> / L, una DQO de 14.0000 ± 5.000 mg O<sub>2</sub> / L y un pH entre 1 y 2. En algunos casos de las mediciones de DBO no hubo suficientes muestras con una lectura dentro del rango de confianza, por lo cual no se pudo calcular el error estándar. No se detectan diferencias significativas entre el contenido de materia orgánica de los dos efluentes, por lo que de acá en adelante se consideran equivalentes para los ensayos a realizar.

Existen distintos compuestos que pueden presentar interferencia a la hora de determinar DQO. La fuente de interferencia más común la presencia es el ion cloruro. Este puede reaccionar con

el ion plata, precipitando en forma de sal e inhibiendo la habilidad catalítica de la plata. Sin embargo, bajo las condiciones de digestión de la DQO, los cloruros pueden reaccionar con el dicromato, resultando en una sobreestimación del contenido de materia orgánica en la muestra (APHA, 2023). En el caso de este ensayo lo que parece haber ocurrido es la interferencia del cloruro con el ion plata, subestimando el contenido orgánico del efluente. Esto lleva a que la DQO medida es menor a la DBO obtenida.

Las altas mediciones de DBO y DQO son comunes en otros efluentes de fuentes naturales por ejemplo el efluente de la producción del aceite de palma llega a tener una DQO de 75.900 mg O<sub>2</sub> / L y una DBO de 34.393 mg O<sub>2</sub> / L (Bala et al., 2015), el desecho de una fábrica papelera llegó a estimar una DQO de 700.000 mg O<sub>2</sub> / L y una DBO de 140.000 mg O<sub>2</sub> / L (Kumar et al., 2011). En ambos casos los altos niveles de materia orgánica que presentaban los efluentes se pudieron reducir con tratamientos no tradicionales. Bala et al. (2015) utiliza un tratamiento biológico, mientras que Kumar et al. (2011) utiliza un tratamiento fisicoquímico.

### 3.3. Titulación

Se utilizó la titulación para calcular la cantidad de CaO que es necesaria para neutralizar el efluente crudo, como parte de la filtración fisicoquímica. Se necesitaron 21,7 mL de NaOH 0,5 M en 30 mL de efluente crudo para alcanzar un pH de 7, calculando una concentración de HCl de 0,3 M. Con estos datos se calculó que para neutralizar el efluente crudo se necesitan 10,16 g/L de CaO.

### 3.4. Ensayos de tratabilidad

#### 3.4.1. Tratamiento fisicoquímico

Como primer método para reducir la carga orgánica de los efluentes de la concentración de bilis bovina se realizó una filtración fisicoquímica y se utilizaron como estimadores la DBO, DQO y el análisis de su espectro de absorción UV-visible.

##### 3.4.1.1. Espectrofotometría

Se compararon fotos y los espectros UV - Vis del efluente crudo y el efluente que pasó por la filtración fisicoquímica, denominado como efluente filtrado.



Figura 17. Aspecto del efluente filtrado (a) y crudo (b). En la foto se puede observar la diferencia en color y transparencia entre el efluente filtrado y el efluente crudo.

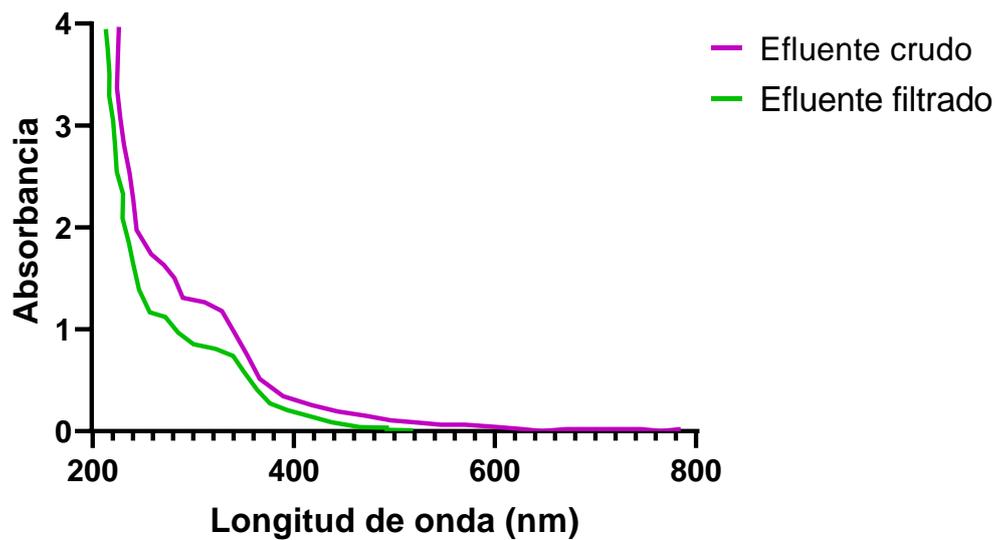


Figura 18. Espectro UV-Visible del efluente crudo y efluente filtrado diluidos 1:10.

Se observaron diferencias de coloración entre el efluente crudo y el filtrado (figura 17). El efluente crudo mostró un color caramelo claro, pero con un cierto grado de turbidez, mientras que el efluente filtrado se lo ve de color caramelo oscuro pero translucido. Esta diferencia en la coloración y turbidez es coherente con los resultados del espectro de absorción en espectro UV - Vis, en los que se ve una disminución en el área de la curva de absorción del 21 % en el efluente filtrado respecto al crudo (figura 18). Este tipo de cambios en la coloración y turbidez

de los efluentes se fue relacionado en otros trabajos también con la disminución de la materia orgánica como es el caso de industrias de fermentación (Inanc et al., 1999) y textiles (Sapci and Ustun, 2003), entre otras (Mehta and Chavan, 2009).

### 3.4.1.2. Contenido de materia orgánica

#### 3.4.1.2.1. DBO

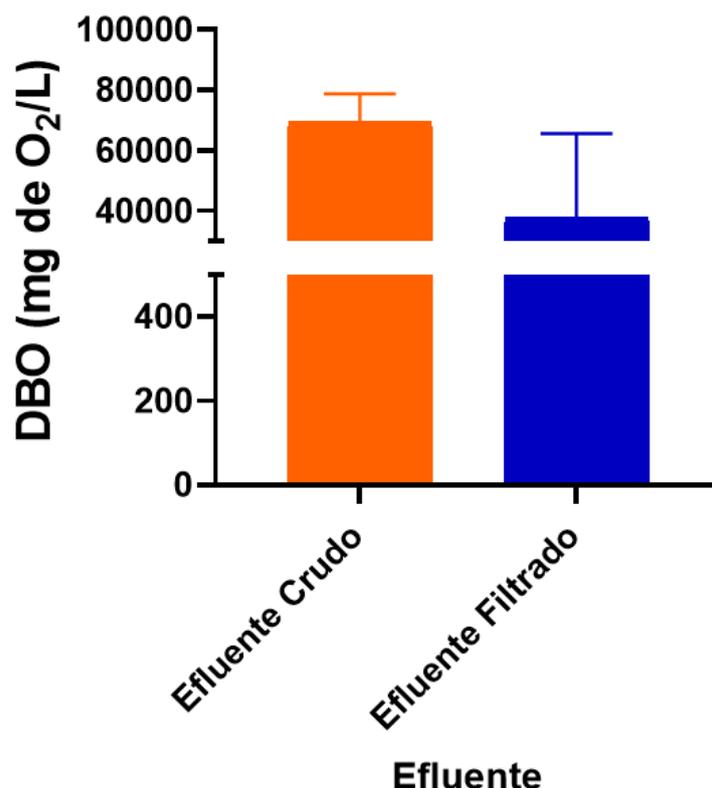


Figura 19. La DBO determinada para el efluente crudo (naranja, 69400 ± 9330 mg O<sub>2</sub>/L) y el efluente filtrado (azul, 37700 ± 27800 mg O<sub>2</sub>/L).

Luego de la filtración se observa una diferencia del 54 % del contenido de materia orgánica estimada a partir de la medición de DBO (figura 19). El tratamiento de efluentes de alta carga orgánica mediante métodos fisicoquímicos puede obtener un amplio rango de eficiencia. Esto se ve reflejado en su implementación en industrias establecidas como la láctea en las que diversas técnicas como precipitación, coagulación, adsorción, filtrado y electrocoagulación obtienen sobre efluentes similares porcentajes de remoción entre 40 y 98 % (Koca, 2018). Otro ejemplo de disminución de materia orgánica por este tipo de métodos es el de las aceiteras en

las que se puede registrar valores de 12691,8 y 557,7 mg/L de DQO y DBO alcanzando un 99 % de remoción mediante técnicas de coagulación (Louhich et al., 2019).

#### 3.4.1.2.2. DQO

En este ensayo se determinó el contenido de materia orgánica químicamente oxidable en un litro de efluente tanto crudo como filtrado.

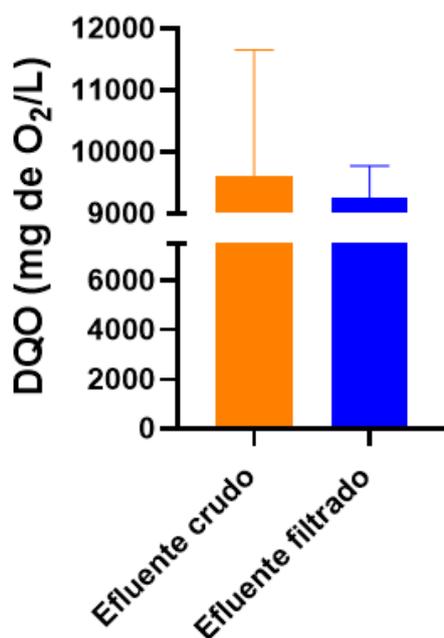


Figura 20. Comparación de la medición de la DQO del efluente crudo con el efluente filtrado. Efluente crudo: 9600 ± 2040 mg O<sub>2</sub>/L. Efluente filtrado: 9250 ± 523 mg O<sub>2</sub>/L.

La determinación de materia orgánica por DQO (efluente crudo: 9600 ± 2040 mg O<sub>2</sub>/L, efluente filtrado: 9250 ± 523 mg O<sub>2</sub>/L) obtuvo valores mucho menores a los alcanzados por el método de DBO (efluente crudo: 69.400 ± 9330 mg O<sub>2</sub>/L; efluente filtrado: 37.700 ± 27.800 mg O<sub>2</sub>/L). A su vez no observamos diferencias en los valores de materia orgánica entre el efluente crudo y el filtrado (figura 19 y 20). En estas mediciones se debe considerar que la dispersión de datos es muy grande, siendo posible que gran parte de la estimación se deba a interferencias por la alta concentración de ácido clorhídrico en el efluente (6N a una concentración del 7,5 %) resultante del proceso de precipitación de ácidos biliares. Esta alta concentración de cloro

puede evitar la reducción del cromo al interferir con el sulfato de plata (catalizador) y por lo tanto subestimar la determinación de materia orgánica. (APHA, 2023).

Como esta es una muestra con alto contenido de cloruros debido a la naturaleza del tratamiento de la concentración de ácidos biliares, en la cual se utilizan ácido clorhídrico, la determinación de DQO sufre interferencias debidas al ion  $\text{Cl}^-$ . Es por esto que al diluir la muestra esta interferencia se minimiza y se puede determinar de manera más confiable el contenido de materia orgánica, como se ve la figura 21.

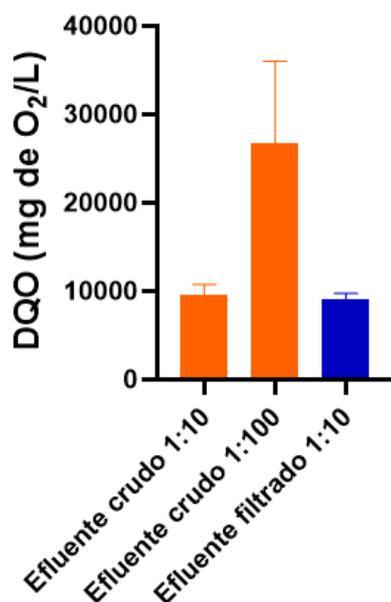


Figura 21. Determinación de la carga de materia orgánica por medio de la DQO del efluente crudo original en dos diluciones diferentes y el efluente filtrado. Efluente crudo 1:10: 9540 ± 1190 mg O<sub>2</sub>/L. Efluente crudo 1:100: 26.700 ± 9260 mg O<sub>2</sub>/L. Efluente filtrado 1:10: 9000 ± 756 mg O<sub>2</sub>/L.

En la figura 21 se puede observar que a una mayor dilución se puede estimar una mayor cantidad de materia orgánica que en las muestras con menor dilución. Esto se puede deber a que hay una menor concentración de ion  $\text{Cl}^-$  en la muestra al 1:100, por lo cual se reduce la interferencia de este ion en la reacción.

En este gráfico se puede observar que la dilución del efluente modifica la determinación de la DQO posiblemente debido a la diferencia en la concentración de cloro.

Si bien al aumentar la dilución se logra disminuir la interferencia por cloruros, no se pudo eliminar por completo, lo que se evidencia al tener valores de DQO menores a los de DBO. Según la bibliografía consultada (Metcalf, 1981; APHA, 2023) las mediciones de DQO deberían ser mayores a las de DBO, dado que estiman la materia orgánica presente en una muestra sea esta biodegradable o no.

### 3.4.2. Tratamiento biológico

#### 3.4.2.1. Relevamiento de cepas

Para el relevamiento se cultivaron las cepas fúngicas detalladas anteriormente (Tabla 1) utilizando el efluente de bilis al 50 % como única fuente de nutrientes y agar al 20 %. Se adoptó como criterio de selección el desarrollo de micelio en las condiciones mencionadas. De las 20 las cepas se observó únicamente crecimiento de *Trametes* sp. (CM7), *P. sanguineus* (CM2), *C. antarcticus* (BAFC 266) y *P. variotii* (CM1), siendo en todos los casos un crecimiento espaciado e inconspicuo. Estos organismos pertenecen a géneros en los que ya se registra tolerancia para el tratamiento de efluentes como es el caso de *Trametes* y *C. antarcticus* para la degradación de colorantes industriales (Diorio et al., 2021, Levin et al., 2004), el de *Pycnoporus* en la industria papelera (Da Re and Papinutti, 2011) y *Paecilomyces* en la aceitera (Abd EL-Aziz et al., 2015).

#### 3.4.2.2. Selección de cepas tolerantes al efluente

Una vez evaluada la capacidad de los hongos para utilizar el efluente como única fuente de carbono, se evaluaron las 4 cepas que presentaron crecimiento para su tolerancia a la toxicidad del efluente crudo.

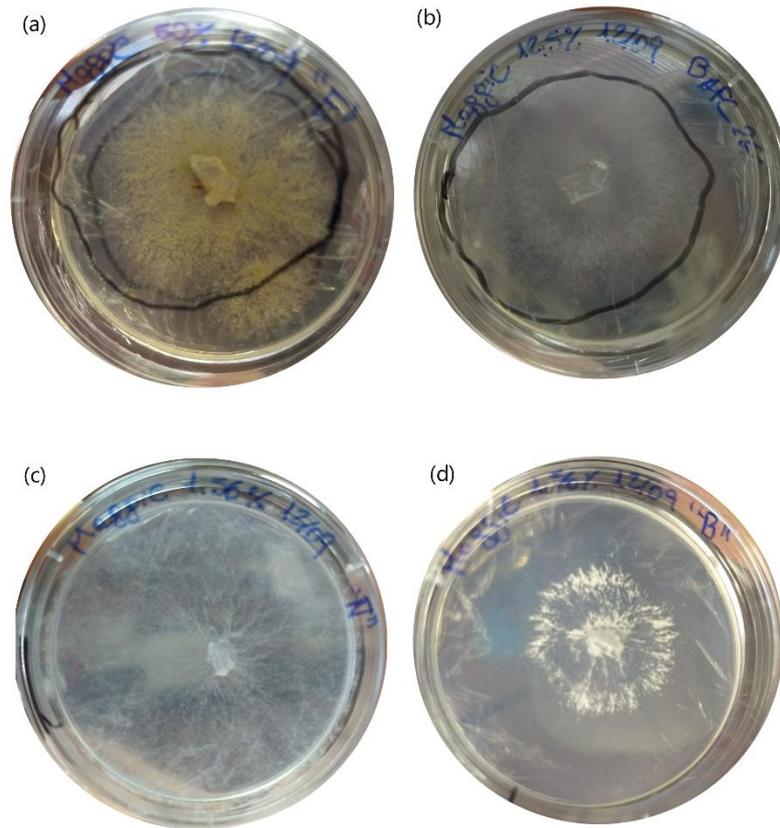


Figura 22. Crecimiento de cultivos en medio de cultivo con efluente crudo. (a): *P. variotii*, (b): *C. antarcticus*. (c): *Trametes* sp., (d): *P. sanguineus*.

Los cultivos en placa mostraron diferencias morfológicas entre los controles (medio basal agarizado) y las que contenían el efluente:

Los cultivos de *P. variotii* (figura 22.a) mostraron colonias con hifas compactas en todas las concentraciones del efluente. Sin embargo, a los 5 días de crecimiento, las cepas ya habían esporulado, lo que podría indicar estrés, a diferencia del control, en el cual el hongo no esporuló.

Los cultivos de *C. antarcticus* (figura 22.b) mostraron inhibición en su crecimiento a menores concentraciones que el resto de las cepas, pero en todos los casos las colonias mostraron un micelio denso, no siendo este un indicador de estrés.

Los cultivos de *Trametes* sp. (figura 22.c) que crecieron con en presencia del efluente mostraron un crecimiento disperso, con un micelio poco denso y blanquecino a diferencia del control que mostró colonias densas de color blanco.

Al igual que *C. antarcticus*, el aspecto de las colonias de *P. sanguineus* (figura 22.d) fue similar en todos los casos, mostrando un micelio hialino, con una capa blanquecina en la zona central, donde se encuentra el micelio más antiguo.

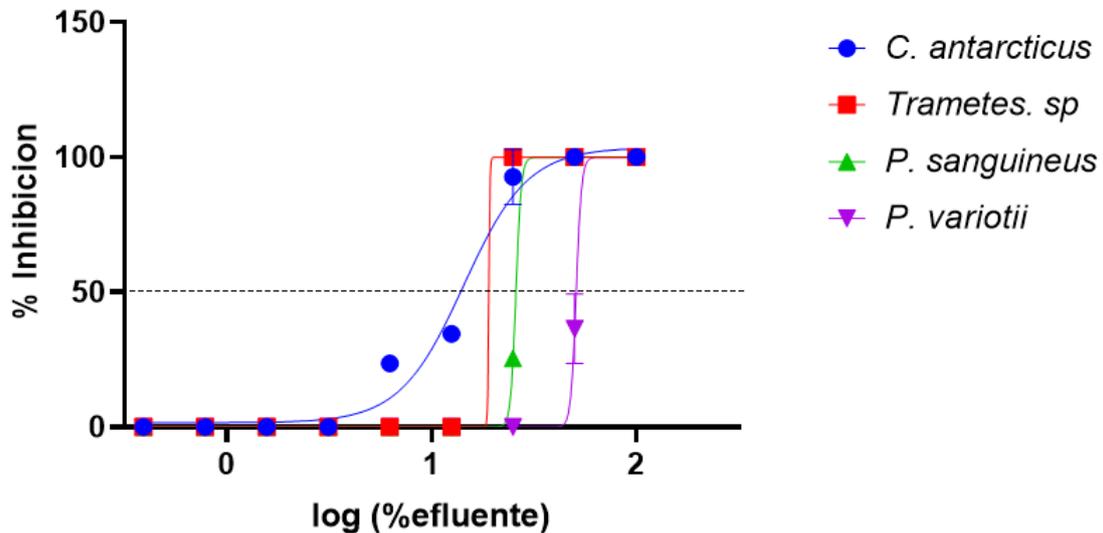


Figura 23. Representación gráfica del porcentaje de inhibición del crecimiento. CE50 para *C. antarcticus*: 14,36 %. CE50 para *Trametes sp.*: 19,03 %. CE50 para *P. sanguineus*: 25,81 %. CE50 para *P. variotii*: 50,86 %.

Como se observó en la sección anterior, todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio agarizado conteniendo el efluente. A pesar de esto, la presencia del efluente en el medio de cultivo modificó la tasa de crecimiento de las cepas mostrando un efecto de inhibición del crecimiento a partir de 6,25 % de efluente. Debido a esto, podemos afirmar que la presencia del mismo tiene un cierto grado de toxicidad para las cepas evaluadas.

Se utilizó la concentración efectiva 50 (CE50) como indicador de la tolerancia al efluente. En escala de mayor tolerancia (> CE50) a menor resistencia (< CE50), las cepas fueron: *P. variotii* > *P. sanguineus* > *Trametes sp.* > *C. antarcticus*. Las cepas de *P. variotii*, *P. sanguineus* y *Trametes sp.* mostraron una inhibición “escalonada”, alcanzando una inhibición del 100 % a partir de la concentración del efluente de 25 % para el *Trametes sp.* y de 50 % para *P. sanguineus*. En el caso del *P. variotii*, no se observó la inhibición del 100 % en las concentraciones probadas, pero en la concentración de efluente del 50 % el crecimiento no alcanzó los límites de las placas de Petri lo que podría indicar un síntoma de toxicidad (figura 23).

En el caso de *C. antarcticus*, la inhibición del crecimiento fue gradual entre 6,25 y 12,5 % de efluente, alcanzando una inhibición total a la concentración de efluente de 25 %. Esta inhibición en diferentes concentraciones lo hace poco adecuado para el tratamiento del efluente, pero podría tener potencial como indicador. En el laboratorio de Micología Experimental se desarrolló y se puso a punto una metodología que utiliza organismos sensibles a colorantes tóxicos para su detección, por ejemplo, el desarrollado con *Phanerochaete chrysosporium* para el colorante industrial verde de malaquita (Papinutti y Forchiassin, 2004).

#### 3.4.2.3. Evaluación de cepas fúngicas en medio líquido conteniendo el efluente y su agregado de fuentes de nitrógeno

Las cepas *P. variotii* (PV) y *P. sanguineus* (PS) seleccionadas por mostrar la mayor tolerancia al efluente, se utilizaron para evaluar su crecimiento en el efluente crudo y filtrado, suplementado con NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. De todos los tratamientos, solo se observó crecimiento en el efluente filtrado inoculado con *P. variotii* (Figura 24, PV - Fil - - y PV - Fil - N2). Entre los tratamientos PV - Fil - - y PV - Fil - N2 se observaron diferencias en la forma de crecimiento del hongo, mostrando en el primero cultivos en forma de *pellet* densos y agregados, mientras que en los que se les había adicionado una fuente de nitrógeno, el crecimiento fue más disperso y con parte de la biomasa precipitada. Por otro lado, encontramos diferencias en el tiempo en que se empezó a observar crecimiento de las colonias entre tratamientos (Figura 24) siendo este evidente para PV - Fil - - a los 4 días de incubación, mientras que para PV - Fil - N2 tardó 5 días. Es de remarcar que la falta de crecimiento de *P. sanguineus* y de *P. variotii* en los medios puede ser debida a un aumento en la toxicidad del medio, siendo la primera vez que se los expone al efluente al 100 %. En el caso de *P. sanguineus* es notable que esta toxicidad se obtuvo tanto con el efluente filtrado y sin filtrar, mientras que *P. variotii* fue capaz de crecer en el efluente filtrado. Esto podría indicar que el tratamiento de filtrado no solo influyó en la disminución de la carga de materia orgánica del efluente, sino también de su toxicidad. Por otro lado, el agregado de NaNO<sub>3</sub> aparenta haber generado un efecto negativo en los cultivos de *P. variotii* evidenciado por la presencia de micelio precipitado. Este efecto no aparenta estar referenciado en la bibliografía, sino más bien se destaca el NaNO<sub>3</sub> como buena fuente de nitrógeno para diversos usos como la producción de exopolisacáridos (Selbmann et al., 2002), de enzimas como tanasas (Wakil et al., 2020), de L-asparaginasas y L-glutaminasas (Elshafei et al., 2012) y hasta en la generación de metabolitos inhibidores del crecimiento bacteriano por *Paecilomyces* WE3-F (Barakat and Saleh., 2016).

Otro factor a evaluar en este ensayo es la agitación, ya que pudo haber generado un estrés mayor para los hongos que la presencia del efluente, dificultando la formación de *pellets* (Liu et al., 2007), siendo por lo tanto el crecimiento sin agitación una variable posible a evaluar.

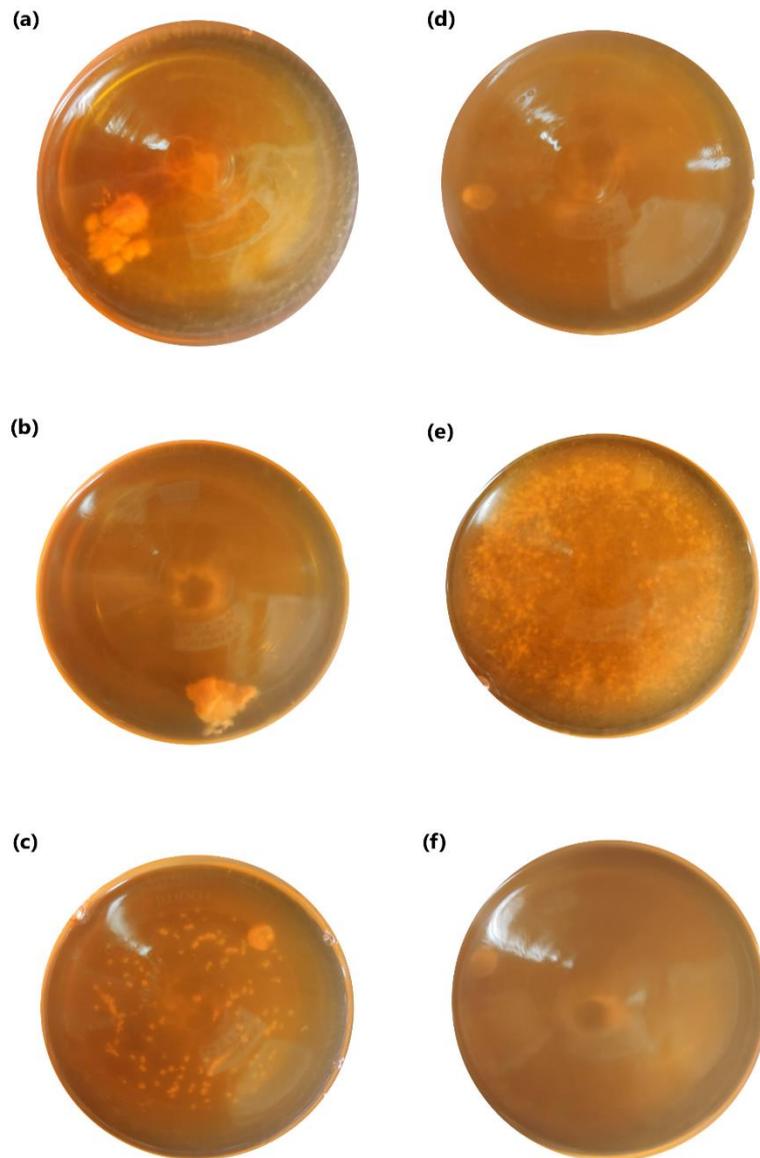


Figura 24. Cultivos de *P. variotii* en el efluente filtrado (a), (b) y (c), y suplementado con NaNO<sub>3</sub> (d), (e) y (f).

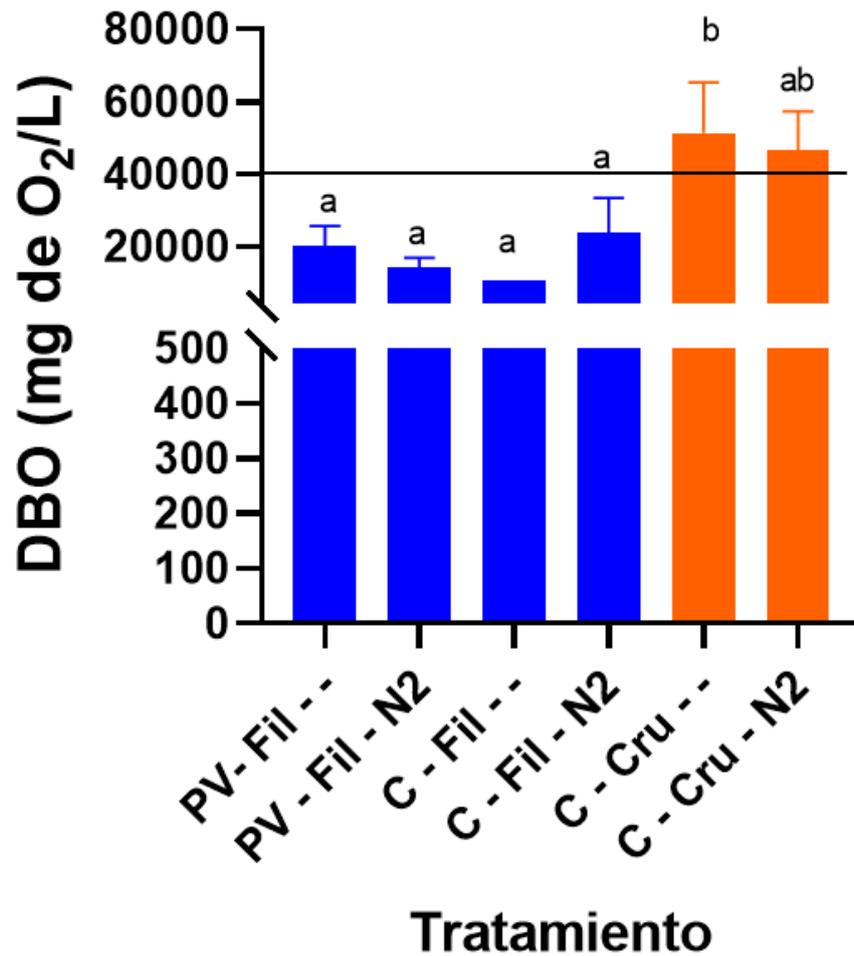


Figura 25. DBO de los sobrenadantes del tratamiento del efluente con *P. variotii* (PV). Los resultados corresponden únicamente a los tratamientos en los que se observó crecimiento fúngico y sus controles. No se realizaron análisis de DBO de los tratamientos con *P. sanguineus*, dado que esta cepa no mostró crecimiento ni en el efluente crudo o el filtrado. Referencias: PV – Fil - -: *P. variotii* con efluente filtrado sin agregado de fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>), PV – Fil – N<sub>2</sub>: *P. variotii* con efluente filtrado con agregado de fuente de nitrógeno (NaNO<sub>3</sub>), C – Fil - -: control de efluente filtrado sin agregado de fuente de nitrógeno, C – Fil – N<sub>2</sub>: control de efluente filtrado con agregado de fuente de nitrógeno, C – Cru - -: control de efluente crudo sin agregado de nitrógeno, C – Cru – N<sub>2</sub>: control de efluente crudo con agregado de nitrógeno. La línea negra indica el valor de DBO para el efluente crudo de los antecedentes (DBO: 40.000 mg O<sub>2</sub>/L).

Ninguna de las dos cepas mostró crecimiento alguno en el efluente crudo y *P. sanguineus* no mostró crecimiento en el efluente filtrado tampoco. Únicamente se observó crecimiento fúngico con la cepa *P. variotii* en efluente filtrado.

En la figura 25 se puede ver que la estimación de materia orgánica de los tratamientos solo muestra diferencias significativas ( $p\text{-value} < 0,5$ ) entre los controles del efluente crudo y filtrado (C - Fil - - : 10.300 mg O<sub>2</sub>/L y C - Cru - - : 51.300 ± 13.900 mg O<sub>2</sub>/L) de forma similar a lo observado al inicio de la sección. No se observaron diferencias entre el efluente filtrado (C - Fil - - y C - Fil - N2: 23.800 ± 9490 mg O<sub>2</sub>/L) y los tratamientos con *P. variotii* (PV - Fil - - : 20.200 ± 5260 mg O<sub>2</sub>/L y PV - Fil - N2: 14.100 ± 2670 mg O<sub>2</sub>/L). Esto último se ve reflejado en el escaso crecimiento de las colonias en el medio que podría ser explicado por un aumento en su toxicidad por la alta concentración del efluente. Por otro lado, si observamos que el tratamiento por filtración permitió el crecimiento de *P. variotii*, lo que podría indicar la disminución de la toxicidad del efluente ya sea por la disminución de la carga orgánica o de los compuestos tóxicos.

No se realizaron estimaciones de DQO para este ensayo.

#### 3.4.2.4. Tratamiento con la cepa seleccionada

Luego de seleccionar a *P. variotii* como organismo para el tratamiento del efluente se decidió evaluar estrategias que favorezcan su crecimiento a expensas del consumo de materia orgánica en el efluente. En este sentido se ensayaron tratamientos con 3 tipos diferentes de inóculo: 1) de colonias en medio agarizado, 2) colonias ya crecidas en medio MG, previamente puesta a punto con curvas de crecimiento (ver anexo, p.70) 3) colonias en medio agarizado y 10 esponjas de poliuretano de 1 cm<sup>3</sup>.

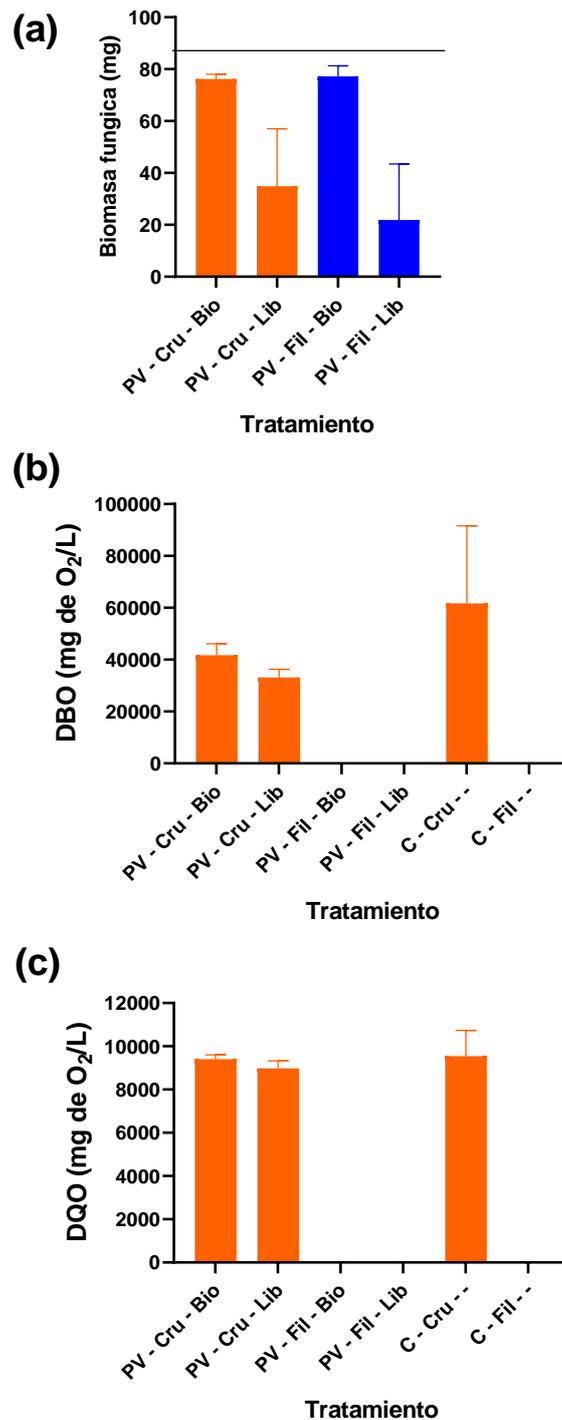


Figura 26. Biomasa fúngica luego del tratamiento del efluente crudo (Cru, naranja) y filtrado (Fil, azul) con *P. variotii* (PV) (a) utilizando como inóculo: cultivos previamente crecidos (Bio) y cubos de agar (Lib). La línea negra indica la biomasa alcanzada en cultivos en MG a los 5 días de crecimiento. En (b) se muestra la estimación de la DBO de los tratamientos con efluente crudo y en el (c) las estimaciones de DQO de los tratamientos. Se presentan los resultados de los tratamientos con efluente crudo y debido a problemas técnicos no fue posible obtener datos para los tratamientos con efluente filtrado.

Se determinó la biomasa de los tratamientos luego de las incubaciones. En los cultivos realizados con los soportes de esponja de poliuretano no se observó crecimiento, por lo que no fueron incluidos. Por otro lado, en los tratamientos PV - Cru - Bio y PV - Fil - Bio se observó una disminución en su biomasa luego del tratamiento del efluente (Figura 26 (a)). Por otro lado, al igual que en la sección previa, los tratamientos en los que se inoculó el efluente con cubos de agar de *P. variotii* (PV - Cru - Lib y PV - Fil - Lib) su crecimiento fue escaso no alcanzando el obtenido en MG a pesar de la alta carga orgánica del efluente. En todos los casos, es posible que el efluente contenga escasos nutrientes metabolizables por *P. variotii*, lo que podría explicar la disminución de biomasa de PV - Cru - Bio y PV - Fil - Bio asociado a la autólisis de los cultivos y el poco crecimiento de los cultivos libres. Otra posibilidad es que el efluente contenga nutrientes, pero que su alta toxicidad impida el desarrollo de la cepa seleccionada, lo que resulta coherente con los valores de inhibición de crecimiento obtenidos en la sección 3.4.2.2. El incremento de biomasa podría estar relacionado a la disminución de la materia orgánica en los tratamientos de efluentes. Si bien esto indicaría que la biodegradación de materia orgánica está atada a un incremento en la biomasa del organismo degradador, no es posible establecer una relación directa entre el crecimiento fúngico y la biodegradación. Por lo cual las condiciones que fomentan el crecimiento fúngico no siempre llevan a una mejor degradación (Collado et al., 2019).

La determinación de materia orgánica estimada mediante la DBO no muestra diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 26). En este análisis se debió excluir a los tratamientos realizados con los efluentes filtrados debido a la pérdida de las muestras. Aun así, en los tratamientos con *P. variotii* en crecimiento libre en el efluente crudo (PV - Cru - Lib) se observa una tendencia a disminuir su materia orgánica. Esta tendencia no se reproduce en la estimación de materia orgánica por medio de DQO, pero al igual que en los ensayos previos es posible su subestimación debida a la interferencia por cloruros.

La falta de diferencias significativas en el contenido de materia orgánica entre los tratamientos se puede deber a varios factores, entre ellos, a que no hubo suficientes réplicas de cada tratamiento, lo que puede explicar el alto desvío estándar que se observa en algunos de los casos (en el gráfico (a) PV - Cru - Lib y PV - Fil - Lib, en el gráfico (b) C - Cru - -). Otra posible causa puede ser la eficiencia de *P. variotii* al crecer. En base a la curva de crecimiento (ver anexo p. 70), este hongo parece no utilizar una gran cantidad de azúcares para su crecimiento, lo que se podría traducir en una baja degradación de la materia orgánica disponible en el efluente.

El tratamiento de efluentes de alta carga orgánica con hongos es una disciplina reciente y en desarrollo. Dado que el efluente que se trata en esta tesis proviene de un proceso novedoso aún no aplicado en la industria para la obtención de ácidos biliares, su comparación con otros puede ser dificultosa. Aun así, es posible encontrar similitudes con efluentes de industrias como los producidos por lixiviados ya que se caracterizan por tener una carga de materia orgánica relativamente elevada (15.000 – 30.000 mg O<sub>2</sub>/L DQO), alta salinidad y baja biodegradabilidad (Collado et al., 2019). El tratamiento con hongos de estos efluentes observa un aumento en la susceptibilidad a la degradación por microorganismos y a la disminución de la carga de materia orgánica. Tal es el caso de efluentes que partían de 10.000 mg O<sub>2</sub>/L que al ser tratados con *P. chrysosporium*, *T. troglitii* y *Lentinus tigrinus* obtuvieron una remoción de 68,8; 79,8 y 90,6%, y también de 71 % utilizando *Aspergillus niger* pero partiendo de 15.000 mg O<sub>2</sub>/L (Ellouze et al., 2008). También es posible tratar otro tipo de efluente como las aguas residuales de granjas de cerdos. En este se encontró que *P. chrysosporium* es capaz de reducir la materia orgánica presente en este residuo entre un 41 y 55 %, partiendo de una carga de 4000 mg O<sub>2</sub>/L (Díaz et al., 2022).

Por otro lado, para este tipo de efluentes se postula también el uso secuencial de tratamientos fisicoquímicos y fúngicos. Entre ellos encontramos el realizado por Kim et al. (2003), en que reporta la reducción de materia orgánica tratando únicamente con cultivos de *P. chrysosporium* del 21,5 % (DQO) y una reducción del 53 % al combinar con filtraciones por medio de columnas de zeolita. También analizaron la relación DBO/DQO, viendo un cambio del 0,1 del lixiviado de vertedero crudo a 0,17 luego del tratamiento con zeolita, mostrando una mayor degradabilidad al realizar tratamientos biológicos luego del fisicoquímico.

A pesar de los antecedentes el tratamiento realizado sobre los efluentes en esta tesis no mostró disminuciones apreciables de materia orgánica. En un principio creemos que parte de la problemática podría estar asociada a errores metodológicos en la determinación de la DBO y DQO, pero que a lo largo de la tesis se fueron solucionando. Debido a esto parte de los resultados contienen una amplia variabilidad. Por otro lado, creemos que la composición del efluente agregó al menos dos factores de variabilidad extra, la presencia de cloruros que interfirieron en las determinaciones de la DQO, como también su heterogeneidad entre lotes de efluentes tratados. Esto último se ve reflejado en los resultados obtenidos en la sección 3.4.2.4 en la que se observa crecimiento de *P. variotii* en efluentes crudos a diferencia de lo obtenido en la sección 3.4.2.3 en la que la filtración fue necesaria para el crecimiento del organismo. Esta diferencia se

puede deber a un distinto nivel de pureza de los reactivos usados para realizar la concentración de la bilis bovina. Por otro lado, es posible que la pequeña disminución de la materia orgánica por el tratamiento con *P. variotii* esté asociada a su escaso crecimiento. Esta última problemática es posible resolverla planteando el tratamiento de estos efluentes como una estrategia de co-metabolismo mediante la cual, el agregado de nutrientes permita también el metabolismo de los componentes del efluente (Harms et al., 2011). Entre las estrategias de co-metabolismo el agregado de fuentes de carbono simples, como glucosa, resulta eficiente para el tratamiento con hongos como *A. niger*, *Cladosporium herbarum* y *T. versicolor*, los cuales tuvieron aumentos en la remoción de materia orgánica de entre 29-34 a 60-84% (Facó y Santaella, 2002; Saetang y Babel, 2009). Es interesante remarcar que una variación en la calidad de las fuentes de carbono no parece modificar el rendimiento de los tratamientos, siendo posible realizarlos con el agregado de sustratos de escaso valor comercial como residuos lignocelulósicos (Collado et al., 2019).

El hongo *P. variotii* está reportado como una especie con alta capacidad degradativa. Es una especie capaz de degradar compuestos fenólicos bajo diferentes condiciones (EL-Aziz et al., 2015). Estos compuestos son altamente contaminantes y recalcitrantes en el ambiente, mientras es posible tratarlos con métodos fisicoquímicos, estos son costosos y con un gran número de desventajas. La capacidad de *P. variotii* de degradar estos compuestos es una evidencia de que este hongo es un buen candidato para el desarrollo de técnicas de biotratabilidad (Wang et al., 2010).

Si bien no fue posible analizar el efecto de la inmovilización de los hongos en esponjas de poliuretano, existen antecedentes de que podría ser un método adecuado para aumentar la degradación de materia orgánica en efluentes. Los beneficios de inmovilizar el hongo son varios, tales como, un aumento en la resistencia al estrés por ruptura de las células en cultivos en agitación, a cambios de pH y a sustancias tóxicas, además de permitir la recuperación y reúso de la biomasa en el caso de una hipotética aplicación a gran escala (Collado et al., 2019). Los materiales usualmente utilizados en la inmovilización de hongos son cenizas (Gao et al., 2004), esponjas de poliuretano (Spina et al., 2018) o *Ecomat* (Wan Razarinah et al., 2015), en los que se observa un incremento de biomasa a los 4 o 7 días de cultivo.

### 3.5. Estudio preliminar para el análisis de la tratabilidad biológica

Como parte del análisis de la biodegradabilidad del efluente se realizó una evaluación preliminar del impacto del efluente filtrado en los barros activados, midiendo los sólidos suspendidos totales y volátiles. Según la información provista por INTI sobre la tratabilidad del efluente de la concentración de bilis bovina, el efluente crudo causa un colapso de los barros activados, entonces se realizó esta evaluación para comprobar si el efluente que pasó por la filtración fisicoquímica también causa un colapso de los barros activados.

Se evaluó el efecto de la filtración fisicoquímica sobre la tratabilidad biológica con barros activados. Para esto, en primer lugar, se realizó un período de aclimatación del barro al efluente, con sucesivas alimentaciones diarias. Las mismas consistieron en ir disminuyendo la cantidad de efluente sintético a medida que se incrementaba la proporción de efluente filtrado, con la finalidad de disminuir los posibles efectos negativos del efluente filtrado sobre la estructura de los barros activados. A continuación, se alimentó el sistema con la máxima proporción DQO/DBO aproximadamente 1:1, determinando a distintos intervalos la proporción SSV/SST como se muestra en la figura 27.

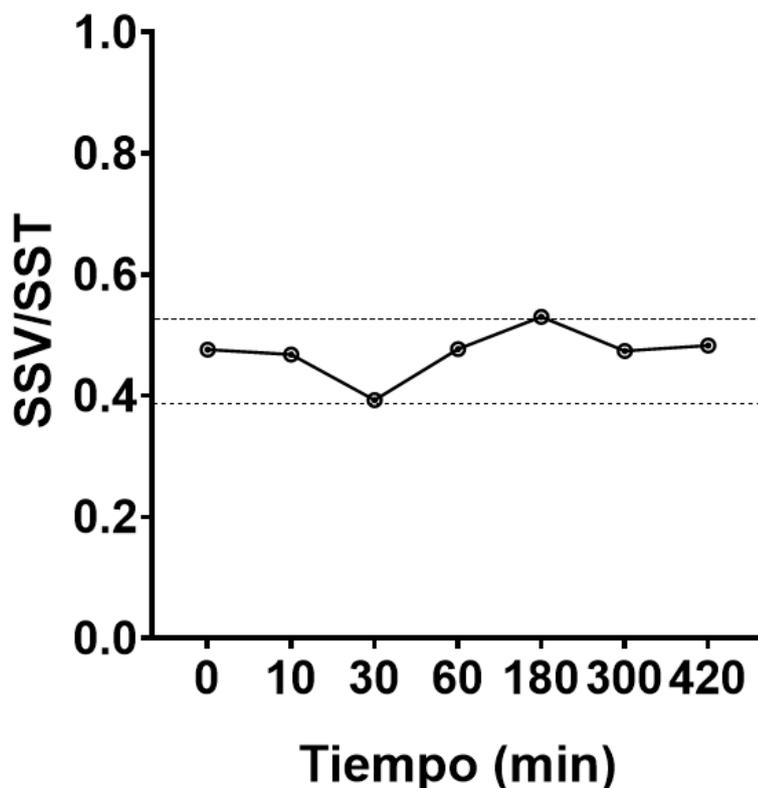


Figura 27. Relación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/ sólidos suspendidos totales (SST) en un barro activado alimentado con el efluente filtrado.

No se observaron grandes variaciones en la relación SSV/SST durante el ensayo, manteniéndose entre 0,4 y 0,6. Esta estabilidad en los barros muestra una adecuada aclimatación del inóculo al efluente filtrado. Para un desempeño óptimo de los barros en el tratamiento de efluentes es deseable mantener una relación SSV/SST entre 0,70 y 0,85 (Von Sperling, 2015). El bajo valor de SSV/SST indica que, al momento de realización del ensayo, el barro presentó un alto nivel de mineralización, característica de barros activados viejos, por lo cual se decidió realizar un ensayo exploratorio sobre el efecto del efluente crudo y el filtrado sobre los barros activados.

A continuación, se comparó la tratabilidad biológica del efluente crudo y del efluente filtrado como la eficiencia de remoción de DQO en el tiempo. En la figura 28 puede observarse que, al cabo de 24 horas, ambas tasas de remoción se ajustan a una ecuación como la presentada en la fórmula 5.

$$Y = -m * x - b$$

Fórmula 5. Ecuación de una regresión lineal inversa.

Y = DQO a tiempo "t"

m = tasa de remoción DQO/hora

x = tiempo en horas

b = DQO inicial

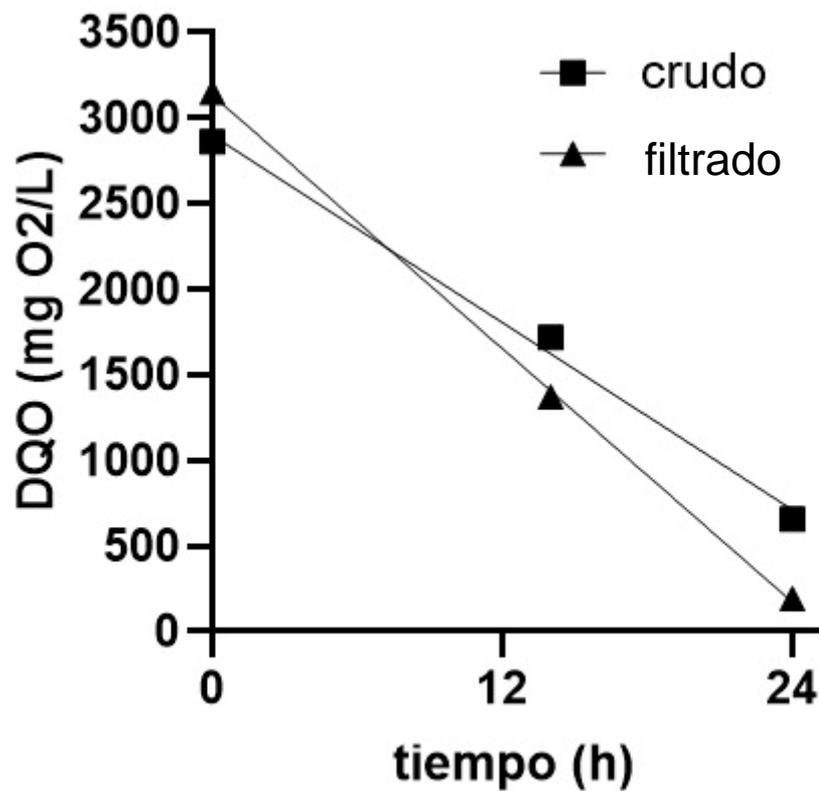


Figura 28. Cambios en la determinación de DQO a diferentes tiempos del efluente crudo y el filtrado.

En el caso del efluente crudo, la tasa de remoción fue de 91,2 mg O<sub>2</sub>/L.hora, mientras que la del efluente filtrado fue de 123,4 O<sub>2</sub>/L.hora, lo que implica un incremento del 35 % en la eficiencia del tratamiento. Para el efluente crudo y el filtrado los R<sup>2</sup> de las regresiones lineales fueron de 0,9944 y 0,9996 respectivamente.

Estos resultados nos dan un indicio de que podría haber un efecto sobre la biotratabilidad del efluente al pasarlo por los tratamientos realizados en esta tesis, principalmente la filtración fisicoquímica.

## 4. Conclusiones

La ejecución de la presente tesis requirió de la puesta a punto de las técnicas de estimación de materia orgánica, las cuales fueron fundamentales para esta investigación. Tanto la puesta a punto del método de DBO como DQO fueron exitosas, validando su uso.

El efluente de estudio fue caracterizado utilizando los métodos previamente calibrados. Se obtuvieron valores consistentes a los medidos por INTI respecto a su DBO. En cuanto a la determinación de materia orgánica mediante DQO, este ensayo no fue concluyente posiblemente debido a la interferencia de iones cloruro. Esta problemática en cuanto el análisis muestra que hay una necesidad de investigar más a fondo esta cuestión.

Se logro una notable disminución de la materia orgánica luego del tratamiento primario. Este consistió en una neutralización con óxido de calcio, seguido de una filtración con tierra de diatomeas y cartón de profundidad. Este tratamiento logró una disminución del 54 % de la materia orgánica, la cual se estimó a través de espectrofotometría UV – Vis, DBO y DQO.

Se realizaron una serie de ensayos de selección de cepas capaces de crecer en presencia del efluente. En la primera etapa se evaluó el crecimiento de 20 cepas en medio agarizado conteniendo un 50 % del efluente. En esta se seleccionaron las cepas *Trametes* sp. (CM7), *P. sanguineus* (CM2), *C. antarcticus* (BAFC 266) y *P. variotii* (CM1). En la segunda etapa de selección se evaluó la tolerancia de estas últimas en concentraciones crecientes de efluente, siendo *P. sanguineus* y *P. variotii* los de mayores CE50. En la última etapa se evaluó el crecimiento de ambas cepas en el efluente y con el agregado de NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno observando crecimiento únicamente en los cultivos de *P. variotii*.

De las 20 cepas evaluadas se seleccionaron las cepas que mostraron evidencias de ser capaces de crecer en un medio agarizado el cual contiene el efluente de la concentración de la bilis bovina. Estas cepas fueron *Pycnoporus sanguineus*, *Paecilomyces variotii*, *Coriolus antarcticus* y *Trametes* sp. De estas cuatro cepas se evaluó el nivel de tolerancia al efluente. *P. variotii* mostró una mayor tolerancia (CE50: 50,86 %), seguida por *P. sanguineus* (CE50: 25,81 %). *Trametes* sp (CE: 25,81 %) y *Coriolus antarcticus* (CE50: 14,36 %) resultaron ser más susceptibles al efecto tóxico del efluente. Con las 2 cepas más tolerantes se realizaron ensayos con medio líquido, con el efluente en concentración al 100 %, tanto crudo como filtrado. En el primer ensayo de crecimiento en efluente crudo y filtrado, con o sin la adicción de NaNO<sub>3</sub> como suplemento,

únicamente se observó crecimiento en *P. variotii* en efluente filtrado, mostrando una morfología menos estresada en los casos sin suplemento.

Por último, se evaluó el crecimiento de *P. variotii* en efluente utilizando 3 tipos diferentes de inóculo: con colonias en medio agarizado, colonias ya crecidas en medio MG, colonias en medio agarizado y 10 esponjas de poliuretano de 1 cm<sup>3</sup>. En los tratamientos que mostraron crecimiento de biomasa aparente fueron en el que se utilizaron colonias crecidas en medio agarizado MG y en el que se utilizaron colonias en medio agarizado. Aun así *P. variotii* no llegó a aumentar su biomasa lo suficiente como para registrar una disminución de materia orgánica significativamente al tratamiento de filtración en ninguno de los dos casos.

Si bien el tratamiento del efluente mediante la combinación del tratamiento fisicoquímico y el cultivo de *P. variotii* mostró una tendencia a la disminución de materia orgánica, esta no fue suficiente para ser estadísticamente significativa, probablemente causado por la alta variabilidad en los datos.

Los ensayos exploratorios realizados parecen indicar que la tratabilidad biológica del efluente luego de aplicar el tratamiento fisicoquímico y el cultivo de *P. variotii* es mayor que la tratabilidad biológica de los efluentes crudos. Esto lleva a concluir que *P. variotii* es una cepa con potencial de aplicación en tratamiento de efluentes generados por la concentración química de sales biliares o de efluentes de similar composición.

## 4.1. Perspectivas

La línea de tratamiento de efluentes de alta carga orgánica con hongos resulta una alternativa interesante a los tratamientos tradicionales. Parte de esta línea de investigación sería la profundización del conocimiento de la cepa de *P. variotii*, especialmente respecto a su fisiología en condiciones de estrés, como las observadas en esta tesis. Esto implicaría la evaluación de las actividades enzimáticas inducidas durante su crecimiento en el efluente.

En relación con las condiciones de estrés, también se buscará diseñar ensayos para el tratamiento del efluente utilizando el cultivo de *P. variotii*, considerando la inmovilización de la cepa.

Otra posible línea a explorar sería modificar la disponibilidad de nutrientes para evaluar el co-metabolismo de los componentes del efluente. Creemos que, ajustando variables importantes como tipo de fuente de nitrógeno, porcentaje del efluente, entre otras, se podría mejorar la transferencia de masa del efluente a los organismos evaluados.

Un antecedente que ejemplifica a favor del co-metabolismo de la materia orgánica presente en el efluente son los resultados de Facó and Santaella (2002), quienes reportan una mejora en la remoción de materia orgánica por DQO de un tratamiento fúngico al adicionar glucosa al medio. En este mismo sentido resultaría interesante ensayar el uso de materiales lignocelulósicos como fuente de nutrientes durante el tratamiento.

También sería posible mejorar las técnicas de análisis trabajando con otros laboratorios que ya cuenten con las técnicas desarrolladas o explorar métodos alternativos, como la determinación de carbono orgánico total. Esta técnica sería una forma de evitar las dificultades encontradas por la presencia de cloruros, tales como las interferencias durante la estimación de materia orgánica por DQO y los obstáculos en la determinación de la DBO.

En una futura investigación se podrá retomar el uso de *P. sanguineus* como cepa degradadora del efluente, se podrá mejorar los análisis de materia orgánica y mejorar el crecimiento de la cepa usada, en especial en relación con la inmovilización. Como fue mencionado anteriormente la inmovilización beneficia a las cepas, aumentando su resistencia a diferentes clases de estrés ambiental, por lo que esperamos que de esta forma *P. sanguineus* sea capaz de crecer en el efluente y disminuir la concentración de materia orgánica.



## 5. Anexo

Se realizó una curva de crecimiento del hongo *P. variotii* cultivándolo en medio líquido malta-glucosa con agitación. Se procesaron seis puntos cada 2 días, siguiendo el crecimiento por 20 días. Para cada punto se midió la biomasa por peso seco y se guardó el sobrenadante para medir azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson.

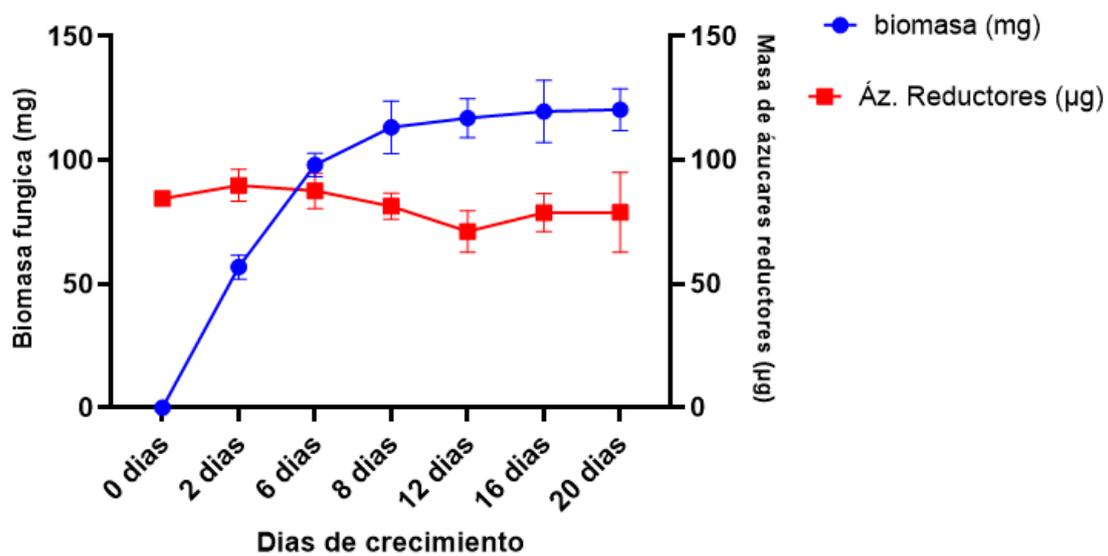


Figura 29. Gráfico que muestra la biomasa obtenida a diferentes días en un medio de MG y la masa de azúcares reductores detectada

Se observa un crecimiento exponencial del *P. variotii* hasta aproximadamente 6 días, después del cual se llega a la fase estacionaria de crecimiento. Luego de 20 días la biomasa sigue estable, por lo que no se llega a la degradación de biomasa.

Los azúcares reductores fueron medidos utilizando el método de Somogyi-Nelson (como utilizado en Hatanaka & Kobara, 1980). No se detectaron cambios significativos en el contenido de azúcares en el medio a lo largo del tiempo medido. Se observan diferencias significativas solamente entre el tiempo 0 y el resto de las mediciones, pero esto se puede deber a la falta de desvío estándar en la medición del tiempo 0, ya que no tiene réplicas.

## 6. Bibliografía

20 minutos, 25 de noviembre del 2019, *¿Qué es la anoxia, el fenómeno que está asfixiando la fauna del Mar Menor?* (Recuperado el 31 de mayo del 2023 de <https://www.20minutos.es/noticia/4066239/0/que-es-anoxia-crisis-mar-menor/>)

Abd EL-Aziz, A. B. E. D., Awad, A. A. E. N., and Zaki, G. H. (2015). Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. *Trends Industrial Biotechnology Res*, 1, 1-9.

Anastasi, A., Tigini, V., Varese, G.C. (2013). *The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi*. In: Fungi as Bioremediators (pp. 29-49). Springer, Berlin, Heidelberg.

Anijiofor, S. C., Jamil, N. A. M., Jabbar, S., Sakyat, S., and Gomes, C. (2017). Aerobic and anaerobic sewage biodegradable processes: the gap analysis. *International Journal of Research in Environmental Science*, 3(3), 9-19.

APHA, AWWA and WEF: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Lipps WC, Braun-Howland EB, Baxter TE, eds. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24rd ed. Washington DC: APHA Press; 2023.

Bala, J. D., Lalung, J., and Ismail, N. (2015). Studies on the reduction of organic load from palm oil mill effluent (POME) by bacterial strains. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 4, 1-10

Baldwin, D. D., & Campbell, C. E. (2001). Short-Term Effects of Low pH on the Microfauna of an Activated Sludge Wastewater Treatment System. *Water Quality Research Journal*, 36(3), 519–535.

Barakat, K., and Saleh, M. (2016). Bioactive Betulin produced by marine *Paecilomyces* WE3-F. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(3), 034-040.

Bartoloni, V., Zannoni, V., Warcok, M., Dominico, R., Martinez, M., Murano, M., Arabia, F. (2013) *Método de concentración de bilis líquida* (Argentina, AR083478) Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). [https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=AR90479859and\\_cid=P11-LK2XW5-22108-1](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=AR90479859and_cid=P11-LK2XW5-22108-1).

Bhattacharya, J., Dev, S., and Das, B. (2017). *Low cost wastewater bioremediation technology: innovative treatment of sulfate and metal-rich wastewater*. Butterworth-Heinemann.

BOLETIN OFICIAL REPUBLICA ARGENTINA - MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SUSTENTABLE AUTORIDAD DE CUENCA MATANZA RIACHUELO - Resolución 46-E/2017. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/160617>

Calvo, J. R. V., Ávila, E. V., Cruz, J. I. L., Zúñiga, M. E. E., Sánchez, F. P. M., Orta, F. M., Zaldívar, C. P., César, M. C. P., Sánchez, P. R., Aguilar, G. M. T., Castro, L. M. Z. T. (2015). *Manual de prácticas de laboratorio de Química Analítica*. 1ra edición. Universidad Autónoma Metropolitana. p. 37

*Causes, Effects and Solutions to Ecological Problem of Eutrophication* (s.f). (Recuperado el 31 de mayo del 2023 de <https://www.conserve-energy-future.com/causes-effects-and-solutions-to-eutrophication.php>)

Casserly, C., & Erijman, L. (2003). Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), 7-12.

Collado, S., Oulego, P., Suárez-Iglesias, O., & Díaz, M. (2019, August). Leachates and natural organic matter. A review of their biotreatment using fungi. *Waste Management*, 96, 108–120.

Corresponsal LID. (8 de junio de 2020). Ingenios azucareros: otra vez aparecen miles de peces muertos en el río Salí de Tucumán. La izquierda diario, Recuperado de <https://www.laizquierdadiario.com/Ingenios-azucareros-otra-vez-aparecen-miles-de-peces-muertos-en-el-rio-Sali-de-Tucuman> el 31 de mayo del 2023

- Da Re, V., and Papinutti, L. (2011). Black liquor decolorization by selected white-rot fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(2), 406-415.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A.A., Purohit, H.J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 56(3): 247-264.
- Díaz, A. I., Laca, A., Sánchez, M., & Díaz, M. (2022, November). Evaluation of Phanerochaete chrysosporium for swine wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108599.
- Diorio, L. A., Fréchou, D. S., and Levin, L. N. (2021). Removal of dyes by immobilization of Trametes versicolor in a solid-state micro-fermentation system. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 3-10.
- Ellouze, M., Aloui, F., & Sayadi, S. (2008). Detoxification of Tunisian landfill leachates by selected fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3), 642-648.
- Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Ali, M. A. E., Mahmoud, D. A., and Elghonemy, D. H. (2012). Screening and optimization of L-asparaginase and L-glutaminase production by some filamentous fungi. *Adv Food Sci*, 34(3), 150-158.
- Facó, A.M., Santaella, S.T., 2002. Treatment of sanitary landfill leachate through a biological process with fungi. *Proceedings of the XXVIII Interamerican Congress of Sanitary and Environmental Engineering*, Cancún, Mexico.
- Fernández Sturla, M. J., Cazzasa, E. G., Itria, R. F. (2007). Estimación de materia orgánica en matrices acuosas con alto contenido de cloruro. *Memorias de las 6ª Jornadas de Desarrollo e Innovación, Medio ambiente: trabajo 107*, INTI.
- Gao, H., Xu, H., Liu, Y., 2004. A study on treatment technology of landfill leachate by a biofilm reactor with the white rot fungi. *Actae Sci Circumtatiae*. 24 (2), 309-314.
- Geist, M., E. (2018). A growing epidemic of toxic algal blooms. *Great Lakes Now*. Recuperado de <https://www.greatlakesnow.org/2018/05/a-growing-epidemic-of-toxic-algal-blooms/> el 31 de mayo del 2023
- Gupta, R., & Singh, R. L. (2019). *Advances in biological treatment of industrial waste water and their recycling for a sustainable future* (pp. 225-66). R. L. Singh, & R. P. Singh (Eds.). Singapore: Springer.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177-192.
- Hatanaka, C., & Kobara, Y. (1980, December). Determination of Glucose by a Modification of Somogyi-Nelson Method. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(12), 2943-2949.
- International Organization for Standardization (2019). *Water quality. Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium. Semi-continuous activated sludge method (SCAS)* (ISO Standard No. 9887:1992) <https://www.iso.org/standard/17768.html>
- Inanc, B., Ciner, F., and Ozturk, I. (1999). Colour removal from fermentation industry effluents. *Water Science and Technology*, 40(1), 331-338.
- Iocoli, G. A., Pieroni, O. I., Gómez, M. A., Alvarez, M. B., and Galantini, J. A. (2017, August). Rapid characterisation of agro-industrial effluents for environmental fate by UV-visible and infrared spectroscopy from fractions obtained by centrifugation. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-12.
- Itria, R. F. (2016). Biodegradación secuencial bacteriana y fúngica de dos compuestos fenólicos recurrentes en efluentes textiles. (Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires)
- Jouanneau, S., Recoules, L., Durand, M., Boukabache, A., Picot, V., Primault, Y., Lakel, A., Sengelin, M., Barillon, B., & Thouand, G. (2014). Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. *Water Research*, 49, 62-82.
- Khan, F. A., and Ansari, A. A. (2005). Eutrophication: an ecological vision. *The botanical review*, 71(4), 449-482.

- Kim, Y. K., Park, S. K., and Kim, S. D. (2003). Treatment of landfill leachate by white rot fungus in combination with zeolite filters. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38(4), 671-683.
- Koca, N. (Ed.). (2018). *Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing*. BoD–Books on Demand.
- Kubicek, C.P. (2013). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. John Wiley & Sons.
- Kumar, P., Teng, T. T., Chand, S., and Wasewar, K. L. (2011). Treatment of paper and pulp mill effluent by coagulation. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*, 5(8), 729-734.
- Kulkarni, S. J. (2016). A review on research and studies on dissolved oxygen and its affecting parameters. *International Journal of Research and Review*, 3(8), 18-22.
- Levin, L., Papinutti, L., and Forchiassin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, 94(2), 169-176.
- Liu, Y., Liao, W., and Chen, S. (2007). Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(1), 117–128.
- Louhichi, G., Bousselemi, L., Ghrabi, A., and Khouni, I. (2019). Process optimization via response surface methodology in the physico-chemical treatment of vegetable oil refinery wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 18993-19011.
- Mack, J. (s.f). *Eutrophication*, Miami University. Recuperado el 31 de mayo del 2023 de <https://www.lakescientist.com/eutrophication/>.
- Majul, L. M. (2020). Uso de los sistemas de enzimas ligninolíticas de hongos Corticales y Geastrales para la degradación de colorantes de industriales (Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires).
- Martinez, M. E.; Marras, C. M.; Reñones, L.; Comin, M. J.; Itria, R. F. (2018) Prospección de cepas fúngicas para la degradación de efluentes de alto contenido orgánico. Libro de Resúmenes del VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Capítulo Argentino “Aunando esfuerzos por un ambiente sustentable”, Fabricio Damián Cid; Nadia Ortega; Nadia Bach. - 1a ed. - San Luis: Fabricio Damián Cid, 2018. ISBN 978-987-778-472-5, p.353.)
- Mehta, V., and Chavan, A. (2009). Physico-chemical treatment of tar-containing wastewater generated from biomass gasification plants. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 57(9), 161-168.
- Metcalf, E. (1981). *Tratamiento y Depuración de Las Aguas Residuales*. p.432, 252-264.
- Molina, J., Jácome, A., Justo, E., Suárez, J., Cagiao, J., Rodríguez, J., & González, C. (2003, December 1). Evaluación de la tratabilidad biológica de las aguas residuales urbanas de Coruña y municipios limítrofes. *Ingeniería Del Agua*, 10(4), 527.
- Operations Manual: Package Treatment Plants*. (2013). BiblioGov.
- Quach-Cu, J., Herrera-Lynch, B., Marciniak, C., Adams, S., Simmerman, A., and Reinke, R. A. (2018). The effect of primary, secondary, and tertiary wastewater treatment processes on antibiotic resistance gene (ARG) concentrations in solid and dissolved wastewater fractions. *Water*, 10(1), 37.
- Pal, P. (2017). *Industrial water treatment process technology*. Butterworth-Heinemann. p.75-76, 465-468.
- Papinutti, V. L., and Forchiassin, F. (February). Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 205–209.
- Perea Mora, B. (2012). Estudio de tratabilidad de agua residual de industria textil a escala laboratorio (Tesis de ingeniería, Universidad de Cantabria).
- Rayner, A.D., Boddy, L. (1988). *Fungal Decomposition of Wood. It's Biology and Ecology*. John Wiley & Sons Ltd.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77, 247-255.

Rodríguez Vidal FJ. (2003). *Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización*. Ediciones Diaz De Santos SA. p. 65.

Saetang, J., & Babel, S. (2009). Effect of leachate loading rate and incubation period on the treatment efficiency by *T. versicolor* immobilized on foam cubes. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 6, 457-466.

Sanchez Rojas, F., and Bosch Ojeda, C. (2005). Effluent analysis in analytical chemistry: an overview. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382, 978-991.

Sapci, Z., and Ustun, B. (2003). The removal of color and COD from textile wastewater by using waste pumice. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(2), 286-290.

Selbmann, L., Onofri, S., Fenice, M., Federici, F., and Petruccioli, M. (2002). Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Research in Microbiology*, 153(9), 585-592.

Sonune, A., and Ghate, R. (2004, August). Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*, 167, 55-63.

Spina, F., Tigini, V., Romagnolo, A., & Varese, G. (2018, July 4). Bioremediation of Landfill Leachate with Fungi: Autochthonous vs. Allochthonous Strains. *Life*, 8(3), 27.

Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I. UV-visible spectrophotometry of Water and Wastewater (1st ed., p. 317-318). Boston: Elsevier Science, C. Burgess and O. Thomas.

Trelles, R. (1979). Química y microbiología de los líquidos cloacales. Monografía Nro 17. Instituto de Ingeniería Sanitaria. UBA. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ingeniería.

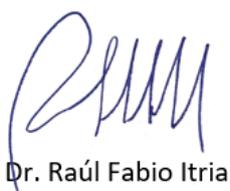
U. S. Geological Survey (n.d). *What is Organic Matter?* (Recuperado el 5 de junio del 2023 de <https://www.usgs.gov/labs/organic-matter-research-laboratory/what-organic-matter-0>)

Von Sperling, M. (2015). Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors. *Water Intelligence Online*, Vol. 6(Issue 0), p.21. ISBN: 9781780402123.

Wakil, S. M., Ajayi, O. D., and Fasiku, S. A. (2020). Production of Tannase by Fungi Isolated from Different Soils. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 16, 1-8.

Wan Razarinah, W. A. R., Zalina, M. N., & Abdullah, N. (2015, March 1). Utilization of the White-rot Fungus, *Trametes menziesii* for Landfill Leachate Treatment. *Sains Malaysiana*, 44(3), 309-316.

Wang, L., Li, Y., Yu, P., Xie, Z., Luo, Y., & Lin, Y. (2010, November). Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.033>



Dr. Raúl Fabio Itria



Dr. Leonardo Majul



Carolina Magalí Marras