

Título: “Biodegradación de compuesto orgánicos y disminución de la conductividad eléctrica por consorcio nativo en efluentes provenientes de la industria olivícola”

Mariela Maldonado^{a,b}, Baigori Mario^b, Graciela Affranchino^a

^a UTN FRM, C. Rodriguez 273, Ciudad de Mendoza, Argentina

^b CONICET, Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

e-mail marielabeatriz1972@yahoo.com.ar

Resumen

Introducción: Los efluentes de aguas de maquinado de la industria olivícola son altamente contaminantes. Estos tienen altos valores de carga orgánica como la demanda biológica de oxígeno y la demanda química de oxígeno, salinidad y otros, que superan con creces la normativa vigente. El objetivo de este trabajo fue lograr, a través de la biorremediación por microorganismos nativos, la reducción de la contaminación de los efluentes.

Metodología: La biorremediación se logró suplementando el efluente con una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo en una proporción aproximada de 100: 5: 1, en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente (25 ± 1 ° C) por un período de 7 a 14 días.

Resultados: El consorcio de microorganismos (bacterias y levaduras) se identificó como: *Pseudomonas aeruginosa* cepa Kasamber 11, *Pseudomonas aeruginosa* cepa 1816, *Klebsiella* sp. cepa DE004, *Enterobacter* sp. DKU NT 01, *Pseudomonas* sp. KC31, *Bacillus* sp. MG06, *Candida thaimueangensis* NWP2-1, *Klebsiella* sp. SI-AL-1B, cepa LX11 de *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp. B9 (2015b), cepa Y7 de *Bacillus pumilus*, *Planomicrobium* sp. cepa MSSA-10 16S, *Candida thaimueangensis* cepa S04-2.2 y un microorganismo sin identificación. Se logró una disminución de aproximadamente un 40-80% de los parámetros específicos e indicadores de contaminación como la demanda biológica de oxígeno (DBO5), la demanda química de oxígeno (DQO) y la conductividad eléctrica.

Conclusión: El consorcio microbiano logró la reducción de la contaminación original del efluente de "aceitunas mecanizadas" mediante bioestimulación, transformándolo en un líquido menos contaminado que podría ser utilizado para otros usos o destinos.

Abstract

Introduction: The machining water effluents from the olive industry are highly polluting. These have high organic load values such as biological oxygen demand and chemical oxygen demand, salinity and others, which far exceed current regulations. The objective of this work was to achieve, through bioremediation by native microorganisms, the reduction of effluent contamination.

Methodology: Bioremediation was achieved by supplementing the effluent with a source of carbon, nitrogen and phosphorus in an approximate ratio of 100: 5: 1, under aerobic conditions at room temperature (25 ± 1 ° C) for a period of 7 to 14 days. .

Results: The consortium of microorganisms (bacteria and yeasts) was identified as: *Pseudomonas aeruginosa* strain Kasamber 11, *Pseudomonas aeruginosa* strain 1816, *Klebsiella* sp. strain DE004, *Enterobacter* sp. DKU NT 01, *Pseudomonas* sp. KC31, *Bacillus* sp. MG06, *Candida thaimueangensis* NWP2-1, *Klebsiella* sp. SI-AL-1B, *Bacillus pumilus* strain LX11, *Bacillus* sp. B9 (2015b), *Bacillus pumilus* strain Y7, *Planomicrobium* sp. strain MSSA-10 16S, *Candida thaimueangensis* strain S04-2.2 and an unidentified microorganism. A reduction of approximately 40-80% of the specific parameters and pollution indicators such as biological oxygen demand (BOD5), chemical oxygen demand (COD) and electrical conductivity was achieved.

Conclusion: The microbial consortium achieved the reduction of the original contamination of the effluent of "mechanized olives" through biostimulation, transforming it into a less contaminated liquid that could be used for other uses or destinations..

Palabras clave: Aguas de maquinado de aceitunas; Bioremediación; Microorganismos nativos; Efluente.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, dos tercios de la población mundial viven en regiones donde sufren escasez de agua al menos un mes al año. Quinientos millones de personas viven en áreas donde el consumo de agua excede los recursos hídricos renovables a nivel local en una proporción de dos a uno. Las áreas altamente vulnerables donde los recursos no renovables continúan agotándose, como las aguas subterráneas fósiles, se han vuelto muy dependientes de las transferencias de áreas con abundantes recursos hídricos y buscan constantemente fuentes económicas alternativas [1].

En este contexto, se sabe que la industria del olivo produce numerosos efluentes que contaminan el agua disponible y los suelos a los que llegan. Según el Consejo Oleícola Internacional [2] en su campaña 2017-2018, la producción mundial fue de 3.284 mil toneladas, donde la Unión Europea se impuso con una producción de 912.5 mil toneladas, seguida de Egipto, Turquía y Argelia con 750, 450 y 303,5 mil toneladas, respectivamente. Argentina fue el sexto con una producción de 106 mil toneladas. Dependiendo del proceso, la estacionalidad y la tecnología utilizada en cada empresa, el volumen de efluente generado por esta industria es muy elevado. Aproximadamente se generan entre 10 y 30 millones de litros de efluentes cada año a partir de la producción de aceite de oliva [3] y lo mismo se produce en la industria de conservas de aceitunas de mesa [4]. Las "aceitunas mecanizadas" están conformadas por aceitunas en rodajas, enrolladas y / o sin escupir utilizadas para aceitunas rellenas y pasta de aceitunas. Representan aproximadamente el 60% de las aceitunas de mesa. Todo el proceso de mecanizado de aceitunas se maneja con agua porque las aceitunas tienen una textura suave y delicada fruto del proceso anterior.

La biorremediación es un proceso que utiliza las capacidades catalíticas de los microorganismos vivos para degradar y transformar contaminantes en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Tiene un enorme potencial para mitigar la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y la versatilidad metabólica. Ambos factores caracterizan a los microorganismos que

transforman los contaminantes en productos inocuos o menos tóxicos que pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales [5]. La biorremediación ha demostrado ser una alternativa para establecer nuevos sistemas de tratamiento de aguas residuales y optimizar los sistemas convencionales [6]. Debido a la importancia de la biorremediación en la sostenibilidad del medio ambiente y su costo relativamente económico, el objetivo principal de este trabajo fue reducir los parámetros fundamentales de contaminación como indicadores de DQO y DBO₅ y conductividad por biorremediación. El segundo objetivo fue demostrar que, al agregar nutrientes como azúcares reductores y sales, es posible bioestimular o activar los microorganismos nativos

DESARROLLO

Ensayo de biorremediación

Se vertió medio litro de efluente de las aguas de mecanizado en cinco matraces Erlenmeyer de un litro de capacidad, previamente agitados. Se suplementaron con una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo a razón de aproximadamente 100: 5: 1. A cada matraz Erlenmeyer se le añadieron los siguientes compuestos: 10g / L de glucosa y 2g / L en forma de las siguientes sales: (NH₄)₂ SO₄, K₂ HPO₄, K H₂PO₄, TRIPLE 15®. El efluente también se complementó con Mg agregando 1g / L de Mg CL₂ y MgSO₄. Luego, cada matraz Erlenmeyer se colocó en un agitador Dragon Lab a 220 rpm para la incorporación de aire durante el experimento generando condiciones de aerobiosis a temperatura ambiente (25 ± 1 ° C) por un período de 7 a 14 días.

Se monitoreó la evolución de diferentes indicadores de contaminación y otras mediciones a lo largo del tiempo, que se detallan a continuación: DBO₅ y DQO según el método estándar [7]; conductividad eléctrica [7], pH por electrodo [7]), polifenoles totales según la técnica de Folin-Ciocalteu, por espectrofotometría [7] y azúcares reductores totales por método DNS [8].

Identificación de microorganismos moleculares

Los microorganismos nativos viables han sido cultivados en medios de cultivo específicos (eosina azul de metileno, agar en placa y agar glucosa-papa) diluidos con efluente en una proporción de 35%, 50% y 100%. Se realizó una caracterización fenotípica y molecular de las cepas. Para las bacterias, las cepas se identificaron mediante la amplificación del gen ribosómico 16S a partir del ADN genómico utilizando el conjunto de cebadores universal para bacterias 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5'TACGGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Estos cebadores dan un producto de amplificación de ~ 1500 pb. La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos de 24 horas mediante dos técnicas de extracción. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía tampón STR (10x) (Promega) 5 µl (suministrado con la enzima), 0,1 µM de cebadores, 2 U de Taq ADN polimerasa (Promega) y 50 ng de ADN. Las condiciones de amplificación consisten en una desnaturalización inicial de 5 min a 94 ° C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94 ° C, 1 min), recocido (55 ° C, 2 min) y extensión (72 ° C, 2 min), y la extensión final a 72 ° C durante 7 minutos.

Para la levadura, las cepas se identificaron mediante la amplificación de la subunidad 26S del ADNr. La amplificación del dominio D1 / D2 de la subunidad 26S del ADNr se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En las reacciones de amplificación de este trabajo utilizamos la plantilla del ADN genómico extraído de la cepa seleccionada. El volumen final de la reacción fue de 50 µl y se utilizaron cebadores universales [9]. Se utilizaron los siguientes cebadores: (i) directo: NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), (ii) inverso: NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático (Perkin -Elmer, modelo 9700, Applied Biosystems) Los productos de amplificación (4 µl) se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p / v) usando 1X TAE (Tris, 24,2%; ácido acético, 5,71%; EDTA, 0,5 M pH8). 10 ml) y 1 µl de Gel Green como tampón de ejecución y tinción de ADN, respectivamente. A 100 pb se incluyó el marcador de peso molecular PB-L (Bio-Logical Products). Promega), se corrió a 75 V durante aproximadamente 30 minutos y se analizó con Programa Cantidad Uno de Bio-Rad. Las bandas se visualizaron mediante fluorescencia en luz

ultravioleta y en el analizador de imágenes en gel Doc BIORAD.

La secuenciación del ADN fue realizada por Macrogen Services. Las secuencias se compararon y emparejaron con secuencias de la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 1: Consorcio de microorganismos

Identificación/Numero de acceso
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Kasamber 11/ Strain10 MM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 1816/Strain 21MM
<i>Klebsiella sp.</i> strain DE004/Strain 22 MM
<i>Enterobacter sp.</i> DKU_NT_01/Strain 25 MM
<i>Pseudomonas sp.</i> KC31 /Strain 27 MM
<i>Bacillus sp.</i> MG06 /Strain 29MM
Without identification /Strain 46 MM
<i>Klebsiella sp.</i> SI-AL-1B /Strain 88 MM
<i>Bacillus pumilus</i> strain LX11 /Strain 91 MM
<i>Bacillus sp.</i> B9(2015b) /Strain 94 MM
<i>Bacillus pumilus</i> strain Y7 /Strain 100 MM
<i>Planomicrobium sp.</i> strain MSSA-10 16S /Strain 102 MM
<i>Candida thaimueangensis</i> strain S04-2.2 /Strain 18282 MM

El consorcio estaba compuesto principalmente por bacterias y, en menor medida, por levaduras. Entre las bacterias, los géneros más conocidos son *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Planomicrobium sp.* y *Enterobacter sp.*, y entre las levaduras del género *Candida sp.* fue la principal. Estos géneros se han encontrado en el tratamiento de otros efluentes como biorremediadores.

Varios estudios han utilizado consorcios bacterianos para la biorremediación [10] [11] [12]. La eficacia de las bacterias aeróbicas para reducir la fitotoxicidad de las aguas residuales de las almazaras (OMWW) varía enormemente. Las bacterias aeróbicas parecen ser muy eficaces contra algunos compuestos fenólicos y relativamente ineficaces contra otros. Por ejemplo, Ramos-Cormenzana et al. [13] informaron de una reducción del 50% en el contenido fenólico de OMWW por *B. pumilis*. Esta bacteria es capaz de degradar completamente el ácido protocatecuico y el ácido cafeico, pero tuvo un efecto mucho menor sobre el tirosol [13].

Pseudomonas aeruginosa se ha utilizado en la biorremediación de suelos contaminados con crudo [14], también en aguas arseniosas [15] y es

capaz de producir biosurfactantes a partir de subproductos de aceituna [16].

Mientras que *Candida thaimueangensis* se ha encontrado entre la biodiversidad típica de los procesos de producción del olivo [17]. y *Planomicrobium sp.* se encontró en las etapas de maduración de compostaje de los residuos de almazara de dos fases [18].

Por otro lado, se encontró que *Enterobacter sp* era capaz de eliminar metales pesados de efluentes domésticos e industriales contaminados [19]. Entonces, todas estas especies viables del consorcio están relacionadas de una forma u otra con la biorremediación de efluentes, pero no se habían encontrado asociadas de esta forma en otros efluentes.

Como comenta Darvishi [10], la capacidad biodegradable de los microorganismos está asociada a su capacidad para producir enzimas.

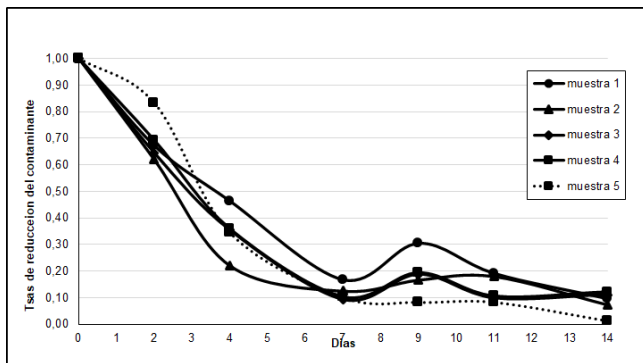


Figura 1: Evolución de la demanda Química de Oxígeno.

Como se puede observar en la figura 1, la DQO presentó una tasa de reducción de la contaminación (DQO en el tiempo n / DQO en el tiempo inicial) que fue de 1 en el tiempo inicial a 0,1 en el séptimo día. Esto se demuestra en la disminución prácticamente exponencial de la curva DQO hasta el séptimo día y luego continúa variando levemente y finalmente se vuelve casi asintótica con el eje x, con lo que la tasa de disminución de contaminante fue de 0.1 a 0.01 en adelante. día 14. Este parámetro inició con un promedio de 13.575 mg O / L y la tasa de disminución de la contaminación bajó casi dos órdenes de magnitud luego de 14 días de tratamiento, alcanzando un valor de 172 mg O / L la legislación de la Resolución 778 de la Provincia de Mendoza, para permitir el vuelco a cause público, debe ser inferior a 250 mg O / L para DQO. Por otro lado, la disminución de la DQO fue consistente con una reducción del 90% en la DBO₅ registrada por las muestras, que disminuyó

de un promedio de 15.500 mg O / L. Según la Resolución 778, para permitir el vuelco a cause público, debe ser de 120mg O / L. La biodegradación podría complementarse con la reacción de Fenton para lograr el valor indicado como lo indica Lucas y Pérez [21]. Sin embargo, este proceso fue más eficaz que la biodegradación aeróbica y la desintoxicación de aguas residuales utilizadas por Fadil et al. [21]. Lograron remociones de DQO de 55.0%, 52.5% y 62.8% en aguas residuales fermentadas con *Geotrichum sp.*, *Aspergillus sp.* y *C. tropicalis*, respectivamente.

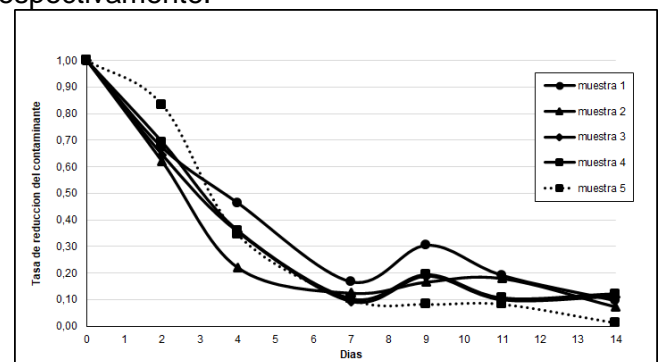


Figura 2: Evolución de Azúcares Reductores.

La figura 2 muestra la disminución de azúcares reductores. La disminución de los azúcares reductores inicialmente fue muy rápida hasta tornarse casi indetectables. Esto es consistente con la disminución de la DQO (ver figura 1), que en el día cuatro está en declive exponencial completo para volverse prácticamente asintótica en el día siete. Este comportamiento probablemente podría deberse a que los microorganismos, que crecen entre las primeras 24 horas y 72 horas, lo harían a expensas del consumo de azúcares reductores, que son los más fáciles de degradar y luego continúan creciendo a expensas de otras fuentes de carbono más complejos.

La Tabla 3 demuestra el crecimiento de microorganismos. Fue seguido por el recuento total de ellos. Se verificó el crecimiento de tres importantes grupos poblacionales: aeróbicos mesófilos, coliformes y levaduras. Los coliformes y aeróbicos mesófilos crecieron durante la primera fase y continuaron creciendo hasta el final. Las levaduras estuvieron presentes en la última fase del proceso de fermentación.

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento de microorganismos fue mayor mientras existía una mayor cantidad de materia orgánica en el sistema y específicamente acompañado de la presencia de azúcares

reductores. Sin embargo, siempre hubo crecimiento de microorganismos nativos viables. Esto indica que estuvieron presentes durante todo el proceso, pero posiblemente su tasa metabólica se redujo por falta de fuente de carbono, por lo que llegó al final del proceso mostrando un comportamiento asintótico en los diferentes parámetros seguidos.

Table 2. Recuento de microorganismos

Tiempo (horas)	UFC/ml		
	Coliformes	Aerobios mesófilos	Levaduras
0	9.9E+12	1.4 E+14	0.00 E+00
2	1.8 E+15	5.2E+17	0.00 E+00
4	7.8 E+12	3.3 E+16	0.00 E+00
6	1.6 E+13	1.5 E+17	3.27 E+07
8	1.17E+11	1.9 E+15	5.52E+07

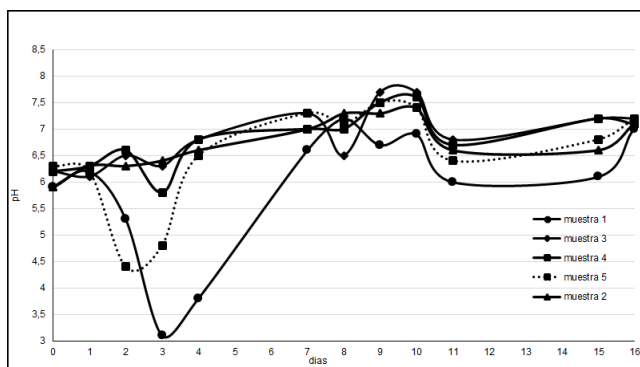


Figura 3: Evolución del pH.

La evolución del pH se puede observar en la Fig. 3. La evolución del pH fue diferente para cada Erlenmeyer con efluente, aunque se utilizó el mismo efluente en todos ellos. Cada uno se comportó como un biorreactor individual, aunque hubo algunas similitudes a considerar. Al principio, el primer día, parece haber un ligero cambio en el pH de las repeticiones. Al segundo día, el pH muestra un pequeño aumento en tres de los Erlenmeyer (2, 3 y 4). Este comportamiento ocurrió principalmente durante las primeras 24 horas. Este cambio posiblemente podría interpretarse debido al crecimiento microbiano que transformó el medio (datos cuantificados no mostrados). Probablemente, el nitrógeno inorgánico, los microorganismos lo utilizaron para generar proteínas básicas y la constitución de la membrana celular [22]. En las técnicas de bioestimulación y bioaumentación se utilizaron fertilizantes comerciales con contenido de N y P para garantizar el óptimo nutricional del proceso metabólico bacteriano [23]-[25]. En este trabajo,

la cantidad de glucosa, nitrógeno y fósforo se agregó mediante la adición de fertilizantes para alcanzar la proporción de 100: 5: 1 como sugieren Nannipieri et al. [26] para promover el crecimiento microbiano.

Por otro lado, las muestras 1 y 5 presentaron una disminución del pH entre el día 2 y 3, posiblemente debido a la producción de ácidos liberados por la respiración aeróbica de azúcares por ciclo de ácidos cítricos [22]. Los azúcares se respiraron casi por completo a las 100 horas como se muestra en la Fig. 2. De hecho, si se observa la Tabla 3 entre los días 2 y 4 hay crecimiento de microorganismos (coliformes y aerobios mesófilos). Por otro lado, las levaduras crecieron a partir del día 6 cuando el pH estaba cerca de pH 6. La disminución del pH también ha sido reportada por otros autores en respiración aeróbica similar [27]. Esto también es consistente con lo encontrado por Barrera y Mejias [28], quienes mostraron que los procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales, mantuvieron el pH entre 4 y 9.1, con una mediana de 7.1 como el pH óptimo para el desarrollo de microorganismos.

Esta disminución del pH es consistente, también, con los cambios organolépticos que se registraron. Los cambios de color observados en el efluente opalescente muestran cómo se desarrollaron y multiplicaron los microorganismos. La actividad microbiana fue consistente con las variaciones de pH que se observaron en cada muestra, comprobando que el aumento de masa microbiana y productos del tratamiento aeróbico elevó casi dos puntos de pH hacia el décimo día. La actividad microbiana y su respiración fueron consistentes con la disminución de la demanda química de oxígeno. Probablemente podría indicar el consumo de otros productos orgánicos más complejos que la glucosa añadida en las muestras tratadas.

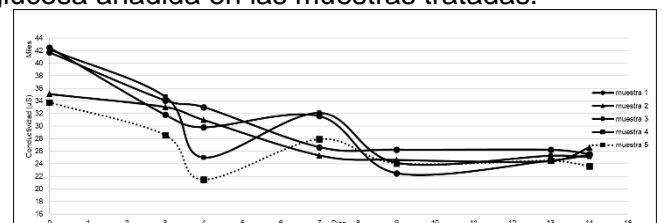


Figura 4: Evolución de la Conductividad Eléctrica.

La figura 4 muestra la evolución de la conductividad eléctrica. La conductividad inicial de las muestras 1, 2 y 3 fue inicialmente mayor

que la de las muestras 4 y 5, posiblemente debido a la matriz compleja tratada. Sin embargo, durante el tratamiento, se observó una disminución de la conductividad del 35%. Las causas de las cuales se estudiarán en detalle en un trabajo futuro. Es interesante analizar esto, ya que no se conoce ni se comprende el mecanismo por el cual se produjo la disminución de la conductividad eléctrica. Esto podría ser causado por cualquiera de los microorganismos seleccionados o por su trabajo sinérgico.

CONCLUSIONES

Se ha logrado reducir los parámetros fundamentales de los indicadores de contaminación de un efluente debido a la acción de microorganismos biorremediadores obtenidos de efluentes nativos viables. Estos parámetros como DQO y DBO₅ disminuyeron aproximadamente un 90% y la conductividad un 35%. Se verificó la presencia de microorganismos nativos viables que consumieron los azúcares reductores hasta dejar trazas de azúcares. Es posible que posteriormente consuman compuestos más complejos. Esto fue consistente con la disminución de la DQO. Se deben realizar más estudios para comprender e informar las causas de la disminución de la conductividad eléctrica. Los resultados de laboratorio son prometedores como una primera aproximación a la biorremediación de este efluente complejo y contaminante para la industria local.

AGRADECIMIENTOS

CONICET-UTN FRM

El proyecto fue financiado por SECyT (UTN FRM) PID ALUTIME 4529 "Estudio de la biorremediación y degradación de polifenoles de Efluentes de la Industria Aceitunera con la correspondiente mitigación del Impacto Ambiental"

REFERENCIAS

[1] UNESCO (2017) Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos. Aguas residuales: El recurso desaprovechado pp 1-5, 2, 13, 41. Editors: E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton. París. Recuperado de: <http://www.unesco.org/new/en/natural->

- sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/
- [2] Consejo Oleícola Internacional (COI) (2019) World table olive figures. Recuperado de: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures/>
- [3] McNamara C. J., Anastasiou C. C., O'Flaherty, V., Mitchell, R. (2008) Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 127–134.
- [4] Borgo, E. (2013) "Diagnóstico sobre los efluentes generados y vertidos en la Industria Olivícola en empresas del Gran Mendoza-Sector aceitunas verdes en conserva". Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.
- [5] Garbisu, C.; Amézaga, I. y Alkorta I. (2002) "Biorremediación y Ecología". *Revista Ecosistemas*. Año XI, Nº 3, Septiembre-Diciembre.
- [6] Chen, Q.; Ni, J.; Ma, T.; Liu, T.; Zheng, M. (2015) Bioaugmentation treatment of municipal wastewater with heterotrophic-aerobic nitrogen removal bacteria in a pilot-scale SBR. *Bioresour. Technol.* 183:25-32.
- [7] American Public Association (1992) Standard Methods for Examination of Water and waste 18th ed. American Public health Association, Washington D.C.
- [8] Miller., G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* Vol. 31, NO. 3:426-428.
- [9] O'Donnell, K. (1993) Fusarium and its near relatives. In: Reynolds DR & Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* CAB International, Wallingford, 225-233.
- [10] Darvisi, F. (2012) Microbial Biotechnology in Olive Oil Industry, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, Boskou Dimitrios, IntechOpen, Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/microbial-biotechnology-in-olive-oil-industry>.
- [11] Ayed, L.; Bekir, K.; Achour, S.; Cheref, A.; Bakhrouf, A. (2016) Exploring bioaugmentation strategies for azo dye CI Reactive Violet 5 decolourization using

- bacterial mixture:dye response surface methodology, *Water Environ. J.* 31: 80–89.
- [12] Ayed, L.; Bouguerra, A.; Charefc, A.; Bakhroufa, A.; El Mzoughi, R. (2019) Biodegradation of Olive Mill Wastewater by a newly isolated novel bacterial consortium under RSM optimized culture conditions. *J Water Proc Eng* Volume 32, December, 1-9.
- [13] Ramos-Cormenzana, A.; Juarez-Jimenez, B.; Garcia-Pareja, M. P. (1996) Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechín) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38: 283–290.
- [14] Ojewumi, M. E.; Okeniyi, J. O.; Ikotun, J. O.; Okeniyi, E. T.; Ejemen, V. A. & Popoola, A. (2018). Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. *Data in brief* 19: 101–113.
- [15] Pellizzari, E. E.; Marinich, L.G.; Flores, S.A. & Giménez, C.M. (2015) Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. *Estudio preliminar. Av. Cienc. Ing.* 6:1-5. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323635882001>.
- [16] Mercade, M. E.; Manresa, M. A. (1994) The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc* 71, 61-64
- [17] Lucena-Padrós, H.; Caballero-Guerrero, B.; Maldonado-Barragán, A.; Ruiz-Barba, J. L. (2014) Genetic diversity and dynamics of bacterial and yeast strains associated to Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies *Int J Food Microbiol* 190: 72-78.
- [18] Tortosa, G.; Castellano-Hinojosa, A.; Correa-Galeote, D.; Bedmar, E. J. (2017) Evolution of bacterial diversity during two-phase olive mill waste ("alperujo") composting by 16S rRNA gene pyrosequencing. *Bioresource Technol*, 224: 101–111.
- [19] Bestawy, E. E.; Helmy, S.; Hussien, H. (2013) Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria. *Appl Water Sci* 3: 181–192. doi.org/10.1007/s13201-012-0071-0
- [20] Lucas, M. S. and Peres, J. A. (2009) Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton's reagent: Kinetic study. *J. Hazard. Mater* 168, Issues 2–3, September, 1253-1259.
- [21] Fadil, K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A.; Zaid A., Borja, R. (2003) Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International Biodeterioration & Degradation* 51:37–41.
- [22] Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C.M.; Lehninger, A. L. & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Omega, Barcelona.
- [23] Duke, N.C.; Burns K. A.; Swannell, R. P. J.; Dalhaus, O.; Rupp, R. J. (2000) Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: the Gladstone field trials. *Mar. Pollut. Bull.* 41(7-12):403-412.
- [24] García, S.; Venosa, A. D.; Suidan, M.T.; Lee, K.; Cobanli, S.; Haines, J.R. (2007) Biostimulation for the treatment of an oil contaminated coastal salt marsh. *Biodegradation*. 18(1):1-15.
- [25] Sanscartier, D.; Laing, T.; Reimer, K.; Zeeb, B. (2009). Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian High Arctic: laboratory and field studies. *Chemosphere*. 77(8):1121-1126. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.006
- [26] Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54(4):655-670.
- [27] Flamarique, J.; Maldonado, M.; Lafi, J. (2016) Biorremediación de un efluente de la industria aceitunera a través de microorganismos nativos. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología XIV. Congreso Argentino de Microbiología.
- [28] Barrera, Ó. and Zafra Mejía, C. (2018) Factores clave en procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales. Una revisión *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 21 (2): 573 – 585.