

# EVALUACIÓN DEL USO DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES (VINAZAS)

Edward Andrés Olarte Gómez  
CC: 91.535.665

Mónica Judith Valencia Giraldo  
CC: 1.050.543.754

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
INGENIERÍA AMBIENTAL  
2016

## RESUMEN

Palabras claves: Microalgas, biorremediación, aguas residuales, vinazas

El hombre en su afán de conservar el agua como recurso vital para la vida, ha venido desarrollando a través del tiempo técnicas de biorremediación para el tratamiento de aguas residuales industriales mediante el empleo de microalgas. En Colombia, las destilerías de etanol generan altos volúmenes de residuos contaminantes, específicamente en las aguas residuales, también conocidas como vinazas.

La finalidad primordial de este estudio es valorar la posibilidad del empleo de la microalga *Chlorella vulgaris*, en el tratamiento de las vinazas y la suficiencia en la remoción de nutrientes como el nitrógeno, fósforo así como de la carga orgánica presente en este tipo de residuos líquidos.

Llevándose a cabo un experimento a escala de laboratorio, en el cual se desarrolló un tratamiento biológico que permitió medir y cuantificar la producción de biomasa y las cantidades de remoción para los nutrientes y parámetros específicos de las aguas residuales, mediante el uso de *Chlorella vulgaris* en un medio como las vinazas.

Este estudio demostró la obtención de porcentajes de remoción de Fósforo, Nitrógeno, DQO y DBO5 de 75,7%, 84,93%, y 30,92%, respectivamente, lo que argumenta la viabilidad de emplear la microalga *Chlorella vulgaris* en la realización de procesos de biorremediación en el sector de los Biocombustibles.

## Contenido

---

INTRODUCCIÓN .....	4
1. MARCO TEORICO .....	9
2. OBJETIVOS DEL PROYECTO .....	12
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1 Medio de cultivo.....	13
3.2 Producción de vinazas .....	13
3.3 Montaje experimental.....	14
3.4 Cuantificación de biomasa .....	15
3.5 Clarificación de la muestras .....	16
3.4 Cuantificación de fósforo .....	16
3.5 Cuantificación de Nitrógeno .....	16
3.6 Cuantificación de DBO5 y DQO .....	17
3.7 Cuantificación de los porcentajes de remoción.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	18
4.1 Cuantificación de Biomasa.....	18
4.2 Cuantificación del Fósforo .....	19
4.3 Cuantificación del Nitrógeno .....	20
4.4 Porcentajes de Remoción .....	21
4.5 Comparación de la Caracterización Físico-Química de la Vinaza con los Valores Máximos Permisibles Contemplados en la Normatividad Colombiana para Vertimientos, Resolución 0631/ 2015. ....	23
4.6 Relación DQO/DBO5 .....	24
5 CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFIA .....	26

### Listado de Tablas

Tabla 1. Experimento No.1 .....	15
Tabla 2. Experimento No. 2.....	15

### Listado de Figuras

Figura 1 Producción de Biomasa- Chlorella Vulgaris. ....	18
Figura 2. Perfil del Fósforo Total .....	19
Figura 3. Perfil del Nitrógeno Total.....	20

## INTRODUCCIÓN

El incremento acelerado del sector industrial y urbanístico de las sociedades de hoy en día, trae consigo el aumento de grandes volúmenes de aguas residuales no tratadas, estas son vertidas en la mayoría de los casos sin un previo tratamiento a las fuentes hídricas, generándose alteraciones significativas en los ciclos biogeoquímicos generales, lo que promueve un aumento en las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono las cuales no son asimilables por los ecosistemas acuáticos.

Las características de las aguas residuales tienen una relación directa a partir de la fuente O industria que las genere, ya sea descargando sus residuos en piscinas o lagos comunitarios, haciendo más difícil el tratamiento de estas mediante un diseño unificado (De Bashan *et al.*, 2004). El vertimiento constante de las aguas residuales pone en riesgo la oferta hídrica mundial (Montaigne & Essick, 2002), y acelera procesos como la eutrofización (crecimiento excesivo de algas y/o otros organismos) a partir de grandes concentraciones de nitrógeno y fósforo en los cuerpos hídricos a nivel mundial (Lau *et al.*, 1997; Trepanier *et al.*, 2002), lo que ha generado la reducción y/o pérdida de la fauna y flora acuática y causalmente la pérdida total de los ecosistemas (An *et al.* 2003).

Con el objetivo de prevenir estas situaciones negativas han aparecido un compendio de normas ambientales que reglamentan los niveles máximos y permitidos de carga orgánica, nitrógeno y fósforo que pueden presentar las aguas tratadas (García *et al.*, 2000). Así mismo de forma paralela al avance normativo presentado y a la contaminación de las fuentes hídricas, se divisa una aumento significativo en la aparición y uso de tecnologías renovales por ejemplo la aplicación de fuentes de energía alternativas, como la producción de biocombustibles, proceso

que contribuye con la reducción del impacto ambiental en el mundo a través del empleo de fuentes de energía sustitutivas como es el caso de la caña de azúcar.

La elaboración de bioetanol a partir de la caña de azúcar tiene sus ventajas y desventajas, a continuación se describe una de las principales consecuencias negativas para el medio ambiente a partir de su proceso de refinación, Castillo (1984) afirma: *“La producción de alcohol produce un residuo final líquido comúnmente llamado vinaza, el cual se ha constituido desde hace mucho tiempo en un grave problema debido a su elevado poder de contaminación, ocasionado principalmente por su gran contenido orgánico”* (p.1). En este sentido se hace necesario investigar y plantear posibles soluciones para el tratamiento biológico de las vinazas.

En Colombia se necesita un millón cien mil litros (1 100000 L) de bioetanol para satisfacer la demanda de ciudades como Bogotá, Medellín, Cali y Barranquilla, donde es obligatorio el uso de esta mezcla de etanol con gasolina (Fedebiocombustibles, 2013), en las industrias dedicadas a la destilación de etanol se producen alrededor de 9 y 14 L de vinazas por litro de etanol producido (Travieso, *et al.*, 2008).

La vinaza como residuo líquido presenta unas particularidades como son; un pH bajo, fuerte olor, color marrón oscuro, una alta Demanda Química de Oxígeno (DQO, 80000 – 100000) mg/L, así como una elevada concentración en la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO, 40000 – 50000) mg/L; además contienen altas proporciones de nutrientes como nitrógeno (1660- 4200) mg/L, fósforo (225 – 3038) mg/L y potasio (1900 – 17475) mg/L; igualmente dentro de sus características se resalta su color, el cual impide la filtración de los rayos de sol complicando procesos como la fotosíntesis de la flora acuática nativa, por lo tanto desmejorando la calidad del agua y afectando la vida acuática (Satyawali *et al.*, 2012); según Travieso *et al.* (2008) la generación de vinazas en la industria de alcohol se compara con la contaminación que se da por

una comunidad aproximada de 1000 habitantes (Travieso, *et al.*, 2008); por lo cual es inevitable el tratamiento a los vertimientos que se producen en este tipo de industrias (Valderrama *et al.*, 2002).

En este sentido se presenta como alternativa biológica para el tratamiento de la vinazas la fitorremediación, que consiste en la descontaminación de suelos y la purificación de las aguas a través del uso de plantas vasculares, macro y microalgas, permitiendo la remoción y transformación de la contaminación, incluyendo nutrientes y compuestos extraños para el ser humano, presentes en las aguas residuales, además del CO<sub>2</sub> presente en el aire (Olguín *et al.*, 2003). Este tipo de alternativas pueden aplicarse en procesos de remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales y efluentes con elevadas concentraciones en materia orgánica, así como con trazas de metales y ácidos, además de la captura de CO<sub>2</sub>, la transformación y degradación de xenobióticos y la identificación de compuestos tóxicos utilizando sensores a base de algas (Costa *et al.*, 2000; Olguín *et al.*, 2001).

Uno de los beneficios de emplear las microalgas se encuentra que pueden crecer fotosintéticamente por lo que la adición de una fuente de carbono al medio no es requerida para su crecimiento, convirtiéndose además en grandes sumideros de CO<sub>2</sub> (Abhay *et al.*, 2010).

La utilización de sistemas de microalgas- bacterias para el tratamiento de aguas residuales agro industriales, ha demostrado ser una alternativa eficaz en la operación de plantas de tratamiento convencionales. En estos sistemas, las microalgas permiten proporcionar oxígeno durante el proceso de la fotosíntesis, el cual es empleado por las bacterias para su metabolismo, mientras que las bacterias liberan al medio CO<sub>2</sub> necesarios para que las microalgas estimulen su crecimiento. Por lo tanto los sistemas de microalgas- bacterias no requieren de oxígeno externo, reflejan una disminución en los costos de energía y permiten la recuperación de nutrientes y

potencializan el CO<sub>2</sub> como una biomasa valorizable. (Hernández *et al.*, 2015).

Distintos reportes sobre el uso de sistemas basados en microalgas para el tratamiento de aguas industriales de origen agroindustrial han descrito principalmente la influencia de factores vitales para su funcionamiento como la temperatura, el suministro de luz, el tiempo de retención hidráulica y la eficiencia en la remoción de nutrientes y materia orgánica, sin embargo la eficiencia de los fotobioreactores debe evaluarse teniendo en cuenta las características químicas de la biomasa, con el objetivo de potencializar y valorizar la biomasa resultante, como por ejemplo los biocombustibles. (Hernández *et al.*, 2015).

La elección de la cepa microalgal es un aspecto preponderante si se pretende obtener resultados óptimos en términos de crecimiento y una excelente capacidad de remoción de los nutrientes, por ejemplo Chacón (2004), con el objetivo de probar la eficiencia de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*, en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO en aguas residuales, concluyo que la remoción de nitrógeno y el fosfato, entre 44,0% y 48,7%; y la DQO entre 54,8% y 55,8%, favorecen el uso potencial de la *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* para el tratamiento de aguas residuales.

La microalga *Chlorella vulgaris* ha llamado la atención en el campo de la biotecnología, al convertirse en una interesante fuente de biomasa para el sector de la producción de biodiesel (Cléber *et al.*, 2006). Diferentes investigaciones han reportado un incremento en la capacidad de asimilación de nutrientes y en su crecimiento, lo que ha conllevado a plantearse que la microalga *Chlorella vulgaris* sea utilizada en el desarrollo de procesos de bioremediación, a partir de la facilidad para adaptarse y su acelerado crecimiento en el medio (Brennan *et al.*, 2010).

En el año 2002 Valderrama *et al.*, emplearon cultivos de *C. vulgaris* por un periodo de 4 días y posteriormente macrófitos por 6 días en el tratamiento de vinazas, alcanzando resultados en la

disminución del 52% en el color. Travieso *et al.*, (1999) usaron cultivos de *C. vulgaris* SR/2 para el tratamiento de vinazas posterior a un pretratamiento aeróbico o anaeróbico, permitiendo obtener un extraordinario medio de cultivo para el desarrollo de las microalgas. Según Travieso *et al* (2008) otro resultado del experimento es que las microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* también contribuyeron a la capacidad de remoción del nitrógeno y fósforo, permitiendo presentar resultados superiores al 85% y en el caso del parámetro sólidos totales a resultados superiores al 90%.



## 1. MARCO TEORICO

Se valora que el volumen de los vertimientos domésticos producidos por Norte América, Europa y América Latina es de aproximadamente 70, 63 y 47 km<sup>3</sup> por año, respectivamente (UN Water, 2009). Por lo tanto, el primordial reto de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) no sólo es producir agua limpia reutilizable, sino también, descubrir nuevas alternativas sostenibles que contribuyan al apoyo y mejoramiento de dicha actividad (Chan *et al.*, 2009).

Las técnicas que se utilizan normalmente solo permiten eliminar sólo una concentración del total de nitrógeno (hasta el 40%) y de fósforo (hasta el 12%) presente en el efluente (Carey *et al.*, 2009). La Directiva Europea 98/15/EC fija un intervalo de 10 a 1 mg/L para el total de Nitrógeno y Potasio. Los efluentes de una PTAR se caracterizan por presentar indicadores de N y P cercanos a 20-70 y 4-12, respectivamente (Carey *et al.*, 2009).

En este orden de ideas existe una evidente necesidad de generar nuevos procesos, basados en el empleo de sistemas biológicos los cuales son valorados y tenidos en cuenta como el medio más apto para tratar a tal demanda (Rawat *et al.*, 2011).

El proceso de producción de bioetanol produce un tipo de agua residual conocida como vinazas, las cuales se generan en altos volúmenes (Brennan & Owende, 2010), este residuo líquido proveniente de la destilación alcohólica presenta unas características específicas tales como el alto contenido de materia orgánica, por consiguiente niveles elevados de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), así como un pH que oscila entre 4 – 4,5 y por último evidencia una temperatura elevada comprendida entre los 80 a 90 °C, lo que hace de este residuo un agente contaminante severo que altera significativamente las condiciones naturales de los cuerpos hídricos receptores

y produce daños irreversibles sobre los ecosistemas acuáticos.

La tecnología empleada en Colombia para la producción de bioetanol a partir de la biomasa que se genera en el sector agroindustrial está basada en el método Praj – Delta T, procedimiento de que se origina en industrias Estadounidenses y de la India y se conforma de tres (3) etapas. La primera etapa de fermentación se presenta en mieles ricas en sacarosa, fructosa y glucosas, las cual son fermentadas mediante la Levadura *S. Cereviciae* y de esta forma se obtiene el etanol y otros metabolitos secundarios. Seguidamente se da la segunda etapa que consiste en la destilación, en ella se da el etanol al 96% y por último la etapa de la deshidratación desarrollada con tamices moleculares en la que se dan resultados de etanol al 98% de volumen. (Quintero, 2009).

El avance de la biotecnología en la utilización de microorganismos específicos para desarrollar transformaciones químicas avanza a pasos a agigantados, uno de los procedimientos más comunes para el tratamiento de aguas residuales con vinazas que se utiliza y el cual es posterior al tratamiento primario que es empleado para eliminar los sólidos suspendidos principalmente, es el de tratar las aguas residuales microbiológicamente (lagunas de estabilización o de lodos activados).

Se ha implementado incluso el uso de microorganismos generados en el mismo ambiente de destilería como es el caso de Selvam *et al* (2011) quien después de un estudio del papel de las cianobacterias en destilería, pudo determinar que la inoculación de *Nostoc muscorum* dio como resultado la eliminación de diversos productos químicos, así como nutrientes tales como nitrógeno, amoníaco y el fósforo del efluente, de igual manera pudo establecer que el 80% del CO<sub>2</sub> fue removido y que esta cianobacteria podría ser empleada potencialmente para el tratamiento de las efluentes de destilerías.

Dentro de las múltiples opciones de microorganismos se presenta el uso de algas tal como *Chorella vulgaris*, esta microalga ha sido pretendida para este clase de tratamientos, a raíz de su fácil adaptabilidad y su acelerado crecimiento (Brennan & Owende, 2010).

Valderrama et al., (2002) se ensayaron con cultivos conjuntos de microalgas *C. vulgaris* y *Lemma minuscule* en efluentes generados en destilerías con un tratamiento previo anaeróbico, estos estudios derivaron que al ser tratados los efluentes solo con *L. minuscule* se disminuía la coloración solo en un 10%, pero al realizar conjuntamente el tratamiento, inicialmente con *C. vulgaris* y posteriormente con *L. minuscule* los resultados en la disminución en la coloración reportaba hasta llegaba a un 52%. Demostraciones con Cianobacterias en distintos efluentes han dado rendimientos relevantes como los obtenidos por Vijayakymor et al., (2005), en donde utilizando *Oscillatoria Aphanopsa* en aguas residuales, percibieron una eliminación del 100 % de los fosfatos presentes en el medio.

Travieso et al., (1999) emplearon cultivos de *C. vulgaris* SR/2 para el tratamiento de vinazas luego de haber realizado un pretratamiento anaeróbico, presentándose como resultado un excelente medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas, y una remoción de nitrógeno y fósforo (> 85%) así como una reducción de los sólidos totales por encima del 90%.

## 2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

### Objetivo general

Evaluar la viabilidad de uso de la microalga *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de vinazas, su adaptabilidad y capacidad de consumo de la materia orgánica presente.

### Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la concentración de las vinazas la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*
- Determinar el tiempo específico del cultivo en donde se obtiene el mayor consumo de nutrientes
- Realizar una adecuada caracterización de las vinazas antes y después del cultivo, con el fin de determinar el efecto de las microalgas como agente biorremediador

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Medio de cultivo

*Chlorella vulgaris* UTEX 1803, será adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y se conservara en un medio Bold Basal (Andersen, 2005), cuya composición en mg/L es: NaNO<sub>3</sub> (2,94), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,04 X 10<sup>-1</sup>) NaCl (4,28 X 10<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,31 X 10<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,29), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,70 X 10<sup>-1</sup>) y micronutrientes (mg/l) ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,07 X 10<sup>-2</sup>), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (7,28 X 10<sup>-3</sup>), MoO<sub>3</sub> (4,93 X 10<sup>-3</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (6,29 X 10<sup>-3</sup>), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1,68 X 10<sup>-3</sup>), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1,85 X 10<sup>-1</sup>), EDTA (1,71 X 10<sup>-1</sup>), KOH (5,53 X 10<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,79 X 10<sup>-2</sup>)., utilizando reactores cilíndricos a un volumen del cultivo de 2 L.

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura con un volumen de cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 mL/min y condiciones de temperatura de 25°C ± 2°C, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO<sub>2</sub> considerándose este cultivo como tratamiento control.

#### 3.2 Producción de vinazas

La vinaza utilizada es un producto de desecho de la producción de etanol a partir de vinazas el cual fue obtenido a partir de melaza fermentada mediante evaporación sin recirculación en el laboratorio de procesos de la escuela de ingeniería química de la Universidad Industrial de Santander. Para la fermentación se diluyeron 45 Kg de melaza comercial en 151 L de agua hasta alcanzar aproximadamente 18° Brix, esta mezcla fue pasteurizada a una temperatura de 80°C durante 1 hora, posteriormente se enfrió hasta los 40°C y se ajustó el pH a 4,2

mediante la adición de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  con una concentración del 95%. El inóculo fue preparado utilizando 20 L de la mezcla y adicionando Cloruro de amonio (144 g), sulfato de magnesio (24 g), urea (24 g) y Roca fosfórica (10 g), utilizados para la activación de 500 g de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan). El inóculo se añadió al tanque en donde se encuentra el resto de la melaza diluida, posteriormente se realizó una aireación durante una hora y para luego tapar de forma hermética el recipiente o tanque y de esta forma se inició el proceso de fermentación, llevado a cabo durante 3 días. Transcurrido este periodo de tiempo se procedió a la evaporación del mosto con el uso de un evaporador el cual trabaja a 94 °C, realizándose en dos etapas cada una con un tiempo promedio de 210 minutos. El residuo que queda después de la evaporación es lo que se conoce como vinazas (Barajas *et al.*, 1991).

### **3.3 Montaje experimental**

Se utilizaron reactores cilíndricos tipo airlift con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura con un volumen de cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 mL/min y a unas condiciones de temperatura de  $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ , sin control de pH. Debido al color oscuro de las vinazas que impiden el paso de luz homogéneamente en todo el reactor y al bajo proceso fotosintético de las microalgas en este medio, no se tuvo en cuenta el efecto del ciclo de luz/oscuridad en el crecimiento. Con el fin de comprobar el efecto de las vinazas en la producción de biomasa microalgal se probó diferentes diluciones de inóculo en vinaza (Tablas 1 y 2). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

En el primer experimento se utilizó un inóculo de una concentración aproximada de 0,6 g/L, y se evaluó el efecto de la concentración final del inóculo en el tratamiento de vinazas, para

esto se emplearon diferentes cantidades de inóculo en tres volúmenes de vinazas (basados en estudios previos no reportados), con el fin de mantener un volumen constante de 2 litros de cultivo, se compensa el volumen de vinazas como el del inóculo (Tabla 1).

*Tabla 1. Experimento No.1*

<b>Vinazas (mL)</b>	<b>Inóculo <i>C. vulgaris</i> (mL)</b>	<b>Conc. final inóculo (g/L)</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>1500</b>	500	0,150	D1
<b>1650</b>	350	0,105	D2
<b>1800</b>	200	0,060	D3

*Fuente: Los Autores, 2016.*

En el segundo experimento se pretendió evaluar el efecto de la cantidad de inóculo, en este caso se usaron diferentes cantidades (gramos) de biomasa en base húmeda, (disminución en un 75% la humedad del inóculo), con lo que determinó su efecto en las vinazas.

*Tabla 2. Experimento No. 2*

<b>Vinazas (mL)</b>	<b>Inóculo <i>C. vulgaris</i> (g base húmedos)</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>2000</b>	1	C1
<b>2000</b>	2	C2
<b>2000</b>	3	C3

*Fuente: Los Autores, 2016.*

### **3.4 Cuantificación de biomasa**

Para las mediciones de concentración de biomasa cada 2 días se tomó una muestra de 10 mL de cada reactor, empleándose una centrifuga marca Clay Adams x 6 tubos, en donde se centrifugó a 3400 rpm durante 20 minutos y se retiró el sobrenadante, el pellet fue re-suspendido en 10 mL de agua destilada, posteriormente filtrado con filtros de celulosa de diámetro de 110 mm y 1 µm de poro, previamente pesados. Los filtros con la muestras

fueron llevados a horno a 105°C durante 24 horas y luego en un desecador hasta alcanzar peso constante (Moheimani *et al.*, 2013).

### 3.5 Clarificación de la muestras

Para determinar el fósforo y nitrógeno en aguas residuales oscuras, es necesario realizar un pretratamiento de clarificación, con el fin de permitir el análisis por métodos colorimétricos. Se Tomó una muestra de 50 mL de vinazas, posteriormente se calentó hasta 60 °C. Luego se agregó 25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> Agitó y calentó durante 10 minutos (Paneque *et al.*, 2010).

### 3.4 Cuantificación de fósforo

Se tomaron 30 mL de medio libre de células, luego se agregó 10 mL de solución de Metavalanato-Molibdato y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 50 ml. Después de 10 minutos la muestra se leyó en el en un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 (Merck) a una longitud de onda de 470 nm. Usando esa absorbancia se obtiene la concentración directamente de la curva estándar (Clesceri *et al.*, 1999).

### 3.5 Cuantificación de Nitrógeno

Se tomaron 50 ml de medio de cultivo libre de células y se agregó 1 ml de solución de HCl 1 N, se agita vigorosamente, después de 10 minutos, la muestra se lee a 220 y a 275 nm, para determinar la interferencia debida a materia orgánica disuelta. Los valores obtenidos se reemplazaron en la ecuación 1, la cual corrige a las absorbancias el ruido debido a materia orgánica (Clesceri *et al.*, 1999).

$$[1] \text{ valor corregido} = (2 \times \lambda_{275}) - \lambda_{220}$$



### **3.6 Cuantificación de DBO5 y DQO**

Para finalizar las muestras iniciales y finales de vinazas se trasladaron al laboratorio PSL Proanálisis LTDA el cual se encuentra acreditado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, con el objetivo de analizar y generar resultados de los parámetros Demanda Bioquímica Oxígeno DBO<sub>5</sub> mediante el método SM 5210 B; S.M. 4500-OG, así mismo la Demanda Química de Oxígeno DQO a través de S.M 5220 C, fósforo total mediante S.M. 4500-P E y por ultimo nitrógeno total con S.M 4500-N C, los métodos de análisis empelados se determinan a partir de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21<sup>a</sup> Edition 2005, APHA. AWWA, WEF.

### **3.7 Cuantificación de los porcentajes de remoción**

Para el cálculo del porcentaje de remoción de los indicadores de contaminación del agua y nutrientes, obtenidos con la aplicación de la microalga *Chlorella vulgaris* en el proceso de depuración de las aguas residuales industriales del proceso de destilación de bebidas alcohólicas (vinazas), se tuvo en cuenta la siguiente expresión:

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(\text{cantidad inicial} - \text{cantidad final})}{\text{Cantidad inicial}} * 100$$

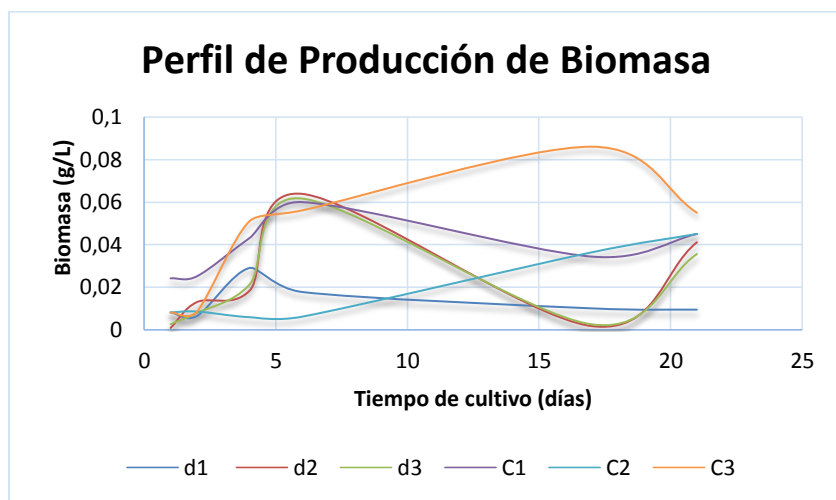
De esta manera, se realizó el cálculo de los porcentajes de remoción de cada parámetro en estudio

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cuantificación de Biomasa

Las microalgas tienen la capacidad de absorber rápidamente nutrientes y CO<sub>2</sub>, esto genera tasas de crecimiento altas, permitiéndoles desarrollarse en diferentes ambientes. Se ha estudiado la capacidad que tienen estas para degradar contaminantes como fenoles, compuestos aromáticos, colorantes sintéticos y biopolímeros recalcitrantes como la melanoidina (Singh & Patel, 2012). Durante el tiempo de experimentación en los tratamientos se evidencia que la mayor producción (0,086 g/L) se obtuvo con el tratamiento C3 al día 17, por otro lado la menor producción (0,001 g/L) se alcanzó en el tratamiento d2 (Figura 1). Pathak et al., (1999) determinó que el aumento en la producción de biomasa, se debe al aprovechamiento de los nutrientes en las vinazas como fosfatos, nitratos, carbono orgánico, entre otros.

Figura 1 Producción de Biomasa- *Chlorella Vulgaris*.



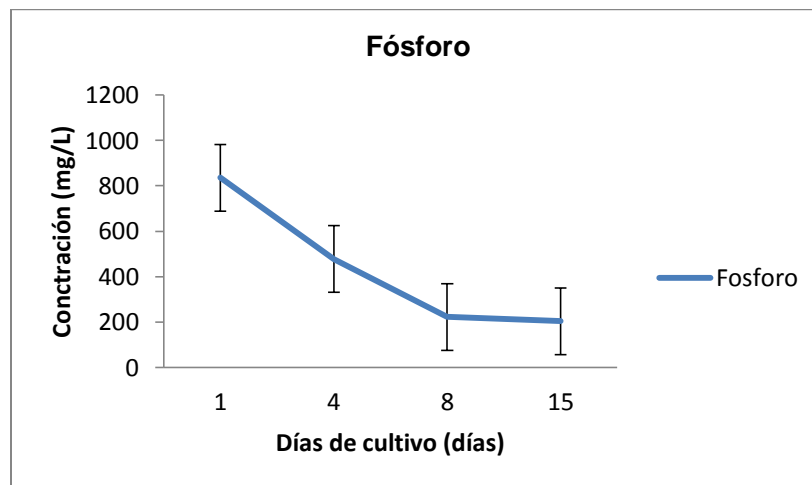
Fuente: Los Autores, 2016.

Liu *et al* (2012) utilizaron molasas diluidas y pre tratadas para el cultivo heterotrófico de *Chlorella zofingiensis*, adicionando cantidades específicas de molasas para mantener una concentración estable de nutrientes, debido a que según los autores un aumento de los nutrientes de las molasas disminuye la producción de la biomasa, con este tipo de cultivo obtuvieron una producción de 3 g/L al 3° día de cultivo y una productividad de 1 g/L\*d. Otros estudios con cultivos heterótrofos de *C. vulgaris* donde fue utilizada glucosa como sustrato se llegaron a obtener 117,2 g/L con un inóculo de 65 g/L en un periodo de tiempo de 36 horas (Doucha & Livansky, 2011) esto significa la duplicación de la biomasa en este lapso de tiempo, la producción es mayor al compararla con la biomasa a partir de vinazas.

#### 4.2 Cuantificación del Fósforo

A continuación en la **Figura 2**, se describe el perfil de Fósforo Total, a partir de las variables concentración mg/L y días de cultivo.

Figura 2. Perfil del Fósforo Total



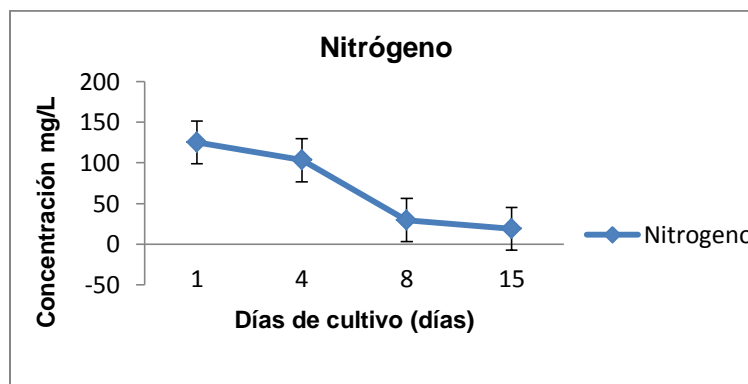
Fuente: Los Autores, 2016.

Como análisis en los porcentajes de remoción se tiene en cuenta que uno de los nutrientes importantes para el crecimiento y producción de biomasa microalgal, es el Fósforo, el cual es empleado por las microalgas para desarrollar sus necesidades metabólicas. En la **Figura 2**, se presenta el perfil de fósforo total obtenido en el ensayo realizado, el cual al cabo de seis días presentó una disminución significativa, pasando de 835 mg/L a 203 mg/L, lo cual representa el consumo de este compuesto por parte de las microalgas, generando así una remoción del 75,7% del fósforo total contenido en las vinazas.

### 4.3 Cuantificación del Nitrógeno

Dentro de la evaluación a los de porcentaje remoción para los nutrientes analizados en el presente estudio, la cinética de consumo del Nitrógeno total, muestra el comportamiento característico en este tipo de proceso, ya que debido a la producción de biomasa microalgal, el nitrógeno es empleado para suplir las necesidades energéticas del cultivo por esta razón, la *Chlorella Vulgaris*, reduce la concentración de este nutriente, asimilándolo directamente como compuestos de amonio. En la **Figura 3**, se presenta el perfil de remoción de Nitrógeno Total durante los 15 días.

*Figura 3. Perfil del Nitrógeno Total*



*Fuente: Los Autores, 2016.*

El porcentaje de remoción de Nitrógeno total obtenido (84,93%) durante el proceso, es un valor satisfactorio, el cual indica el aprovechamiento de este compuesto necesario para la demanda energética por parte del inóculo microalgal y la producción de biomasa, depurando las aguas residuales de este nutriente.

Estos resultado coinciden a los obtenidos por Travieso (2008) quien logró la eliminación entre 600-1000 mg/L de nitrógeno de vinazas pre tratadas anaeróbicamente y cultivada en un fotobioreactor continuo con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12, sin embargo para el caso hay que aclarar que la vinaza utilizada en este estudio no tuvo ningún tipo de pre tratamiento

#### **4.4 Porcentajes de Remoción**

A partir de la metodología señalada para el cálculo de los porcentajes de remoción se logró determinar los siguientes resultados:

- **Porcentaje de Remoción de DBO<sub>5</sub>**

$$\% \text{ Remoción DBO}_5 = \frac{(\text{DBO}_5 \text{ inicial} - \text{DBO}_5 \text{ final})}{\text{DBO}_5 \text{ inicial}} * 100$$

$$\% \text{ Remoción DBO}_5 = \frac{(42,528 - 29,376)}{42,528} * 100$$

$$\% \text{ Remoción DBO}_5 = 30,92$$

- **Porcentaje de Remoción de DQO**

$$\% \text{ Remoción DQO} = \frac{(\text{DQO inicial} - \text{DQO final}) * 100}{\text{DQO inicial}}$$

$$\% \text{ Remoción DQO} = \frac{(70,773 - 48,886) * 100}{70,773}$$

$$\% \text{ Remoción DQO} = 30,92$$

- **Porcentaje de Remoción de Fósforo**

$$\% \text{ Rem. Fósforo} = \frac{(\text{Fósforo inicial} - \text{Fósforo final}) * 100}{\text{Fósforo inicial}}$$

$$\% \text{ Remoción Fósforo total} = \frac{(835 - 203) * 100}{835}$$

$$\% \text{ Remoción Fósforo} = 75,7$$

- **Porcentaje de Remoción de Nitrógeno**

$$\% \text{ Rem. N} = \frac{(\text{Nitrógeno inicial} - \text{Nitrógeno final}) * 100}{\text{Nitrógeno inicial}}$$

$$\% \text{ Remoción Nitrógeno total} = \frac{(124,93 - 18,823)}{124,93} * 100$$

**% Remoción Nitrógeno= 84,933**

#### **4.5 Comparación de la Caracterización Físico-Química de la Vinaza con los Valores Máximos Permisibles Contemplados en la Normatividad Colombiana para Vertimientos, Resolución 0631/ 2015.**

En la **Tabla 3**, se reportan los valores iniciales de los parámetros contemplados en la muestra de vinaza, los valores después del tratamiento del efluente de vinaza con la microalga *Chlorella Vulgaris* y los valores máximos permisibles contemplados en la Normatividad colombiana vigente.

Tabla 3. Comparación valores del efluente de vinaza con la normatividad colombiana vigente.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>VALOR INICIAL VINAZAS</b>	<b>VALOR VINAZAS TRATADAS CON <i>Chlorella vulgaris</i></b>	<b>UNID</b>	<b>VALOR MÁXIMO PERMISIBLE RESOLUCIÓN 0631/2015</b>	<b>UNID</b>
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	42528	29376	mg O <sub>2</sub> /L	1500	mg O <sub>2</sub> /L
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	70773	48886	mg O <sub>2</sub> /L	3000	mg O <sub>2</sub> /L

Fuente: Los Autores, 2016.

Observaciones de la tabla: \*Análisis y reporte

- Valores no reportados

De acuerdo con la **Tabla 3**, los valores reportados para DQO y DBO5 luego del tratamiento realizado al efluente (vinaza) con la microalga *Chlorella vulgaris*, no cumplen con los valores máximos permisibles para estos aspectos, por lo cual, aunque se garantiza una remoción del 30.92% de DQO y DBO5 en 15 días de tratamiento al efluente,.

#### **4.6 Relación DQO/DBO5**

La biodegradabilidad de la materia orgánica contenida en las aguas residuales, ya sea suspendida o disuelta, es la propiedad que permite depurar estas aguas mediante microorganismos, los cuales suplen sus necesidades metabólicas y energéticas mediante la ingesta de la materia orgánica contenida en ella. Por esta razón es necesario determinar cuantitativamente la relación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO), para estimar teóricamente la biodegradabilidad de un efluente a tratar, en este caso la vinaza.

De esta manera, se estima el índice de relación DQO/DBO<sub>5</sub>, para el agua residual procedente del proceso de destilación para este caso de estudio la vinaza:

$$\text{DQO/DBO}_5 = 70,773/42,528$$

$$\text{DQO/DBO}_5 = \mathbf{1,66}$$

De acuerdo con el valor obtenido (1,66), se infiere teóricamente que si la relación DQO/DBO<sub>5</sub> < 2,5, se tiene un efluente biodegradable, lo cual implica que el uso de sistemas biológicos como lechos bacterianos o lodos activos, es una medida de depuración satisfactoria para el tratamiento de este efluente de aguas residuales (vinazas).



## 5 CONCLUSIONES

El tratamiento biológico empleado en este estudio constituye una buena alternativa para la depuración de aguas residuales, ya que los bajos requerimientos energéticos y la simplicidad de su tecnología permiten su fácil implementación, sin embargo, se recomienda, mayores tiempos de retención y contacto con el inóculo microalgal, con el fin de aumentar los porcentajes de remoción de los parámetros indicadores de contaminación DQO y DBO5.

En el ensayo llevado a cabo se obtuvieron porcentajes de remoción de Fósforo, Nitrógeno, DQO y DBO5 de 75,7%, 84,93%, y 30,92%, respectivamente, generando así resultados de depuración óptimos de las aguas residuales industriales procedentes de la destilación de bebidas alcohólicas (vinazas), mediante el uso de un sistema de tratamiento biológico (*Chlorella Vulgaris*).

La producción de biomasa obtenida (0,086 g) con estos ensayos, sustenta la viabilidad del uso de *Chlorella Vulgaris* en este tratamiento de depuración, generando un subproducto de valor significativo en otras industrias como la producción de biocombustibles.

Para el tratamiento de depuración de las vinazas caracterizadas en este estudio, se recomienda utilizar un sistema biológico, que combine tecnologías aerobias y anaerobias, con el fin de remover la materia orgánica y los nutrientes tales como nitrógeno y fósforo

## BIBLIOGRAFIA

- Abhay B. Fulke, S.N.M., Raju Yadav, Ajam Shekh, N. Srinivasan, Rishiram Ramanan, K. Krishnamurthi, S. Saravana Devi, T. Chakrabarti, Bio-mitigation of CO<sub>2</sub>, calcite formation and simultaneous biodiesel precursors production using *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 2010. 101 p. 8473-8476.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. (1915). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 2). American Public Health Association.
- An, J. Y., Sim, S. J., Lee, J. S., & Kim, B. W. (2003). Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 185-191.
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Academic press
- Barajas, C., & Escalante, H. (1991) *Manual de laboratorio de operaciones unitarias I. Publicaciones UIS*. Bucaramanga,
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Rev.* 14(2), 557-577.
- Carey, R. O., & Migliaccio, K. W. (2009). Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems: a review. *Environmental Management*, 44 (2), 205-217.

- Castillo, V. H. (1984). Propuesta para poner en funcionamiento la planta de tratamiento de la fábrica nacional de licores. Ministerio de Industria, Energía y Minas de San José de Costa Rica. *I*(1), 1-2.
- Chacón C. Andrade C. Cardenas C. 2002. Uso de *Chorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* En la remoción de Nitrógeno, Fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Centro de Investigación del Agua (CIA), Facultad de Ingeniería, Universidad de Zulia – Maracaibo, Estado de Zulia. Boletín del centrode investigaciones biológicas 38(2): 94-98
- Chan, Y. J., Chong, M. F., Law, C. L., & Hassell, D. G. (2009). A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal, 155*(1), 1-18.
- Cléber, F. E., M. Sant’Anna, G. L. Villela, and O. Barcelos. 2006. Lipids, fatty acid composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y aceites 57* (3):270-274.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. & Eaton, A. D. (1999). Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association.
- Costa, R. Medri, W., & Perdomo, C.C. (2000) High-rate pond for treatment of piggery wastes. *Water Sci. Technol.* 42(10): 357–362.
- De-Bashan L.E. Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water Research, 38*(19), 4222–4246.

- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811-826.
- Fedebiocombustibles. Boletín Informativo no. 81 Miércoles 23 De Enero De 2013. [Print(0)]. [Consultado el 08/202013]. Disponible en: <http://www.fedebiocombustibles.com/v3/nota-web-id-1347.htm>
- García, J., Mujeriego, R., Hernandez-Martinez, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen. *Journal of Applied Phycology*, 12: 331–339.
- Hernandez, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A., Garcia – Gonzalez, M. (2015). Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. *Chemical Engineering Journal*. 285 (2016), 449 – 458.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., & Wong, Y.S. (1997). Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella Vulgaris*. *Environ Technol.* 18(9): 945-951
- Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource technology*, 107, 393-398.
- Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., & Sing, S. F. (2013). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In *Algae for Biofuels and Energy* (pp. 265-284). Springer Netherlands.
- Montaigne, F., Essick, P., (2002). Water Pressure. *Natl. Geog.* 202:2–33.
- Olguin, E.J. (2003). Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 81–91.

- Olguin, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp* (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*, 77(1), 19–24.
- Paneque, V., Calaña, J., Calderon, M., Borges, Y., Hernandez, T., y Caruncho, M. (2010). *Manual de Tecnicas Analiticas para el Analisis de Aguas Residuales*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, la Habana, Cuba.
- Pathak, H., Joshi, H. C., Chaudhary, A., Chaudhary, R., Kalra, N., & Dwiwedi, M. K. (1999). Soil amendment with distillery effluent for wheat and rice cultivation. *Water, air, and soil pollution*, 113(1-4), 133-140.
- Quintero, V. (2009). *Evaluación potencial de producción de etanol combustible a partir de biomasa secundaria disponible en la agroindustria azucarera colombiana*. Universidad Industrial de Santander – UIS, Bucaramanga
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424.
- Satyawali, Y., Balakrishnan, M. (2008) “Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review”. *Journal of Environmental Management*, 83(3), 481-497.
- Selvam, G. G., Baskaran, R., & Mohan, P. M. (2011). Microbial diversity and bioremediation of distilleries effluent. *Journal of Research in Biology*, 1(3), 153-162.
- Singh, N.K., & Patel, D.B. (2012). Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. *Farming for Food and Water Security*,

- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F., & Rincón, B. (2008). Assessment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. *Environ Technol.* 29(9):985-992.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo F., Rincón B. (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary Treatment of Distillery Wastewaters. *Chem. Biochem. Eng*, 22(4), 467–473.
- Travieso, L., Benítez, F., Dupeyrón, R. (1999). Algae growth Potential measurement in distillery wastes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 62(4), 483-489.
- Trepanier, C., Parent, S., Comeau, Y., Bouvrette, J. (2002). Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water Research*, 36(4), 1007–1017.
- UN Water (2009) The United Nations World Water Development Report 3 – Water in a Changing World. (UNESCO Publishing/Earthscan).
- Valderrama, L.T., Del-Campo, C.M., Rodríguez, C.M., De-Bashan, L.E., & Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule*. *Water Research*, 36(17), 4185–4192.
- Vijaykumar, S., Thajuddin, N., & Manoharan, C. (2005). Role of cyanobacteria in the treatment of dye industry effluent. *Pollution Research*, 24(1), 69.