

Comunicación Técnica

Desarrollo de un sistema de biofiltración con bacterias proteolíticas y amilolíticas inmovilizadas utilizando subproductos del beneficio de café

Nestor Algeciras,¹ Rosmira Barrera,² María Mercedes Martínez,^{*2} Aura Pedroza,² Claudia Reyes,² Edwin Rodríguez,² Nelson Rodríguez³ y Saida Rojas²

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.

² Departamento de Microbiología Ambiental, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Cra. 7 No. 43-82 of. 111. Santafé de Bogotá, Colombia Tel: 3208320 ext 4030; Fax: 3208320 ext 4120. E-mail: mmmartin@javercol.javeriana.edu.co

³ Laboratorio de digestión anaeróbica. CENICAFE. Colombia.

Recibido el 26 de junio del 2002; aceptado el 30 de septiembre del 2002

Resumen. Los procesos con filtros microbiológicos son unos de los tratamientos de aguas residuales donde se usan microorganismos inmovilizados atrapados en soportes. La inmovilización se realizó utilizando bacterias amilolíticas y proteolíticas aisladas y caracterizadas a partir de muestras de aguas provenientes del tratamiento anaeróbico de fincas cafeteras y de la planta piloto de Cenicafe. Así mismo se aislaron bacterias con igual capacidad enzimática a partir de pilas de compost obteniendo un total de siete cepas correspondientes a *Bacillus licheniformis* con una actividad amilolítica de 12289 UA/min; *Bacillus megatherium* de 9890 UA / min y *Brevibacterium* sp. de 3433 UP / min. La inmovilización de las células se llevó a cabo en columnas de 50 cm de alto por 3.5 cm de diámetro, empleando diferentes subproductos de la producción de café pergamo como borra, cascarilla de café y película plateada y sus respectivas mezclas, utilizando carbón activado como control de inmovilización por adsorción. El soporte seleccionado en este estudio fue la mezcla de borra 25%, cascarilla de café 25 % y carbón activado 50 %, con una remoción de 88.6 % DQO sobre el valor obtenido postratamiento anaeróbico, a las 36 h. Las condiciones del experimento fueron flujo 2.5 mL / min.; temperatura entre 22-24 °C. y pH 7.0 ± 0.2.

Palabras claves: Adsorción, amilasas, biofiltro, DQO, inmovilización, proteasas *Bacillus licheniformis*, *B. megatherium*, *B. brevibacterium*.

Introducción

Colombia es un país reconocido, en el ámbito mundial, por ser productor de café suave de excelente calidad, utilizando el proceso de beneficio húmedo que permite obtener café lavado y en el cual se emplea en promedio 1 litro de agua por cada kilogramo de café pergamo seco, cuando se utiliza el desmucilaginador mecánico y 4.1 litros por kilogramo de café pergamo seco cuando se utiliza fermentación natural y lavado en tanques. Después de esta etapa, el agua utilizada queda con una gran carga orgánica, en términos de DQO de 110000 mg / L cuando se utiliza el desmucilaginador y de 30000 mg / L cuando se utilizan los tanques [1, 2].

Cenicafé (Centro Nacional de Investigaciones de Café), perteneciente a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, está utilizando un tratamiento anaerobio para las aguas residuales de las fincas cafeteras mediante un sistema modular

Abstract. Processes using microbiological filters are included under those waste water treatments that use immobilized microorganisms that are trapped in supports. Immobilization was achieved through the use of isolated amylolytic and proteolytic bacteria, characterized from water samples taken from an anaerobic treatment at coffee-growing farms and at Cenicafe's pilot plant. Furthermore, bacteria having identical enzymatic capacity were isolated from compost piles. In all, seven strains were obtained, corresponding to *Bacillus licheniformis* featuring an amylolytic activity of 12289 UA/min; *Bacillus megatherium*, with an activity of 9890 UA / min; and *Brevibacterium* sp., with an activity of 3433 UP / min. Cell immobilization efforts were carried out on columns measuring 50 cm in height and 3.5 cm in diameter, while using different sub-products deriving from production of vellum coffee ("pergamo"), such as floss, coffee shells, and silverplated pellicle, and mixtures thereof. Activated carbon was used in the absorption-based immobilization control. The selected support for this essay was made up of a mixture of 25 % floss, 25 % coffee shells, and 50 % activated carbon, with a removal rate of 88.6 % DQO over the obtained value for the anaerobic post-treatment, after 36 h. Experimental conditions were: 2.5 mL / min. flux; temperature range of 22-24 °C.; pH 7.0 ± 0.2.

Keywords: Absorption, amylases, bio-filter, DQO, immobilization, proteases *Bacillus licheniformis*, *B. megatherium*, *B. brevibacterium*.

de tratamiento. Este consta de un reactor hidrolítico acido-génico y un reactor metanogénico, con recámara de dosificación entre ellos con el propósito de encontrar una forma económica de tratar las aguas y así evitar la contaminación ambiental [3].

Sin embargo, a pesar de que los SMTA (Sistemas Modulares de Tratamiento Anaeróbico) desarrollados en Cenicafe permiten eliminar el 80.4 % de la carga orgánica inicial, cumpliendo con lo dispuesto por la legislación ambiental (80 % DQO5-Decreto 1594 / 84), estudios realizados por Matuk V., 1997 encontraron que los efluentes de los SMTA aún generan un impacto biológico adverso en el ecosistema acuático cafetero, razón por la cual es necesario desarrollar sistemas de postratamiento que disminuyan el 19.6 % restante, en las aguas tratadas.

Los sistemas de cultivos fijos utilizados en aguas, que utilizan microorganismos inmovilizados, se definen como aque-

los procesos que retienen una alta concentración de microorganismos y en los que se pueden utilizar sistemas de recirculación de un efluente a tratar. Los microorganismos transforman la carga orgánica biodegradable de las aguas residuales y ciertas fracciones inorgánicas en nueva biomasa y otros productos no contaminantes como agua y dióxido de carbono por medio de mecanismos enzimáticos como la producción de amilasas y proteasas [4].

Debido a que la inmovilización celular permite dar mayor estabilidad a las bacterias mejorando la eficiencia de los procesos en los que participan, se planteó el desarrollo de un biofiltro, bajo sistema continuo, utilizando bacterias aeróbicas aisladas de aguas y compostas de café, con gran capacidad enzimática, retenidas en soportes orgánicos de baja biodegradabilidad, mediante la técnica de adsorción [5].

Metodología

Recolección de muestras. El área de trabajo se localizó en el municipio de Chinchiná Departamento de Caldas. Las muestras seleccionadas como soportes fueron borra, película plateada y cascarilla de café; subproductos del proceso de torrefacción del café, suministradas por el laboratorio de biodigestión de Cenicafé (Chinchina).

El agua a tratar en el biofiltro, se tomó a la salida del reactor metanogénico de Cenicafé y fueron transportadas hasta los laboratorios de Microbiología en Bogotá a 4 °C.

Recuperación de cepas. Los microorganismos correspondientes a Cepa 4A (*Bacillus licheniformis*), con una actividad amilolítica de 12289 UA/min/l; Cepa 7A *Bacillus megatherium*, con una actividad de 9890 UA/min/l y cepa 9P (*Brevibacterium* sp.), actividad proteolítica de 3433 UP/min; fueron recuperadas de trabajos anteriores realizados por el grupo de Biotecnología de la Universidad Javeriana [4].

Se recuperaron en Agar Standar Plate Count, sembrando por aislamiento e incubando por 24 horas a 30 °C. La pureza de la cepa se verificó mediante coloración de Gram.

Medición de la actividad celulolítica. La actividad celulolítica se midió para cada una de las cepas, tanto cualitativa como cuantitativamente, para determinar si las cepas tenían la capacidad enzimática para degradar el soporte. Para la prueba cualitativa se sembró por triplicado cada uno de los microorganismos en agar celulosa al 1 % (p/v) pH 7.0 ± 0.2, a 30 °C durante 24 h, y se observó el crecimiento y la formación de halo de hidrólisis [6].

Para la prueba cuantitativa se tomaron como sustrato los soportes a evaluar, midiendo la actividad enzimática mediante la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico que define 1 unidad celulolítica como la cantidad de enzima capaz de liberar una micromol de glucosa por minuto por litro bajo las condiciones de ensayo [7].

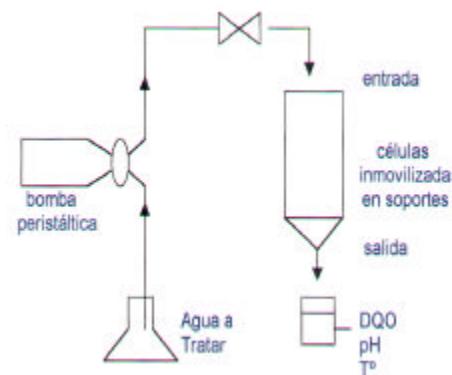


Fig. 1. Esquema del sistema semicontinuo utilizado para el biofiltro.

Medición de capacidad lipolítica. Se sembró por triplicado cada uno de los microorganismos en agar aceite de palma al 1 % (p/v) a 30 °C durante 24 h, y se observó el crecimiento y la formación de halo de hidrólisis [8].

Evaluación de los soportes para la inmovilización. Se evaluaron tres residuos agroindustriales para la inmovilización: Borra, cascarilla de café, película plateada como soportes por adsorción, utilizando como control carbón activado.

Ensayo de caracterización del soporte. De los soportes facilitados por Cenicafé (cascarilla de café, borra y película plateada) se seleccionó el soporte o la mezcla de estos que no fue degradado por los microorganismos; presentó mayor porcentaje de porosidad y un porcentaje de densidad que no permitió la compactación ni el desprendimiento de éstos y a su vez mostró mayor capacidad de retención celular y menor color.

Caracterización física del soporte. Se evaluaron características como densidad, porosidad y color para lo cual se lavó el soporte elegido pasando agua destilada estéril, con un flujo de 2.5 mL / min, empleando bomba peristáltica [9, 10]. Igualmente se midió la capacidad de retención celular; inoculando los microorganismos el caldo almidón y caseína al 1 % (p/v) pH 7.0 ± 0.2, con agitación de 180 rpm durante 17 horas. [4]. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrífugó por 10 min a 4 °C; las células fueron lavadas 3 veces con solución salina 0.85 % (p/v), igualando la concentración celular con el tubo 1 de Mc Farland (107 células / mL, absorbancia a 540 nm: 0.7). Posteriormente las células fueron resuspendidas en solución salina y se pasaron a través de unas columnas de vidrio de 50 cm de largo por 3.5 cm de diámetro, que contenían las mezclas de los diferentes soportes (borra 50 % y cascarilla 50 %), y el control con carbón activado. La recirculación del agua se hizo utilizando una bomba peristáltica con un flujo de 2.5 ml/min [9]. La evaluación del proceso se realizó tomando muestras cada 15 min, para verificar por absorbancia y recuento en placa las células retenidas; por un periodo de evaluación de 5 h.

Tabla 1. Tratamientos para la evaluación de biofiltros.

Tratamiento	Descripción
Control 1	Soporte (50 % borra-50% cascarilla de café) + agua salida reactor metanogénico sin inocular
Tratamiento 1a	Agua salida reactor metanogénico + biofiltro (50 % borra-50 % cascarilla de café + células inmovilizadas por adsorción)
Tratamiento 1b	Agua sintética + biofiltro (50 % borra-50 % cascarilla de café + células inmovilizadas por adsorción)
Control 2	Carbón activado + agua salida reactor metanogénico sin inocular
Tratamiento 2	Agua salida reactor metanogénico + biofiltro (carbón activado + células inmovilizadas por adsorción)
Tratamiento 3	Agua salida reactor metanogénico + Biofiltro (25 % borra-25 % cascarilla de café + 50 % carbón activado + células inmovilizadas)
Tratamiento 4	Agua sintética + biofiltro (25 % borra-25 % cascarilla de café+ 50 % carbón activado + células inmovilizadas por adsorción)

Remoción de materia orgánica en el efluente. Conociendo las características físicas del soporte y la retención celular, se procedió a realizar el mismo procedimiento de filtración mediante un sistema semi-continuo (Fig. 1), con el agua de salida del reactor metanogénico de la planta piloto de Cenicafé ubicada en Chinchiná y con agua sintética, con un contenido de DQO similar al del reactor metanogénico, según los tratamientos establecidos en la Tabla 1.

A cada uno de estos tratamientos se les midió pH, temperatura y DQO (HACH de 0 a 1500 ppm).

Diseño estadístico. Cada tratamiento se repitió tres veces y los resultados fueron evaluados mediante un diseño de bloques al azar con análisis de varianza y pruebas de Scheffe para determinar homogeneidad entre los grupos. Además se realizó una prueba de hipótesis para la proporción con el programa Stata.

Resultados y discusión

Actividad celulolítica. Según los resultados obtenidos, ninguno de los tres microorganismos evaluados presentaron actividad en las pruebas cualitativas ya que no se observó crecimiento, ni formación de halos de hidrólisis revelados con rojo congo sobre agar celulosa al 1 % (p/v) y de igual forma la actividad cuantitativa estadísticamente mostró datos por debajo de 19 UC / min / L, rango mínimo detectado por la técnica, lo que es considerado como actividad celulolítica negativa de acuerdo con los trabajos publicados en Colombia con respecto a actividad celulolítica con microorganismos termófilos [10]. Los anteriores resultados demuestran que los microorganismos no producen celulasas extracelulares y son incapaces de degradar los soportes para obtener a partir de ellos fuentes de carbono y energía.

Actividad lipolítica. Con respecto a la actividad lipolítica, los microorganismos no producen lipasa extracelulares ya que no se observó crecimiento sobre medio utilizado, simultáneamente las tres cepas fueron cultivadas en agar tributirina medio específico para lipolíticos y el crecimiento fue negativo. Generando una gran ventaja para este estudio, puesto que la borra contiene hasta un 34 % de grasa y podría ser utilizada por los microorganismos como fuente de carbono [11].

Selección del soporte. Cada uno de los soportes y sus respectivas mezclas fue evaluado basándose en tres características, absorbancia a la salida del efluente, debido a que si ésta es muy alta, producirá gran cantidad de color, propiciando contaminación al cuerpo de agua; densidad, la cual no puede ser ni muy baja ni muy alta ya que en las dos situaciones puede generar fallas en la eficiencia del filtro por que los soportes se pueden desprender o compactar generando zonas con gradientes de oxígeno disuelto [8] y porcentaje de porosidad elevado ya que éste es directamente proporcional a la cantidad de microorganismos que se puedan adherir, si hay una gran área superficial mayor será la retención y la difusión de oxígeno en el filtro.

Al medir la absorbancia, del líquido pasado por el biofiltro, estadísticamente la borra sin tamizar (0.096 DO) presentó la menor absorbancia pero a su vez el menos poroso (16.8 %), razón por la cual se descartó. Seguidamente la película plateada sin tamizar presentó una absorbancia baja, pero al igual que el anterior, presentó una porosidad muy baja frente a los otros soportes (17.5 %). En tercer lugar la mezcla borra 50 %-Cascarilla 50 %, tamiz 10, fue tomada en cuenta como posible soporte por presentar una buena porosidad (32.2 %) y una densidad media (0.33 DO). Los demás soportes no fueron tomados en cuenta por presentar absorbancias muy altas en el efluente, determinando que son soportes que arrojan color, característica física indeseable en el tratamiento de aguas residuales contemplada dentro de la legislación Colombiana [12].

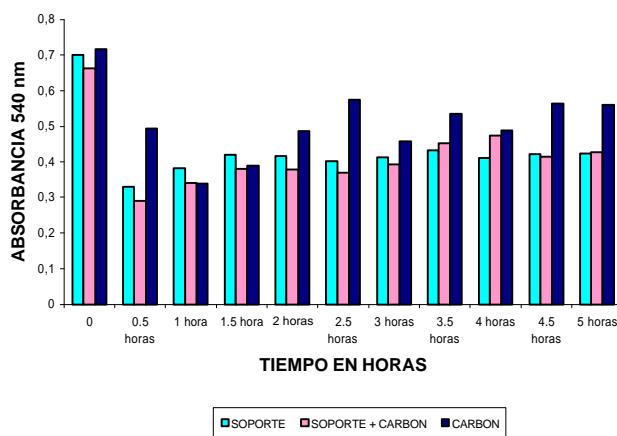


Fig. 2. Resultados de absorbancia retención celular en los tratamientos.

En cuanto a la densidad, el soporte estadísticamente con menor resultado fue cascarilla y película plateada (tamiz 10) (0.10 g/cc), pero con una absorbancia muy alta en el efluente (0.343 DO), por ello se descartó del estudio. La cascarilla (tamiz 10) mostró una densidad baja (0.12 g/cc), una absorbancia alta (0.233 DO) y una porosidad baja (27.3 %) con respecto a otros soportes. En referencia a película plateada, fue un soporte que presentó grandes problemas por compactación y desprendimiento del soporte, situación que también se presentó en las mezclas que contenían este soporte y por ello se descartaron. La mezcla borra 50 %-cascarilla 50 % (tamiz 10), presentó una densidad promedio, una porosidad aceptable y una absorbancia baja, razón por la cual fue tenida en cuenta como posible soporte.

En relación con el porcentaje de porosidad se encontró estadísticamente que la mezcla borra 50 %-cascarilla 50 % (tamiz 10), fue una de las mejores (32.2%); la cual fue seleccionada como el soporte para la inmovilización. El control (carbón activado), fue seleccionado por ser un soporte para inmovilizar por adsorción y además por sus características sortivas [13].

Lavado de soporte para la remoción de color. El soporte (cascarilla 50 %, borra 50 %) se sometió a un lavado de nueve horas debido a que la presencia de taninos (aproximadamente 40 %), incrementa el color (0.175 DO) en el efluente final (11); por su parte, la mezcla (soporte 50 % y, carbón activado 50 %) fue sometida a un lavado de 2 horas ya que arrojaron una absorbancia menor (0.162 DO), al igual que con el carbón activado (0.219 DO). La utilización de carbón activado en mezcla con los subproductos borra y cascarilla, permite la remoción de color (0.020 DO) debido a su capacidad absortiva [14].

Retención celular. La determinación de la retención celular se realizó por adsorción lavando las células con solución salina (0.8 5% p/v) para eliminar el exceso de sustrato que no fue empleado por los microorganismos para la producción de bio-

masa y enzimas en la fase logarítmica y evitando un incremento en DQO adicional a la carga inicial del afluente.

Posteriormente se midió el tiempo de retención de células bacterianas por parte del soporte, del carbón activado y de la mezcla de éstos, empacados en columnas de inmovilización de 50 cm de largo por 3.5 cm de diámetro, evaluando tiempos de 0 hasta 5 horas [8].

Se determinó el número de microorganismos no retenidos, mediante densidad óptica y recuento en placa, practicando al filtrado recolectado y expresado en UFC / mL; se observó que a la media hora tanto la absorbancia como el recuento fueron bajas (Figs. 2 y 3), esto debido a que el soporte fue sometido a un lavado previo en donde quedaron residuos de agua que contribuyeron a la disminución de dichos parámetros, actuando como un agente de dilución; a su vez el flujo fue bajo y por ende los microorganismos tardaron aproximadamente una hora en colonizar todo el soporte, por eso antes de este tiempo no se puede garantizar la adhesión. Sin embargo, es importante tener en cuenta que luego de este tiempo el sistema aumentó en recuento y absorbancia, por lo que se tomaron 2 h y media como tiempo ideal para lograr la mayor retención celular. En el control (carbón activado) el tiempo de retención bacteriana fue de tres horas (Tabla 2). Es importante destacar que todo este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente y pH de 7.0.

Evaluación de la capacidad de remoción. El tratamiento 1a, (Tabla 1) presentó una remoción del 70 % de materia orgánica comparada con el tratamiento 2 (97.3 %), y 4 (83.1 %); debido a que el soporte sin inmovilizar arrojó un porcentaje de materia orgánica fuera del rango, mostrando así que no es buen soporte para el biofiltro, no permitiendo la remoción de materia orgánica. Además por la composición de taninos del soporte luego de ser sometido a un lavado, arrojó pequeñas cantidades de color, ocasionando así la contaminación del efluente.

Con respecto a la capacidad de remoción de materia orgánica, se encontró que estadísticamente los tratamientos que

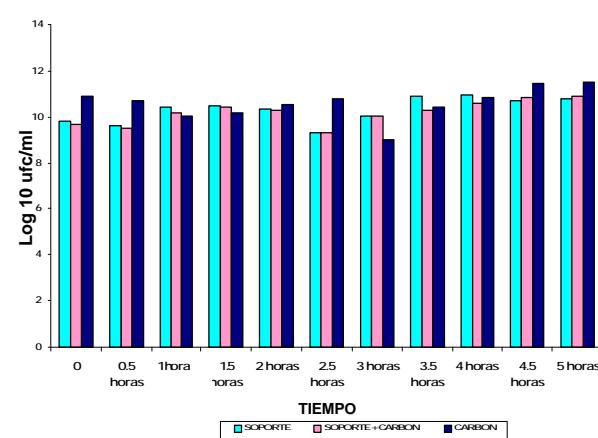


Fig. 3. Resultados de recuento en retención celular.

contenían carbón y también sus mezclas [2-4], fueron los mejores, alcanzando un porcentaje de remoción entre 88 y 100 %. Sin embargo, la utilización de carbón activado sólo incrementa los costos en el tratamiento, razón por la cual se optó por utilizar la mezcla de carbón activado 50 %, cascarilla y borra 50 %.

Este soporte mixto permitió el uso y aprovechamiento de subproductos del beneficio húmedo del café y el lavado previo del filtro disminuyó de nueve a dos horas y media el proceso de alistamiento. Es por esto que el tratamiento 3 (microorganismos inmovilizados, agua del reactor metanogénico, carbón 50 %, cascarilla 25 % y borra 25 %) fue seleccionado como el mejor tratamiento del presente estudio.

Otro parámetro que se tuvo en cuenta para evaluar la remoción de materia orgánica por parte de las bacterias inmovilizadas fue el uso de agua residual sintética con una DQO similar a la del reactor metanogénico [15]; esta evaluación se realizó para tener en cuenta los microorganismos acompañantes presentes en el agua del reactor, que prodrían potencializar el porcentaje de remoción de materia orgánica. Sin embargo, al observar los resultados se presentó una remoción del 20 % en agua sintética, comparada con el agua de salida del reactor metanogénico (70 %), (Fig. 4) esto posiblemente debido a que los microorganismos que se encuentran en dicha agua hacen una relación de sinergismo o cometabolismo frente a las bacterias inmovilizadas, propiciando así un incremento en la remoción de dichos nutrientes.

De esta manera se sugiere que los microorganismos inmovilizados presentaron actividad degradadora, la cual se mejoró con la presencia de las bacterias del agua metanogénica, y a su vez fue más eficiente la remoción al adicionar carbón activado al proceso.

Al comparar los tratamientos se observó que a las 36 h se presentó la mayor cantidad de remoción de materia orgánica y a las 48 h la remoción se redujo (Fig. 4), puesto que la cantidad de oxígeno presente en el filtro disminuye con el paso del tiempo provocando anaerobiosis y por ende disminución tanto en la carga microbiana como en la actividad enzimática [16, 17].

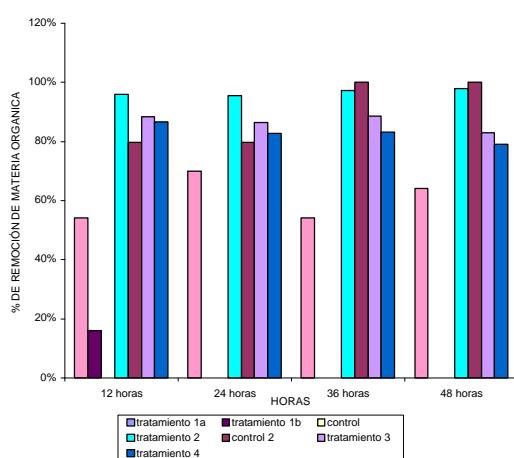


Fig. 4. Porcentaje de remoción de materia orgánica.

Tabla 2. Retención celular.

Soporte	Tiempo (h)	Densidad-óptica 540 nm	Recuento UFC / mL
Borra 50 % - cascarilla 50 %	2.5	0.401	80×10^8
Carbón activado	3	0.457	10×10^8
Mezcla borra 25 % cascarilla 25 % y carbón activado 50 %	3.5	0.369	80×10^7

El pH y la temperatura fueron estables en el momento de la degradación de la materia orgánica, y como se observó estadísticamente, no presentaron cambios significativos en el transcurso del tiempo; mostrando que la actividad enzimática y la degradación no se vieron alteradas por ninguno de los dos factores.

Conclusiones

Se recuperaron tres cepas correspondientes a *Bacillus megatherium*, *Bacillus licheniformis* y *Brevibacterium* sp.

Las bacterias utilizadas no presentaron actividad celulolítica significativa ya que los resultados estuvieron por debajo de 19 UC/min/l valor mínimo detectado por la técnica y además no se evidenció crecimiento. Evitando que los microorganismos utilicen los soportes como fuentes de carbono.

Los microorganismos inmovilizados en el biofiltro no presentaron actividad lipolítica lo que garantizan que no tomaron los soporte como fuente de carbono y nitrógeno.

La mezcla de carbón activado 50 %, borra 25 % y cascarilla 25 %, fue seleccionado como el mejor soporte para inmovilización dadas las características adsorptivas de densidad, porosidad, retención celular y eliminación de color.

Los microorganismos inmovilizados presentaron capacidad para degradar materia orgánica la cual se mejoró con la presencia de las bacterias que salen del reactor metanogénico, y a su vez fue más eficiente la remoción al utilizar como parte del soporte carbón activado, el cual mostró mayor remoción de materia orgánica (88.6 %) a las 36 h. Con respecto al valor obtenido pos tratamiento anaeróbico.

Agradecimientos

A Colciencias, Cenicafé-Laboratorio de Biodigestión Anaeróbica, Chinchíná-Caldas y al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Referencias

1. Matuk, V. El impacto biológico de las aguas residuales del lavado del beneficio húmedo del café tratado anaeróbicamente. Edición de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. **1998**.
2. Zambrano, D., en: *Manual de Cenicafé*, Vol 1. Centro Nacional del Café, Chinchina, **1999**, 54-56.
3. Rodríguez, V. Centro Nacional de Investigaciones del café. *Informe Anual de la Disciplina de Química Industrial*. Chinchiná, Colombia. **1998**, 95.
4. Dharmsthit, S.; Kuhasuntisuk, B. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 21, 75-80.
5. Reyes, C.; Barrera, R.; Martínez, M.; Pedroza, A. *Distritalia*. **2000**, 2, 1: 69-82.
6. Páez, A., Castro, D., Martínez, M., Pedroza, A. *Asocolflores*. **2001**, 60, 34-40.
7. Miller, G. *Anal Chem.* **1959**, 31, 426-428.
8. Pedroza, A., Poutou, R., Álvarez, N. *Universitas Scientiarum*. **1997**, 2, 130-134.
9. Martínez, M.; Torres, R. *Mundo Microbiológico*. **2002**, 1, 3-13.
10. Shaolin, C.; Wilson, D. *Appl and Env. Microbiol.* **1997**, 63, 2442-2445.
11. Páez, A.; Castro, D.; Martínez, M.; Pedroza, A. *Agricultura de las Américas*. **2001**, 301, 25- 30.
12. García, P., en: *Aprovechamiento de los subproductos de la industria del café*, Vol 2. Universidad Nacional de Caldas. **1997**, 3-67.
13. Ministerio de Salud de Colombia. *Decreto 1594 para el tratamiento de aguas residuales*. **1984**.
14. Dictor, M.; Brunet, B. *Env Poll.* **1997**, 9, 287-294.
15. Hang, D. *J. Food Sci.* **1995**, 44, 246-250.
16. Orozco, A.; Giraldo, E. *Centro de estudios e investigaciones de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes*. **1998**, 2-63.
17. Mogollón, L.; Rodríguez, W. *Ecopetrol*. **1996**, 123-157.