



Efecto de la concentración de inóculo de un consorcio bacteriano nativo en la degradación de los nitratos de vinaza de una destilería de alcohol

Effect of inoculum concentration of a native bacterial consortium on the degradation of vinasse nitrates from an alcohol distillery

Susana Jáuregui*; Heber Robles

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de inóculo de un consorcio bacteriano nativo para la degradación de los nitratos (NO₃-N) en la vinaza. El consorcio bacteriano fue analizado en cuanto a la morfología macroscópica y por observaciones microscópicas y luego inoculado en biorreactores aeróbicos de recirculación con flujo ascendente que contenían vinaza. La vinaza tratada con el inóculo y un control fueron evaluados en función de su pH, DBO, contenido de nitratos, nitritos, nitrógeno y nitrógeno amoniacal. El pH no varió significativamente y se mantuvo cercano al neutro. Una reducción significativa de la DBO (hasta 47,67%) y el contenido de nitratos (hasta 8,66 mg/L) se encontró en este trabajo. Un alto contenido de nitrógeno, como resultado de la degradación de los nitratos se encontró. La vinaza tratada en esta investigación puede ayudar a mitigar la contaminación producida por este residuo y además permitiría enriquecer el suelo de cultivo.

Palabras clave: vinaza; consorcio bacteriano nativo; nitratos; contaminación.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the inoculum concentration of a native bacterial consortium for the degradation of nitrates (NO₃-N) in the vinasse. The bacterial consortium was analyzed in terms of macroscopic morphology and microscopic observations and then inoculated in recirculating aerobic bioreactors with upflow containing vinasse. The vinasse treated with the inoculum and a control were evaluated according to their pH, BOD, content of nitrates, nitrites, nitrogen and ammoniacal nitrogen. The pH did not vary significantly and remained close to neutral. A significant reduction in BOD (up to 47.67%) and nitrate content (up to 8.66 mg / L) was found in this work. A high nitrogen content, as a result of the degradation of nitrates was found. The vinasse treated in this research can help mitigate the pollution produced by this waste and also allow the enrichment of the soil.

Keywords: vinasse; native bacterial consortium; nitrates; pollution.

1. Introducción

En la actualidad, temas como el calentamiento global, el cambio climático, la reducción de la capa de ozono, la contaminación por residuos, la desertificación y la escasez de agua adquieren un mayor interés en el campo de la investigación (Ferrer et al., 2008).

Una de las actividades agrícolas más representativas del mundo y del Perú es la producción de caña de azúcar. Los subproductos de la caña de azúcar son el bagazo, la cachaza es un residuo que se obtiene en el proceso de clarificación de los jugos de caña de azúcar, y las melazas o mieles finales, que suelen ser definidas como los residuos

de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Es un líquido denso y viscoso de color oscuro, producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar (Helfgott, 2011).

La industria alcoholera es parte de la industrialización de la caña de azúcar debido a que se utiliza como materia prima las melaza o mieles finales, la que incluye el proceso de fermentación alcohólica en tres etapas importantes, el cual recircula la levadura, limita el crecimiento celular y maximiza la producción de alcohol, a la vez que logra disminuir los tiempos de fermentación debido a la alta densidad celular en el fermentador. Esta

actividad genera un subproducto en grandes cantidades llamado vinaza, aproximadamente el 13 - 15 L vinaza / L de etanol, en promedio (Salomon y Silva Lora, 2009).

La vinaza es un efluente ácido de composición variable que presenta riesgo de contaminación del medio ambiente, principalmente debido a su alta concentración de materia orgánica recalcitrante (Colin et al., 2016). Constituyen un líquido de color oscuro, que puede variar desde carmelita hasta casi negro, de olor fuerte, temperatura cercana a 100 °C y pH medianamente ácido. La demanda química de oxígeno (DQO) de la vinaza se ha estimado entre 50 y 150 g L⁻¹, mientras que su demanda biológica de oxígeno (DBO) es de aproximadamente 30 - 70% de la DQO (Pant y Adholeya, 2007). Están compuestas por un 93% de agua, 2% de compuestos inorgánicos (potasio, calcio, sulfatos, nitratos, nitritos, cloruros, nitrógeno, fósforo, plomo, cadmio, cromo, etc.) y un 5% de compuestos orgánicos que se volatilizan al ser calentados a 65 °C; por todo aquello se considera un residuo líquido muy agresivo que provoca serios problemas ambientales en los recursos hídricos donde se descarga (Pérez y Garrido, 2006).

Una característica típica de la vinaza es una alta concentración de potasio, que la hace particularmente atractiva como una enmienda del suelo o fertilizante (Prado et al., 2013). Por ello, una opción adecuada para el manejo de las vinazas es el fertirriego; el cual consiste en verter la vinaza diluida directamente en el suelo (Pérez y Garrido, 2006). La utilización de la vinaza en el fertirriego incrementa la productividad de la caña de azúcar (Nunes et al., 2012).

Vásquez (2013) evaluó el efecto de la adición de vinaza sobre el contenido de potasio intercambiable en el suelo agrícola, logrando que la aplicación de la vinaza incremente en forma significativa el contenido de potasio intercambiable a la profundidad de 0 - 20 cm. No obstante, existen restricciones prácticas y legales sobre el contenido de potasio y otros elementos contenidos en el medio de irrigación para los suelos agrícolas, y a menudo la vinaza excede dichas normas (Da Silva et al., 2013). La presencia de una variedad de metales pesados en la vinaza también ha limitado su uso agrícola debido al efecto negativo sobre el suelo (España-Gamboa et al., 2011). De hecho, en algunos países las legislaciones ambientales, por ejemplo, la U.S. EPA (2010) prohíbe la disposición inadecuada de la vinaza en ríos, lagos, océanos y suelos sin un tratamiento de acondicionamiento previo.

En el Perú, el empleo actual que se le da a las vinazas en ciertas zonas azucareras es de aplicación directa sobre los terrenos de cultivo o es

vertida directamente a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento previo (Vásquez, 2013). En la gran mayoría de las destilerías de alcohol, el único tratamiento utilizado para las vinazas es la corrección del pH en torno a 7, con el empleo de agua de pozo o ríos, incorporándola a los efluentes para disminuir la concentración de los factores contaminantes y que se encuentren por debajo de los niveles máximos permitidos por las entidades nacionales (Prodanov y Cobo, 2004; Belhadj et al., 2013).

Uno de los elementos poco estudiados y de considerable presencia en las vinazas son los nitratos (NO₃-N). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) (WHO, 2006), el nitrato es uno de los pocos productos químicos encontrados en el agua potable que causan problema de salud muy rápido. Los principales peligros para la salud de beber agua con nitratos se producen cuando el nitrato se transforma a nitrito en el sistema digestivo. La metahemoglobina se forma cuando el nitrito oxida el hierro ferroso en la hemoglobina a la forma férrica y no puede unirse al oxígeno que conduce a la condición conocida como metahemoglobinemia o síndrome del bebé azul (WHO, 1985).

Además, los nitratos altamente solubles no son retenidos por las cargas negativas de los coloides del suelo, más teniendo en cuenta el bajo poder de adsorción que presenta la mayoría de los suelos para las partículas cargadas negativamente, en consecuencia, se estarían desplazando libremente con el agua de drenaje, a través del perfil del suelo, hacia los acuíferos (Carpenter et al., 2011).

El nitrato debe ser transportado por debajo de la interfaz de redox, que delimita la transición de óxido a condiciones anóxicas, con el agua subterránea que fluye a fin de que la reducción se produzca. La cantidad de reducción de nitratos en aguas subterráneas en una cuenca depende, por lo tanto, de la profundidad de la interfaz de redox y de los patrones de flujo del agua subterránea. El potencial de reducción de nitrato natural, por lo tanto, a menudo es muy variable incluso dentro de pequeñas áreas, debido a la gran heterogeneidad de la superficie inferior. Esto conduce a la existencia de dos áreas vulnerables: (1) donde la lixiviación de nitrato alcanza el agua de la superficie con una reducción muy pequeña, y (2) las áreas sólidas donde se reduce casi todo el nitrato lixiviado (Jacobsen y Hansen, 2016).

La adsorción a través del mecanismo de intercambio iónico es un método eficiente para la eliminación de nitrato, además el adsorbente puede regenerarse y reutilizarse (Sowmya y Meenakshi, 2013a); sin embargo, éstas son muy costosas. Las resinas poliméricas con grupos funcionales de la

matriz de poliestireno-divinilbenceno y cloruro de amonio cuaternario se utilizan ampliamente para la eliminación de nitrato; no obstante, ellas solo retiran el nitrato, no lo degradan (Chabani et al., 2007; Milmile et al., 2011; Dron y Dodi, 2011; Sowmya y Meenakshi, 2013b). Además, la eliminación selectiva del nitrato en presencia de aniones comunes, como el sulfato y cloruro es una de las principales preocupaciones ambientales (Sowmya y Meenakshi, 2013a).

Los métodos microbiológicos para reducir el nitrato vienen siendo probados como sustitutos a las resinas. El nitrato (NO_3^-) se puede transformar de forma natural a N_2 por un proceso de reducción microbiana mediada en condiciones anóxicas (Appelo y Postma, 2005). Esta tarea puede ser realizada mediante consorcio de microorganismos, los cuales son utilizados en los procesos de biorremediación. Existen más de 50 géneros de bacterias que están distribuidas ampliamente en ecosistemas acuáticos y terrestres, como *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Thiosphaera*, entre otros, que pueden llevar a cabo la desnitrificación, que implica la transformación biológica paso a paso del nitrato (NO_3^-) al nitrito (NO_2^-), al óxido nítrico (NO), al óxido nitroso (NO) y al nitrógeno (N_2) mediante las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa, respectivamente. Éstos son compuestos gaseosos y no son fácilmente accesibles para el crecimiento microbiano; por ello, se liberan normalmente en la atmósfera.

Además, debido a la adición de ácido sulfúrico y sulfato de amonio en la fabricación de etanol, la vinaza es un sustrato líquido rico en sulfato para la digestión anaeróbica (Barrera et al., 2016), que permite la recuperación de parte de su contenido de energía debido a la producción de biogás (Días et al., 2016).

El desnitrificador típico es un anaerobio facultativo que preferentemente utiliza O_2 como aceptor de electrones y restringe el flujo de electrones hacia N -óxidos siempre que O_2 está disponible (Bergaust et al., 2011). Sin embargo, los estudios sobre desnitrificadores modelo han demostrado que las diferentes etapas de la ruta pueden ser diferencialmente controlados por O_2 , y la razón por la que O_2 detiene el proceso puede ser tanto por limitaciones químicas como por las necesidades fisiológicas (Martínez-Espinosa et al., 2011; Shapleigh, 2011; Bateman y Baggs, 2005). Por ejemplo, la reacción química rápida de NO con el O_2 se puede deber a que la producción y la reducción de NO es la parte de la vía más estrechamente regulado en presencia de O_2 (Bergaust et al., 2008; Hartsock y Shapleigh, 2010;

Watmough et al., 1999). Por el contrario, el nitrato y nitrito no reaccionan fácilmente con O_2 , y por lo tanto la reducción de nitrato a nitrito se ajusta a las mejores necesidades fisiológicas (Dalsgaard et al., 2014; Hartsock y Shapleigh, 2011; Martínez-Espinosa et al., 2011).

Sandoval (2013) evaluó la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) en vinazas mediante tratamiento biológico utilizando un biorreactor anaerobio de lecho fijo, obteniendo eficiencias de remoción de DQO en el intervalo de 20 a 32% al operarse en sistema por lote y de 15 a 21% en sistema continuo; la columna de burbujeo (biorreactor aerobio) presentó eficiencias de remoción en el intervalo de 49 a 55% en sistema por lote y de 8 a 12% en sistema continuo; y de los sistemas probados, la eficiencia mayor de remoción de DQO en las vinazas se obtuvo en la columna de burbujeo en cultivo por lote inoculada con un consorcio de microorganismos provenientes de la mezcla de las fuentes naturales: cubas de almacenamiento de vinazas, vinazas diluidas con agua proveniente de la limpieza de equipos y suelo cercano al lugar donde se vierten las vinazas diluidas.

Benavides et al. (2006) aisló e identificó diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla. Esta investigación demuestra que los microorganismos aislados tienen capacidad desnitrificante in vitro, transformando el nitrato a nitrógeno molecular, permitiendo un mejor aprovechamiento de este compuesto.

Es evidente entonces, que existe la necesidad de tratar el efluente residual "vinaza" utilizando microorganismos para degradar los nitratos de la vinaza, con el único afán de contribuir en el manejo de éste tipo de efluente residual y así coadyuvar bases para cumplir con el valor establecido (máximo 100 mg/L) de concentración de nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$), para el riego de vegetales de tallo bajo y tallo alto, según los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para agua (Aprobado el 7 junio del 2017).

El objetivo general se centró en evaluar el efecto de la concentración de inóculo de un consorcio bacteriano nativo para la degradación de los nitratos ($\text{NO}_3\text{-N}$) en la "vinaza" de una destilería de alcohol.

2. Material y métodos

2.1 Materiales

Se utilizaron 15 litros del efluente residual vinaza y 500 g de lodo de vinaza de una destilería de alcohol (Ascope, La Libertad, Perú). Esta recolección se

realizó en coordinación con el personal de control de calidad de la destilería.

Se aisló un consorcio bacteriano nativo del lodo del efluente residual vinaza. Para determinar el crecimiento de bacterias desnitrificadoras se utilizó Agar nitrato; y para demostrar la reducción de nitratos por bacterias integrantes del consorcio bacteriano nativo se utilizó Caldo nitrato. Para el mantenimiento del consorcio bacteriano aislado se utilizó Agar nutritivo (AN), y para la preparación del inóculo se utilizó Caldo Soya tripticasa. Para la identificación de las bacterias del consorcio nativo se utilizó Gram y se usó reactivo de GRIESS-ILOSVAY y Zinc en polvo, para la identificación de microorganismos reductores de nitrato. Todos los agares y reactivos utilizados en esta investigación fueron adquiridos de Merck (Alemania).

2.2 Métodos

2.2.1 Diseño de la investigación

Se utilizó un diseño experimental de estímulo creciente que permitió evaluar la degradación de los Nitratos (NO₃-N) de la vinaza por un consorcio de microorganismos nativos. La variable independiente será la concentración de un consorcio bacteriano nativo y la variable dependiente será la degradación de los nitratos (NO₃-N) de la vinaza.

2.2.2 Diseño y construcción del biorreactor

Se diseñó cinco biorreactores aeróbicos de recirculación con flujo ascendente (Figura 1), con válvulas para muestreo y entradas de tubos para recirculación, de 1,5 litros de capacidad con un volumen de trabajo de 1 litro. El material utilizado fue botellas de vidrio las cuales se cortaron según las dimensiones requeridas; una vez construidos los biorreactores fueron evaluados durante 24 horas para realizar cualquier corrección en el diseño y construcción de los biorreactores (Miranda et al., 2006).



Figura 1. Biorreactores.

2.2.3 Recolección y transporte de la muestra

Las muestras del efluente residual vinaza y lodo de vinaza de una destilería, fueron recolectadas de forma puntual (puntos de flujo continuo y almacenamiento). Primero se tomaron 500 g de lodo de vinaza en bolsas plásticas herméticas de primer uso, las que fueron transportadas inmediatamente al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Trujillo y fueron procesadas en un tiempo no mayor a cuatro horas desde la recolección de la muestra; posteriormente se tomarán 15 Litros de vinaza, para lo cual se empleó (02) baldes de 10 Litros, fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo y puestos en el sistema de tratamiento.

2.2.4 Análisis previo de la muestra

Obtenida la muestra del lodo de vinaza se realizó diluciones y siembras con el fin de aislar las bacterias nativas que luego fueron identificadas; en cuanto al efluente residual vinaza, parte de la muestra obtenida, fue enviada a un laboratorio certificado, para la determinación de DBO, Nitratos (NO₃-N), Nitritos (NO₂-N), Nitrógeno Amoniacal (NH₃-), Nitrógeno (N₂) y pH.

2.2.5 Aislamiento e identificación del consorcio bacteriano nativo

Homogenizado del lodo de vinaza

Se tamizó el lodo de vinaza y se pesó de la muestra tamizada 25 gramos en un matraz estéril. Luego se agregó 225 ml de solución salina fisiológica (0,85%) estéril. Se mezcló a 120 rpm, por 30 minutos a temperatura ambiente (27 °C).

Siembra del homogenizado del lodo de vinaza

A partir del homogenizado se realizó siembra por estría en placas con Agar nutritivo.

Una vez inoculado el medio de cultivo se llevó las placas de petri a incubarse a 30 °C durante 48-96 horas, en condiciones de aerobiosis, para obtener crecimiento de colonias.

2.2.6 Caracterización del Consorcio Bacteriano Nativo

A partir del crecimiento de colonias que se obtuvieron de las placas de petri, se realizó resiembra por estría en medio de cultivo Agar Nutritivo a 30 °C durante 48 horas, en condiciones de aerobiosis, hasta obtener cepas puras.

Los microorganismos aislados (cepas puras) se clasificaron según criterios fenotípicos, teniendo en cuenta la morfología macroscópica de las

colonias, la morfología microscópica y por características de tinción Gram.

Morfología macroscópica

Las colonias de las cepas puras sembradas en Agar Nitrato, posterior al periodo de incubación, fueron evaluadas y seleccionadas mediante un examen visual, según su forma (puntiforme, circular, rizoide, irregular y filamentosa); aspecto del borde (entero, ondulado, lobulado, filamentoso); su elevación (plana, elevada, convexa, crateriforme, acuminada); por su superficie (lisa o rugosa, mate o brillante, seca o cremosa e invasiva o superficial); por su tamaño (colonias muy diminutas hasta un diámetro de varios milímetros) y Pigmentación (colonias rojas, anaranjadas, amarillas, etc.) (Koneman et al., 2004).

Observaciones microscópicas

Para realizar la observación microscópica del consorcio bacteriano nativo, se prepararon láminas con tinción Gram de acuerdo con Koneman et al. 2004; y éstas preparaciones se observaron al microscopio con el objetivo de 100x usando aceite de inmersión, pudiéndose así determinar la morfología de las bacterias; ya que existen cuatro morfologías básicas: células esféricas o cocos, células con forma de bastón o bacilos, células con forma de espiral o espirilos y células con forma de coma llamadas vibriones; además se evaluará la disposición de las células que pueden ser cocos en pares (diplococos), en cadenas (estreptococos) o en racimos (estafilococos), bacilos cortos (cocobacilares), bacilos con alguno de sus extremos ensanchado (corineforme), entre otras disposiciones (Holt, 2000).

Degradación de nitratos por el consorcio bacteriano nativo

Se sembró en 10 mL de caldo nitrato cada colonia de las cepas puras y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Se agregó varias gotas del reactivo de GRIESS-ILOSVAY de los nitritos y se esperó aproximadamente 1 minuto. La aparición de una coloración roja, indicó que el nitrato presente en el medio de cultivo se degradó a nitritos. Se analizaron las muestras con resultados negativos tomándose 5 mL y un poco de Zinc en polvo (aproximadamente del tamaño de un grano de pimienta), se dejaron sedimentar sin agitación. La presencia de nitratos exhibe una coloración rosa alrededor del zinc después de 1-2 minutos, indicando que "no existió degradación de nitratos", mientras que la ausencia de coloración significa que "existió degradación completa del nitrato".

Se seleccionó y conservó las cepas puras que formarán parte del consorcio bacteriano nativo en Caldo Soya Trypticasa (TSB) con glicerol estéril en una proporción final de 15%, almacenados a -20°C.

2.2.7 Preparación del inóculo

Los cultivos fueron inoculados en Caldo Soya Trypticasa y se incubaron a temperatura 30 °C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo, cada cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se llevaron a cabo dos lavados de las células con Solución Salina Fisiológica (SSF). Luego se resuspendieron en SSF y se prepararon suspensiones similares al tubo N° 3 del Nefelómetro de Mac Farland, para alcanzar una densidad celular de 10⁹ cel/mL manteniendo las mismas proporciones para cada cultivo bacteriano.

2.2.8 Acondicionamiento de la vinaza en cada biorreactor

Los biorreactores fueron lavados con detergente, desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% y permanecieron en reposo durante 24 horas. Luego fueron enjuagados con ADE (Agua destilada Estéril), y expuestos a irradiación de luz ultravioleta a 20 cm de distancia durante 60 minutos.

Una vez armados y debidamente esterilizados, a cada biorreactor (4 en total) se adicionó inóculo en volúmenes de 50, 100, 150 y 200 mL respectivamente y se completó el volumen de trabajo a 1,0 litro con la vinaza para obtener concentraciones de inóculo de 5, 10, 15 y 20% v/v. Cada concentración se evaluó en 1 biorreactor, además del control al cual no se le adicionó el consorcio bacteriano nativo (Figura 2).



Figura 2. Acondicionamiento de biorreactores.

2.2.9 Monitoreo y evaluación del bioproceso

Se realizó (05) evaluaciones del proceso de degradación del consorcio bacteriano nativo sobre la vinaza con monitoreos hasta alrededor de los 30 días, de los cuales se tomaron muestras para los análisis de DBO, Nitratos (NO₃-N), Nitritos (NO₂-N), Nitrógeno Amoniacal (NH₃-), Nitrógeno (N₂) y pH, los que fueron ejecutados por el laboratorio certificado.

2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada sistema de tratamiento se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de tukey ($p < 0,05$), para determinar si existió diferencia significativa en la degradación de los nitratos, para lo cual se empleará el programa estadístico SPSS.

3. Resultados y discusión

3.1 Recolección y Análisis de la muestra "Vinaza"

En la Tabla 1 se muestra las características iniciales del efluente residual "vinaza" de la destilería de alcohol, ubicada en Ascope-Perú.

Los estándares de calidad ambiental (ECA) para el agua (Aprobado el 7 junio del 2017) establecen que para aguas utilizadas para riego de vegetales, los valores de DBO_5 sean menores 15 mg/L, el contenido de Nitratos + Nitritos sean menores de 100 mg/L, sin embargo no tiene un parámetro establecido para el contenido de nitrógeno y nitrógeno amoniacal; por otro lado establece un rango de pH entre 6,5 – 8,5, lo que está acorde con los valores de pH de las muestras recolectadas en este trabajo.

Los valores obtenidos demuestran que el efluente residual "vinaza" de la destilería de alcohol al mezclarse con el agua utilizada para el riego de vegetales puede ocasionar serios problemas ambientales, ya que sus características fisicoquímicas están por encima de los parámetros establecidos.

Tabla 1

Características de las muestras de vinaza recolectadas

Característica	Valores		
	Menor	Promedio	Mayor
pH	6,78	7,02	7,30
DBO_5 (mg O ₂ /L)	206,7	246,4	293,1
Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	147,3	169,8	190,4
Nitritos (mg NO ₂ ⁻ /L)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Nitrógeno (mg N/L)	591,0	671,1	730,2
Nitrógeno Amoniacal (mg NH ₄ ⁺ /L)	24,1	28,6	32,0

3.2 Identificación del consorcio bacteriano nativo

Los microorganismos fueron aislados del lodo de vinaza y sembrados en agar según la metodología propuesta en el apartado 2.2.6, y posteriormente fueron analizados respecto a su morfología macroscópica y mediante observaciones microscópicas.

La Figura 3 muestra que las bacterias aisladas tenían formas de cocos (2A y 2B) y formas de bacilos (2C y 2D). Las figuras 2A y 2B probablemente hacen referencia a bacterias como *Acinetobacter* sp., que tienen forma de cocos y que han sido aisladas de un reactor de columna de burbujas de aire que trataba las aguas residuales de las destilerías después de 6 meses de operación (Petruccioli et al., 2000).

En la figura 2C y 2D los microorganismos tienen forma de bacilos, por lo que probablemente sean de la especie *Bacillus* sp. Esta especie ha sido ampliamente reportada en distintos trabajos y es comúnmente usada para decolorar residuos de efluentes de la destilería; como *Bacillus smithii* (Kambe et al., 1999) y *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus brevis* y *Bacillus* sp. (Kumar y Chandra, 2006).

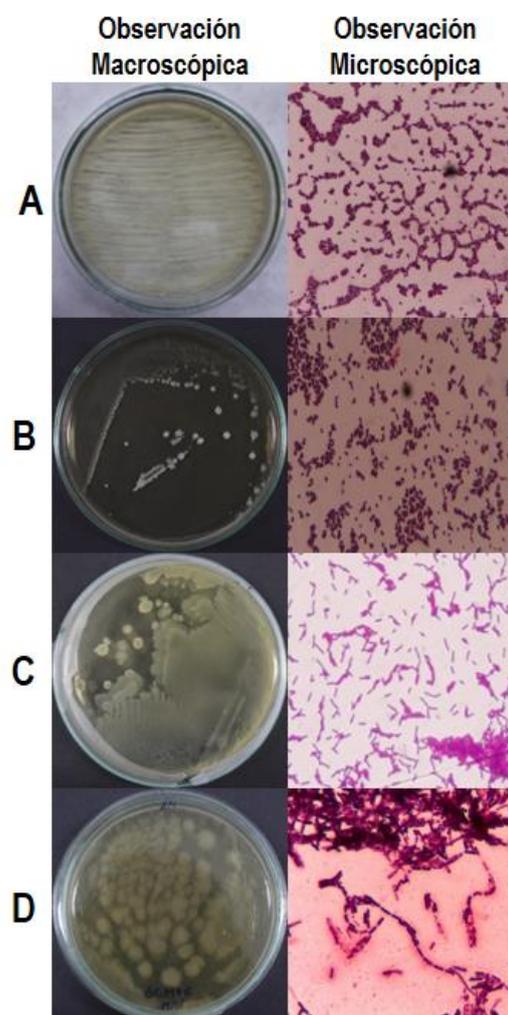


Figura 3. Bacterias nativas aisladas: (A) Bacteria LVM2B, (B) Bacteria SCM3A1, (C) Bacteria SCM5A1 y (D) Bacteria SCM5B.

No obstante, otras especies de microorganismos con forma de bacilo también se han encontrado en

biorreactores de columna de lecho fijo y móvil y en efluentes de destilería, tales como *Pseudomonas Fluorescens* (Dahiya et al., 2001), *Acetobacter acetii* (Sirianuntapiboon et al., 2004), *Pseudomonas putida* (Ghosh et al., 2002) y *Aeromonas* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium* sp., *F. meningosepticum*, *Pseudomonas* sp., *P. paucimobilis*, *P. vescicularis* (Petruccioli et al., 2000).

Los microorganismos antes mencionados han demostrado alta capacidad en la remoción de compuestos contaminantes en la vinaza, por lo que el aislamiento probablemente sea adecuado para la remoción de nitratos.

3.2 Evaluación del bioproceso

Los tratamientos microbianos que emplean cultivos bacterianos puros se han informado con frecuencia en años pasados y recientes.

Los nitritos contenidos en el efluente residual "vinaza" se mantuvieron constantes (valores < 0,01 mg/L), independientemente del contenido de inóculo en los biorreactores. Como el proceso de desnitrificación comienza desintegrando los nitratos a nitritos y posteriormente a nitrógeno (en sus formas de nitrógeno amoniacal y nitrógeno molecular), se puede inferir que el proceso realizado por los microorganismos ha sido eficiente, sin acumular productos intermedios (nitritos) durante el proceso de desnitrificación de los nitratos.

3.2.1 pH

Varios factores ambientales afectan la actividad de las poblaciones microbianas de aguas residuales y la tasa de reacciones bioquímicas. De particular importancia son la temperatura, el pH, los nutrientes y la inhibición de compuestos tóxicos. Debido a la naturaleza ácida de las vinazas, el pH es uno de los factores más relevantes que afectan la actividad microbiológica en el proceso biológico. El pH del agua residual de una destilería aumenta de 4,0 a 7,5 después de una digestión anaeróbica debido a la oxidación de los ácidos orgánicos a CO₂ y la reacción entre el CO₂ y los compuestos básicos para formar carbonatos y bicarbonatos (Beltran et al., 1999). El incremento en la concentración de inóculo no generó variaciones significativas ($p < 0,05$) en el pH de la vinaza (Figura 4). El rango de pH fue cercano al neutro, lo que indicaría que bioproceso no genera subproductos ácidos durante la degradación de los nitratos. Además, el pH se mantuvo en el rango establecido por los estándares de calidad ambiental

(ECA) para el agua (Aprobado el 7 junio del 2017), entre 6,5 y 8,5.

3.2.2 DBO₅

La DBO o Demanda Biológica de Oxígeno es la cantidad de oxígeno que necesitan los microorganismos para degradar la materia orgánica biodegradable existente en un efluente residual.

La DBO₅ de la vinaza disminuyó significativamente ($p < 0,05$) de 270 mg/L a 129 mg/L después del tratamiento microbiano, lo que significa que las sustancias biodegradables contenidas en la vinaza han sido degradadas por el consorcio bacteriano nativo, ya que la desnitrificación está relacionada directamente con la disminución de la DBO₅. Además, los resultados también indican que un incremento en la concentración del consorcio bacteriano nativo favorece una mayor reducción de la DBO₅ (Figura 4). En otras investigaciones como la de Zúñiga y Gandini (2013), se analizó DBO₅ en muestras de vinazas tomadas de diversas destilerías colombianas, encontrando valores entre 6.200 y 17.100 mg/L. Estos valores son bastante elevados en comparación con los reportados en esta investigación, incluso de la vinaza sin tratar, lo que puede deberse a condiciones del proceso de producción de etanol. No obstante, los autores indican que el método más eficaz para reducir el contenido de DBO₅ sería el método biológico y esto queda demostrado en esta investigación, donde una reducción significativa de la DBO₅ ha sido encontrada.

Se ha encontrado que, durante la etapa de remoción anaeróbica, se produce una eliminación de 80-90% de DBO y la energía bioquímica recuperada es del 85-90% como biogás (Pant y Adholeya, 2007). En este trabajo se encontró una reducción máxima de la DBO₅ de 47,67% cuando la concentración del inóculo del consorcio microbiano nativo fue del 20%.

En otros trabajos, para un tratamiento del sistema secuencial global (anaeróbico/aeróbico), las eficiencias de eliminación de DQO y DBO fueron del 99,5% y 98,1%, respectivamente, para el tratamiento de aguas residuales de whisky de malta (Uzal et al., 2003). Esto demuestra que la vinaza tratada puede servir como acondicionador del suelo y nutriente de plantas.

3.2.3 Nitratos

La figura 4 muestra que el contenido de nitratos disminuye significativamente ($p < 0,05$) de 171,7 mg/L (Control) a 8,66 mg/L (20% de inóculo). Esto indica que los microorganismos presentes en el

consorcio bacteriano nativo asimilan correctamente el nitrógeno contenido en las vinazas (Mutis, 2009). Zúñiga y Gandini (2013) encontraron un rango de nitratos entre 122 y 600 mg/L en diferentes vinazas obtenidas de destilerías colombianas. Los autores describen que las vinazas con menos contenido de nitrato fueron sometidas a un tratamiento, similar a lo usado en esta investigación.

Los estándares de calidad ambiental (ECA) para el agua (Aprobado el 7 junio del 2017) establecen que el contenido de Nitratos + Nitritos sean menores de 100 mg/L. Por lo tanto, el tratamiento biológico utilizado permite la obtención de una vinaza ajustada a los estándares establecidos, incluso usando un contenido de inóculo 5%.

3.2.4 Nitrógeno y Nitrógeno amoniacal

El contenido de nitrógeno varió significativamente ($p < 0,05$) de 595,7 mg/L en el control a 876,8 mg/L en la muestra con 20% de inóculo. Sin embargo, no

existió diferencia significativa cuando la concentración de inóculo era de 15% y 20%.

Para el nitrógeno amoniacal, existió una variación significativa con el incremento del inóculo en la vinaza (desde 21,3 a 44,12 mg/L).

El incremento en el contenido de nitrógeno y nitrógeno amoniacal reflejan que el proceso de degradación de los nitratos por el consorcio bacteriano nativo ha sido eficiente.

Zúñiga y Gandini (2013) encontraron en vinazas de destilerías colombianas una concentración de nitrógeno de 76 a 123 mg/L y para nitrógeno amoniacal de 92,5 a 149,5 mg/L. La concentración de nitrógeno fue superior en este trabajo, probablemente a que la vinaza fue tratada con un consorcio microbiano.

Este incremento en el contenido de nitrógeno y nitrógeno amoniacal resultan interesantes y eficientes para mejorar la calidad del suelo de cultivo, asegurando que no se contamine por la presencia de nitratos.

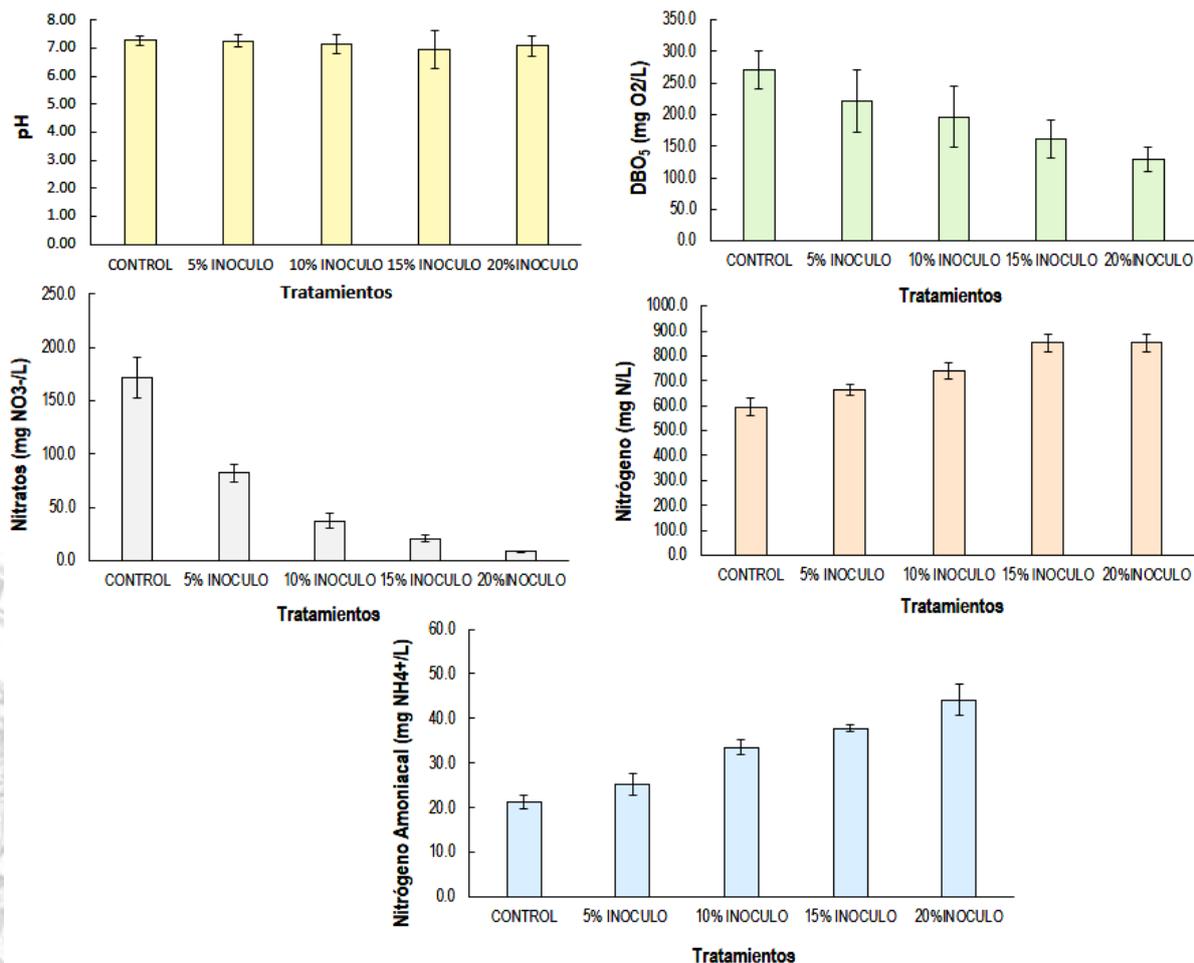


Figura 4. Evolución del bioproceso: pH, DBO₅, Nitratos, Nitrógeno y Nitrógeno Amoniacal.

4. Conclusiones

La contaminación generada por el efluente residual "vinaza" por ser vertido directamente a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento previo, resulta preocupante para el medio ambiente. Los microorganismos aislados de la vinaza podrían pertenecer al grupo de *bacillaceae* y *pseudomonas*, las cuales han sido ampliamente reportadas en otras investigaciones y que son capaces de tratar eficientemente la vinaza. Un incremento en la concentración de inóculo favorece la reducción de los nitratos y la DBO y el incremento del contenido de nitrógeno y nitrógeno amoniacal. Este trabajo presenta una alternativa menos costosa y eficiente para reducir los nitratos en la vinaza y generar una vinaza rica en nitrógeno que puede enriquecer el suelo de cultivo. Se recomienda estudiar el efecto del inóculo del consorcio microbiano en un biorreactor de lecho continuo.

Agradecimientos

Se agradece a todos los profesionales que brindaron su apoyo directamente o indirectamente en el desarrollo de esta investigación científica culminándose con el presente artículo científico.

Referencias bibliográficas

- Appelo, C.A.J.; Postma, D. 2005. Geochemistry, groundwater and pollution. 2da Edition. A. A. Balkema publishers, Leiden, the Netherlands.
- Barrera, E.I.; Rosa, E.; Spanjers, H.; Romero, O.; De Meester, S.; Dewulf, J. 2016. A comparative assessment of anaerobic digestion power plants as alternative to lagoons for vinasse treatment: life cycle assessment and exergy analysis. *Journal of Cleaner Production* 113: 459-471.
- Bateman, E.J.; Baggs, E.M. 2005. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and fertility of soils* 41(6): 379-388.
- Belhadj, S.; Karouach, F.; El Bari, H.; Joute, Y. 2013. The biogas production from mesophilic anaerobic digestion of vinasse. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 2319-2402
- Beltran, F.J.; Garcia-Araya, J.F.; Alvarez, P.M. 1999. Wine distillery wastewater degradation 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (ozone)-biological treatment *Journal of agricultural and Food Chemistry* 47: 3919-3924.
- Benavides, L.J.; Quintero, G.M.; Ostos, O.O.L. 2006. Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla en la laguna de tota, Boyacá, Colombia. *Nova* 4(6): 50-54.
- Bergaust, L.; Bakken, L.R.; Frostegård, Å. 2011. Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria. *Biochemical society transactions* 39(1): 207-212.
- Bergaust, L.; Shapleigh, J.; Frostegård, Å.; Bakken, L. 2008. Transcription and activities of nox reductases in agrobacterium tumefaciens: the influence of nitrate, nitrite and oxygen availability. *Environmental microbiology* 10(11): 3070-3081.
- Carpenter, S.R.; Caraco, N.E.; Correll, D.L.; Howarth, R.W.; Sharpley, A.N.; Smith, V.H. 2011. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological applications* 8: 558-568.
- Chabani, M.; Amrane, A.; Bensmaili, A. 2007. Kinetics of nitrates adsorption on amberlite ira 400 resin. *Desalination* 206: 560-567.
- Colin, V.L.; Juárez Cortes, Á.A.; Aparicio, J.D.; Amoroso, M.J. 2016. Potential application of a bioemulsifier-producing actinobacterium for treatment of vinasse. *Chemosphere* 144: 842-847.
- Dahiya, J.; Singh, D.; Nigam, P. 2001. Decolourisation of molasses wastewater by cells of pseudomonas fluorescens immobilized on porous cellulose carrier. *Bioresource Technology* 78: 111-114.
- Dalsgaard, T.; Stewart, F.J.; Thamdrup, B.; De Brabandere, L.; Revsbech, N.P.; Ulloa, O.; Canfield, D.E.; Delong, E.F. 2014. Oxygen at nanomolar levels reversibly suppresses process rates and gene expression in anammox and denitrification in the oxygen minimum zone off northern Chile. *mBio* 5(6): 1966-01914.
- Da Silva, M.A.S.; Kliemann, H.J.; De-Campos, A.B.; Madari, B.E.; Borges, J.D.; Gonçalves, J.M. 2013. Effects of vinasse irrigation on effluent ionic concentration in Brazilian oxisols. *African journal of agricultural* 8(45): 5663-5671.
- Dias, M. F.; Colturato, L. F.; De Oliveira, J. P.; Leite, L. R.; Oliveira, G.; Chemicharo, C. A.; De Araújo, J. C. 2016. Metagenomic analysis of a desulphurisation system used to treat biogas from vinasse methanisation. *Bioresource technology* 205: 58-66.
- Dron, J.; Dodi, A. 2011. Comparison of adsorption equilibrium models for the study of Cl⁻, NO₃⁻ and S₄O₂⁻ removal from aqueous solutions by an anionexchange resin. *Journal of hazardous materials* 190: 300-307.
- España-Gamboa, E.; Mijangos-Cortes, J.; Barahona-Perez, L.; Dominguez-Maldonado, J.; Hernández-Zarate, G.; Alzate-Gaviria, L. 2011. Vinasses: characterization and treatments. *Waste management & research* 29(12): 1235-1250.
- Ferrer, J.; Davalillo, Y.; Chandler, C. 2008. Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Repositorio de la University of Toronto 12(2): 56-63.
- Ghosh, M.; Ganguli, A.; Tripathi, A.K. 2002. Treatment of anaerobically digested distillery spentwash in a two-stage bioreactor using pseudomonas putida and aeromonas sp. *Process Biochemistry* 7: 857-862.
- Hartsock, A.; Shapleigh, J. P. 2010. Mechanisms of oxygen inhibition of nirK expression in rhodobacter sphaeroides. *Microbiology* 156(10): 3158-3165.
- Hartsock, A.; Shapleigh, J.P. 2011. Physiological roles for two periplasmic nitrate reductases in rhodobacter sphaeroides 2.4. 3 (atcc 17025). *Journal of Bacteriology* 193(23): 6483-6489.
- Helfgott, S. 2011. El cultivo de la caña de azúcar en la costa peruana. Editorial arte gráfica. Universidad nacional agraria la Molina. No. F01 H4. 1997. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=inperupe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008273>.
- Holt, J. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Editorial Lippincott and Wilkins eds. Philadelphia. pp.781.
- Jacobsen, B.H.; Hansen, A.L. 2016. Economic gains from targeted measures related to non-point pollution in agriculture based on detailed nitrate reduction maps. *Science of the total environment* 556: 264-275.
- Kambe, T.N.; Shimomura, M.; Nomura, N.; Chanpompong, T.; Nakahara, T. 1999. Decolourization of molasses wastewater by *Bacillus* sp. under thermophilic and anaerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 119-121.
- Kumar, P.; Chandra, R., 2006. Decolourisation and detoxification of synthetic molasses melanoidins by individual and mixed cultures of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology* 97: 2096-2102.

- Koneman, W.; Allen, D.; Janda, M.; Schreckenberger, C.; Winn, C. 2004. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 5ta edición. Editorial médica panamericana. argentina. pp 5-85.
- Martínez-Espinosa, R.M.; Cole, J.A.; Richardson, D.J.; Watmough, N.J. 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical society transactions* 39(1): 175-178.
- Milmlie, S.N.; Pande, J.V.; Karmakar, S.; Bansiwala, A.; Chakrabarti, T.; Biniwale, R.B. 2011. Equilibrium isotherm and kinetic modeling of the adsorption of nitrates by anion exchange indion NSSR resin. *Desalination* 276: 38-44.
- Miranda, H.; Robles-Castillo, H.; Villanueva-Alva V.; Rodríguez-Quezada V. 2006. Biorreactores. Diseño y Aplicaciones. Sociedad peruana de biotecnología. pp. 90.
- Mutis, D. 2009. Deslignificación de residuos de la caña de azúcar (hojas y cogollos) con procesos químicos. Tesis de grado-pregrado, Cali, Colombia. Universidad del valle.
- Nunes, M.R.; Leal, J.R.; Velloso, A.C.S. 2012. Efeitos da vinhaça na lixiviação de nutrientes do solo. III. potássio, cálcio, magnésio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 17(3): 371-374.
- Salomon, K.R.; Silva Lora, E.E. 2009. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass & Bioenergy* 33: 1101-1107.
- Sandoval, M. 2013. Disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) en vinazas mediante tratamiento biológico. Tesis de grado-pregrado. Universidad tecnológica de mixteca. México.
- Shapleigh, J.P. 2011. Oxygen control of nitrogen oxide respiration, focusing on α -proteobacteria. *Biochemical Society Transactions* 39(1): 179-183.
- Sowmya, A.; Meenakshi, S. 2013a. An efficient and regenerable quaternary amine modified chitosan beads for the removal of nitrate and phosphate anions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1: 906-915.
- Sowmya, A.; Meenakshi, S. 2013b. Removal of nitrate and phosphate anions from aqueous solutions using strong base anion exchange resin. *Desalination and Water Treatment* 51: 7145-7156.
- Sirianuntapiboon, S.; Phothilangka, P.; Ohmomo, S. 2004. Decolourization of molasses wastewater by a strain no. bp103 of acetogenic bacteria. *Bioresource Technology* 92: 31-39.
- Pérez, I.; Garrido, N. 2006. Aprovechamiento integral de vinazas de destilerías. *Ingeniería Química* 38(435): 129-133.
- Petruccioli, M.; Duarte, J.C.; Federici, F. 2000. High rate aerobic treatment of winery wastewater using bioreactors with free and immobilized activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90: 381-386.
- Pant, D.; Adholeya, A. 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource Technology* 98(12): 2321-2334.
- Prado, R.D. M.; Caione, G.; Campos, C.N.S. 2013. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Applied and Environmental Soil Science* 2013(1).
- Prodanov, M.; Cobo, R. 2004. Impacto ambiental de la industria vinícola (i). *Alimentación, Equipos y Tecnología* 186: 97-100.
- U.S. E.P.A. 2010. Renewable fuel standard program (rfs2). Regul. Impact Anal. pp. 1-1107. Available en: <http://www.epa.gov/otaq/renewablefuels/420r10006.pdf>.
- Uzal, N.; Gokacay, C.F.; Demirer, G.N. 2003. Sequential anaerobic/aerobic biological treatment of malt whisky wastewater. *Process biochemistry* 39: 279-286.
- Vásquez, E. 2013. Manejo ambiental de la vinaza: efecto de su adición sobre el contenido de potasio intercambiable en el suelo agrícola. Tesis de maestría. Universidad nacional de ingeniería. Lima. Perú.
- Watmough, N.J.; Butland, G.; Cheesman, M.R.; Moir, J.W.B.; Richardson, D.J.; Spiro, S. 1999. Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411(2): 456-474.
- WHO - World Health Organization. 1985. Health hazards from nitrate in drinking water-environmental health. Copenhagen. Available on: <http://www.ircwash.org/sites/default/files/203.3-85he-993.pdf>.
- WHO - World Health Organization. 2006. Guidelines for drinking-water quality-first addendum to third edition. Geneva. Available on: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf.
- Zúñiga, C.V.; Gandini, M.A. 2013. Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol. *DYNA* 80(177): 124-131.

