

IMPACTO BIOLÓGICO DE LOS EFLUENTES DEL BENEFICIO HUMEDO DEL CAFÉ¹

Vivian Matuk-Velasco*, Gloria Inés Puerta- Quintero**, Nelson Rodríguez-Valencia***

RESUMEN

MATUK V., V.; PUERTA Q., G.I.; RODRÍGUEZ V., N. Impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo del café. Cenicafé 48(4): 234-252. 1997.

Se evaluó el impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo de café: aguas del lavado tratadas anaerobiamente y no tratadas, mucílago proveniente del desmucilagador mecánico y drenados de la pulpa y del mucílago obtenidos en el módulo BECOLSUB. Se utilizó el alga *Chlorella vulgaris*, el pez *Lebistes reticulatus* y el microcrustáceo *Daphnia pulex*. Se determinó la CE511 (concentración efectiva media) para el alga y la CL50 (concentración letal media) para los otros dos bioindicadores. El drenado de la pulpa y del mucílago causó el mayor efecto, con una concentración efectiva media (en función de la DQO) de 495 ppm para *C. vulgaris*, una CL50 de 390 ppm para *D. pulex* y 290 ppm para *L. reticulatus*. Las aguas del lavado tratadas anaerobiamente generaron el efecto menos nocivo. *L. reticulatus* fue el organismo más sensible y se demostró que todos los efluentes del beneficio húmedo sin tratamiento pueden ser tóxicos en el ecosistema en concentraciones superiores a 300 ppm de DQO. Las aguas del lavado tratadas anaerobiamente son tóxicas en concentraciones superiores a 500 ppm. Todos los efluentes deben ser tratados antes de ser vertidos a los cuerpos de agua, inclusive aquellos provenientes del Sistema Modular de Tratamiento Anaerobio.

Palabras claves: Subproductos del café, aguas residuales, efluentes, beneficio húmedo de café, contaminación, digestión anaerobia, toxicidad, *Chlorella sp*, *Daphnia sp*, *Lebistes sp*.

ABSTRACT

Biological tests using alga *Chlorella vulgaris*, micro-crustacean *Daphnia pulex*, and fish *Lebistes reticulatus* were carried out to measure the impact caused by coffee-processing wastes. Anaerobically treated and untreated waste water, mucilage from a mechanical device, and pulp and mucilage drain water from the BECOLSUB module were evaluated. Effective mean concentration (ECSO) for the alga and mean lethal concentration (LC50) for the other two bio-indicators were determined. Pulp and mucilage drain water caused the greatest effect, with a ECSO (measured as a function of the chemical oxygen demand, COD) of 495 ppm for *C. vulgaris* and a LC50 of 390 ppm for *D. pulex* and 290 ppm for *L. reticulatus*. Waste water treated anaerobically was the least harmful. *L. reticulatus* was the most sensitive organism and all untreated wastes can be toxic when in concentrations above 300 ppm of COD. Anaerobically treated waste water is also toxic above 500 ppm. All effluents must be treated before disposal into water bodies, even those from the Anaerobic Treatment Modular System.

Key words: Subproductos del café, aguas residuales, efluentes, beneficio húmedo de café, contaminación, digestión anaerobia, toxicidad, *Chlorella sp*, *Daphnia sp*, *Lebistes sp*.

1 Fragmento del trabajo de tesis "Impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo de café" presentado a la Pontificia Universidad Javeriana, para optar al título de Bióloga. Santafé de Bogotá. 1997

* Bióloga

** Investigador Científico 1. Química Industrial. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Asistente de investigación. Química Industrial. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

El agua constituye el elemento esencial para el mantenimiento de la vida en nuestro planeta, pero desafortunadamente el aumento en el crecimiento poblacional y el empeño del hombre por satisfacer sus necesidades ha generado su contaminación y a la vez, su agotamiento.

Existen numerosas causas de contaminación hídrica, pero dentro de las más comunes se encuentra el vertimiento de los desechos agroindustriales y domésticos, los cuales generan la destrucción de los recursos hídricos, la disminución del agua como elemento de abastecimiento, deterioro de la salud y la economía pública, así como efectos desastrosos sobre los ecosistemas acuáticos y sus componentes.

En Colombia la industria cafetera tiene gran importancia y significado en la vida socioeconómica del país. En el procesamiento del café por vía húmeda que se realiza se generan residuos líquidos altamente contaminantes por su valores de acidez, contenido de sólidos y Demanda Química de Oxígeno (DQO), lo cual genera graves desequilibrios en el ecosistema receptor y en sus componentes (18).

Conscientes del potencial contaminante de los efluentes del beneficio húmedo de café, en el Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé, se han desarrollado tecnologías con el fin de reducir el consumo de agua en el proceso, concentrar los subproductos del procesamiento del café, y transformar la pulpa y el mucílago de café por medios biológicos. Se ha logrado entonces reducir el consumo de agua por medio del despulpado en seco y el transporte de la pulpa y del café en baba por gravedad, reduciéndose con esta tecnología el 75% de la contaminación potencial ocasionada por el beneficio húmedo de café (1). Igualmente, utilizando la tecnología BECOLSUB que considera el desmucilaginado mecánico y la transformación de la pulpa y del mucílago de café por medio de la lombricultura, se ha

logrado reducir el consumo de agua a sólo 1 litro/Kg de café pergamino seco y convertir los subproductos, obteniéndose un drenado concentrado. Se ha reducido además el consumo de agua en la etapa de lavado del café beneficiado por fermentación natural tradicional, disminuyéndose en un 80% el consumo de agua y logrando una remoción de más del 90% de los residuos de la fermentación del café mediante el lavado del café en Tanque tina, tecnología con la cual se utilizan 4 litros de agua por cada kilogramo de café pergamino seco (18).

De otra parte se ha tomado conciencia del sobre costo ecológico que esta asumiendo el país al producir un café suave y de alta calidad a través del beneficio por vía húmeda y por lo anterior, se han diseñado y utilizado biodigestores anaerobios (Upflow anaerobic sludge blanket UASB -upflow anaerobic filter UAF) para disminuir las características contaminantes de dichos efluentes y cumplir con el Decreto Colombiano 1594 de 1984 sobre el uso del agua y vertimiento de los residuos líquidos.(11, 19).

En esta investigación se evaluó el impacto biológico que generan los efluentes del beneficio húmedo de café tratados y sin tratar anaerobiamente, mediante pruebas de toxicidad en tres organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos dentro de una cadena alimenticia: el pez *Lebistes reticulatus*, el microcrustáceo *Daphnia pulex* y el alga *Chlorella vulgaris*. Cada uno de estos organismos tiene su función en esta cadena: los peces consumen y controlan poblaciones de insectos, microcrustáceos y algas y permiten de esta forma la recirculación, remoción y resuspensión de material dentro del ecosistema (9). *Daphnia pulex*, representa el zooplancton y contribuye al movimiento de sustancias y energía entre los productores y consumidores (10). El alga, como productor primario de los ecosistemas acuáticos y representante del fitoplancton, produce oxígeno dentro del ecosistema y favorece la recirculación de

materia orgánica, y se constituye a la vez, en alimento de microcrustáceos y peces; su incremento en los cuerpos de agua favorece procesos de eutrofización (3,9,14)

Se comparó entonces el efecto de los efluentes en el crecimiento del alga y en la mortalidad del microcrustáceo y el pez, determinándose cual resultó ser el bioindicador más sensible, el efluente más tóxico y la máxima concentración tóxica permisible de cada efluente del beneficio húmedo de café que no produzca impacto biológico en la zona cafetera y que por no ser contaminante, garantice la calidad del agua y la vida de los ecosistemas de la región.

Dado que en la mayoría de las investigaciones sobre contaminación por residuos agroindustriales, domésticos y de la industria química desarrolladas en Colombia se han basado solo en análisis fisicoquímicos de los efluentes, la presente investigación constituye un avance en el diagnóstico de la contaminación del proceso de beneficio del café, ya que involucra los componentes tanto abióticos como bióticos reuniendo un conocimiento general y real sobre el efecto e impacto que se generaría por el vertimiento de las aguas y subproductos del café en el ecosistema acuático.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biodigestión del Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía", CENICAFE ubicado en Chinchiná - Caldas, con los siguientes efluentes del beneficio húmedo de café de las cosechas de 1995 y 1996.

Efluentes del beneficio húmedo de café no tratados. Se utilizaron aguas del procesamiento de café cereza de la especie *Coffea arabica* L. de recolección normal, despulpado sin agua y lavado con los siguientes

volúmenes de agua después del proceso de fermentación natural:

- 4 L /Kg café pergamino seco (cps) lavado en tanque tina
- 20 L /Kg cps lavado después de fermentación en tanque tradicional
- 50 L /Kg cps lavado después de fermentación en tanque tradicional
- Mucílago de café proveniente del desmucilagador mecánico experimental de capacidad
- 600 @ café cereza/ hora, utilizando 1 L de agua / minuto equivalente a 0,5 L de agua /Kg de cps.
- Drenados de mezcla de pulpa y mucílago de café del módulo BECOLSUB.

Aguas residuales del beneficio de café tratadas anaerobiamente:

Se utilizaron aguas del procesamiento de café cereza de la especie *Coffea arabica* L. de recolección normal, proveniente de un reactor para el tratamiento anaerobio de aguas residuales de café, ubicado en el municipio de Chinchiná, en la vereda El Trébol, en la finca Buenos Aires, (Latitud N 4° 59', Longitud 0 75° 39' Altitud 1400, temperatura media 21,3 °C, humedad relativa 78%, precipitación media anual 2677 mm, 248 días de lluvia, 1730 horas de brillo solar anual (4)), en el cual se procesaron aguas del lavado de café y mucílago, con concentraciones iniciales de DQO hasta 28000 ppm, y en el cual se removía como mínimo el 80% de la carga orgánica presente en 2000 L de agua contenidos en el reactor metanogénico. El proceso de digestión anaerobia operó con tiempos de retención de 6 días.

Agua de dilución: Como elemento de dilución para los bioensayos se utilizó el agua proveniente de un manantial que surte al laboratorio de Biodigestión de Cenicafe.

Material biológico: Se utilizaron peces (*Lebistes reticulatus*) suministrados por El Acuario Manizales, Microcrustáceos (*Daphnia*

pulex) y Algas (*Chlorella vulgaris*) suministrados por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Bioensayos del Programa de Saneamiento Ambiental de la Pontificia Universidad Javeriana de Santafé de Bogotá.

Medio nutritivo C30: Constituido por KNO₃, MgSO₄ 7H₂O, KH₂PO₄, K₂HPO₄, FeSO₄ 7H₂O, oligoelementos H₃BO₃, MnCl₂ 4H₂O, ZnSO₄ 7H₂O, CuSO₄ 5H₂O, Na₂MoO₄.

Materiales para bioensayos: acuarios de vidrio, espejo, frascos, láminas porta y cubreobjetos, capilares, mangueras de polietileno, vinyl y de jardín, jabones y materiales de aseo, guantes quirúrgicos, tapabocas, batas de laboratorio, frascos lavadores, lámpara de luz blanca, recirculadores de agua (757 L/h), uniones, válvulas distribuidoras de aire, mallas para acuario, piedras difusoras, levadura, comida para truchas, alfalfa seca y pulverizada.

Bioensayos: Se realizaron bioensayos de toxicidad aguda en un sistema estático, lo cual permitió someter a los organismos a condiciones drásticas y obtener resultados más confiables sobre la toxicidad de los efluentes del beneficio húmedo del café. Se realizaron mediciones de mortalidad para *Daphnia pulex* y *Lebistes reticulatus* y de inhibición de crecimiento para *Chlorella vulgaris* cada 24 horas, hasta 96 horas, tiempo para el cual se determinó la concentración letal media en el caso del microcrustáceo y el pez y la concentración efectiva media para el alga. Para este mismo período se hicieron medidas del pH. En general, para todos los bioensayos se evaluó un rango de 1200 a 200 ppm de DQO con cada efluente y bioindicador, a excepción de *Daphnia pulex* y las aguas de lavado donde se comenzó con 2500 ppm.

Chlorella vulgaris. A partir del cultivo axénico se realizaron dos preinóculos (2 ml de inóculo algal y 200 ml de medio nutritivo C30) con el objetivo de estandarizar el crecimiento de la

población y conocer su tasa de crecimiento para determinar la etapa de crecimiento exponencial o estable. Posteriormente para mantener a la población en dicha etapa, se realizaron recambios cada 24 horas del 20 % del medio nutritivo y se mantuvo a este cultivo al igual que a los preinóculos bajo luz blanca constante, a 20 ± 5 °C, así como en agitación constante. Las pruebas de toxicidad se iniciaron con un número entre 200 a 300 x 10⁴ células / ml.

***Daphnia pulex*.** Los microcrustáceos se colocaron en frascos de 4 litros en una densidad aproximada de 30 a 50 individuos por litro para el transporte hasta el laboratorio. El agua de dilución utilizada para el mantenimiento de los organismos se caracterizó por presentar un pH entre 6,5 - 8,5 unidades y una dureza entre 120 - 160 mg de CaCO₃; se hizo una decloración previa, aireación y se microfiltró utilizando un filtro milipore de 0,45 mm; este procedimiento se repitió una vez. A estos microcrustáceos se les le suministraba como fuente alimenticia algas de la especie *Chlorella vulgaris*, (1 ml/L) cada dos días. El agua del cultivo de reserva se renovó cada mes. Para la realización de las pruebas de toxicidad se trabajó con individuos de 24 horas de nacidos, los cuales se obtenían aislando a las hembras en etapa reproductiva en vasos de precipitados de 1.000 ml, con agua de dilución con las características físicoquímicas mencionadas con anterioridad, esperando a que las crías fueran liberadas (3-4 días).

***Lebistes reticulatus*.** Para las pruebas de toxicidad se trabajó con hembras con longitud máxima entre 3 y 6 cm. Se escogieron las hembras para la experimentación, ya que estas son las responsables del sostenimiento y preservación de la especie en el ecosistema. Los peces se mantuvieron en observación y aclimatación durante 15 días antes de ser utilizados en las pruebas y se colocaron en dos acuarios de 80 litros de capacidad, los cuales poseían recirculadores para la filtración y oxigenación del agua. El agua se renovó cada

vez que el nivel bajara, utilizando agua declorada (con reposo de 24 h). Se suministró alimentación (comida comercial para peces) 3 veces por semana durante la aclimatación y se suspendió 24 h antes de comenzar el bioensayo.

Análisis fisicoquímicos. A los efluentes del beneficio húmedo del café con y sin tratamiento, se les realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos: demanda química de oxígeno DQO, demanda bioquímica de oxígeno DBO, pH, acidez, alcalinidad, sólidos totales suspendidos y volátiles, ácidos grasos volátiles, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, fosfatos, fósforo, sulfatos, color verdadero y aparente, dureza, conductividad y viscosidad a muestras de un litro con concentraciones de 1200 y 400 ppm de DQO para cada efluente evaluado en los bioensayos. A los efluentes en todas las concentraciones evaluadas en los bioensayos, se les determinó la DQO, el pH y la temperatura. Así mismo, se determinó la DQO y el pH de cada efluente, tal como sale del proceso. Todas las determinaciones fisicoquímicas se realizaron según la metodología de la APHA (2), Field (5), Isaza (6), Jenkins (7), y Ugrinovits (15).

Diseño experimental: Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para los tres bioindicadores, realizándose 2 ensayos: el primero con los efluentes del beneficio húmedo de café sin tratar y el segundo con los efluentes tratados anaerobiamente; para los primeros se realizaron 4 repeticiones y con los segundos seis repeticiones. En cada caso se utilizaron los controles respectivos que consistieron en la evaluación de los bioindicadores en agua limpia suministrada al laboratorio.

La unidad experimental en el caso del alga fue de 1 ml del inóculo algal previamente estabilizado y 10 ml del efluente; en el caso del microcrustáceo, 10 individuos de 24 horas de nacidos y 50 ml del efluente y para el pez, 10 hembras y 10 litros del efluente. Se consideraron como variables independientes la

DQO y el pH y como variables de respuesta la mortalidad para los peces y los microcrustáceos, además de la inhibición del crecimiento para el alga.

Análisis estadístico. Para determinar la CL50 y la CE50 se utilizó el método del número Probit. Los resultados de las pruebas de toxicidad se expresaron con probabilidad del 95%, como la concentración del efluente que inhibe o genera la mortalidad del cincuenta por ciento (50 %) de los organismos en 96 horas (CE50 - 96h, CL50 - 96 h).

Con el fin de analizar las respuestas de los bioindicadores frente a los efluentes en las concentraciones evaluadas y determinar el efluente que genera el efecto más drástico sobre los organismos, así como el bioindicador más sensible, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas comparativas de Tukey con un nivel de significancia del 5%. La relación entre los componentes bióticos y abióticos se analizó por medio de un análisis multivariado de componentes principales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de carga orgánica expresada en términos de demanda química de oxígeno DQO (en ppm) y el pH de los efluentes del beneficio húmedo del café evaluados en los bioensayos se muestran en la Tabla 1.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos para 1200 y 400 ppm de DQO de los efluentes del beneficio húmedo de café evaluados se presentan en la Tabla 2.

Se observa que existe una relación de linealidad para las concentraciones de carga orgánica evaluadas en la mayoría de las determinaciones fisicoquímicas de las aguas tratadas anaerobiamente, mientras que en el caso de los efluentes sin recibir tratamiento anaerobio

no se presentó esta tendencia, debido a que los efluentes tratados presentan una carga orgánica estable ya que han finalizado los procesos fermentativos, mientras que en el caso de los efluentes sin tratar estos procesos continúan.

Bioensayos con *Daphnia pulex*. Para la primera concentración evaluada de las aguas de lavado del café con este bioindicador que correspondió a 2500 ppm, es decir, a la demanda química de oxígeno que se obtiene al lavar 1 Kg de café en baba con 18,5 L de agua o al utilizar 50 litros de agua por cada Kg de café pergamino seco (cps) se determinó un pH de 5,46 y se encontró que se generaron efectos inmediatos en el microcrustáceo, ya que los organismos no sobrevivieron a un período mayor de 6 horas (Figura 1). Esta concentración y el resultado con el bioindicador sirvieron como base para establecer el rango de concentraciones por utilizar con los demás efluentes y con los otros dos bioindicadores. De esta forma se disminuyó la concentración a 1200 ppm (aproximadamente la mitad), y se establecieron las siguientes concentraciones para los

bioensayos preliminares: 1200, 800, 600 y 200 ppm, y a partir de estas concentraciones, dependiendo de los resultados obtenidos, el rango se redujo en los ensayos definitivos entre 600 y 50 ppm de DQO.

En la Figura 2 se muestra que en los bioensayos con *Daphnia pulex* con los efluentes del beneficio húmedo del café tratados y sin recibir tratamiento anaerobio, el drenado de la pulpa y del mucílago de café (BECOLSUB) es el efluente del beneficio húmedo de café que genera un mayor efecto en la mortalidad de *Daphnia pulex*, seguido por las aguas del lavado y el mucilage de café, las cuales generaron un efecto muy similar en el bioindicador. Las aguas tratadas anaerobiamente fueron las que generaron un menor efecto en el microcrustáceo en todas las concentraciones evaluadas. Igualmente se observa que para 1200 ppm el efecto de todos los efluentes fue similar en el microcrustáceo, generándose un efecto drástico muriendo el 100% de los individuos, mientras que para las concentraciones inferiores a 600 ppm existe una diferencia entre el efecto

Tabla 1. Demanda química de oxígeno (DQO) y pH de los efluentes del beneficio húmedo del café. CENICAFE. 1996

Efluente	Proceso	DQO (ppm)	pH
Drenados de pulpa y mucílago	BECOLSUB	100000 ppm	3,88
Mucílago de café	Desmucilagador experimental (0,185 l de agua / kg de café baba)	120000 ppm	4,84
Aguas del lavado de café	Tanque tina (4 L de agua / Kg de cps)	28000 ppm	3,09
Aguas del lavado de café	Tanque tradicional (20 L de agua / Kg de cps)	5600	**
Aguas del lavado de café	Tanque tradicional (50 L de agua / Kg de cps)	2500	5,46
Aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente	Reactor SMTA***	5600 ppm	7,27

** Este efluente no se evaluó en los bioensayos

*** SMTA: sistema modular para tratamiento anaerobio de aguas residuales del café (18,19)

Tabla 2. Resultados de los análisis fisicoquímicos de los efluentes del beneficio húmedo del café tratados y sin tratamiento anaerobio.* CENICAFE. 1996

PARAMETRO FISICOQUIMICO	TIPO DE EFLUENTE							
	Drenado de la pulpa y del mucilago de café		Mucilago de café		Aguas del lavado de café		Aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente	
	1200ppm	400ppm	1200ppm	400ppm	1200ppm	400ppm	1200 ppm	400 ppm
pH	3,84	3,94	5,02	5,11	3,46	3,66	7,46	7,77
Temperatura (°C)	25,7	25,6	25,6	25,4	25,2	25,6	22	24,6
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	—	—	—	—	—	—	1877	599
Acidez (mg NaOH / g DQO)	106	90	101	112	96	107	—	—
Color verdadero (u Pt -Co)	194	81	64	47	81	69	360	174
Color aparente (u Pt - Co)	546	206	FE	250	FE	279	FE	FE
DQO (ppm)	1197	482	1197	430	1185	408	1046	357
DBO (ppm)	674	222	704	302	674	232	634	132
Nitrógeno Total (ppm)	12,60	5,82	16,58	8,80	20,66	12,27	184,18	66,42
Nitrógeno amoniacal (ppm)	1,68	1,70	3,50	1,92	1,81	0,90	122,56	38,89
Nitrógeno orgánico (ppm)	10,93	4,13	13,08	6,87	18,85	11,37	61,62	27,53
Nitratos (ppm)	0	0	0,10	0	0,05	0	0	0,20
Nitritos (ppm)	0	0	0,0015	0,0005	0,0005	0,008	0	0
Fosfatos (ppm)	1,27	0,65	1,02	0,28	1,84	0,53	13,25	2,00
Fósforo (ppm)	0,42	0,22	0,34	0,09	0,62	0,18	4,42	0,67
Dureza Total (mg CaCO ₃ /l)	58	19	31	12	39	25	1335	430
Acidos Grasos								
Volátiles (meq /l)	5,04	2,40	2,00	1,64	3,63	2,02	2,71	1,74
Sólidos Totales (ppm)	664	267	763	315	778	283	2807	995
Sólidos Suspendidos (ppm)	59	14	144	46	160	52	712	220
Sólidos Suspendidos Volátiles (ppm)	27	12	139	35	141	14	359	118
Sólidos solubles (ppm)	605	253	619	269	618	231	2095	775
Conductividad (mS/cm ²)	221	102	84	53	178	67	2421	943
Sulfatos (ppm)	2	0	10	12,5	10,5	5,50	0	0
Viscosidad (cps)	1,24	1,02	1,37	1,33	1,16	1,04	1,26	1,02

FE: Fuera de escala, * promedio de dos determinaciones por análisis

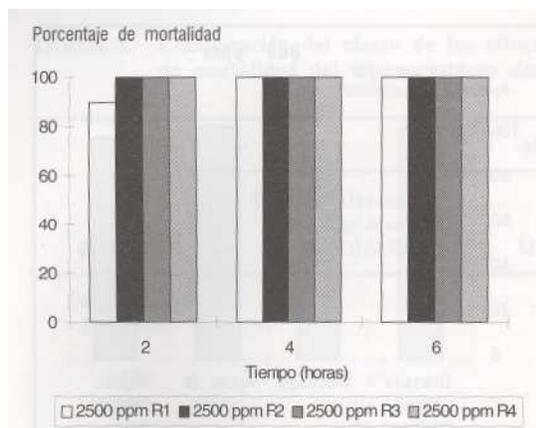


Figura 1. Mortalidad de *Daphnia pulex* por efecto de las aguas del lavado de café con DQO de 2500 ppm. Cenicafé, 1996.

generado por las aguas tratadas en comparación con los efluentes del beneficio sin recibir tratamiento. El efecto en la mortalidad del microcrustáceo disminuyó a medida que los efluentes estaban más diluidos y fueron tratados, de esta forma, para una concentración de 400 ppm la mortalidad del microcrustáceo varió desde 52,5 % para el drenado hasta 15% para las aguas del lavado de café tratadas.

Como se observa en la Tabla 3, se encontraron diferencias significativas entre el efecto ocasionado al microcrustáceo a las 96 h por el drenado de la pulpa y del mucílago del café, en comparación con los otros efluentes evaluados para 600 ppm de DQO. El efecto de las aguas tratadas anaerobiamente se diferenció del efecto de los efluentes sin tratar para concentraciones entre 600 y 200 ppm. Para el caso del mucílago y las aguas del lavado de café, no existieron diferencias significativas entre el efecto que generan estos dos efluentes sobre el bioindicador para ninguna de las concentraciones evaluadas.

La concentración letal media de demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes del beneficio húmedo del café en *Daphnia pulex*,

correspondió en el caso del drenado de la pulpa y del mucílago del café (BECOLSUB) a 390 ppm, en el caso del mucílago y de las aguas del lavado del café a 480 ppm y para las aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente a 700 ppm.

En el transcurso de los bioensayos se pudieron determinar por observación varias facetas comportamentales del bioindicador *Daphnia pulex* frente a los efluentes evaluados, así:

- **Etapa exploratoria.** El microcrustáceo presentó movimientos rápidos y en toda la columna de agua al ser colocado en el recipiente con el efluente.
- **Etapa de infiltración.** Durante esta etapa los organismos no presentaban mucha movilidad y en comparación con la anterior etapa, disminuían su área de movilidad tendiendo a ubicarse hacia la película de agua; algunos individuos presentaban movimiento arrítmicos y no tan verticales como lo realizan en su estado natural.
- **Etapa letal.** Después de las anteriores etapas los organismos presentaron movimientos esporádicos, con tendencia horizontal hasta que finalmente murieron, cayendo al fondo del recipiente.

En concentraciones superiores a las 600 ppm (1200 y 800 ppm), las etapas mencionadas anteriormente se presentaron sólo en las primeras 24 horas, mientras que en concentraciones entre 600 y 400 ppm, estas tres etapas se presentaron a lo largo de las 96 horas. En concentraciones bajas como 100 y 50 ppm, las etapas no fueron muy detectables ya que el porcentaje de mortalidad fue muy bajo.

La sensibilidad reportada por el microcrustáceo frente a los efluentes en evaluación se puede explicar desde el punto de vista biológico de la siguiente forma: Los Efluentes

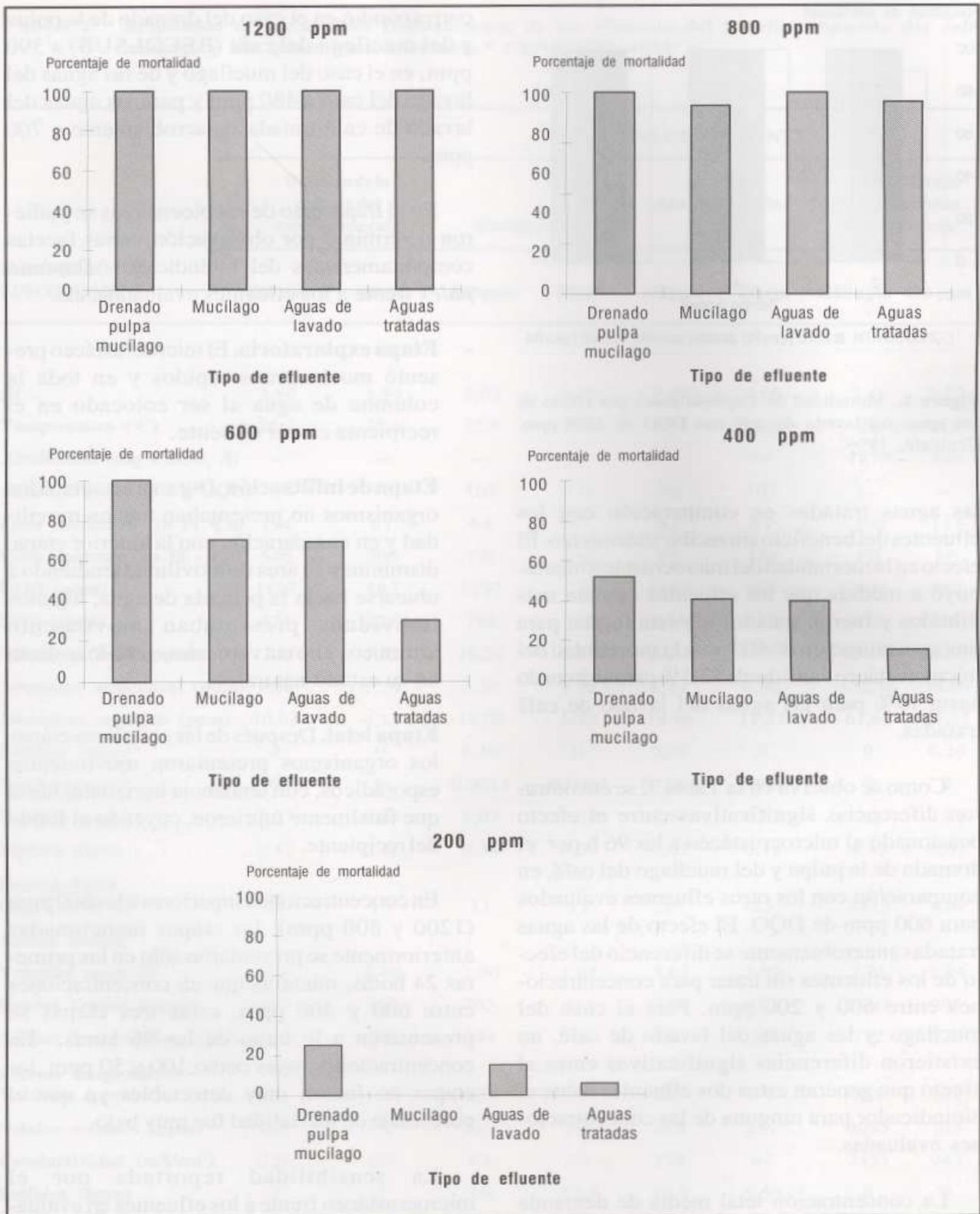


Figura 2. Efecto en la mortalidad de *Daphnia pulex* por los efluentes del beneficio del café tratados y sin tratamiento anaerobio en concentraciones de DQO correspondientes a 1200, 800, 600, 400, y 200 ppm. Cenicafé, 1996.

Tabla 3. Comparación del efecto de los efluentes del beneficio húmedo de café en el porcentaje de mortalidad del microcrustáceo *Daphnia pulex* 96 horas después. Cenicafé.1996.

EFLUENTES	MORTALIDAD (%)			
	Drenado de la pulpa y del mucilago de café (BECOLSUB)	Mucilago de café	Aguas del lavado del café	Aguas del lavado del café tratadas anaerobiamente
Carga orgánica DQO (ppm)				
1200	100 a*	100a	100a	100a
800	100a	95a	100a	95,8a
600	100b	70a	69,2a	32,5c
500	—	58,8a	58,8a	—
400	52,5a	41,3a	40a	15d
300	42,5b	37,5a	27,5a	—
200	23,8a	23,8a	15c	5,83e
100	—	7,5a	5a	—
50	—	5a	5a	—

* Valores identificados con letras distintas presentan diferencia estadística significativa. Tukey al 5%

del beneficio sin recibir tratamiento generaron un efecto más drástico en *Daphnia pulex*, ya que el pH se encontraba por debajo de los requerimientos del bioindicador (entre 6,5 y 8,5), lo cual junto con la acidez reportada en estos efluentes, generó un efecto drástico en el microcrustáceo de quemaduras sobre los epitelios. Igualmente, las altas cargas orgánicas disminuyeron la disponibilidad de oxígeno en el medio acuático, lo cual estaba relacionado con la carga orgánica inestable de estos efluentes sujeta a fermentación, que generó aún mayor disminución de este elemento, ubicándose por debajo de los requerimientos del bioindicador que en este caso es del 40%. En cuanto a la alcalinidad, la cual solo se pudo determinar en las aguas tratadas como se muestra en la Tabla 2, los valores tolerados por el bioindicador variaron entre 60 a 70 mg de CaCO₃ / L, valor que es muy inferior al reportado por estos efluentes, lo cual pudo afectar al microcrustáceo por efectos de quemaduras por alcalinidad en los epitelios así como debido a la reducción del potencial osmótico de sus células. La dureza de

los efluentes que no recibieron tratamiento anaerobio (90 a 112 mg de CaCO₃ /L), es inferior a la requerida por *Daphnia pulex*, que se encuentra entre 120 a 260 mg de CaCO₃ /L (10), mientras que en las aguas tratadas, los valores de dureza fueron superiores a aquellos tolerados por el microcrustáceo. Estos valores superiores o inferiores reportados por los efluentes del beneficio de café pudieron generar efectos en las membranas celulares y en la actividad muscular del bioindicador (13).

En cuanto a los sólidos, aunque no se conocen los requerimientos por parte de los bioindicadores, se pudieron generar efectos sobre la filtración del microcrustáceo debido a que este es un organismo netamente filtrador que no es selectivo en cuanto al tipo de partícula por filtrar, pero sí en cuanto al tamaño, ya que solo filtra partículas de 1 mm ; las partículas tanto de los efluentes sin tratar (flóculos) como de los tratados (1 mm) son de valores superiores a los requeridos por el bioindicador. Este parámetro igualmente afectó el proceso

respiratorio del microcrustáceo pudiéndose generar un efecto de obstrucción de las vías respiratorias.

Aunque no se conocen los requerimientos en cuanto a ácidos grasos volátiles, Zegers (20) menciona que éstos, bajo un pH ácido, se encuentran en forma ionizada lo cual resulta altamente tóxico y afectó a *Daphnia pulex*, como ocurrió en el caso de los efluentes sin tratar anaerobiamente, mientras que para las aguas tratadas, donde el pH es superior a 5, estos compuestos se encontraron en forma no ionizada, no tóxica. En cuanto a los valores de amoníaco reportados por los efluentes del beneficio del café tratados y sin tratamiento anaerobio, se encontraron entre 0,90 a 122,56 ppm, valores muy altos que afectaron al microcrustáceo. La literatura registra al amoníaco como un veneno altamente tóxico el cual en dosis pequeñas desarrolla una acción mortal afectando los nervios a través de la sangre y llegando a generar destrucción de las branquias y del intestino (14).

Bioensayos con *Lebistes reticulatus*. En la Figura 3 se muestra que en los bioensayos con este bioindicador y los efluentes del beneficio húmedo del café tratados y sin tratamiento anaerobio, el drenado de la pulpa y del mucílago de café derivados de la tecnología BECOLSUB, es el efluente del beneficio húmedo que genera un mayor efecto en la mortalidad de *Lebistes reticulatus*, seguido por el mucílago de café y las aguas de lavado. Las aguas tratadas anaerobiamente fueron las que generaron un menor efecto en el pez en todas las concentraciones evaluadas. Igualmente se observa que para concentraciones entre 1200 y 800 ppm el efecto de todos los efluentes sin tratar fue similar, generándose una mortalidad drástica de todos los individuos mientras que para concentraciones inferiores, como por ejemplo 400 ppm, el efecto generado en la mortalidad del pez oscila entre 70% en el caso del drenado y 25% para el caso de las aguas del lavado del café tratadas anaerobiamente.

Para 200 ppm el drenado y el mucílago de café causaron la mortalidad en menos del 20% de los peces.

Del análisis de varianza y las pruebas comparativas de Tukey (Tabla 4), se encontró que para concentraciones entre 800 y 1200 ppm, el efecto de toxicidad de los efluentes del beneficio húmedo de café sin tratamiento anaerobio no se diferenció estadísticamente muriendo el total de los organismos. De otra parte se presentaron diferencias significativas estadísticamente a las 96 h del bioensayo entre el efecto que generan las aguas de lavado de café tratadas anaerobiamente con los efluentes sin tratar, para concentraciones entre 800 y 200 ppm, en tanto que el efecto del drenado de la pulpa y del mucílago del café sobre el pez se diferenció del efecto causado por las aguas de lavado tratadas y sin tratar para concentraciones entre 600 y 200 ppm, y fue estadísticamente similar al efecto del mucílago de café para DQO entre 800 y 400 ppm.

La concentración letal media de demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes del beneficio húmedo del café en *Lebistes reticulatus*, correspondió en el caso del drenado y de la pulpa y del mucílago del café (tecnología BECOLSUB) a 290 ppm, en el caso del mucílago a 320 ppm, para las aguas del lavado del café a 380 ppm y para las aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente a 490 ppm.

El comportamiento de *Lebistes reticulatus* frente a los efluentes evaluados durante los bioensayos se resume en las siguientes etapas:

- Etapa exploratoria. Los individuos al ser colocados en los acuarios mostraron movimientos rápidos en todo el recipiente y en toda la columna de agua; estos movimientos eran individuales.
- Etapa de asimilación. En concentraciones superiores a las 200 ppm se pudo observar esta fase, en la cual existió una restricción

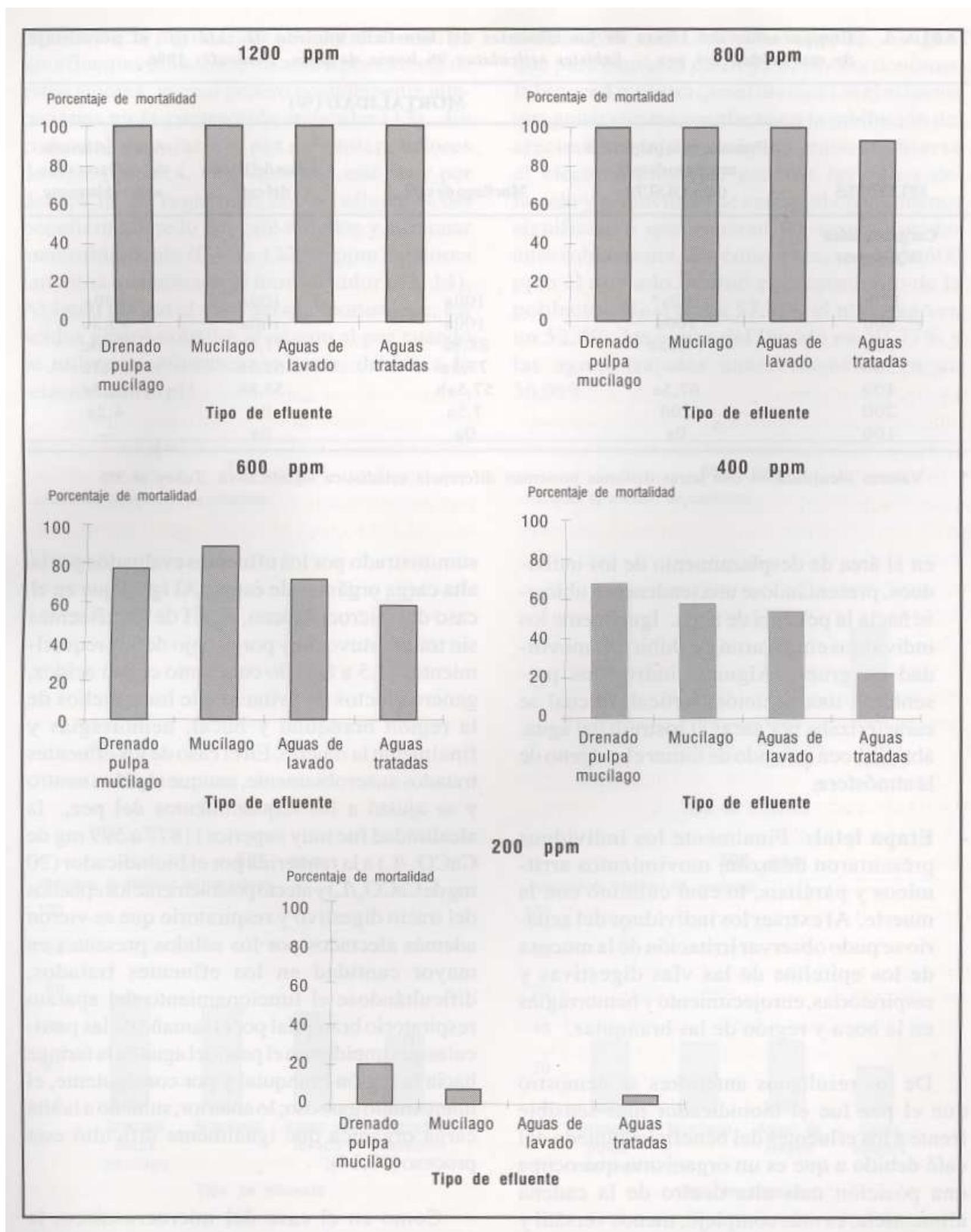


Figura 3. Efecto en la mortalidad de *Lebistes reticulatus* por los efluentes del beneficio del café tratados y sin tratamiento anaerobio, en concentraciones de DQO equivalentes a 1200,800, 600, 400, y 200 ppm. Cenicafé. 1996.

Tabla 4. Comparación del efecto de los efluentes del beneficio húmedo de café en el porcentaje de mortalidad del pez *Lebistes reticulatus* 96 horas después. Cenicafé. 1996.

EFLUENTES	MORTALIDAD (%)			
	Drenado de la pulpa y del mucílago de café (BECOLSUB)	Mucílago de café	Aguas del lavado del café	Aguas del lavado del café tratadas anaerobiamente
Carga orgánica DQO (ppm)				
1200	100a*	100a	100a	100a
800	100a	100a	100a	93,3b
600	77,5ab	88,8a	71,6b	58,3c
500	—	77,5a	62,5b	51,7c
400	67,5a	57,5ab	53,8b	22,5c
200	20d	7,5a	0a	4,2a
100	0a	0a	0a	—

* Valores identificados con letras distintas presentan diferencia estadística significativa. Tukey al 5%

en el área de desplazamiento de los individuos, presentándose una tendencia a ubicarse hacia la película de agua. Igualmente los individuos empezaron a exhibir una movilidad en grupo. Algunos individuos presentaron una posición vertical, la cual se caracterizaba por sacar el rostrum del agua, abrir la boca tratando de tomar el oxígeno de la atmósfera.

- Etapa letal: Finalmente los individuos presentaron desazón, movimientos arrítmicos y parálisis, lo cual culminó con la muerte. Al extraer los individuos del acuario se pudo observar irritación de la mucosa de los epitelios de las vías digestivas y respiratorias, enrojecimiento y hemorragias en la boca y región de las branquias.

De los resultados anteriores se demostró que el pez fue el bioindicador más sensible frente a los efluentes del beneficio húmedo del café debido a que es un organismo que ocupa una posición más alta dentro de la cadena alimenticia, es más complejo, menos versátil y necesita un porcentaje de saturación de oxígeno del medio de más del 80%, el cual no fue

suministrado por los efluentes evaluados por la alta carga orgánica de éstos. Al igual que en el caso del microcrustáceo, el pH de los efluentes sin tratar estuvo muy por debajo de sus requerimientos (7,5 a 8,5), lo cual junto con la acidez, generó efectos de irritación de los epitelios de la región branquial y bucal, hemorragias y finalmente la muerte. En el caso de los efluentes tratados anaerobiamente, aunque el pH es neutro y se ajustó a los requerimientos del pez, la alcalinidad fue muy superior (1877 a 599 mg de CaCO₃ /L) a la requerida por el bioindicador (20 mg de CaCO₃ /L) y afectó posiblemente los epitelios del tracto digestivo y respiratorio que se vieron además afectados por los sólidos presentes en mayor cantidad en los efluentes tratados, dificultándose el funcionamiento del aparato respiratorio branquial por el tamaño de las partículas que impidieron el paso del agua de la faringe hacia la región branquial y por consiguiente, el intercambio gaseoso; lo anterior, sumado a la alta carga orgánica que igualmente dificultó este proceso (10,14).

Como en el caso del microcrustáceo, la dureza reportada en los efluentes no tratados se encontró por debajo de los requerimientos del

pez (50 a 250 mg de CaCO₃ / L) y en el caso de los efluentes tratados se encontró por encima de estos valores, lo cual generó posiblemente alteraciones en la contracción muscular (13). En cuanto al amoníaco, el pez sólo tolera valores de 0,02 ppm (14, 16), valor que esta muy por debajo de lo registrado en los efluentes del beneficio húmedo del café tratados y sin tratar anaerobiamente (0,90 a 122,56 ppm), valores tan altos que afectan al bioindicador (12, 14). Al igual que en el caso del microcrustáceo, los ácidos grasos volátiles afectaron al pez cuando se utilizaron efluentes sin tratar, debido a la relación con el pH.

Bioensayos con *Chlorella vulgaris*. Al igual que para *Daphnia pulex* y *Lebistes reticulatus*, la Figura 4 muestra que el drenado es el efluente que genera un mayor efecto en la inhibición del crecimiento del alga, e igualmente, se observa el efecto similar que generan las aguas del lavado y el mucílago de café, y el efecto menos significativo que generan las aguas tratadas anaerobiamente. En concentraciones de 600 ppm el drenado inhibió el crecimiento de la población algal en un 57,3%, el mucílago en un 52,4%, las aguas del lavado en 50,77% y las aguas tratadas anaerobiamente en un 36,06%.

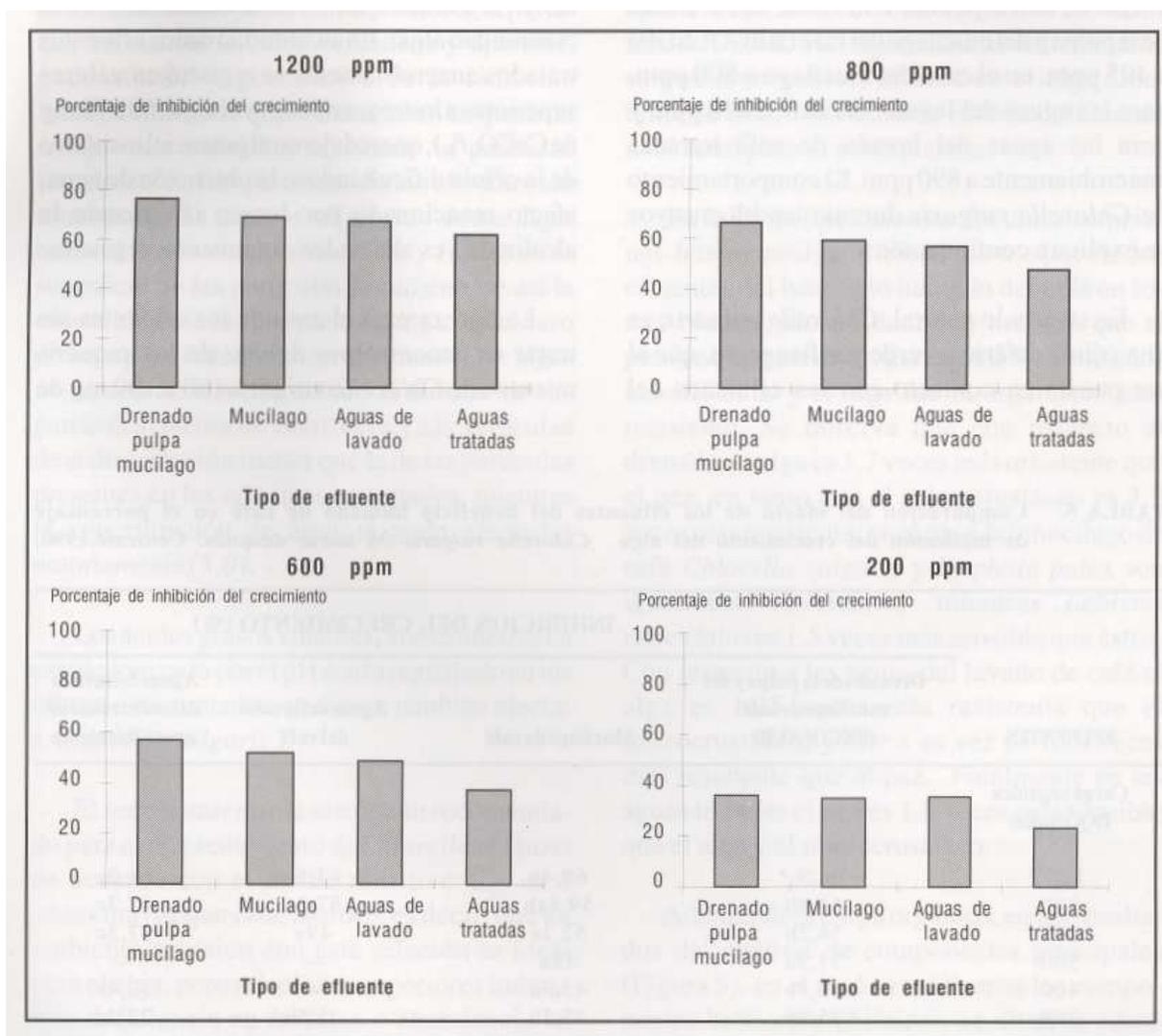


Figura 4. Efecto en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* por los efluentes del beneficio húmedo del café tratados y sin tratamiento en concentraciones de 1200, 800, 600 y 200 ppm. Cenicafé. 1996.

Estadísticamente existieron diferencias significativas entre el efecto que genera el drenado de la pulpa y del mucílago del café sobre el crecimiento del alga, en comparación con los otros efluentes del beneficio. Las aguas tratadas anaerobiamente causaron un efecto significativamente menor y diferente, comparado con el efecto causado por los efluentes sin tratamiento para concentraciones entre 1200 y 200 ppm (Tabla 5).

La concentración efectiva media de demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes del beneficio húmedo del café en *Chlorella vulgaris*, correspondió en el caso del drenado de la pulpa y del mucílago del café (BECOLSUB) a 495 ppm; en el caso del mucílago a 500 ppm, para las aguas del lavado del café a 600 ppm y para las aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente a 890 ppm. El comportamiento de *Chlorella vulgaris* durante los bioensayos se explica a continuación:

En su estado natural, *Chlorella vulgaris*, es una célula esférica, verde y refringente, que al ser puesta en contacto con los efluentes del

beneficio del café se vió afectada perdiendo la última característica y observándose su membrana citoplásmica con la apariencia de un cascarón, por la salida del material protoplasmático.

El alga fue el bioindicador más resistente, debido a que es un organismo más versátil y prolífico y puede utilizar el dióxido de carbono como fuente primaria de carbono en el proceso de fotosíntesis (8, 17). En cuanto a los valores de pH de los efluentes del beneficio que no recibieron tratamiento anaerobio, se encontraron inferiores a los requeridos por el alga (entre 6,5 y 7,5), lo cual junto con la acidez afectó a la comunidad algal. La alcalinidad de los efluentes tratados anaerobiamente se registró en valores superiores a los requeridos por el alga (60 a 70 mg de CaCO₃ /L), que redujeron el potencial osmótico de la célula dificultándose la obtención de agua, efecto mencionado por Jensen (8) cuando la alcalinidad es alta en los organismos vegetales. La dureza para el caso de los efluentes sin tratar se encontró por debajo de los requerimientos de *Chlorella vulgaris* (80 a 100

Tabla 5. Comparación del efecto de los efluentes del beneficio húmedo de café en el porcentaje de inhibición del crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* 96 horas después. Cenicafé.1996.

EFLUENTES	INHIBICION DEL CRECIMIENTO (%)			
	Drenado de la pulpa y del mucílago de café (BECOLSUB)	Mucílago de café	Aguas del lavado del café	Aguas del lavado del café tratadas anaerobiamente
Carga orgánica DQO(ppm)				
1200	76,2b*	69,4a	67,5a	61,9c
800	66,4b	59,8ab	57,2a	47,3c
600	56,2b	52,2a	49a	37,3c
500	51,2a	48a	—	—
400	42,3b	43,3a	—	32,4c
200	35,9b	35,2b	35,5b	23,3c

* Valores identificados con letras distintas presentan diferencia estadística significativa. Tukey al 5%

CaCO₃/L) y en el caso de los efluentes tratados, los valores reportados por estas aguas se encontraban por encima de lo requerido por el bioindicador; esta deficiencia o exceso en estos elementos pudo afectar varias actividades metabólicas, la estabilidad de la pared celular y la actividad de muchas enzimas que participan en la transferencia de fosfatos e igualmente la permeabilidad de la membrana (16). El nitrógeno amoniacal posiblemente no afectó al alga, debido a que ésta puede asimilar el compuesto.

La gran cantidad de sólidos reportados, en particular, en el caso de los efluentes tratados anaerobiamente, junto con los valores reportados en cuanto al color verdadero y aparente, pudo afectar la penetración de la radiación lumínica de modo que el material en suspensión reflejó esta radiación afectando la actividad fotosintética. Las partículas de los efluentes sin tratar pudieron generar el arrastre de las algas hacia el fondo siendo absorbidas y fijadas en la superficie de las partículas impidiéndose así la obtención de la luz por parte del alga. En el caso de las aguas tratadas anaerobiamente, las algas no fueron arrastradas debido al tamaño de sus partículas (menor de 1mm) (11), y a la velocidad de sedimentación menor que la de las partículas presentes en los efluentes no tratados, mientras la concentración de éstas si pudo afectarlas notoriamente (3, 9).

Los ácidos grasos volátiles, al encontrarse en estado ionizado por el pH ácido registrado en los efluentes no tratados, pudieron también afectar a *Chlorella vulgaris*.

El requerimiento de nitrógeno recomendado para el mantenimiento de *Chlorella vulgaris* de acuerdo con el medio nutritivo C30, es 2 veces mayor que el de fósforo, es decir, que un ambiente acuático con esta relación es ideal para el alga; pero relaciones superiores indicarían deficiencia en fosfatos o abundancia en nitrógeno, o relaciones inferiores marcan abundancia en fuentes de fosfato o deficiencias

en nitrógeno. Al analizar la relación nitrógeno - fósforo en los efluentes sin tratar y en los tratados, se puede apreciar que para todos los casos la relación nitrógeno - fósforo es muy superior a 2, lo que representa un desbalance en los requerimientos nutricionales ideales de estos dos elementos en el alga que puede afectarla. La población algal al inicio de los bioensayos (200 a 300 x 10⁴ células / ml) requería 0,3 mg de fósforo y 0,6 mg de nitrógeno. En 10 ml de agua tratada anaerobiamente (unidad experimental), el nitrógeno era aproximadamente 1,84 mg y el fósforo 0,04 mg, lo cual indica que existía una deficiencia de fósforo en este efluente, con un aporte nutricional de este elemento 10 veces menor. Debido a la importancia de este elemento se pudieron generar efectos en el alga afectándose la consecución de fósforo elemento para el protoplasma.

En la Tabla 6 se resumen las concentraciones letales medias y efectivas medias de los efluentes del beneficio húmedo del café en los tres bioindicadores, donde se muestra que el pez fue el organismo más sensible frente a todos los efluentes y el alga fue el organismo más resistente. Se observa que con respecto al drenado, el alga es 1,7 veces más resistente que el pez, en tanto que el microcrustáceo es 1,3 veces más resistente; en el caso del mucílago de café *Chlorella vulgaris* y *Daphnia pulex* son igualmente resistentes, mientras *Lebistes reticulatus* es 1,5 veces más sensible que éstos. Con respecto a las aguas del lavado de café el alga es 1,25 veces más resistente que el microcrustáceo, y este a su vez es 1,25 veces más resistente que el pez. Finalmente en las aguas tratadas el pez es 1,8 veces más sensible que el alga y el microcrustáceo

Además de la carga orgánica, en los resultados del análisis de componentes principales (Figura 5), en el cual se analizaron los componentes bióticos y abióticos, se observa cómo los parámetros fisicoquímicos principales de cada efluente del beneficio húmedo del café

Tabla 6. Concentración efectiva media y letal media de demanda química de oxígeno (DQO) de los efluentes del beneficio húmedo del café en *Chlorella vulgaris*, *Daphnia pulex* y *Lebistes reticulatus* a las 96 horas. Cenicafé. 1996

EFLUENTE	BIOINDICADOR		
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Daphnia pulex</i>	<i>Lebistes reticulatus</i>
Drenado de la pulpa y del mucilago de café	495 ppm	390 ppm	290 ppm
Mucilago de café	500 ppm	480 ppm	320 ppm
Aguas del lavado de café	600 ppm	480 ppm	380 ppm
Aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente	890 ppm	700 ppm	490 ppm

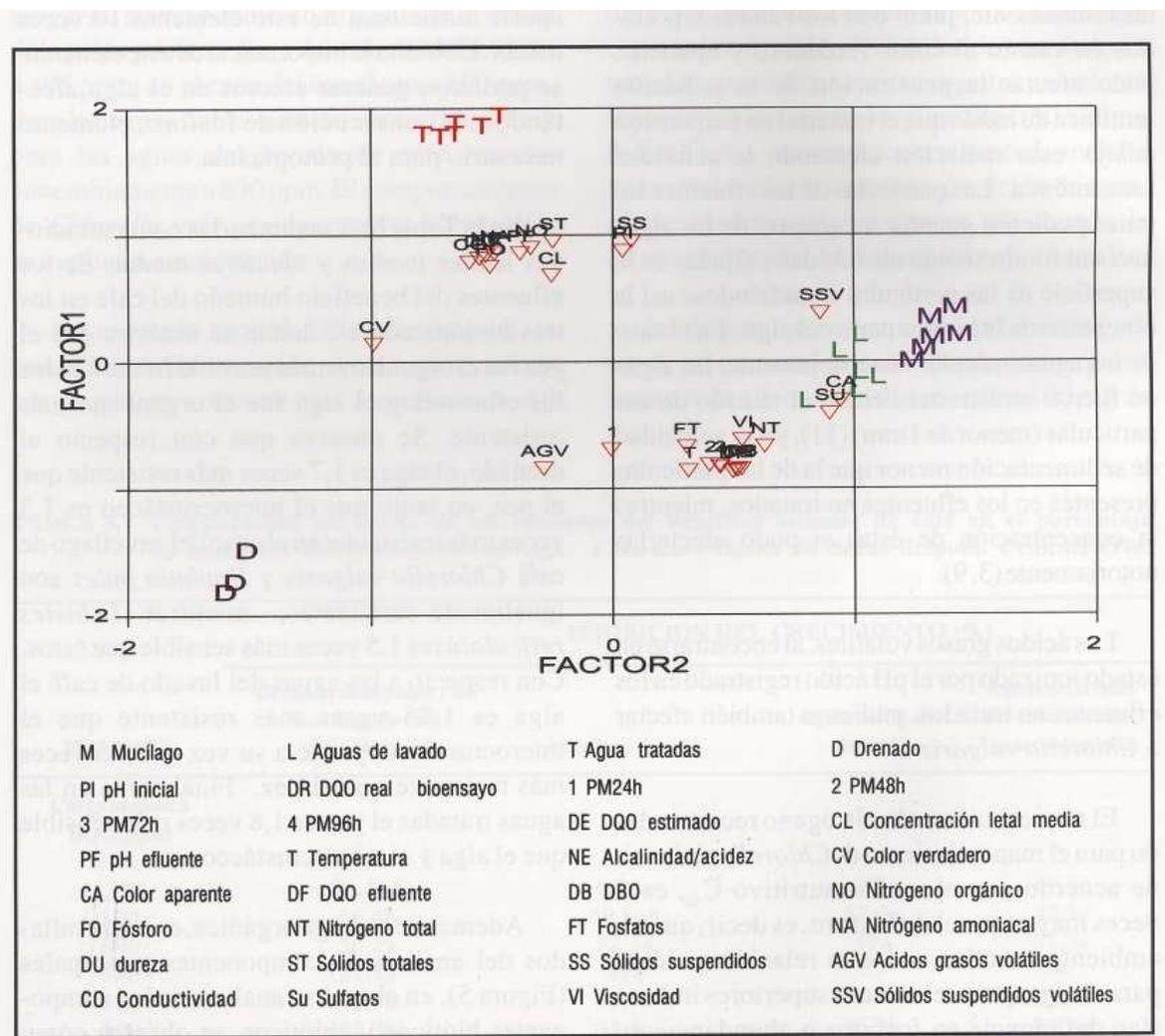


Figura 5. Análisis de componentes bióticos y abióticos en el estudio del impacto biológico por los efluentes del beneficio húmedo de café. (Análisis de componentes principales). Cenicafé. 1996.

que contribuyen a causar impacto biológico en *Daphnia pulex*, *Lebistes reticulatus* y *Chlorella vulgaris*, son: en el caso drenado, su composición, la acidez, el pH y los ácidos grasos volátiles; para el mucílago, el pH y la acidez, así como los sólidos suspendidos volátiles y la viscosidad, igualmente para las aguas del lavado de café su acidez, pH, sólidos suspendidos volátiles y los ácidos grasos volátiles y finalmente en el caso de las aguas tratadas, los factores más importantes que contribuyen a causar impacto son los sólidos totales y suspendidos y el nitrógeno amoniacal.

Una posible alternativa para minimizar el impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo de café y no afectar a la comunidad de peces, fito y zooplancton, consistiría en diluir cada efluente dependiendo de su toxicidad, lo cual sería ilógico y poco viable debido a que como se observa en la Figura 6 se requeriría de factores de dilución de 6 a 375, sobretodo para el caso del mucílago de café y el drenado (BECOLSUB), para los cuales y debido a su alta carga orgánica, se necesitaría diluir 30 a 38 veces más que a las aguas de lavado de café tratadas anaerobiamente, lo cual implicaría uso excesivo del recurso hídrico.

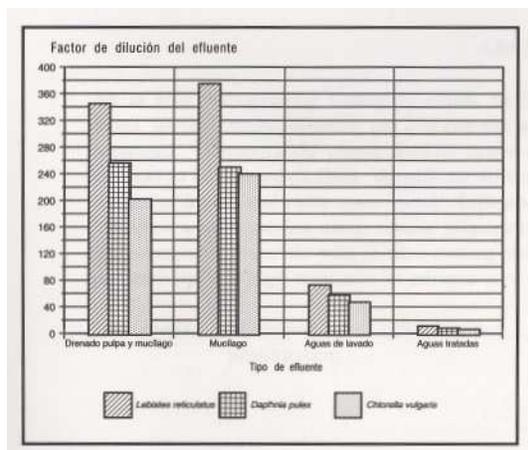


Figura 6. Factores de dilución para los efluentes del beneficio húmedo del café para minimizar el impacto biológico en el ecosistema acuático. Cenicafé. 1996.

Considerando que tanto los efluentes del beneficio húmedo de café tratados y sin tartar anerobiamente generan efectos tóxicos sobre la vida y dado que el drenado proveniente del módulo BECOLSUB y el mucílago de café concentrado generaron los efectos más drásticos se sugiere que estos efluentes deben ser tratados antes de ser vertidos a los cuerpos de agua. De otra parte aunque las aguas del lavado de café tratadas anaerobiamente cumplen con las exigencias hechas por el Decreto Colombiano 1594 de 1984 también generan impacto biológico en la mortalidad de los peces, los microcrustáceos y el crecimiento de las algas, deduciéndose que los efluentes provenientes del Sistema Modular de Tratamiento Anaerobio, deben ser sometidos a postratamientos, para disminuir los sólidos, el nitrógeno amoniacal, la alcalinidad y la dureza, disminuyendo así su toxicidad para los sistemas acuáticos.

Finalmente se sugiere como medida preventiva antes de vertir cualquier efluente del beneficio húmedo de café al ecosistema acuático, hacer un estudio preliminar del caudal de la cuenca en relación con la frecuencia y el volumen de agua a vertir por la finca cafetera.

LITERATURA CITADA

1. ALVAREZ G., J. Despulpado de café sin agua. Avances Técnicos Cenicafé No. 164: 1-6. 1991.
2. APHA, AWWA, WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid, Ediciones Díaz de Santos. 1992. 1914 p.
3. BRANCO, M. S. Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales. Washington. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional del Desarrollo Científico y Tecnológico. 1994. 120 p. (Monografía No. 28).
4. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ - CENICAFE. CHINCHINA. COLOMBIA. Anuario Meteorológico 1993. Chinchiná, Cenicafé, 1994. 457 p.

5. FIELD, J. Aguas Residuales del Café. In: MANUAL del Curso de arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodos -UASB-. Santiago de Cali, 1987. p. H1-H11.
6. ISAZA H., J.D. Manual de laboratorio sobre biodigestión anaerobia. Chinchiná, Cenicafé. 1.995. 58 p. (Mecanografiado).
7. JENKINS, S.R.; MORGAN, J.M.; SAWYER, C.L. Monitoring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. Journal of Water Pollution Contamination Fed. 55 (5): 448-453. 1983.
8. JENSEN, A.M.; SALISBURY, F.B. Botánica. 2 ed. México, Mc Graw Hill, 1.988. p. 495-497.
9. ODUM, E. P. Ecología. 3 ed. México, Interamericana, 1971. 569 p. 10. ORTIZ, E. E. S.; HERNANDEZ, P. E.; ZARVALA, V. A.; HERNANDEZ, G. J.; CRUZ, S. F. Manual de bioensayos con microorganismos Cladóceros (*Daphnia magna* straus). México, CEPIS. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, 1987. 46 p.
11. RODRIGUEZ V., N. Metanogénesis de las aguas residuales del proceso del beneficio húmedo del café. Producción y manejo de lodos. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ - CENICAFÉ. Informe anual de actividades de la disciplina de Química Industrial 1995 - 1996. Chinchiná, Cenicafé, 1996. (Mecanografiado).
12. STERBA, G. Freshwater fishes of the world. T. F. H Publications, Inglaterra. 1.973. p. 568-571.
13. STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. Zoología general. 6 ed. Barcelona. Omega . 1982. p 439 - 695.
14. TORTORELLI, M. C.; DI MARZIO, W.; SAENZ, M. E.; ALBERDI, J. L. Curso de postgrado: Ensayos toxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Buenos Aires, 1990. s.p.
15. UGRINOVITS, M. Kjeldhal Nitrogen determination with various catalyts. Internacional Laboratory, 1.982. s. p.
16. VILLEE, C. A.; SOLOMON, E. P.; MARTIN, CH. E.; MARTIN, D. W.; BERG, L. R.; DAVIS, P. W. Biología. 2 ed. Mexico. Interamericana-Mc.Graw Hill, 1992. 1188 p.
17. WILSON, C. L.; LOOMIS, E. W. Botánica . México, UTEHA, 1982. p. 422-430. 18. ZAMBRANO F., D. A. Fermente y lave su café en el tanque tina. Avances Técnicos Cenicafé No. 197: 1-8. 1993
19. ZAMBRANO F., D. A.; ISAZA H. J. D. Lavado de café en los tanques de fermentación. Cenicafé 45 (3): 106-118. 1993.
20. ZEGERS, F. Microbiología. In: MANUAL del curso de arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo -UASB-. Santiago de Cali , 1987. p A-1-A-14.