

## Discoloration of wastewater from a paint industry by the microalgae *Chlorella* sp

### Decoloración de aguas residuales de una industria de pinturas por la microalga *Chlorella* sp

Edgardo Angulo M<sup>1\*</sup> M.Sc, Grey Castellar O<sup>2</sup> M.Sc,  
Ma Mercedes Cely B<sup>3</sup> Ph.D, Lilia Ibáñez S<sup>1</sup> Qco, Lidys Prasca M<sup>1</sup> Qco.

<sup>1</sup>Universidad del Atlántico, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biotecnología de Microalgas, Físicoquímica Aplicada y Estudios Ambientales, Puerto Colombia Km 7 Old Road, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma del Caribe, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ciencias Básicas, Grupo Interdisciplinario de Investigación en Energía y Medio Ambiente. <sup>3</sup>Universidad Autónoma del Caribe, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Mecánica, Grupo de Investigación en Materiales, Procesos y Tecnologías de Fabricación, 46-112 90th Street, Barranquilla, Colombia. \*Correspondence: [edgangulo20@gmail.com](mailto:edgangulo20@gmail.com)

Received: June 2016; Accepted: February 2017.

#### ABSTRACT

**Objective.** Decoloring wastewater from a paint factory making use of *Chlorella* sp., microalgae as a biological way of treatment. **Materials and methods.** Samples of this microalgae previously cultivated with nourishing fertilizer under photoperiods of light and darkness were taken to test the microalgae *Chlorella* sp., initial concentration effect in the bioremoval process. For this purpose, it was cultivated in 0.10, 0.20 and 0.30 units of absorbance in bioreactors with 200 mL wastewater with and without nutrients. The biotest with the best rate of colour removal was chosen and the DBO5 and DQO were marked out. The immobilized *Chlorella* sp., in kappa carrageenan was also tested. **Results.** In the tests colour decrease percentage were 81.7, 69.7 and 58.3% without nutrients in the initial concentrations of 0.10, 0.20 and 0.30 units of absorbance respectively and 72.6, 69.0 and 86.8% for 0.10, 0.20 and 0.30 units of absorbance with nutrients respectively in the day of maximum growth. The immobilized microalgae score were 72.60% and 78.36% of color removal for 0.4 and 1.6 units of absorbance respectively. The higher colour removal test score was that with nutrients at 0.30 units of absorbance with several changes in DBO5 and DQO values. **Conclusion.** The biological wastewater treatment making use of *Chlorella* sp., microalgae can be considered as an effective choice in decolorating wastewater.

**Keywords:** Absorbance, biodegradation, biotest (Source: AGROVOC).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Decolorar aguas residuales obtenidas de una empresa de pinturas, empleando la microalga *Chlorella* sp., como medio biológico de tratamiento. **Materiales y métodos.** Muestras de la microalga previamente cultivada con fertilizante como nutriente y fotoperiodos de luz y oscuridad, se tomaron para evaluar el efecto de la concentración inicial de la microalga *Chlorella* sp., en el proceso de bioremoción. Para tal fin, esta se cultivó a 0.10, 0.20 y 0.30 unidades de absorbancia en biorreactores con 200 mL

de aguas residuales en presencia y ausencia de nutrientes. Se seleccionó el bioensayo con mejores porcentajes de remoción del color y se le determinó el DBO<sub>5</sub> y DQO. *Chlorella* sp., inmovilizada en kappa carragenina también se estudió. **Resultados.** Los porcentajes de reducción de color de los bioensayos en ausencia de nutrientes fueron de 81.7, 69.7 y 58.3% para las concentraciones iniciales de 0.10, 0.20 y 0.30 unidades de absorbancia respectivamente y en presencia de nutrientes fueron 72.6, 69.0 y 86.8% para 0.10, 0.20 y 0.30 unidades de absorbancia respectivamente, en el día de máximo crecimiento. Los resultados de la microalga inmovilizada fueron de 72.60% y 78.36% de remoción del color para 0.4 y 1.6 unidades de absorbancia respectivamente. El bioensayo con mayor rendimiento de remoción fue el realizado en presencia de nutrientes a 0.30 unidades de absorbancia con cambios importantes en los valores de DBO<sub>5</sub> y DQO. **Conclusión.** El tratamiento biológico de aguas empleando la microalga *Chlorella* sp., puede considerarse una alternativa eficaz en la decoloración de aguas residuales.

**Palabras clave:** biodegradación, absorbancia, bioensayo (Fuente: AGROVOC)

## INTRODUCTION

Worldwide quality in natural resources has been suffering a growing spoiling nowadays specially in water resources because of the effusion of huge amount of home and industrial debris into them under the race of development. Among those debris commonly found in water bodies, paint industry waste is mostly effused. Wastewater resulting from these processes have an opposite impact in terms of Total Organic Carbon (TOC), hanged up solids, salt level, color in a wide range of pH and organic recalcitrant compound such as colorants "azo". The relation DBO/DQO in the rank between 0.2 to 0.5 indicates that these affluents have a great amount of organic material non biodegradable (1). Though pigments or colorific make the world glower, at the same time it is a serious problem both biological and aesthetical as well, because of water coloration and changes or stopping photosynthesis process in the water ecosystem. Pigments in water or stain is the most obvious and common pollutants gauge and, effusion with high synthetic concentration of dye may cause a great damage to water bodies because of toxic compounds, mutagenic or carcinogenic (1,2,3), so it is necessary to treat all debris before effusion.

Pigments removal in wastewater has been a very great challenge for a long time trying to find both a cheaper and effective treatment (4). Some of these substances can stand biodegradation or changes because they are xenobiotic compounds in nature; there are very versatile microorganisms with a typical or distinctive metabolic system, which let them biodegradation these compounds bringing out decoloration and mineralization of them; Due to this, in recent years biotechnology is being used as an applied science for wastewater treatment of this kind (4,5), because they are environment friendly, they produce lower sludges at a lower cost (1). In this way, microalgae are a good option for dyed wastewater bioremediation (6).

## INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo se ha observado un deterioro creciente en la calidad de los recursos naturales, esencialmente en los cuerpos de agua, debido a los vertimientos de grandes cantidades de desechos industriales y domésticos por el hombre, en su afán de desarrollo. Entre los muchos desechos industriales que se pueden encontrar en los cuerpos de agua, están los derivados de las empresas que tienen como actividad económica la producción de pinturas. Las aguas residuales resultantes de estos procesos tienen un impacto adverso en términos del Carbono Orgánico Total (COT), sólidos suspendidos, salinidad, color en un amplio rango de pH y los compuestos orgánicos recalcitrantes, tales como los colorantes "azo". La relación de DBO/DQO en el rango entre 0.2 a 0.5 indica que estos afluentes contienen una gran proporción de materia orgánica no biodegradable (1). Aunque los colorantes hacen que el mundo luzca más hermoso, a la vez representan serios problemas, tanto estéticos debido a la coloración, como biológicos; interrumpiendo o alterando los procesos fotosintéticos del ecosistema acuático. El color es uno de los indicadores más evidentes de la contaminación del agua, y la descarga de efluentes con alta concentración de colorantes sintéticos causa gran daño a los cuerpos receptores de agua por sus características de compuestos tóxicos, mutagénicos o carcinógenos (1,2,3), por lo cual, es necesario tratar los desechos antes de ser vertidos.

La remoción de colorantes en aguas residuales ha sido un gran desafío por muchos años, tratando de buscar un tratamiento económico y atractivo que pueda ser efectivo (4). Algunas de estas sustancias pueden resistir la biodegradación por ser compuestos xenobióticos para la naturaleza; sin embargo, existen microorganismos muy versátiles, con un sistema metabólico característico, el cual les permite la biodegradación de estos compuestos produciendo en consecuencia la decoloración y mineralización de estas sustancias; debido a esto, en los últimos años se ha hecho

The decoloration mechanism with algae may include adsorption, enzymatic degradation or a combination of both (7). The capacity of biosorption is attributed to its high surface area and its great affinity for bond (8,9). Functional groups such as hydroxyls, carboxylates, amines and phosphates in the cell surface are considered as direct responsible by means of electrostatic attraction and complexation, to remove pollutants from wastewater (4, 10). Unlike bacteria, algae can degrade colorants "azo" through azoreductase that starts breaking the "azo" bond, producing aromatic amines (1, 11-13). Oxidative enzymes also play part in this decoloration process (13).

Many species of microalgae such as *Chlorella* sp. (14), *Scenedesmus* sp., or *Desmodesmus* sp. (15, 16), *Neochloris* sp., *Chlamydomonas* sp. (17), *Nitzschia* sp., and *Cosmarium* sp. (18), have been used for many water treatments close to biodiesel production under controlled sterilized and non-sterilized conditions. Species like *Chlorella*, *Scenedesmus*, and some cyanobacteria are the most used because their high growing speed, high tolerance to environment and their high capacity of amassing lipids/starch (14, 19). On the other side, *Chlorella* sp., is widely used in wastewater treatments because of its better capacity of nitrogen, phosphorus removal and chemical oxygen demand (COD) (20).

This research tested the *Chlorella* sp., live microalgae capacity to treat decoloration biologically in wastewater from a paint factory in Barranquilla (Colombia), changing the initial concentration of microalgae, in absence or not of nutrients and the effect when it is immobilized.

## MATERIALS AND METHODS

***Chlorella* sp., growth.** Microalgae used in this research was supplied by Photosynthetic Microorganism Laboratory from the Zulia University, Maracaibo (Venezuela). It was made a "stock" cultivating activity during a 15 days period time using a complex fertilizer NPK "Nutrifoliar" (Colinagro, Bogotá, Colombia), of composition: nitrogen total (200 g/L), P<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100 g/L), K<sub>2</sub>O (50 g/L), MgO (10 g/L), S (14 g/L), B (1.5 g/L), Cu (2.5 g/L), Fe (1.0 g/L), Mn (1.0 g/L), Mo (0.03 g/L) y Zn (5.0 g/L); diluting 25 mL up to a volume of 500 mL with sterile water. This solution supplies both essential macro and micronutrients for a normal cell grow. To let microalgae grow 14 mL of the cultivated medium was placed inside a

uso de la biotecnología como ciencia aplicada a los tratamientos de aguas residuales de este tipo (4,5), pues son amigables con el medio ambiente, producen pocos lodos y no son tan costosos (1). En este sentido, las microalgas son una buena opción para la bioremediación de aguas residuales coloreadas (6).

Los mecanismos de decoloración con algas pueden incluir adsorción, degradación enzimática o una combinación de ambos (7). La capacidad de biosorción se atribuye a su relativa alta área superficial y su gran afinidad de enlace (8,9). Grupos funcionales tales como hidroxilos, carboxilatos, aminas y fosfatos que se encuentran en la superficie de la pared celular son considerados los responsables mediante atracción electrostática y complejación, de retirar los contaminantes de las aguas residuales (4,10). Al igual que las bacterias, las algas son capaces de degradar colorantes "azo" a través de la azoreductasa que inicia el rompimiento del enlace "azo", resultando en la formación de aminas aromáticas (1,11-13). Enzimas oxidativas también están involucradas en los procesos de decoloración (13).

Varias especies de microalgas, tales como *Chlorella* sp. (14), *Scenedesmus* sp., o *Desmodesmus* sp. (15, 16), *Neochloris* sp., *Chlamydomonas* sp. (17), *Nitzschia* sp., y *Cosmarium* sp. (18), se han usado para varios tipos de tratamientos de agua acoplado con la producción de biodiesel bajo condiciones esterilizadas o no esterilizadas. Especies como *Chlorella*, *Scenedesmus*, y algunas cianobacterias son las más empleadas debido a su alta velocidad de crecimiento, alta tolerancia al medio ambiente y su alto potencial de acumulación de lípidos/almidón (14, 19). Por otro lado, *Chlorella* sp., es ampliamente aplicada en el tratamiento de agua residual debido a su mejor capacidad para remover nitrógeno, fósforo y demanda química de oxígeno (DQO) (20).

Esta investigación evaluó la capacidad de la microalga *Chlorella* sp., viva como tratamiento biológico en la decoloración de aguas residuales procedente de una empresa de pinturas ubicada en la ciudad de Barranquilla (Colombia), modificando la concentración inicial de microalga, la presencia o no de nutrientes y su efecto cuando se encuentra inmovilizada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Crecimiento de *Chlorella* sp.** La microalga utilizada en este estudio fue suministrada por el Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela). Se realizó un cultivo "stock" durante un período de 15

bioreactor in order to get a final concentration of 4 mM of nitrogen (21). Microalgae growth was tested during these days measuring chlorophyll absorbance at a wavelength ( $\lambda$ ) 665 nm (22). Inoculation of microalgae *Chlorella* sp., was developed in glass bioreactors under sterile conditions at a temperature from  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , in light photoperiods day/night of 12 hours with airing and continuous shaking at a flow of 1 mL/min using oxygen pumps made ac-1500, following the methodology described by Steffan et al (23).

Inoculums used are based on the normal behavior of a curve of growing for microorganism which indicates different adaptation phases, growing, stationary and death.

**Wastewater sample.** Wastewater sample was taken at the final effusion point at the paint factory and bottled in a plastic container. Sample was ready for biotests without any later treatment.

**Biotests with live microalgae *Chlorella* sp., in suspension.** In different previously sterilized 250 mL capacity glass bottles it was filled separately 200 mL of wastewater and 14 mL microalgae biomass at 0.10, 0.20, and 0.30 units of absorbance measured at a wave length  $\lambda = 665$  nm (22), with and without nutrients, at a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , with a smooth shaking, making use of air pumps and photoperiods of time day/night of 12 hours. At the same time a growth control was taken to *Chlorella* sp., cultivation in sterile medium at the same absorbance values as biotested in wastewater.

At the end of these biotests aliquots samples were taken from bioreactors, then centrifuged at 3500 rpm for 7 minutes. From the overflowing liquid, absorbance was measured by spectrophotometry and calculated the rate of colorific removed, replacing values in equation 1 (24, 25):

$$\text{Decoloration percentage (\%)} = \frac{A_o - A_e}{A_o} * 100$$

Whereas  $A_o$  is the initial absorbance of the medium and  $A_e$  is absorbance in decolorated medium.

The calibration curve used consisted in relating the concentration of different dilutions wastewater without treatment volume/volume percentage and their respectively absorbance.

Analysis of  $\text{DBO}_5$  and DQO were made according to Standard Methods methodology, method 5210B ( $\text{DBO}_5$ ) and 5220D (DQO) only to that

días usando fertilizante complejo NPK "Nutrifoliar" (Colinagro, Bogotá, Colombia), de composición: nitrógeno total (200 g/L),  $\text{P}_2\text{O}_3$  (100 g/L),  $\text{K}_2\text{O}$  (50 g/L), MgO (10 g/L), S (14 g/L), B (1.5 g/L), Cu (2.5 g/L), Fe (1.0 g/L), Mn (1.0 g/L), Mo (0.03 g/L) y Zn (5.0 g/L); diluyendo 25 mL hasta un volumen de 500 mL con agua estéril. Esta solución suministra los macro y micronutrientes necesarios para un normal crecimiento celular. Para el crecimiento de la microalga se colocó en un biorreactor, 14 mL del medio de cultivo para una concentración final de 4 mM de nitrógeno (21). Durante estos días se evaluó el crecimiento de la microalga midiendo la absorbancia de la clorofila a una longitud de onda ( $\lambda$ ) igual a 665 nm (22). La inoculación de la microalga *Chlorella* sp., se llevó a cabo en biorreactores de vidrio en condiciones estériles a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con fotoperiodos de luz día/noche de 12 h, con aireación y agitación continua a un flujo de 1 mL/min empleando bombas de oxígeno marca ac-1500, siguiendo la metodología descrita por Steffan et al (23).

Los inóculos que se utilizaron están basados en el comportamiento normal de una curva de crecimiento para microorganismos, las cuales presentan las diferentes fases de adaptación, crecimiento, estacionaria y muerte.

**Muestra del agua residual.** La muestra de agua residual fue colectada en el punto de vertimiento final de la industria de pinturas y envasada en un depósito plástico. La muestra fue dispuesta para los bioensayos sin ningún tipo de tratamiento posterior.

**Bioensayos con *Chlorella* sp., viva en suspensión.** En diferentes frascos de vidrio de 250 mL de capacidad previamente esterilizados y por separado, se colocó 200 mL de agua residual y 14 mL de biomasa algal a 0.10, 0.20 y 0.30 unidades de absorbancia medidos a una  $\lambda$  igual a 665 nm (22), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con agitación constante a través de bombas de aire y fotoperiodos de luz día/noche de 12 horas. Simultáneamente se realizó un control de crecimiento con un cultivo de *Chlorella* sp., en un medio estéril a los mismos valores de absorbancia de los bioensayos con agua residual.

Finalizados los bioensayos se tomaron alícuotas de los biorreactores, luego se centrifugación a 3500 rpm por 7 minutos. Del sobrenadante se midió su absorbancia por espectrofotometría y se calculó el porcentaje de colorante removido, reemplazando los valores correspondientes en la ecuación 1 (24,25):

$$\text{Porcentaje de decoloración(\%)} = \frac{A_o - A_e}{A_o} * 100$$

bio-test that recorded a higher decoloration percentage.

#### Analysis of results by analytical techniques.

*Chlorella* sp., growth was tested through absorbance measured as  $\lambda_{\text{máx}} = 665$  nm conformable to chlorophyll absorption (22), making use of a UV-Vis spectrophotometer model LKB ultrospec II with a fixed  $\lambda$  (Biochrom Ltd. Cambridge, Great Britain). Concentration of dye wastewater samples was determined at  $\lambda_{\text{máx}} = 514$  nm obtained by scanning in a range between 200 and 750 nm.

#### Biotests with immobilized *Chlorella* sp.

The immobilization of the microalga was carried out by the ion exchange gelation process, consisting of the dropwise addition of kappa carrageenan (Sigma, St Louis, MO) dissolved in a 2% KCl solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to live microalgae *Chlorella* sp., in suspension, at a concentration percentage of 0.66% m/m in order to get it encapsulated and immobilized. The relation used was 1 g of microalgae live in suspension by mL of kappa carrageenan (26, 27).

All biotests were developed three times under the same laboratory conditions.

## RESULTS

In the growth curve of *Chlorella* sp., (Figure 1a) you can see a linear behavior until day six with absorbance of 0.7. Thereafter you can see a slightly smooth growth from day six till day ten, which is the maximum absorbance with a value of 0.8 and, at the end, it begins a smooth slope that belongs to the same microalgae death phase later.

Donde es la absorbancia inicial del medio y es la absorbancia del medio decolorizado.

La curva de calibración empleada consistió en relacionar la concentración de diferentes diluciones del agua residual sin tratar en porcentaje volumen/volumen y su respectiva absorbancia.

Se realizaron análisis de DBO<sub>5</sub> y DQO según la metodología del Standard Methods, método 5210B (DBO<sub>5</sub>) y 5220D (DQO) sólo al bioensayo que registró el mayor porcentaje de decoloración.

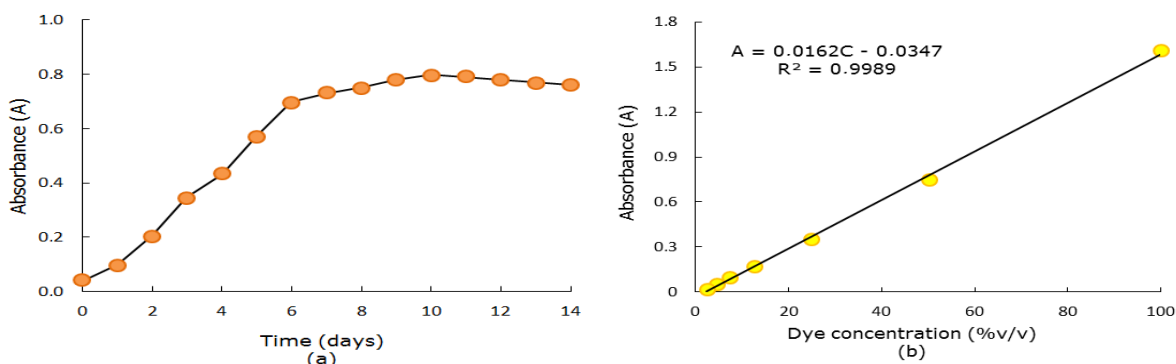
#### Análisis de los resultados por técnicas analíticas.

El crecimiento de *Chlorella* sp., se evaluó mediante la absorbancia medidas a  $\lambda_{\text{máx}} = 665$  nm correspondiente a la absorción de la clorofila (22), empleando un espectrofotómetro de UV-Vis modelo LKB ultrospec II de  $\lambda$  fija (Biochrom Ltda. Cambridge, Gran Bretaña). La concentración de las muestras de agua residual coloreada se determinó a  $\lambda_{\text{máx}} = 514$  nm obtenida al hacer un barrido en un rango entre 200 y 750 nm.

#### Bioensayos con *Chlorella* sp., inmovilizada.

La inmovilización de la microalga se realizó mediante el proceso de gelación con intercambio iónico, que consiste en la adición por goteo de la kappa carragenina (Sigma, St Louis, MO) disuelta en una disolución al 2% de KCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a la microalga *Chlorella* sp., viva en suspensión a una concentración de 0.66% m/m, de manera que quedara encapsulada e inmovilizada. La relación empleada fue de 1 g de microalga viva en suspensión por mL de kappa carragenina (26,27).

Todos los bioensayos se realizaron por triplicado y se trabajaron a las mismas condiciones de laboratorio.



**Figure 1.** (a) Growth curve of microalgae *Chlorella* sp. (b) Calibration curve between absorbance and concentration in %v/v from dye wastewater dilutes, measured in absorbancy ranks between 0.02 y 1.6.

Calibration curve that set the removal of dyes percentage values is shown in Figure 1b. Adjustments of experimental data to a straight line carried out a correlation coefficient of 0.998, which offers a direct dependency between absorbance and concentrations of prepared dilutions.

Daily tracing of biotest absorbance with live *Chlorella* sp., in suspension with nutrients under respective controls are shown in Figure 2a and, the values of maximum absorbance and decoloration percentages are shown in Table 1. The growth of microalgae *Chlorella* sp., in the controls show a typical behavior: you can see an adaptation phase, then a strong development of microalgae amount and then, a stability and decrease, not shown in Figure. Inoculating it into wastewater it stops growing and stabilizes its development, meanwhile it keeps growing in the controls.

With regard to results related to microalgae decolorated wastewater with nutrients are shown in Figure 2b. Absorbance values decrease in wastewater reflects the remotion process made by the microalgae day by day. Performing the mathematical calculations it yields the decoloration percentage at the maximum growth day (Table 1). The biotest with initial absorbance of 0.3 showed the best percentage exceeding 80% in the maximum growth day.

The results of the kinetic of growing of the microalgae and absorbance of wastewater without nutrients are shown in Figures 3a y b respectively and, in Table 2 decoloration percentages values are compiled. So absence of nutrients can affect

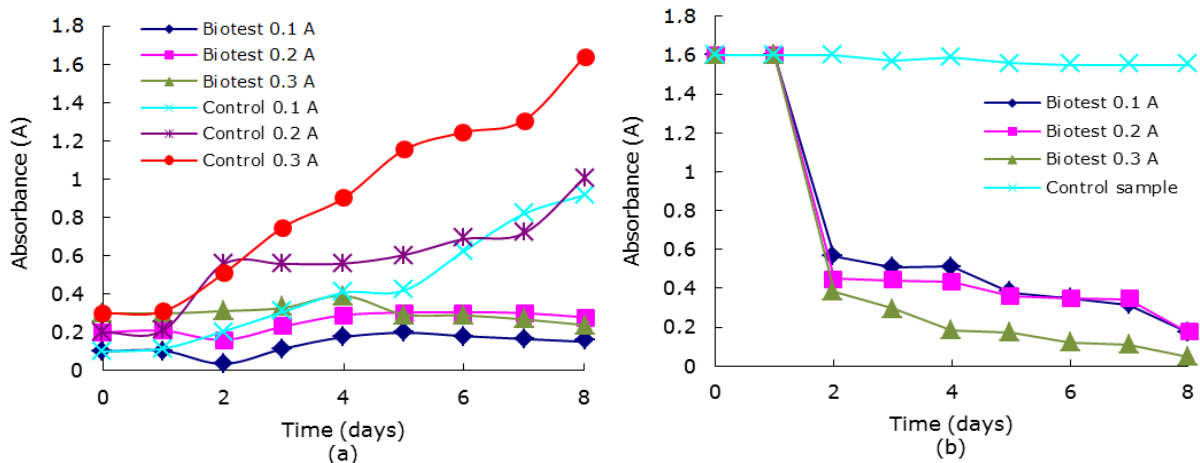
**RESULTADOS**

En la curva de crecimiento de la *Chlorella* sp., (Figura 1a) se observa un comportamiento lineal hasta el sexto día con una absorbancia de 0.7. Luego se nota un crecimiento ligeramente constante del sexto al décimo día, siendo este el día de máxima absorbancia con un valor de 0.8 y por último, comienza un suave declive que corresponde a la misma fase de muerte de la microalga en días posteriores.

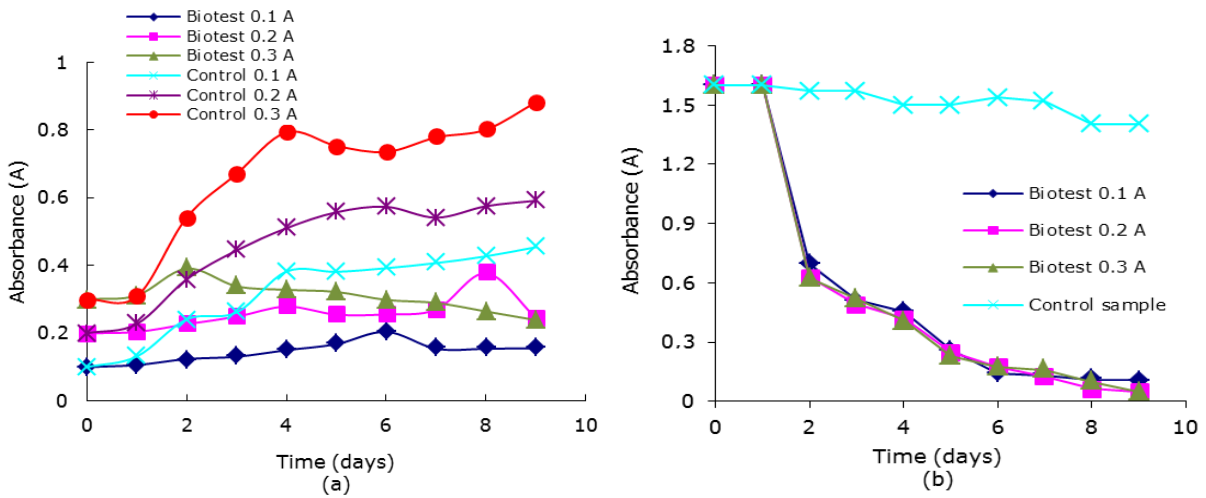
La curva de calibración que permitió establecer los valores de porcentaje de remoción del colorante se muestra en la Figura 1b. El ajuste de los datos experimentales a una línea recta reportó un coeficiente de correlación de 0.998, el cual ofrece una dependencia directa entre la absorbancia y las concentraciones de las diluciones preparadas.

El seguimiento diario de la absorbancia de los bioensayos con *Chlorella* sp., viva en suspensión en presencia de nutrientes con sus respectivos controles se muestran en la Figura 2a y, los valores de absorbancia máxima y porcentajes de decoloración están en la Tabla 1. El crecimiento de la microalga *Chlorella* sp., en los controles tiene un comportamiento típico: se observa la fase de adaptación, luego un desarrollo vertiginoso de la población algal y por último, la estabilización y decaimiento que no se muestran en la Figura. Al inocularla en aguas residuales se inhibe su crecimiento e incluso se estabiliza su desarrollo, mientras que en los controles sigue creciendo.

Con respecto a los resultados relacionados con la decoloración de las aguas residuales con microalga en presencia de nutrientes se muestran en la Figura



**Figure 2.** (a) Shows *Chlorella* sp., growth curve in wastewater with nutrients and their controls. (b) *Chlorella* sp., variation of absorbance in time with nutrients.



**Figure 3.** (a) *Chlorella sp.*, growth curve in wastewater without nutrients and its controls. (b) Variation of absorbance of *Chlorella sp.*, in time in wastewater without nutrients.

**Table 1.** *Chlorella sp.*, wastewater decoloration results with nutrients and its proper growth control.

Biotest of <i>Chlorella sp.</i> , with nutrients	Growth control		
	0.10	0.20	0.30
Initial absorbance (A)	0.10	0.20	0.30
Maximum absorbance (A)	0.20	0.30	0.39
Maximum growth day	5	6	4
Decoloration percentage during maximum growth day (%)	72.6	69.0	86.8

**Table 2.** Results of *Chlorella sp.*, decoloration in wastewater without nutrients and its proper growth control.

Biotest of <i>Chlorella sp.</i> , without nutrients	Growth control		
	0.10	0.20	0.30
Initial absorbance (A)	0.10	0.20	0.30
Maximum absorbance (A)	0.20	0.28	0.39
Maximum growth day	6	4	2
Decoloration percentage in the maximum growth day (%)	81.7	69.7	58.3

growth and therefore the process efficiency and biotest initial absorbance of 0.1 yielded the higher percentage in decoloration.

The Biotests making use of *Chlorella sp.*, in kappa carrageenan show higher percentage of biodegradation than those reported in suspension, but it spent more days to match those rates reported in the last day test (Table 3).

The experiments performed show that making use of live microalgae in suspension with nutrients with initial absorbance of 0.3 yields a higher percentage of remotion in the maximum absorbance, consequently, it was chosen in order to evaluate the process efficiency. Table 4 shows the results from analysis of DBO<sub>5</sub> and DQO for a liter of sample.

2b. La disminución de los valores de absorbancia del agua residual refleja el proceso de remoción que realiza la microalga al paso de los días. Realizando los cálculos matemáticos correspondientes se logra obtener el porcentaje de decoloración en el día de máximo crecimiento (Tabla 1). El bioensayo con absorbancia inicial de 0.3 reportó el mejor porcentaje superando el 80% en su día de máximo crecimiento.

Los resultados de la cinética de crecimiento de la microalga y la absorbancia de las aguas residuales en ausencia de nutrientes se muestran en las Figuras 3a y b respectivamente y, en la Tabla 2 se consignan los valores de los porcentajes de decoloración. Se observa que la ausencia de nutrientes afecta el crecimiento y en consecuencia el rendimiento del proceso, siendo el bioensayo con

**Table 3.** Results of immobilized *Chlorella* sp., decoloration of wastewater by kappa carrageenan.

Properties	Value	
Initial absorbance (A)	0.40	1.60
Average decoloration percentage (%)	72.60	78.40
Maximum growth day	5	4
Last day (11) decoloration percentage (%)	89.7	92.0

**Table 4.** Efficiency results of *Chlorella* sp., in decoloration of wastewater with nutrients.

Characteristic	Valor
Initial absorbance (A)	0.30
Maximum absorbance (A)	0.38
Maximum growth day	3
Live microalgae decoloration rate (%)	93.60
Dead microalgae decoloration rate (%)	94.34
Percentage of DQO removed (%)	84.80
Percentage of DBO <sub>5</sub> removed (%)	78.00

## DISCUSSION

In the curve of growth of *Chlorella* sp., there are four different phases from the parameters of evolution: the phase of adaptation to new ambient conditions, the phase of exponential or logarithmic, the stationary phase and at the end, the phase of dead. The phase of adaptation happened in a faster way because of the valuable contribution of macronutrients and oil elements supplied by fertilizer, and nitrogen was one of the most influencing elements in the microalgae biochemical structure and, after carbon, the great dry ingredient supplier to live cells. Also it is important to highlight air supplied to bioreactors that contains CO<sub>2</sub> from atmosphere (almost 0.03%), which is useful as a source of carbon. So thanks to this proper ambience there is an accelerated increase of exponential factor because of an accelerated increase of chlorophyll. Subsequently the stationary phase is shown nutrients became exhaust because of an increase of the population in the last phase and, therefore the dead phase because the growth decreases due to lower values of absorbance.

Comparing the growth curves of *Chlorella* sp., with nutrients in time with their own controls it can be seen a notorious decrease mainly in the

absorbancia inicial de 0.1 el que reportó el mayor porcentaje de decoloración.

Los bioensayos empleando *Chlorella* sp., inmovilizada en kappa carragenina muestran porcentajes de biodegradación más altos que los reportados en suspensión, pero demoró más días en igualar los porcentajes reportados como último día de experimentación (Tabla 3).

Los experimentos realizados muestran que los bioensayos empleando microalga viva en suspensión y en presencia de nutrientes con una absorbancia inicial de 0.3, arroja el mayor porcentaje de remoción en el día de máxima absorbancia, razón por la cual, se seleccionó para evaluar la eficiencia del proceso. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos de los análisis de DBO<sub>5</sub> y DQO para un litro de muestra.

## DISCUSIÓN

En la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp., se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros: la fase de adaptación a las nuevas condiciones ambientales, la fase exponencial o logarítmica, la fase estacionaria y por último, la fase de muerte. La fase de adaptación ocurrió de manera rápida debido al valioso aporte de los macronutrientes y oligoelementos suministrados por el fertilizante comercial siendo el nitrógeno uno de los elementos más influyentes en la composición bioquímica de la microalga, y después del carbono el de mayor contribución en la materia seca de las células vivas. También es importante señalar que el aire suministrado a los bioreactores contiene CO<sub>2</sub> atmosférico (aproximadamente 0.03%), el cual les sirve como fuente de carbono. Gracias a este ambiente apropiado sigue un crecimiento exponencial que se registra por un aumento acelerado en la formación de clorofila. Posteriormente se presenta la fase estacionaria debido al agotamiento de nutrientes producido por el aumento de la población en la fase anterior y, por último se presenta la fase de muerte con disminución del crecimiento representado con valores bajos de absorbancia.

Al comparar las curvas de crecimiento de la *Chlorella* sp., en presencia de nutrientes con sus respectivos controles, se observa una notoria disminución principalmente en la etapa logarítmica. Mientras los bioensayos de 0.1, 0.2 y 0.3 de absorbancia inicial llegan a alcanzar valores de 0.2, 0.3 y 0.39 de absorbancia máxima respectivamente, para los mismos días las lecturas de los controles fueron de 0.4, 0.6 y 1.2 con la tendencia de seguir aumentando. Estos resultados muestran la importancia del efecto de la luz en la productividad del cultivo. La presencia de colorantes disueltos



logarithmic phase. While biotests of 0.1, 0.2 and 0.3 of initial absorbance reached values of 0.2, 0.3 and 0.39 of maximum absorbance respectively, control readings taken the same days were 0.4, 0.6 y 1.2 following an increasingly tendency. This results show the importance of light effect in the cultivation. The presence of dissolved dyes in the water acts as xenobiotic compounds that may change microalgae metabolic process, greatly decreasing light penetration and consequently decreasing photosynthesis activities and the growth speed as well (3). Moreover, it's been reported that inhibition can be caused because by the interaction between dyes and *Chlorella* sp., cell walls changing its enzymatic activities (28). Same behavior is shown in tests without nutrients.

The very notorious difference among biotests with or without nutrients is plenty shown at controls. Maximum values of absorbance of 0.45, 0.59 y 0.88 (Table 2) compared to 0.92, 1.00 and 1.64 (Table 1), read at initial absorbencies of 0.1, 0.2 y 0.3 respectively, show a decrease. The absence of the necessary nutrients and the appropriate chemical conditions inhibit the growth of the microalga, being the nitrogen one of those determining elements. If there are lower levels of this element in the cultivating process it will decrease both the amount of protein in the cells and photosynthetic pigments that help cell to grow.

The removal of colour in wastewater was notorious in the first days of all biotests. Percentages of decoloration of 72.6, 69.0 and 86.8% with initial absorbance of 0.1, 0.2 and 0.3 respectively with nutrients, calculated during the maximum growth day, show the effectiveness of these biological treatments. Without nutrients, the percentages were 81.7, 69.7 and 58.3% for initial absorbencies of 0.1, 0.2 and 0.3 respectively. Previous studies have shown that the main mechanism used by the microalgae *Chlorella* sp., for the removal of colour is by biosorption. The cells surface show functional groups of carboxylates, amines, sulphates, phosphates and imidazoles associated to polysaccharides, proteins and alginic acid that allows make bond with pollutants (20). Both this characteristic and its great surface and faster growth make the algae great adsorbents. Also, it's very important to point those "azo" compounds as chromophorous groups of the colorants can be used by the algae as a unique source of carbon and nitrogen. In the reduction of these colorants by the algae, double bond "N=N" is broken by azoreductase enzyme producing aromatic amines (29, 30). Moreover,

en el agua actúan como compuestos xenobióticos que interfieren en el metabolismo de la microalga, reduciendo notablemente la penetración de la luz al medio y en consecuencia se disminuye la actividad fotosintética y la velocidad de crecimiento (3). Pero además, se ha reportado que esta inhibición puede ser causada por la interacción de los colorantes con las paredes de la célula de la *Chlorella* sp., interfiriendo en su actividad enzimática y celular (28). Igual comportamiento muestran los resultados de los bioensayos en ausencia de nutrientes.

La diferencia más notoria entre los bioensayos tanto en ausencia como en presencia de nutrientes se evidencia en los controles. Valores de absorbancia máxima de 0.45, 0.59 y 0.88 (Tabla 2) comparados con 0.92, 1.00 y 1.64 (Tabla 1), leídos a absorbancias iniciales de 0.1, 0.2 y 0.3 respectivamente, muestran una disminución. La ausencia de los nutrientes necesarios y las condiciones químicas adecuadas inhiben el crecimiento de la microalga, siendo el nitrógeno uno de esos elementos determinantes. Cuando existen niveles escasos de este elemento en el medio de cultivo ocurre un descenso en el contenido de proteína celular, pero además de los pigmentos fotosintéticos responsables del crecimiento.

La remoción de color de las aguas residuales fue evidente desde los primeros días en todos los bioensayos. Porcentajes de decoloración de 72.6, 69.0 y 86.8% con absorbancia inicial de 0.1, 0.2 y 0.3 respectivamente en presencia de nutrientes, calculados el día de máximo crecimiento, muestran la efectividad de estos tratamientos biológicos. En ausencia de nutrientes se obtuvieron porcentajes de 81.7, 69.7 y 58.3% para absorbancias iniciales de 0.1, 0.2 y 0.3 respectivamente. Estudios previos han mostrado que el principal mecanismo empleado por la microalga *Chlorella* sp., para la remoción del color es por biosorción. Las paredes celulares de las algas ofrecen grupos funcionales carboxilatos, aminas, sulfatos, fosfatos e imidazoles asociados a polisacáridos, proteínas y ácido algínico, lo cual permite formar enlaces con los contaminantes (20). Esta característica junto con su relativa alta área superficial y su rápido crecimiento hacen de las algas potenciales adsorbentes. Es importante también mencionar que los compuestos "azo" presentes como grupos cromóforos del colorante, pueden ser utilizados como única fuente de carbono y nitrógeno por las algas. En la reducción de estos colorantes por algas, el doble enlace "N=N" es roto por la enzima azoreductasa, derivándose de esa ruptura las aminas aromáticas (29, 30). Además, se encontró que las algas pueden utilizar las aminas aromáticas y llevarlas a mineralizar completamente. Cabe destacar que hasta los últimos días de la fase de declinamiento siguió un proceso de remoción por parte de la biomasa muerta, debido a la inhibición

it was found that algae can use aromatic amines and mineralize them completely. It is outlined till the last decline days there was a removing process used by the death biomass, because of photosynthesis inhibition. And finally, with a low percentage, roughly 0.34% belongs to colorant photodegradation as you could see the slightest change in absorbancy in the control samples from figures 2b and 3b. Although results show the best decoloration percentage obtained with initial absorbancy of 0.3 with nutrients (86.8%), we can suggest not to use it considering that the percentage of decoloration achieved without nutrients at an initial absorbancy of 0.1 was 81.7%.

Results in biotests with immobilized *Chlorella* sp., in kappa carrageenan showed a higher decoloration speed compared to those tested in suspension. From the second day of the experiments this behavior was evident, although the end it spent more days to percentage values of removal rates close to those obtained by the live microalgae in suspension such as in Table 3. Microalgae are autotrophs microorganisms that immobilised in kappa carrageenan depending on the position of bioreactor, some cells can remain exposed to gel surface, while others remain inside. This is the proper condition for photoinhibition and photolimitation respectively, decreasing anabolic activities. On the other side, it's important to note the effect of immobilization over colorant transportation speed in the gel due to resistance for diffusion.

The test of efficiency of *Chlorella* sp., as a biotechnological way for decolorating wastewater poured out from paint factories yielded values, before treatment of 543 and 2221.5 mg/L O<sub>2</sub> for DBO<sub>5</sub> and DQO respectively. Samples were taken at the final point of drain in the industrial process, not including water from daily human usage inside the factory. The difference among those values of DBO<sub>5</sub> and DQO is due to the great amount of biodegradable substances in the samples.

New data of DBO<sub>5</sub> and DQO were 340 and 118 mg/L of O<sub>2</sub> respectively, after treatment with microalgae. This shows a removal total percentage of the total organic load of 84.8% and 78% biodegraded material, calculated from initial to final values.

This research job allows us to come to the conclusion that treatment of coloured wastewater coming out from paint factories using microalgae *Chlorella* sp., depicts an efficient alternative method achieving a high percentage of removal.

de la fotosíntesis. Y por último, con un bajo porcentaje, aproximadamente del 0.34% se debe a la fotodegradación del colorante, como puede observarse en la leve modificación de la absorbancia en las muestras de control presentadas en las Figuras 2b y 3b. Aunque los resultados muestran que el mejor porcentaje de decoloración se obtuvo con absorbancia inicial de 0.3 en presencia de nutrientes (86.8%), podría sugerirse no usarlos considerando que el porcentaje de decoloración alcanzado sin nutrientes a absorbancia inicial de 0.1 fue del 81.7%.

Los resultados de los bioensayos con *Chlorella* sp., inmovilizada en kappa carragenina mostraron una rapidez de decoloración mayor en comparación con los realizados en suspensión. Desde el segundo día de los experimentos fue evidente este comportamiento, aunque al final empleó más días para lograr los valores de porcentaje de remoción cercanos a los obtenidos por la microalga viva en suspensión como se muestra en la Tabla 3. Las microalgas son microorganismos autótrofos y al inmovilizarlas en kappa carragenina dependiendo de la posición del bioreactor, algunas células quedarán expuestas a la superficie del gel, mientras que otras se ubicaran en su interior. Esta condición es propicia para que se presente fotoinhibición y fotolimitación respectivamente, disminuyendo la actividad anabólica. Por otro lado, es importante anotar el efecto de la inmovilización sobre la velocidad de transporte del colorante en el gel debido a la resistencia por difusión.

La evaluación de la eficiencia de la *Chlorella* sp., como medio biotecnológico para la decoloración de aguas residuales procedentes de la industria de pintura arrojó unos valores iniciales, es decir, antes de ser tratadas de 543 y 2221.5 mg/L O<sub>2</sub> para el DBO<sub>5</sub> y DQO respectivamente. Las muestras fueron tomadas en el punto de vertimiento final del proceso industrial, mas no incluyen las aguas de uso doméstico de la empresa. La diferencia entre los valores del DBO<sub>5</sub> y DQO se le atribuye a la gran cantidad de materia no biodegradable presente en las muestras.

Los nuevos datos de DBO<sub>5</sub> y DQO fueron de 340 y 118 mg/L de O<sub>2</sub> respectivamente, luego del tratamiento con la microalga. Esto muestra un porcentaje de remoción de la carga orgánica total del 84.8% y de material biodegradado del 78%, calculados a partir de los valores iniciales y finales.

Este trabajo de investigación permite concluir que el tratamiento de aguas residuales coloreadas procedentes de la industria de pinturas con la microalga *Chlorella* sp., representa un método alternativo eficiente, logrando altos porcentajes de remoción.

## REFERENCES

1. Solis M, Solis A, Perez HI, Manjarrez N, Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochem* 2012; 47(12):1723-1748.
2. Kurade MB, Waghmode TR, Khandare RV, Jeon B-H, Govindwar SP. Biodegradation and detoxification of textile dye Disperse Red 54 by *Brevibacillus laterosporus* and determination of its metabolic fate. *J Biosci Bioeng* 2016; 121(4):442-449.
3. Saroj S, Kumar K, Pareek N, Prasad R, Singh RP. Biodegradation of azo dyes Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. *Chemosphere* 2014; 107:240-248.
4. Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *J Environ Manage* 2010; 91(10):1915-1929.
5. Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeter Biodegr* 2007; 59(2):73-84.
6. Acuner E, Dilek FB. Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. *Process Biochem* 2004; 39(5):623-631.
7. Wu Y, Li T, Yang L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. *Bioresour Technol* 2012; 107:10-18.
8. Dönmez G, Aksu Z. Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochem* 2002; 38(5):751-762.
9. Tien C-J. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochem* 2002; 38(4):605-613.
10. Şatıroğlu N, Yalçınkaya Y, Denizli A, Arıca MY, Bektaş S, Genç Ö. Application of NaOH treated *Polyporus versicolor* for removal of divalent ions of group IIB elements from synthetic wastewater. *Process Biochem* 2002; 38(1):65-72.
11. El-Sheekh MM, Gharieb MM, Abou-El-Souod GW. Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *Int Biodeter Biodegr* 2009; 63 (6):699-704.
12. Omar HH. Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(10):1310-1316.
13. Priya B, Uma L, Ahamed AK, Subramanian G, Prabakaran D. Ability to use the diazo dye C. I. Acid Black 1 as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *Oscillatoria curviceps* BDU92191. *Bioresour Technol* 2011; 102(14):7218-7223.
14. Wang Y, Guo W, Yen HW, Ho SH, Lo YC, Cheng CL, Ren N, Chang JS. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresour Technol* 2015; 198:619-625.
15. Ji F, Liu Y, Hao R, Li G, Zhou Y, Dong R. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresour Technol* 2014; 161:200-207.
16. Martínez ME, Sánchez S, Jiménez JM, El Yousfi F, Muñoz L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol* 2000; 73(3):263-272.
17. Xiong J-Q, Kurade MB, Abou-Shanab RAI, Ji M-K, Choi J, Kim JO, Jeon B-H. Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresour Technol* 2016; 205:183-190.
18. Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee AR, Pourhassan M. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresour Technol* 2007; 98(6):1176-1182.
19. Kim H-C, Choi WJ, Chae AN, Park J, Kim HJ, Song KG. Evaluating integrated strategies for robust treatment of high saline piggy wastewater. *Water Res* 2016; 89:222-231.
20. Wang Y, Ho S-H, Cheng C-L, Guo W-Q, Nagarajan D, Ren N-Q, Lee D-J, Chang J-S. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresour Technol* 2016; 222:485-497

21. Angulo E, Castellar G, Morales E, Barrios M. Remoción de azul de metileno por la microalga *Chlorella* sp. *Viva*. *Prospect* 2012; 10(1):53-60.
22. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters*. 21 edition. American Public Health Association: Washington; 2005.
23. Steffan S, Bardi L, Marzona M. Azo dye biodegradation by Microbial cultures immobilized in alginate beads. *Environ Int* 2005; 31(2):201-205.
24. Wang X, Gai Z, Yu B, Feng J, Xu C, Yuan Y, Lin Z, Xu P. Degradation of carbazole by microbial cells immobilized in magnetic gellan gum gel beads. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(20):6421-6428.
25. Cheng Y, Lin H, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* C09V immobilized on PVA-sodium alginate-kaolin gel beads. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 83:108-114.
26. De-Bashan LE, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour Technol* 2010; 101(6):1611-1627.
27. Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa LG, Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresour Technol* 2010; 101(1):58-64.
28. Kalyani DC, Telke AA, Dhanve RS, Jadhav JP. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *J Hazard Mater* 2009; 163(2-3):735-742.
29. Tan L, Ning S, Zhang X, Shi S. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresour Technol* 2013; 138:307-313.
30. Dos Santos AB, Cervantes FJ, van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour Technol* 2007; 98(12):2369-2385.