

Estudios preliminares del tratamiento de efluentes urbanos con microalgas autóctonas

Andrea N. PILA ⁽¹⁾⁽²⁾, María C. CUELLO ⁽¹⁾, Eliana P. DAGNINO ⁽¹⁾⁽²⁾, Ester R. CHAMORRO ⁽¹⁾⁽²⁾

(1) Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Resistencia, Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica. French 404, Resistencia, Chaco, Argentina

(2) Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av Libertad 5460 Ed Física 1er piso, Corrientes, Argentina

E-mail de contacto: andreanatalia_87@hotmail.com.ar

Resumen. Las localidades del interior del país enfrentan una gran problemática debido a la falta de tratamiento de efluentes urbanos. La biorremediación de dichos efluentes con microalgas fotosintéticas es una tendencia en aumento a nivel mundial. El objetivo del presente trabajo fue analizar la viabilidad de realizar una biorremediación de efluentes cloacales de la localidad de General San Martín (Chaco) utilizando microalgas y, evaluar la posibilidad de hacer una biorrefinería.

El efluente utilizado fue recolectado de la localidad de General San Martín (Chaco). El cultivo se desarrolló a partir de una especie autóctona de microalga, identificada como *Chlorella sp.*, presente en el efluente cloacal crudo. El cultivo de microalgas en el efluente cloacal se llevó a cabo en fotobiorreactores cerrados de 6 L en condiciones ambientales a lo largo del año. El crecimiento se evaluó mediante recuento celular, monitoreando el crecimiento de protozoos y las condiciones de cultivo (pH, temperatura e irradiación). Al final del experimento, el cultivo de microalgas fue separado mediante decantación. El concentrado obtenido fue filtrado y luego secado en estufa de vacío a 60°C y 0,25atm de presión absoluta. La biomasa cosechada fue caracterizada mediante la determinación de lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas.

Los resultados obtenidos nos indicarían que es posible realizar el cultivo de microalgas en el efluente cloacal estudiado sin esterilizar ni diluir. Debido a la estabilidad que demostró frente a sus competidores biológicos, es posible pensar en su utilización como método de tratamiento. Los resultados indican que sería factible realizar el tratamiento a lo largo del año.

Palabras clave: Microalgas, Tratamiento, Efluente

1. Introducción

El constante crecimiento de la población genera como consecuencia directa un aumento de aguas residuales urbanas, éste es un problema creciente que plantea serios desafíos a los conglomerados urbanos más grandes de la provincia. Si además, tenemos en cuenta la ausencia o falta de eficiencia en los tratamientos de efluentes municipales en las localidades pequeñas del interior estamos frente a una problemática que es necesario abordar con urgencia.

La contaminación de los cuerpos de agua radica en la eutrofización, que es causada por la liberación de compuestos orgánicos e inorgánicos al medio (Lavoie & de la Noüe 1985, Rawat *et al.* 2011) con concentraciones de nitrógeno y fósforo que pueden alcanzar hasta 3 veces o más lo estipulados por las normas (Park *et al.* 2011a, Rawat *et al.* 2011).

La biorremediación con microalgas fotosintéticas es particularmente atractiva para estos casos, debido a las capacidades de estos organismos unicelulares, foto-autotróficos, para asimilar nitrógeno y fósforo, reducir la demanda de oxígeno químico y bioquímico y realizar una desinfección indirecta de microorganismos patógenos.

Las principales formas en las que el nitrógeno y el fósforo se encuentran en las aguas residuales son: NH_4^+ (amonio), NO_2^- (nitrito), NO_3^- (nitrato) y $(\text{PO}_4)^{3-}$ (ortofosfato), siendo su abundancia en los cursos de agua la causa principal de la eutrofización (Porta Díaz, 2005). Las microalgas consumen estos compuestos en forma de nutrientes que intervienen en su metabolismo (Dominic *et al.*, 2009)

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, capaces de consumir CO_2 del ambiente, elevando como consecuencia el pH por encima de 9 y aumentando la concentración de O_2 disuelto hasta lograr la saturación en algunos momentos del día, observándose una relación directamente proporcional a la intensidad de la radiación solar. Estos factores, combinados con la intensidad lumínica permitirían la desinfección indirecta del cultivo (Oswald, 1988; Chisti, 2007; González-López *et al.*, 2011).

El crecimiento algal y el consumo de nutrientes también depende de complejas interacciones entre factores físicos como el pH (Azov and Shelef, 1987; Darley, 1982), intensidad lumínica, temperatura (Talbot and de la Noue, 1993), y factores biológicos. Es por ello, que realizar el estudio de las condiciones óptimas de cultivo para cada efluente y zona geográfica es de suma importancia para que la biorremediación sea exitosa. Pero para poder remediar un efluente es fundamental que el cultivo pueda desarrollarse durante todo el año.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la viabilidad de realizar una biorremediación de efluentes cloacales de la localidad de General San Martín (Chaco) utilizando microalgas, y evaluar la posibilidad de hacer una biorrefinería.

2. Materiales y Métodos

2.1. Efluente

El efluente utilizado fue recolectado del sistema de saneamiento municipal de la localidad de General San Martín (Chaco), de la cámara de rebose a la entrada de la estación depuradora que posee la ciudad actualmente. Las muestras fueron recolectadas sistemáticamente a lo largo del año.

3.5.1. Técnicas Analíticas de Monitoreo

Para monitorear el efluente y determinar si hay disminución de las principales formas nitrogenadas y fosforadas se analizó el efluente mediante el test kit de HACH NitraVer3, PhospoVer5, para obtener la concentración NO_3^- , PO_4^{3-} respectivamente, y reacción mediante el reactivo de Nessler para determinar NH_4^+ . Estas mediciones se realizaron al efluente crudo previo tratamiento con microalgas y luego del tratamiento, una vez cosechada la biomasa algal para su análisis.

2.2. Monitoreo del cultivo

El cultivo se desarrolló a partir de una especie autóctona de microalga, identificada como *Chlorella sp.*, presente en el efluente cloacal crudo.

El cultivo de microalga autóctona, en el efluente sin diluir ni esterilizar, se escaló a fotobiorreactores cerrados de 6L; con agitación manual diaria; ubicados a cielo abierto, recibiendo luz solar directa.

El crecimiento del cultivo microalgal se evaluó a través de datos de densidad celular y valores de rendimiento de biomasa seca libre de cenizas. La densidad celular fue obtenida diariamente, en días laborales, por recuento en cámara de Neubauer. Para el cálculo del rendimiento de la biomasa, la técnica utilizada fue gravimétrica. En cada ocasión, se filtró una alícuota del cultivo a través de papel de filtro estéril de nitrocelulosa previamente pesado, se secó el residuo en estufa de vacío a 60°C y 0,25atm de presión absoluta durante 120min, luego de lo cual se realizó una pesada para conocer el peso seco. Luego se lo calcinó en mufla a 575°C hasta peso constante y se realizó nuevamente la determinación del peso, para conocer el peso seco libre de cenizas.

El crecimiento de protozoos se evaluó a través de medición de su densidad celular, mediante el mismo método y frecuencia que los utilizados para las microalgas.

Asimismo, fueron monitoreadas las condiciones de cultivo: pH, temperatura exterior e irradiación. El pH se midió una vez al día durante las primeras horas de la mañana con un pHímetro de mesa Adwa Ad1030. La temperatura fue relevada por una estación meteorológica a 7,4 km y la irradiación por otra ubicada a 15 km.

Al final del experimento, el cultivo de microalgas fue separado del agua mediante decantación, alcalinizando previamente el medio por adición de NaOH hasta aproximadamente pH 13 y dejando sedimentar por alrededor de 12 h al resguardo de la luz. El concentrado obtenido fue filtrado con papel Whatman N°1 y luego secado en estufa de vacío a 60°C y 0,25atm de presión absoluta.

2.3. Análisis de la biomasa

La biomasa obtenida como resultado del procedimiento anterior fue caracterizada mediante la cuantificación de lípidos, proteínas y carbohidratos. Cada determinación se realizó por triplicado, de modo de estimar el valor real por intervalo de confianza. Dicho intervalo se calculó con la distribución t de Student, con un nivel de confianza del 95%.

La determinación de lípidos se realizó pesando el extractivo resultante de un proceso de lixiviación batch en corriente cruzada, usando como solventes n-hexano, etanol 95% y acetona, en este orden. Se empleó 6ml de cada solvente para 0,5 g de biomasa, fraccionado en 5 etapas de contacto ejecutadas en un tubo de ensayo, vortex durante 5 minutos, para asegurar mejor contacto y extracción de lípidos. El extractivo obtenido con cada solvente fue separado de estos mediante un equipo de rotavapor y posteriormente pesado. El contenido de proteínas fue determinado usando el método descrito por Waterborg (2002) basado en el trabajo de Lowry.

La determinación de carbohidratos se realizó por el método Ácido Sulfúrico – UV (Albalasmeh et al., 2013), que consiste en la reacción de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y medición espectrofotométrica del sobrenadante a 315nm. Se empleó glucosa para la curva de calibrado.

3. Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestran los resultados periódicos del recuento celular obtenido a lo largo del año. Se puede observar la influencia directa que tienen las condiciones climáticas en el crecimiento celular.

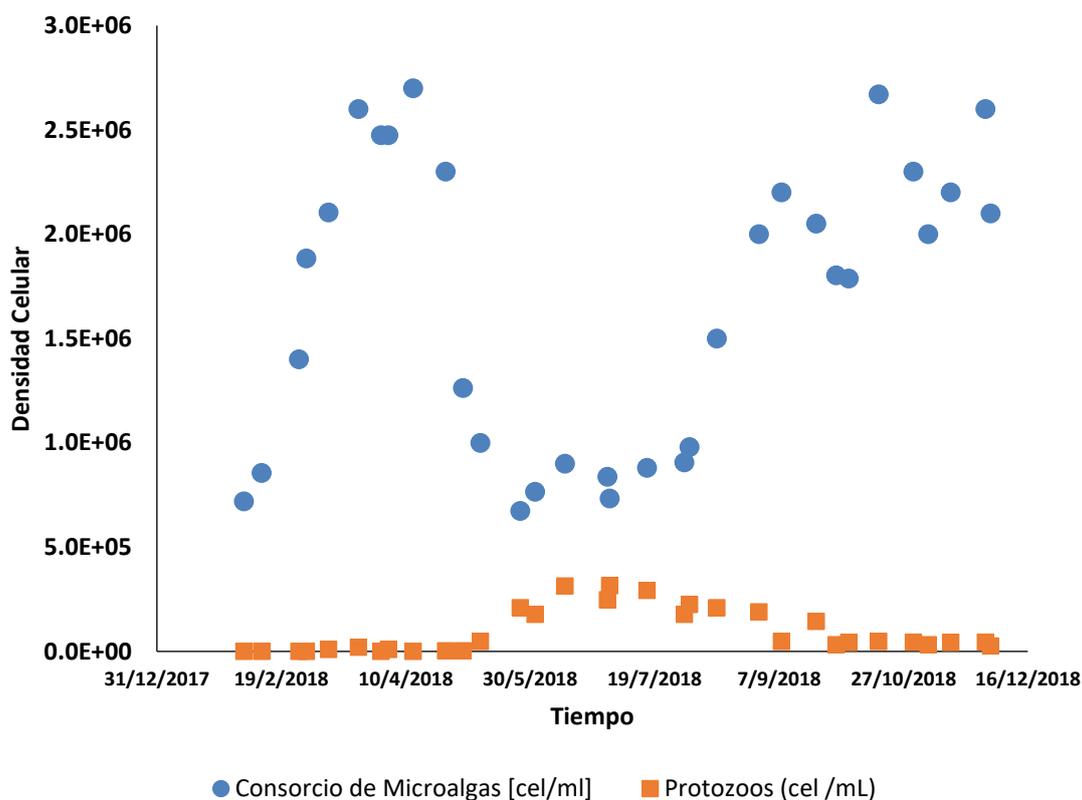


Figura 1. Valores de densidad celular del consorcio de microalgas y protozoos expresados en células por mL, obtenida a lo largo del año 2018.

En la figura 1 se puede observar claramente como los valores de densidad celular se ven directamente afectados por las condiciones climáticas. Si bien el cultivo alcanzó valores de recuento mayores en los meses más cálidos del año, éste se mantuvo en valores de recuento que oscilaban entre $1,5 \times 10^6$ cel/mL y $6,5 \times 10^6$ cel/mL a través de los meses con condiciones climáticas desfavorables (meses correspondientes a las estaciones de otoño e invierno). El crecimiento de protozoos mostró un aumento durante los períodos donde la densidad microalgal disminuía. Es importante destacar que estando el efluente sin esterilizar, la concentración de protozoos, que forma parte del ecosistema y es una amenaza para el crecimiento de las microalgas, en ningún momento dominó el cultivo.

Se realizaron cuatro cosechas a lo largo del año (una para cada estación del año) para analizar la biomasa obtenida en las diferentes estaciones y así lograr determinar la influencia de las condiciones en la producción de biomasa y poder evaluar la factibilidad de llevar adelante el cultivo a lo largo del año. Se determinó la composición de lípidos, carbohidratos, proteínas y compuestos inorgánicos (cenizas) de la biomasa se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de la biomasa algal obtenida del cultivo en diferentes estaciones.

Muestra	Extractivo Lipídico (mg/g muestra)	Extractivo Proteico (mg/g muestra)	Carbohidratos (mg/ g muestra)	Cenizas
Cultivo Verano	$3,1 \pm 0,2$	$27,4 \pm 2,6$	$14,5 \pm 2,6$	$41,2 \pm 2,4$
Cultivo Otoño	$7,3 \pm 0,3$	$20,3 \pm 2,1$	$15,0 \pm 1,7$	$45,2 \pm 3,7$

Cultivo Invierno	11,1±0,4	16,1±0,3	21,3 ±1,2	46,3 ±4,1
Cultivo Primavera	5,1 ± 0,2	29,4 ± 2,6	12,2 ± 2,6	44,2±3,4

Los resultados obtenidos en la tabla 1 ponen en evidencia la influencia de las condiciones ambientales en las características de la biomasa obtenida. Si analizamos los resultados en función de las variaciones de intensidad de radiación y temperatura podemos agrupar a las estaciones de Verano y Primavera como las más favorables para el cultivo, mientras que Otoño e Invierno como las menos favorables.

La biomasa obtenida en las estaciones de Otoño e Invierno se encuentra bajo estrés debido a que recibe menor radiación y tiene menor temperatura promedio. Esta situación de estrés no solamente indujo la mayor síntesis lipídica, sino también se evidenció un aumento en el contenido de carbohidratos, a expensas de una disminución del contenido proteico. Los carbohidratos provenientes de microalgas, consisten principalmente en celulosa y almidones sin lignina, por ello, pueden ser una fuente directa de carbono para la industria de la fermentación (Del Campo *et. al.*, 2000; Yen *et. al.*, 2013). Con respecto a las estaciones más favorables el comportamiento fue exactamente opuesto, donde se puede observar un aumento notable en el contenido proteico, convirtiendo a la biomasa en potencial suplemento proteico para ganado (Spolaore *et. al.*, 2006).

Se puede observar como a lo largo del año la biomasa obtenida presenta características favorables para la realización de un biorrefinería de la biomasa obtenida del tratamiento de efluentes urbanos sin diluir ni esterilizar.

Desde el punto de vista de la biorremediación del efluentes cloacales con microalgas, se evaluaron las formas nitrogenadas ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) y fosforadas así como también la concentración de oxígeno disuelto. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de NH_4^+ , NO_3^- , $(\text{PO}_4)^{3-}$ y O_2 disuelto. Todos los resultados se expresen en mg L^{-1}

	NH_4^+	NO_3^-	$(\text{PO}_4)^{3-}$	O_2 disuelto
Efluente crudo	46,31	47	19,21	5,8
Efluente tratado	31,16	31	15,11	22,1

Estos resultados preliminares nos estaría indicando que es posible realizar la biorremediación de efluentes cloacales con microalgas autóctonas, de los valores presentados en la tabla 2 se puede observar que el 44% de las formas nitrogenadas fueron removidas, junto con un 22% de las formas fosforadas, acompañada de un aumento considerable del O_2 disuelto.

4. Conclusiones

Es posible el cultivo de microalgas en el efluente cloacal estudiado sin esterilizar ni diluir. Debido a la estabilidad que demostró frente a sus competidores biológicos, es posible pensar en su utilización como método de tratamiento a lo largo del año.

Los resultados indican que la biomasa obtenida del consorcio autóctono de microalgas desarrolladas en el efluente, contiene metabolitos de interés, factibles de ser aprovechados comercialmente.

Los resultados hasta aquí obtenidos son muy alentadores en vista de realizar una biorremediación de efluentes cloacales con microalgas autóctonas.

Referencias

- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, 97(2), 253-261.
- Azov, Y., Shelef, G. (1987). The effect of pH on the performance of the high-rate oxidation ponds. *Water Sci. Technol.* 19(12):381-383.
- Chisti, Y (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Advanteges* 25(3):294-306.

- Darley, W.M. (1982). *Algal Biology; A physiological Approach*. Basic Microbiology, vol. 9. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- De la Noue, J., De Pauw, N. (1988) The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* 6:725-770.
- Del Campo, J.A., J. Moreno, H. Rodríguez, M. Angeles Vargas, J. Rivas and M.G. Guerrero (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology* 76:51-59.
- Dominic VJ, S Murali & MC Nisha. 2009. Phycoremediation efficiency of three algae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Gloeocapsa gelatinosa*. *Academic Review* 16(1- 2): 138-146.
- González-López CV, FG Acién, JM Fernández-Sevilla & E Molina. 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 2(2): 93-106.
- Lavoie A & J de la Nouë. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach of wastewater biological tertiary treatment? *Water Research* 19(11): 1437-1442.
- Oswald, W.J., Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (1988) *Micro-algae and wastewater treatment*. Micro-algal Biotechnology, Cambridge University Press, pp:305-328.
- Park J, R Craggs & A Shilton. 2011a. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 35-42.
- Porta Díaz, A. (2005). Regeneración y reutilización de aguas residuales depuradas.
- Rawat I, R Ranjith-Kumar, T Mutanda & F Bux. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88: 3411-3424.
- Spolaore, P., C. Joannins-Cassan, E. Duran and A. Isambert (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101:87-96.
- Talbot, P., De la Noue, J. (1993). Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Res.* 27(1):153-159.
- Waterborg, J.H. (2002) "The Lowry Method for Protein Quantitation" *The Protein protocols Handbook*. Zhang, X., Sargent, R. W. H. (1994). The Optimal Operation of Mixed Production Facilities - A General Formulation and some Approaches for the Solution. *In Proceedings of the 5th International Symposium on Process Systems Engineering*. Kyongju, Korea, 171.
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, 135, 166-174.