

# Evaluar la biorremediación de efluentes industriales/municipales con consorcios de microalgas-bacterias promotoras del crecimiento, aprovechando la biomasa generada para producir compuestos orgánicos de alto valor agregado

Bioremediation of industrial/municipal wastewaters by microalgae-plant growth promoting bacteria consortia, coupled with commercial metabolites production from the biomass

Presentación: 17/10/2019

Doctorando:

**Ing. Qca. María Carolina Cuello**

Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Resistencia  
carolinacuello@gmail.com

Director/es:

**Prof. Dra. Ester R. Chamorro**

## Resumen

El cultivo de microalgas en sinergia con el tratamiento de efluentes tiene mucho potencial para ser un enfoque óptimo en la gestión del agua dulce. La gestión de efluentes de una manera en la que se maximice la recuperación de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, al mismo tiempo que se produzca biomasa microalgal, puede incluso ser una alternativa de negocio agro-industrial, especialmente cuando no hay prácticas de gestión de efluentes implementadas (Fenton y Ó hUallacháin, 2012). Los consorcios diseñados de microalga-bacteria tienen un alto potencial de complementariedad para la remoción tanto de nitrógeno y fósforo como de compuestos orgánicos de carbono.

En este estudio se cultivaron exitosamente las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* en mezclas de dos efluentes de la industria láctea, el purín vacuno y el suero ácido de queso, sin esterilizar ni diluir en diferentes condiciones de laboratorio hasta la escala de estanques abiertos al exterior.

Palabras claves: Microalgas, Tratamiento de efluentes, Biorrefinería, Bacterias promotoras del crecimiento de plantas

## Abstract

Microalgae cultivation coupled with wastewater treatment could be the optimal process approach in freshwater management. The management of agricultural ‘wastes’ in a manner that maximizes the nutrient

recovery and microalgal biomass production could be an alternative agricultural enterprise, especially where management practices are not currently in place (Fenton and Ó hUallacháin, 2012). Engineered consortia of microalgae-bacteria have a great potential for the removal of both nitrogen and phosphorus compounds and also organic carbon ones.

In this study, two microalgae, namely *Scenedesmus dimorphus* and *Chlorella pyrenoidosa*, were successfully co-cultured with the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* in mixtures of two effluents from the dairy industry, such as raw liquid cow manure and second cheese whey, without any sterilization or dilution, from laboratory conditions up to the scale of open ponds.

**Keywords:** Microalgae, Wastewater treatment, Biorefinery, Plant growth promoting bacteria

## Introducción

Un aspecto importante de la conservación del agua dulce es la gestión de las aguas residuales. La descarga desmedida de desechos humanos, la expansión de las redes de agua en ciudades sin construcción paralela de nuevos sistemas de tratamiento de efluentes, y el crecimiento de la población en un contexto de recursos finitos de agua dulce, plantean graves amenazas cuantitativas y cualitativas con respecto al futuro suministro de agua dulce (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et al. 2012).

Las microalgas son microorganismos unicelulares, fotosintéticos, eucarióticos y procarióticos que pueden crecer en una amplia variedad de condiciones, ya sean aguas dulces, salobres, salinas o, incluso, residuales. Estos microorganismos fotosintéticos tienen una mayor eficiencia que las plantas terrestres para la captación de dióxido de carbono y el aprovechamiento de la luz solar, por lo que tienen una mayor productividad en términos de biomasa y metabolitos (Oswald 2003). Debido a su alta tasa de reproducción y velocidad de crecimiento, tienen mayor rendimiento en biomasa por unidad de superficie que las plantas y además, se pueden cultivar en tierras no adecuadas para la agricultura. Las microalgas pueden metabolizar eficientemente los nutrientes de varias corrientes de efluentes (aguas residuales municipales, agrícolas e industriales) y producir numerosos compuestos valiosos como proteínas, carbohidratos y lípidos (Borowitzka 1992, Olguín 2012).

Si una corriente de aguas residuales (municipal, agrícola o industrial o mezcla de ellas) o una corriente intermedia de un proceso de tratamiento de efluentes (por ejemplo, el líquido de salida de una digestión anaeróbica) contiene altas concentraciones de nutrientes inorgánicos, como nitrógeno y fósforo, el cultivo de microalgas puede servir para remover estos compuestos de dichas aguas residuales y por ende, servir de tratamiento. Más aún, los consorcios diseñados de microalga-bacteria tienen un alto potencial de complementariedad. Las bacterias heterotróficas son capaces de consumir carbono orgánico para reducir la demanda química y bioquímica de carbono, DQO/DBO. Las microalgas fotoautotróficas son capaces de reducir el contenido de nutrientes, Nitrógeno y Fósforo, en aguas residuales.

Hoy en día, los análisis que utilizan electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés) permitieron revelar, a través del estudio de una diversidad de muestras ambientales, que la mayoría de esas bacterias que coexisten en simbiosis con las microalgas son aquellas clasificadas como Bacterias Promotoras de Crecimiento de Plantas (PGPB, por sus siglas en inglés) (Ramanan, Kang et al. 2015). Entre éstas, *Azospirillum brasilense*, produce una fitohormona, el ácido indol-3-acético (IAA), y esta molécula es la responsable de la estimulación del crecimiento de las plantas. El mismo mecanismo ha sido probado en la promoción del crecimiento de microalgas (de-Bashan, Bashan et al. 2002).

Por otra parte, la demanda de productos lácteos se encuentra en aumento a nivel mundial, principalmente como resultado del aumento de la población humana. La industria láctea se divide en varios sectores que producen diferentes tipos de efluentes, que van desde las corrientes generadas en las parcelas donde se ordeña y lava el ganado hasta las aguas residuales producidas en las diferentes etapas de los procesos de industrialización de la leche (Prazeres 2012).

Por ejemplo, una granja lechera produce una cantidad significativa de efluentes que contienen estiércol de ganado. Más de 113L de aguas residuales se generan por vaca en una granja lechera (Prajapati 2014), lo que plantea un problema de contaminación no solo por la mayor demanda de producción de leche, sino también por el aumento de las prácticas de confinamiento de los animales y la centralización de las plantas de producción.

Por ejemplo, el Purín Vacuno se genera por la combinación del estiércol de animales confinados en una parcela o corral y las aguas de lavado de ganado e instalaciones.

La producción de queso es otro ejemplo dentro de esta industria, que genera una gran cantidad de aguas residuales. Solo el 10% de la leche se convierte realmente en queso y el 90% restante se convierte en suero de queso.

En Argentina, el 55% del suero de queso no se valoriza, sino que se utiliza para suplementar la alimentación animal o se descarga directamente al medio ambiente.

La descarga directa al ambiente de estos dos efluentes, Purín Vacuno y Suero de Queso, es una práctica agrícola de larga data en todo el mundo (Prajapati 2014, Prazeres 2012), pero continuar con ella podría conducir a la contaminación de las napas de agua subterráneas por lixiviación de la excesiva cantidad de nutrientes que poseen.

El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad del cultivo de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*, solas y consorciadas con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense*, en mezclas de Suero Ácido de Queso (SAQ) y Purín Vacuno (PV) y encontrar la proporción de estas dos corrientes de aguas residuales en las que simultáneamente se logran las mejores tasas de remoción de nutrientes y la mayor producción de bioproductos (biomasa, metabolitos de interés comercial) en cultivos abiertos al exterior.

## Resultados

En laboratorio, las tres condiciones experimentales que simultáneamente maximizaron los parámetros de crecimiento productividad volumétrica de biomasa y tasa específica de crecimiento, fueron *C. pyrenoidosa* y *S. dimorphus* cultivadas en una mezcla de 25% PV-75% SAQ y *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ.

Cuando fueron cultivadas en mesocosmo, la eliminación de fósforo (P-PO<sub>4</sub>) en todos los cultivos alcanzó valores superiores al 99%. Sin embargo, *Scenedesmus dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ logró la mayor remoción de compuestos inorgánicos nitrogenados. *S. dimorphus* pudo crecer en una mezcla del 50% de cada una de estas dos aguas residuales y eliminar el 90% de P-PO<sub>4</sub>, el 96% de N-NO<sub>3</sub> y el 70% de N-NH<sub>4</sub>, logrando una productividad de volumétrica de biomasa de 0,41 ± 0,03 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> y dominando el cultivo en todo momento.

La biomasa obtenida fue analizada para determinar su contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas. El contenido de proteínas no mostró diferencias significativas entre los replicados de las tres condiciones de cultivo (ANOVA (MR) p > 0.05). Sin embargo, el contenido de lípidos y carbohidratos mostró diferencias significativas entre los cultivos. *C. pyrenoidosa* y *S. dimorphus* cultivadas en una mezcla de 25% PV-75% SAQ lograron un mayor contenido de lípidos que *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ, que registró la menor cantidad.

Los resultados obtenidos indican que es posible tratar el Purín Vacuno y el Suero Ácido de Queso con microalgas. Además, la combinación de ambos efluentes permite superar los principales obstáculos reportados para el tratamiento de cada uno de estos dos efluentes.

En un escalado posterior, cuando *Scenedesmus dimorphus* fue cultivada con la bacteria *Azospirillum brasilense*, no se evidenció un mayor crecimiento de dichos cultivos, sino por el contrario, el crecimiento fue menor, no solamente respecto de la misma microalga cultivada sola sino también respecto de los cultivos control, es decir, *Chlorella pyrenoidosa* cultivada sola y en asociación con la bacteria. No se reportan en la bibliografía estudios que utilicen esta asociación de microorganismos (*S. dimorphus* + *A. brasilense*), por lo cual puede que ambos microorganismos no desarrollen estrategias de mutualismo. Por otro lado, el cultivo de *S. dimorphus* en el medio 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, que había tenido el desempeño óptimo en el estudio anterior, tampoco tuvo un desempeño mejor que los cultivos control.

Si bien *S. dimorphus* tuvo el mejor desempeño de los cultivos con alguna microalga en la degradación de compuestos contaminantes, medido como DBO<sub>5</sub> (53,5% de remoción) y DQO (98,1% de remoción), en lo referente a la remoción de compuestos de nitrógeno y fósforo, el desempeño fue en todos los casos inferior tanto a los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* sola como consorciada con *A. brasilense*.

En la última etapa del escalado, los resultados obtenidos luego del cultivo durante el período de un mes, en estanques abiertos agitados de 200L y en modo semicontinuo, mostraron que la diferencia entre el cultivo de la cepa de *Chlorella pyrenoidosa* consorciada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*, no es significativa en la reducción de DBO/DQO en comparación con el cultivo control de *Chlorella pyrenoidosa* sola

en una mezcla de 50% purín vacuno y 50% suero ácido de queso. Por otra parte, la reducción en compuestos de nitrógeno y fósforo orgánico es significativamente mayor en el cultivo control de *Chlorella pyrenoidosa* sola en una mezcla de 50% purín vacuno y 50% suero ácido de queso en comparación con la cepa de *Chlorella pyrenoidosa* consorciada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*, en el mismo estanque. Dependiendo si el objetivo del cultivo microalgal es la obtención de biomasa, este consorcio resulta tener interés y potencial, en cambio si el objetivo es la depuración de las aguas residuales, resulta menos efectivo cultivarlo en ellas. Además, la producción de lípidos del cultivo control de *Chlorella pyrenoidosa* sola en una mezcla de 50% purín vacuno y 50% suero ácido de queso, en estanques abiertos agitados de 200L fue de  $160 \pm 9$  mg.g<sup>-1</sup> y de  $68 \pm 5$  mg.g<sup>-1</sup> para la biomasa obtenida del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* consorciada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*.

Las cromatografías en placa realizadas a los extractivos lipídicos de las biomásas en diferentes momentos a lo largo del período de estudio muestran una mayor intensidad en la zona de las clorofilas para las muestras del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* consorciada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense* en contraposición con una más variada coloración en la zona de los aceites (zona en la que también eluyen algunos compuestos de alto valor agregado como ésteres de astaxantina) para el cultivo control de *Chlorella pyrenoidosa* sola en una mezcla de 50% purín vacuno y 50% suero ácido de queso. Estos extractivos lipídicos contienen, entonces, biomoléculas de alto valor agregado que justifican su aislamiento de la biomasa algal tanto o más que las grasas y aceites a los cuales acompañan.

Se ha logrado llevar a cabo exitosamente un cultivo de una cepa de microalgas que consorciada con una bacteria promotora de crecimiento o sin ella, es capaz de crecer en efluentes de la industria láctea, tales como el purín vacuno y el suero ácido de queso, sin esterilizar, ni diluir, ni agregar nutrientes, lo que disminuye la huella hídrica, de carbono y energética, de un cultivo tradicional de microalgas.

Son necesarios más estudios como el presente, dado que la mayor cantidad de información encontrada en publicaciones han estudiado cultivos de microalgas en efluentes esterilizados o diluidos con agua dulce, que en un bajísimo porcentaje, son escalados a volúmenes de planta piloto o a condiciones reales en el exterior. Estos estudios de laboratorio aislados de su escalado a condiciones reales, son intervenciones que la autora de este trabajo encuentra inconducentes al desarrollo de tecnologías que nos permitan crear procesos industriales sustentables para ser transferidos a los pequeños y medianos productores. La autora sostiene que considerar los efluentes como materias primas para un proceso industrial en lugar de tratarlos solo como flujos de desechos, es prioritario para poder aplicar en su estudio, todo el avance que hemos hecho en la optimización de procesos industriales.

## Referencias

- Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan and I. B. Ibraheem (2012). "Microalgae and wastewater treatment." *Saudi J Biol Sci* 19(3): 257-275.
- Borowitzka, M. (1992). "Algal biotechnology products and processes — matching science and economics." *Journal of Applied Phycology* 4(3): 267-279.
- de-Bashan, L. E., Y. Bashan, M. Moreno, V. K. Lebsky and J. J. Bustillos (2002). "Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*." *Canadian Journal of Microbiology* 48(6): 514-521.
- Fenton, O. and D. Ó hUallacháin (2012). "Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review." *Algal Research* 1(1): 49-56.
- Olguín, E. J. (2012). "Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery." *Biotechnology Advances* 30(5): 1031-1046.
- Oswald, W. J. (2003). "My sixty years in applied algology." *Journal of Applied Phycology* 15(2-3): 99-106.
- Prajapati, S. K., et al. (2014). "Algae mediated treatment and bioenergy generation process for handling liquid and solid waste from dairy cattle farm." *Bioresource Technology* 167(0): 260-268.

Prazeres, A. R., et al. (2012). "Cheese whey management: A review." *J Environ Manage* 110: 48-68.

Ramanan, R., Z. Kang, B.-H. Kim, D.-H. Cho, L. Jin, H.-M. Oh and H.-S. Kim (2015). "Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats." *Algal Research* 8: 140-144.