

## Remoción de contaminantes acoplada a la producción de biomasa de alto valor agregado mediante el cultivo de microalgas: una aproximación rentable al tratamiento de efluentes

*Ignacio José Zaballa<sup>1</sup>, María Carolina Cuello<sup>2</sup>, Juan Ignacio Gori<sup>1</sup>, Claudia Mónica Ribaudó<sup>1</sup>, Raúl Ernesto Vaccaro<sup>2</sup> y Ester Chamorro<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía UBA

<sup>2</sup> Cátedra de Economía General, Facultad de Agronomía UBA

<sup>3</sup> Centro QUIMOBÍ, UTN Resistencia

E-mail: zaballa@agro.uba.ar

### RESUMEN

La contaminación ambiental, por liberación de lixiviados sin tratar, es consecuencia de la falta de conciencia de sus efectos nocivos y la no sanción por incumplimiento de las leyes. Paralelamente debe contemplarse la incapacidad financiera de algunas PyMES y/o municipios, para instalar equipos de tratamiento convencional. El desarrollo de tecnologías innovadoras de descontaminación de efluentes, debe enfocarse en la sinergia de costos. Esto se logra acoplando servicios de tratamiento, con procesos productivos. Es decir, usar contaminantes como materia prima para producción de biomasa, y extraer metabolitos de interés comercial. El objetivo del trabajo es optimizar los parámetros del crecimiento microalgal, en conjunto con la mejor combinación de efluentes, para obtener metabolitos de alto valor agregado y la mayor descontaminación. Como medio de cultivo se utilizaron efluentes provenientes de Lincoln (Provincia de Buenos Aires): 1.- lixiviados de una planta de tratamiento de RSU, ricos en metales ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , etc); y 2.- efluentes de un tambo, ricos en nitrógeno y fósforo. Se evaluó la velocidad de crecimiento y producción de biomasa, en efluentes solos y combinados. La biomasa sufrió extracciones con solventes orgánicos de uso industrial (hexano, acetona, etc.). Dichos extractivos fueron analizados cualitativamente por cromatografía en capa delgada (TLC) y cuantitativamente por cromatografía en columna. Los resultados muestran mayor eficiencia de descontaminación al mezclar efluentes que por separado. Las reducciones obtenidas van entre: 42 – 85 % para  $N-NO_3^-$  y 18 – 84 % para otras especies químicas. La biomasa registrada varió entre 0,8 y 2 gr/L. Los metabolitos de mayor interés comercial extraídos fueron  $\beta$ -caroteno, licopeno, y ficocianina entre otros. En conclusión, sería factible realizar un manejo sustentable en la descontaminación de los residuos, ya que al combinar los diferentes efluentes se podría maximizar la generación de biomasa y compuestos de alto valor. Esto permitiría construir bio-refinerías y obtener una renta económica de los desperdicios de las actividades humanas.

**Palabras Claves:** Microalgas, Contaminantes, Efluentes.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías innovadoras, cuyo objeto sea reducir la contaminación ambiental tratando los efluentes urbanos, agrícolas o industriales, debe enfocarse en la sinergia de costos. Esto se logra acoplando los servicios del tratamiento con procesos productivos (Trivedi et al. 2015). De ésta manera se reducen los costos ambientales, los de remediación y producción, al utilizar los contaminantes como sustrato productivo.

Las microalgas son capaces de reducir concentraciones peligrosas de nitrógeno y fósforo en aguas residuales a través de la asimilación de dichas sustancias en la generación de biomasa celular, y luego de cosechadas (separadas del agua), ofrecen el beneficio adicional de ser una fuente de materia prima para la producción de metabolitos de interés comercial (Vílchez et al. 1997, Zeng et al. 2015).

Los componentes de microalgas son actualmente considerados valiosos bio-productos, con un amplio rango de aplicaciones (Bharathiraja et al. 2015). El alto contenido lipídico de la biomasa algal hace de ésta, una materia prima promisoría para la producción de biodiesel (Chisti 2007, Hena et al. 2015), mientras que los pigmentos y proteínas tienen aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas (Del Campo et al. 2000, Spolaore et al. 2006).

Los pigmentos carotenoides son considerados uno de los más importantes grupos de compuestos. Estructuralmente pertenecen a la familia de los terpenos y se clasifican coloquialmente en dos grupos: carotenos (por ejemplo licopeno,  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno) y oxicarotenoides o xantófilas (por ejemplo luteína, zeaxantina, criptoxantina, astaxantina) que poseen al menos un átomo de oxígeno en sus moléculas.

Estos compuestos son los que contribuyen a los colores desde amarillo a rojo de flores, frutas y vegetales; sin embargo, son mucho más que meros pigmentos y juegan un rol importante como antioxidantes. Son beneficiosos para la salud, ya que presentan propiedades antioxidantes y pro-vitamínicas, revistiendo actualmente por ello, un gran interés.

La técnica elegida actualmente, para el análisis de carotenoides, es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), aunque debido a sus cromóforos, los carotenoides pueden ser fácilmente detectados por cromatografía en capa delgada (TLC). Más aún, existen algunas ventajas que el análisis en TLC presenta sobre el uso de HPLC, como menor uso de solvente, preparación mínima y sencilla de las muestras y consecuentemente menores costos de análisis, lo que contribuye a la sinergia de costos que una biorrefinería basada en el uso de aguas residuales requiere.

El acoplar servicios de ficoremediación (fico=algas) de aguas sin metales pesados con la producción de biomoléculas de valor comercial posibilita utilizar residuos de las industrias como fuente de nutrientes de

bajo costo (Zhou et al. 2015), y lograr un aumento en la rentabilidad de ambas actividades, constituyendo además una estrategia para el logro de procesos de saneamiento sustentables.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la factibilidad y alcance de ficorremediación de aguas residuales de dos orígenes, utilizándolas solas y combinadas al 50% para el crecimiento de microalgas y la posterior evaluación, con una técnica sencilla y de bajo costo como la TLC, la presencia de componentes carotenoides en los extractivos de las mencionadas biomásas algales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizó biomasa algal proveniente de microalgas cultivadas en efluentes líquidos de dos orígenes: el lixiviado de una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos (RSU), rico en metales ( $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) y el residuo líquido de un tambo, rico en compuestos nitrogenados (principalmente  $N-NH_4^+$ ) y fosforados ( $P-PO_4^{3-}$ ), ambos efluentes de Lincoln, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Se determinaron las concentraciones de las diferentes especies químicas en dos momentos. El primero en los efluentes tal cual (previo a la realización de los tratamientos) y el segundo, en las muestras de agua post tratamiento con las microalgas. Las determinaciones fueron realizadas en laboratorios ajenos.

El inóculo inicial fue un consorcio de microalgas de la familia Chlorophyta, proveniente de un cultivo anterior en estos mismos efluentes, y en concentración de  $3 \times 10^5$  células/mL. Se probó el crecimiento de las microalgas en los efluentes solos y en concentración 50 % v/v de los mismos combinados. El cultivo se desarrolló en un proceso en batch por duplicado, en biorreactores de 500 mL agitados sin aireación. Se utilizaron períodos de luz/oscuridad de 16:8 h durante una semana.

La densidad celular se evaluó por conteo en cámara de Neubauer cada dos días.

Al final del experimento, cada cultivo de microalgas fue centrifugado para separar la biomasa algal del agua tratada (Fig.1). Las muestras centrifugadas de microalgas fueron secadas en estufa, con vacío, a 60 °C, obteniéndose así la biomasa algal para su extracción.



**Figura 1.** Aspecto de la biomasa cosechada antes de ser extraída

La extracción de lípidos de la biomasa algal se llevó a cabo como proceso batch con solventes etanol, n-hexano y acetona. La misma consistió en colocar la biomasa en un tubo de ensayo y 5 mL de etanol en cuatro porciones, mortereando la biomasa con una varilla de vidrio, en todos los casos. El solvente de cada extracción fue recuperado mediante rotavapor y el extracto obtenido, pesado. Sobre la masa residual se repite el procedimiento con n-hexano y finalmente con acetona.

Posteriormente, el extracto obtenido es utilizado para la siembra en TLC.

La caracterización de los diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos se realizó por TLC, comparándolas con patrones conocidos.

La cromatografía en placa se utilizó para evaluar cualitativamente la presencia de carotenos y xantófilas, así como de lípidos saponificables. Esta técnica se realizó sembrando los patrones y las muestras en Cromatofolios AL TLC 20 x 20 silicagel 60 F254 utilizando n-hexano:éter etílico (10:3) y n-hexano:acetona (7:3) como eluyentes y permanganato de potasio acidificado al 1% como revelador.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las concentraciones de los principales componentes de los efluentes originales se resumen en la Tabla N°1.

**Tabla N°1.** Composición química de los efluentes líquidos utilizados como medio de cultivo de microalgas previo al tratamiento con microalgas.

		<b>Lixiviado de RSU</b>	<b>Residuo líquido de Tambo</b>	<b>Límite</b>
<b>N-NO<sub>3</sub></b>	mg/L	46.00	22.00	45*
<b>P-PO<sub>4</sub></b>	mg/L	2.13	22.52	0.2**
<b>N-NH<sub>4</sub></b>	mg/L	5.52	86.28	0.2*
<b>Ca total</b>	mg/L	66.00	60.00	
<b>Mg total</b>	mg/L	62.40	40.20	
<b>Zn total</b>	mg/L	0.54	0.03	
<b>Cu total</b>	mg/L	0.31	0.01	
<b>Na total</b>	mg/L	550.00	190.00	
<b>K total</b>	mg/L	1400.00	500.00	

\*Codigo Alimentario Argentino  
Capítulo XII Res Conj. SPRyRS  
y SAGPyA N° 68/2007 y N°  
196/2007

\*\* Directiva EU 91/271/CEE

El mayor crecimiento microalgal se observa para la mezcla de concentración 50 % lixiviado RSU – 50 % residuo tambo, siendo  $1 \times 10^7$  células/mL al cabo de seis días (Fig.2).

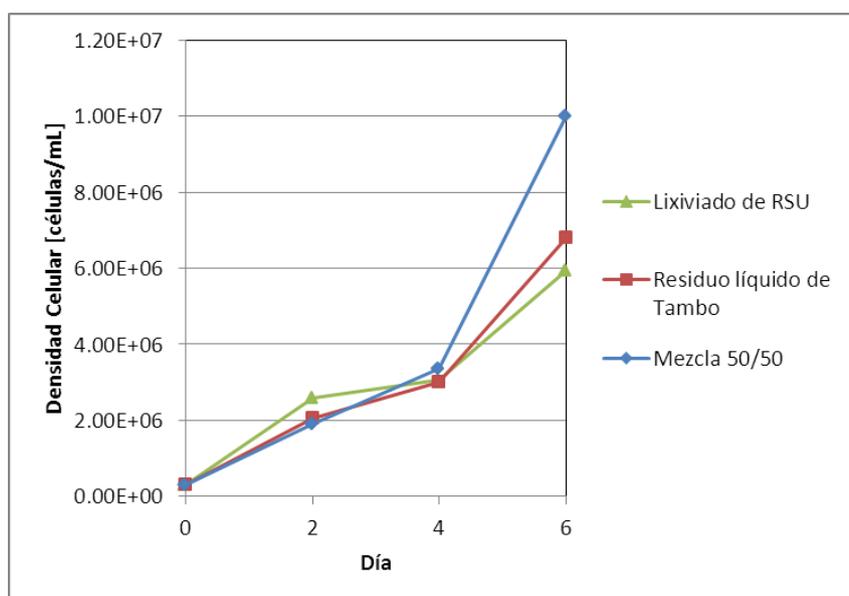
Entre el día 0 y 2 del tratamiento, se observa una pequeña diferencia de mayor crecimiento del cultivo (densidad celular) en el lixiviado de residuos sólidos urbanos respecto de los otros dos medios. Esto puede deberse a algún efecto inhibitor presente en los otros dos medios y ausente en éste. Se ha reportado, que el

alto contenido de nitrógeno amoniacal puede tener un efecto tóxico en el crecimiento de los cultivos microalgales (Abeliovich y Azov, 1976).

El efluente líquido de tambo, tiene mayor concentración de nutrientes que el lixiviado de RSU, y dentro de esos nutrientes, prevalece el nitrógeno amoniacal. Esto explicaría el efecto inhibitor del crecimiento algal durante los primeros dos días de cultivo para este medio, lo cual no ocurre con el lixiviado de RSU.

Luego de transcurrida la fase de crecimiento inicial (adaptación del cultivo al medio), el aumento de la densidad celular del cultivo es mayor en el efluente líquido de tambo y mucho menor en el lixiviado de RSU, donde el crecimiento queda limitado por la baja concentración de los nutrientes fosforados y nitrogenados.

Las biomasa obtenida fue de 1,08 g/L para el cultivo en lixiviado de RSU, 1,01 g/L para el cultivo en residuo líquido de lechería y 1,90 g/L para la mezcla al 50% de ambos efluentes combinados.



**Figura 2.** Crecimiento (densidad celular) del consorcio microalgal en los tres efluentes: lixiviado de un tratamiento de residuos sólidos urbanos (triángulo), residuo líquido de tambo (cuadrado) y mezcla 50%-50% v/v de los mismos combinados (rombo).

En los tres casos hubo una deseable disminución de los tres principales compuestos que promueven la eutrofización, como ser nitrato y amoníaco y fosfatos. Esta reducción, en porcentajes, se resume en la Tabla N°2.

**Tabla N°2.** Porcentajes de reducción de las concentraciones iniciales de compuestos nitrogenados y fosforados presentes en las aguas residuales en estudio

		Lixiviado de RSU	Residuo líquido de Tambo	Mezcla 50/50
P-PO <sub>4</sub>	mg/litro	18%	92%	84%
N-NO <sub>3</sub>	mg/litro	42%	66%	78%
N-NH <sub>4</sub>	mg/litro	100%	100%	100%

La baja reducción de fosfatos en el lixiviado de RSU se debe a que los valores de concentración inicial son bajos, y la relación nitrógeno/fósforo óptima para el crecimiento microalgal no se alcanza. Esto también explica la menor tasa de crecimiento expresada anteriormente.

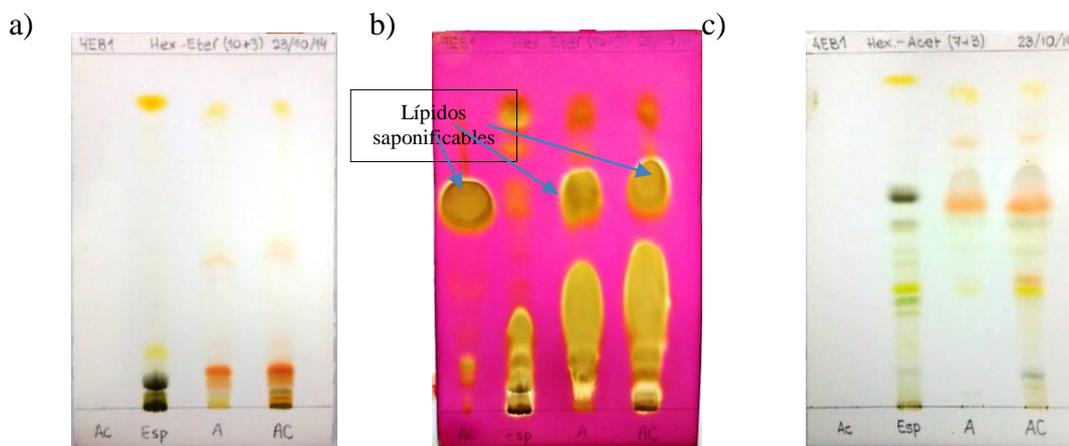
La mezcla al 50% de ambos efluentes presenta la mejor relación de disponibilidad de nutrientes y por ello, la reducción total más alta de las tres muestras.

En cuanto a la biomasa separada del agua residual y posteriormente extraída con solventes, se logró obtener entre un 18,2% y 28,8% de contenido de extraíbles, en porcentaje en base seca (información no presentada aquí), utilizando solventes que tienen bajo costo y grado de peligrosidad comparativamente con otros de uso frecuente en laboratorio, como metanol, cloroformo y clorometano. Utilizando estos últimos solventes, otros estudios realizados con consorcios similares, obtuvieron un máximo de 32% de extractivo, utilizando sofisticados medios de ruptura de pared celular. De ello se puede evaluar el porcentaje extraído como apreciable.

Respecto a la determinación de presencia de carotenoides, los extractivos de las muestras eluidas con n-hexano:éter etílico presentan cortos recorridos de elución y los componentes más polares quedan “apilados” cercanos a la línea de origen (Fig.3a). Sin embargo son muy útiles para detectar la presencia de aceites, incoloros, debido a la preferencia de arrastre por el n-hexano, y son evidenciados al revelar con permanganato (Fig.3b). Se visualizan como una mancha (amarilla) a la altura del patrón (aceite), en las placas reveladas con permanganato de potasio (rosa).

Las muestras eluidas con n-hexano:acetona, presentan una separación nítida de cada componente, muy útil para detectar la gran variedad de colorantes presentes (Fig. 3c).

Se muestran a modo de ejemplo, las placas TLC de una muestra, aunque fueron realizadas dos por cada muestra de biomasa algal. En todos los casos se repiten los resultados anteriores.



**Figura 3.** a) TLC eluída con hexano:éter etílico de patrón de aceite, extracto de espinaca y extracto de dos muestras de microalgas, b) TLC de a) revelada con permanganato de potasio, c) Las mismas muestras analizadas en a) pero eluídas con n-hexano:acetona

Todos los extractivos poseen uno o más de los siguientes carotenoides identificados, con alto valor comercial: licopeno, luteína, feofitina,  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno.

### PRINCIPALES CONCLUSIONES DEL TRABAJO

- En todos los tratamientos hubo un porcentaje apreciable de reducción de nitrógeno y fósforo.
- De la biomasa generada, fue posible extraer metabolitos de interés comercial, con métodos sencillos, utilizando solventes de bajo costo y técnicas de análisis cualitativo de pigmentos carotenoides (antioxidantes) y lípidos saponificables (aceites) sencillas, rápidas y confiables.
- Todos los extractivos poseen uno o más de los siguientes carotenoides: licopeno, luteína, feofitina, alfa- y beta-caroteno.

### BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich, A. and Y. Azov (1976). "Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds." *Applied and Environmental Microbiology* 31(6): 801-806.
- Bharathiraja, B., M. Chakravarthy, R. Ranjith Kumar, D. Yogendran, D. Yuvaraj, J. Jayamuthunagai, R. Praveen Kumar and S. Palani (2015). "Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 47(0): 634-653.
- Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." *Biotechnol Adv* 25(3): 294-306.
- Del Campo, J. A., J. Moreno, H. Rodríguez, M. Angeles Vargas, J. n. Rivas and M. G. Guerrero (2000). "Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta)." *Journal of Biotechnology* 76(1): 51-59.
- Hena, S., S. Fatimah and S. Tabassum (2015). "Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production." *Water Resources and Industry* 10(0): 1-14.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert (2006). "Commercial applications of microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96.

- Trivedi, J., M. Aila, D. P. Bangwal, S. Kaul and M. O. Garg (2015). "Algae based biorefinery—How to make sense?" Renewable and Sustainable Energy Reviews **47**(0): 295-307.
- Vílchez, C., I. Garbayo, M. V. Lobato and J. Vega (1997). "Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal." Enzyme and Microbial Technology **20**(8): 562-572.
- Zeng, X., X. Guo, G. Su, M. K. Danquah, S. Zhang, Y. Lu, Y. Sun and L. Lin (2015). "Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production." Renewable and Sustainable Energy Reviews **42**(0): 1385-1392.
- Zhou, Q., P. Zhang, G. Zhang and M. Peng (2015). "Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of photoperiod." Bioresour Technol **190**: 196-200.