

Título del trabajo: Cultivo de microalgas en efluentes combinados: una oportunidad para una sustentabilidad rentable

Datos del/os autor/es:

Ing. Qca. María Carolina Cuello

Daniela Belén Regeiro

Ing. Agr. Mag. Juan Ignacio Gori

Dra. Ester Chamorro

Institución/es a la/s que representa/n:

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Resistencia, Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Cátedra de Bioquímica.

Nombre del/os director/es de la tesis/ trabajos:

Dra Ester Chamorro

Palabras Claves: Biorremediación; Microalgas;

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, Aila et al. 2015).

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, Garbayo et al. 1997, Zeng, Guo et al. 2015).

Los componentes de microalgas son actualmente considerados valiosos bio-productos, con un amplio rango de aplicaciones (Bharathiraja, Chakravarthy 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, Fatimah et al. 2015), mientras que los pigmentos y proteínas tienen aplicaciones nutraceuticas y farmaceuticas (Del Campo, Moreno et al. 2000, Spolaore, Joannis-Cassan 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, alfa 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 estas 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 (Rodríguez, Simonovska et al. 2006), lo que contribuye a la sinergia de costos que una biorrefinería basada en el uso de aguas residuales requiere.

El acoplar servicios de fitorremediación (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, Zhang 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 fitorremediación 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 es la cromatografía en capa delgada (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, K, Ca, Cu, Zn) y el residuo líquido de una lechería, rico en compuestos nitrogenados (N-NH₄) y fosforados (P-PO₄), ambos efluentes de una localidad de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

La determinación de las concentraciones de las diferentes especies químicas fue realizada en laboratorios externos a los efluentes crudos antes del ensayo y a las muestras de agua separadas de la biomasa algal, al finalizar el mismo.

El inóculo inicial fue un consorcio de microalgas del género *Chlorophyta*, proveniente de un cultivo anterior en estos mismos efluentes, y en concentración de 3×10^5 células/mL.

Se probó el crecimiento de las microalgas en los efluentes solos (100% v/v) y en concentración 50%-50%v/v de los mismos combinados. El cultivo se desarrolló por duplicado, en biorreactores de 500mL agitados sin aireación, con períodos de luz/oscuridad de 16h:8h, como proceso batch, 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.



Fig. 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 5mL del primer solvente 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 el segundo solvente y finalmente con el tercero.

Posteriormente, el extracto obtenido es utilizado para la siembra de las placas cromatográficas.

La caracterización de los diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos se realizó por cromatografía en placa (TLC), por comparación con muestras patrones conocidas.

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.

| | | Lixiviado de RSU | Residuo de Lechería | Límite |
|-------------------------|----------|------------------|---------------------|--------|
| N-NO₃ | mg/litro | 46.00 | 22.00 | 45* |
| P-PO₄ | mg/litro | 2.13 | 22.52 | 0.2** |
| N-NH₄ | mg/litro | 5.52 | 86.28 | 0.2* |
| Ca total | mg/litro | 66.00 | 60.00 | |
| Mg total | mg/litro | 62.40 | 40.20 | |
| Zn total | mg/litro | 0.54 | 0.03 | |
| Cu total | mg/litro | 0.31 | 0.01 | |
| Na total | mg/litro | 550.00 | 190.00 | |
| K total | mg/litro | 1400.00 | 500.00 | |

*Codex Alimentario

** Directiva EU 91/271/CEE

El mayor crecimiento microalgal se observa para la mezcla de concentración 50%-50%v/v de los efluentes combinados, siendo 1×10^7 células/mL al cabo de seis días (Fig.2).

Se observa una pequeña diferencia de mayor crecimiento (densidad celular) en el lixiviado de residuos sólidos urbanos durante los primeros dos días de tratamiento. En el caso del efluente líquido de la lechería, que tiene mayor concentración de nutrientes que el lixiviado de RSU y que la mezcla al 50% de ambos efluentes, la alta concentración de nitrógeno amoniacal, parece tener un efecto tóxico, y por ende inhibitor del crecimiento algal. Esto no ocurre con el lixiviado, 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.

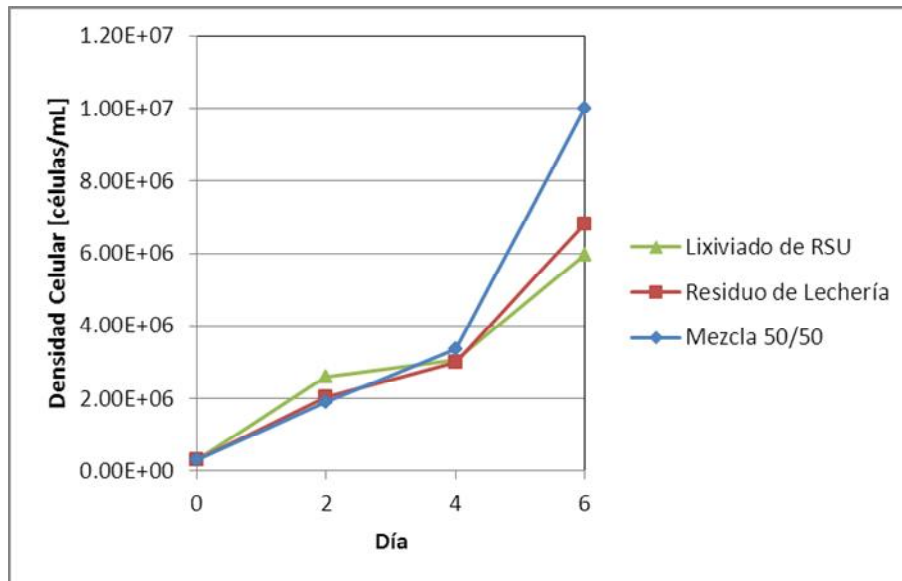


Fig.2. Crecimiento (densidad celular) del consorcio microalgal en los tres efluentes: lixiviado de un tratamiento de residuos sólidos urbanos (triángulo), residuo líquido de una lechería (cuadrado) y mezcla 50%-50%v/v de los mismos combinados (rombo).

En los tres casos hubo una deseable disminución de los tres principales compuestos que promueven la eutrofización, como ser nitrógeno de nitratos y amoniacal 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 Lechería | Mezcla 50/50 |
|-------------------|----------|------------------|-----------------------------|--------------|
| P-PO ₄ | mg/litro | 18% | 92% | 84% |
| N-NO ₃ | mg/litro | 42% | 66% | 78% |
| N-NH ₄ | 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.

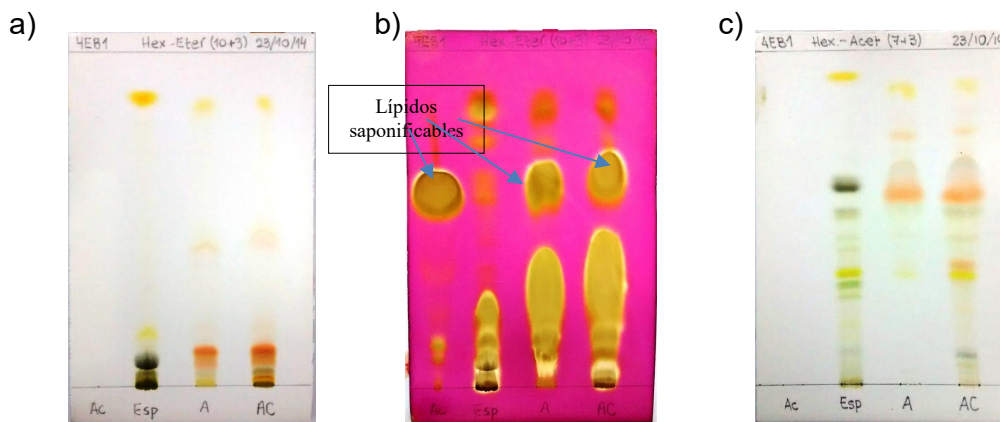


Fig.3. a) TLC eluida con hexano:éter etílico de patrón de aceite, extracto de espinaca y extracto de dos muestras de microalgas, b) TLC de a) revelada con permanganato de potasio, c) Las mismas muestras analizadas en a) pero eluidas con n-hexano:acetona

Todos los extractivos poseen uno o más de los siguientes carotenoides de interés comercial: licopeno, luteína, feofitina, alfa- y beta-caroteno (Fig.4).

Fig. 4. Identificación de algunos de los componentes presentes en los extracto de microalgas.

Principales conclusiones del trabajo

- ✓ En todos los casos 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.
- ✓ La biorrefinería algal se encuentra en un contexto de promisorio evolución, pero requiere de mayores investigaciones para confirmar y/o posibilitar la viabilidad económica de los procesos y un necesario desarrollo de métodos de extracción de menor costo y complejidad. Estos resultados obtenidos son alentadores para dar el próximo paso, que será probar con cultivos a mayor escala y por mayores períodos de tiempo, así como establecer la ecuación económica que posibilitan.

Bibliografía

- 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.