

**Evaluación de 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**

**María Carolina Cuello**

Tesis presentada como parte de los requerimientos para alcanzar el grado de  
**Doctor en Ingeniería mención Química de la Universidad Tecnológica Nacional**

**Universidad Tecnológica Nacional**

**Facultad Regional Córdoba**

**Diciembre 2019**



Directora de Tesis:

Dra. Ester R. Chamorro

QUIMOBÍ –Universidad Tecnológica Nacional

Co- director de Tesis:

Dr. Navid R. Moheimani

Algae Center –Murdoch University

Jurado de Tesis:

Dra. María Verónica Beligni (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Dra. Eliana Paola Dagnino (Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Resistencia)

Dr. Josué Miguel Heinrich (Universidad Nacional del Litoral)

***“Hacer y deshacer, llaman al aprender”***

*María Luisa Martín Abeleira*

A mi abuela, y a todo lo que eso significa

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero agradecer a la Dra. Mandhy Chamorro, mi directora de tesis y al Dr. Navid Mohemiani, mi co-director de tesis, por la paciencia, la dedicación, el compromiso con mi aprendizaje y la generosidad en compartir su conocimiento conmigo, no solamente técnico, sino de muchos otros aspectos que enriquecieron y enriquecen mi vida académica, profesional y personal.

A la Universidad Tecnológica Nacional, especialmente a las Facultades Regionales de Córdoba y Resistencia por la formación recibida tanto en la carrera de grado de Ingeniería Química como en la carrera de Doctorado, y por el financiamiento que hizo posible esta tesis. A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, por permitirme utilizar las instalaciones y ser mi segundo lugar de trabajo.

A la Dra. Natalia Pila, por su enorme ayuda en la realización de las extracciones de lípidos y las determinaciones de características de la biomasa.

A todos mis compañeros del Centro QUIMOBÍ, en general, por bancarse “los efectos colaterales” del procesamiento de la biomasa y, en particular, a Enzo Castro, “Carlitos” Ruiz, Denis Fariña Núñez, Camila Vargas Gómez, Adrián Medina, Araceli Cañete, Alejandro Valenzuela, Debra Zavala, David Blanc Consolani, Flor Maidana, Cecilia Daciuk y Tatiana Gagliardone por colaborar a menudo y compartir mi camino de aprendizaje en esta tesis.

A la Dra. Alicia López Méndez, por su amistad, su pericia académica y su enorme generosidad.

Al Dr. Agustín Rearte por generosamente prestarme junto con el radiómetro para hacer las mediciones de intensidad de luz su tiempo y su colaboración.

A Ankitha Randir, Ashiwin Vadiveloo, Jeremy Ayre y Jason Crisp, compañeros de laboratorio de mi estancia en el Algae Centre de la Universidad de Murdoch, Australia, por compartir conocimiento y mucha bibliografía, sobre todo al inicio de mi aprendizaje en el tema de cultivos microalgales.

A mis compañeros de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, mi segundo lugar de trabajo, Daniela Riva, Catalina Molina, Daniela Regeiro, Juan Ignacio Gori, Ignacio Zabala, Brian Zenteno, por su ayuda en lo cotidiano, sus aportes técnicos y, sobre todo, por su acompañamiento en los momentos de “crisis” de los cultivos.

A la Dra. María Verónica Beligni por atender mis dudas, sobre todo al inicio de la tesis, a la Dra. Claudia M. Ribaudó, por hacerme un lugar en el equipo, y a ambas por facilitarme los microorganismos para trabajar. Al Dr. Raúl Vaccaro por acercar a los grupos de investigación que luego permitieron el desarrollo de mi tesis.

A Ezequiel Godoy por su ayuda con el diseño experimental en la herramienta de software.

A Diego Granados, Osvaldo Moreno, Javier Oillataguerre y Juan Veiga, por ayudarme con la logística nada sencilla de recolectar, almacenar y transportar tantos litros de ambos efluentes.

A Diego Osuna por compartir su conocimiento de tantos años en la Consultoría de Tratamiento de efluentes.

A mi familia toda, por ser mi ejemplo, mi aliento y mi lugar.

## RESUMEN

Hoy en día, nos enfrentamos ya a una importante escasez de agua dulce, lo que amenaza la sostenibilidad del desarrollo humano, las estimaciones indican que la demanda mundial de agua dulce aumentará en un 55% para 2050, principalmente debido a la creciente demanda en las actividades de manufactura (400%), la generación de electricidad térmica (140%) y el uso doméstico (130%) (FAO 2012). Por otra parte, la gran cantidad de líquidos residuales de origen agrícola-ganadero y las aguas residuales de ciudades en crecimiento, están contaminando los cursos de agua más rápidamente de lo que la naturaleza puede remediarlas (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et al. 2012).

Las microalgas, microorganismos unicelulares, fotosintéticos, eucarióticos y procarióticos, que pueden crecer en una amplia variedad de condiciones, tienen 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 y, además 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.

En este trabajo se evaluó la viabilidad del cultivo de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*, solas y consociadas con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense*, en mezclas de Suero Ácido de Queso y Purín Vacuno y, 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.

En primer lugar, se realizó la selección o *screening* en condiciones controladas de laboratorio para seleccionar las condiciones más convenientes para el crecimiento de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*, en Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso. Luego se evaluó la capacidad de remoción de nutrientes por parte del cultivo de las microalgas en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*, la productividad volumétrica de biomasa algal y la composición bioquímica de dicha biomasa (es decir, el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas) para los cultivos.

Finalmente se estudió el co-cultivo en modo semicontinuo, en estanques abiertos al exterior, en las condiciones optimizadas.

Se encontró que las microalgas fotoautotróficas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* se adaptan y crecen en los efluentes de la industria láctea, a saber, Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso. La opacidad del Purín Vacuno, su alto contenido en nitrógeno amoniacal, el alto contenido de sólidos suspendidos totales, así como el bajo pH del Suero Ácido de Queso y el rápido descenso del mismo por acción de las bacterias lácticas cuando el efluente no es esterilizado ni diluido, y su bajo contenido de nitrógeno en relación al fósforo (Relación N:P 1,8:1) en comparación con la proporción óptima para el crecimiento microalgal (Relación óptima N:P 16:1) (Redfield 1958), son los principales factores que retrasan el crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* en los mismos.

El resultado óptimo de crecimiento microalgal y depuración simultáneas, se alcanzó en mezclas de 50% Purín Vacuno y 50% Suero Ácido de Queso (v/v).

Los consorcios *Scenedesmus dimorphus*-*Azospirillum brasilense* y *Chlorella pyrenoidosa*-*Azospirillum brasilense* fueron estudiados por primera vez consociados de manera programada sin estar co-inmovilizados en microcápsulas de alginato, en este estudio. Los resultados indican que el consorcio *Chlorella pyrenoidosa*-*Azospirillum brasilense*, es de beneficio para el crecimiento de la microalga, sobre todo en condiciones adversas al exterior. Esto no ocurre para *Scenedesmus dimorphus* en consorcio con la misma bacteria. Además, esta microalga mostró una escasa tolerancia a bajos pH y altas temperaturas y, sobre todo, inhabilidad para competir con *Chlorella pyrenoidosa* en las condiciones cambiantes de los cultivos al exterior.

En resumen, este estudio muestra que es posible cultivar *Chlorella pyrenoidosa* exitosamente y ésta, consociada 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 además de remover contaminantes de los mismos, disminuye la huella hídrica, de carbono y energética, de un cultivo tradicional de microalgas.

Además, los extractivos lipídicos de la biomasa algal obtenida, contienen 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.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN.....	v
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvi
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	xviii
ABREVIACIONES .....	xix
OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	1
1 INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Contexto global y motivación de este estudio.....	3
1.2 Tratamiento convencional de efluentes.....	6
1.2.1 Tratamiento primario .....	6
1.2.2 Tratamiento secundario .....	6
1.2.3 Tratamiento terciario.....	6
1.3 Microalgas.....	7
1.3.1 Condiciones de cultivo.....	8
1.3.1.1 Luz.....	8
1.3.1.2 Temperatura .....	8
1.3.1.3 pH.....	9
1.3.1.4 Nutrientes .....	10
1.3.2 Sistemas de cultivo de microalgas .....	10
1.3.2.1 Fotobiorreactores cerrados .....	11
1.3.2.2 Fotobiorreactores abiertos: Estanques abiertos .....	13
1.3.3 Las microalgas en el tratamiento de aguas residuales.....	14
1.3.3.1 Ventajas y potencial .....	14
1.3.3.2 Principales obstáculos .....	17
1.4 Interacciones microalgas-bacterias .....	19
1.4.1 Bacterias promotoras del crecimiento.....	21

1.4.2	Interacciones de <i>Azospirillum brasilense</i> con microalgas: ventajas y potencial .....	22
1.5	La industria láctea y sus efluentes .....	25
1.5.1	Purín Vacuno.....	26
1.5.2	Suero de Queso.....	27
1.5.3	Antecedentes del cultivo de microalgas en Purín Vacuno o Suero Ácido de Queso .....	27
2	MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....	30
2.1	Microorganismos utilizados y mantenimiento de cultivos.....	30
2.1.1	Microalgas.....	30
2.1.2	Bacteria.....	31
2.2	Obtención de los efluentes usados en el estudio .....	32
2.2.1	Purín Vacuno (PV).....	33
2.2.2	Suero Ácido de Queso (SAQ).....	33
2.3	Procedimientos generales de limpieza y esterilización .....	33
2.4	Procedimientos analíticos.....	34
2.4.1	Precauciones generales.....	34
2.4.2	Muestreo de cultivos .....	34
2.4.3	Determinación del crecimiento microalgal .....	34
2.4.3.1	Conteo celular .....	34
2.4.3.2	Determinación de peso seco y peso seco libre de cenizas.....	35
2.4.3.3	Determinación de la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y la productividad volumétrica.....	35
2.4.4	Determinación del crecimiento bacteriano.....	36
2.4.5	Determinación de la composición bioquímica de la biomasa .....	38
2.4.5.1	Análisis de carbohidratos totales.....	38
2.4.5.2	Contenido lipídico total.....	38
2.4.5.3	Contenido total de proteínas.....	39
2.4.6	Análisis de aguas y caracterización de nutrientes .....	40

CAPÍTULOS DE RESULTADOS .....	41
3 CRECIMIENTO DE MICROALGAS EN MEZCLAS DE SUERO ÁCIDO DE QUESO Y PURÍN VACUNO .....	42
3.1  Introducción .....	42
3.2  Materiales y métodos .....	44
3.2.1  Diseño experimental.....	44
3.2.1.1  Ensayo 1: Selección de la proporción de efluentes para un óptimo crecimiento microalgal.....	44
3.2.1.2  Ensayo 2: Remoción de nutrientes y crecimiento de microalgas en condiciones al exterior en mesocosmos .....	47
3.3  Resultados .....	49
3.3.1  Efecto de la proporción de efluentes en la velocidad de crecimiento y productividad de los cultivos (Ensayo 1).....	49
3.3.1.1  Relación Nitrógeno:Fósforo y disponibilidad de luz .....	51
3.3.1.2  Optimización por diseño factorial.....	54
3.3.2  Comparación de las eficiencias de remoción de nutrientes y composición bioquímica de la biomasa (Ensayo 2) .....	55
3.3.2.1  Remoción de nutrientes.....	56
3.3.2.2  Composición bioquímica de la biomasa .....	57
3.4  Discusión.....	58
3.4.1  Penetración de la luz .....	58
3.4.2  pH.....	61
3.4.3  Relación N:P .....	65
3.4.4  Uso de agua dulce .....	68
3.4.5  Remoción de nutrientes.....	69
3.5  Conclusiones .....	70
4 CO-CULTIVO DE MICROALGAS Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO .....	72
4.1  Introducción .....	72
4.2  Materiales y métodos .....	74
4.2.1  Microorganismos .....	74

4.2.2	Medio de cultivo.....	75
4.2.3	Sistema de cultivo (fotorreactores) .....	75
4.2.4	Muestreo y determinaciones analíticas .....	77
4.3	Resultados .....	77
4.3.1	Crecimiento y productividad microalgal.....	77
4.3.2	Capacidad de remoción de nutrientes.....	81
4.3.3	Composición bioquímica de la biomasa.....	85
4.3.4	Crecimiento bacteriano .....	86
4.4	Discusión.....	87
4.5	Conclusión.....	94
5	CULTIVO SEMICONTINUO AL EXTERIOR.....	95
5.1	Introducción .....	95
5.2	Materiales y métodos .....	97
5.2.1	Microorganismos.....	97
5.2.2	Medio de cultivo.....	98
5.2.3	Sistema de cultivo (estanques abiertos agitados).....	98
5.2.4	Muestreo y determinaciones analíticas .....	99
5.2.5	Inoculación de estanques abiertos agitados.....	99
5.2.6	Modo batch y semicontinuo .....	100
5.2.7	Gestión del cultivo .....	100
5.3	Resultados .....	102
5.3.1	Comparación del crecimiento y la productividad de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> con y sin <i>Azospirillum brasilense</i> .....	109
5.3.2	Remoción de nutrientes y tiempo de retención hidráulica .....	112
5.3.3	Crecimiento bacteriano .....	117
5.3.4	Composición bioquímica de la biomasa algal.....	117
5.4	Discusión.....	118
5.5	Conclusión.....	123
6	APROVECHAMIENTO DE LA BIOMASA ALGAL GENERADA .....	124
6.1	Introducción .....	124
6.2	Materiales y métodos .....	125

6.2.1	Mircoorganismos (Biomasa).....	125
6.2.2	Extracción de lípidos.....	126
6.2.3	Caracterización y separación de lípidos.....	126
6.3	Resultados .....	127
6.4	Discusión.....	131
6.5	Conclusión .....	132
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		134
BIBLIOGRAFÍA .....		137

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de escasez física o económica de agua dulce. Fuente: FAO. (Earthscan 2007) .....	4
Figura 2. Distintos tipos de fotobiorreactores cerrados.....	12
Figura 3. Distintos tipos de estanques abiertos .....	13
Figura 4. Tasa específica de crecimiento [ $d^{-1}$ ] de las 15 condiciones de cultivo testeadas en el <i>screening</i> inicial. Sc ( <i>Scenedesmus dimorphus</i> ); Ch ( <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ); Sc-Ch (ambas en consorcio)..	50
Figura 5. Productividad volumétrica en biomasa [ $g.L^{-1}d^{-1}$ ] de las 15 condiciones de cultivo testeadas en el <i>screening</i> inicial. Sc ( <i>Scenedesmus dimorphus</i> ); Ch ( <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ); Sc-Ch (ambas en consorcio).....	51
Figura 6. Muestras de Purín Vacuno (izquierda) y Suero Ácido de Queso (derecha)	51
Figura 7. Mezclas de efluentes usadas en este estudio.....	53
Figura 8. Comparación de la luz transmitida a través de cada una de las muestras de efluentes usados en este estudio y mezclas de ellos.....	54
Figura 9. Tasas de crecimiento específico obtenidos en el Ensayo 1 para las diferentes combinaciones de microalgas.....	60
Figura 10. Productividades volumétricas de biomasa obtenidas en el Ensayo 1 para las diferentes combinaciones de microalgas. ....	61
Figura 11. Nódulos radicales en leguminosas .....	72
Figura 12. Vista superior del bastidor de luces .....	76
Figura 13. Imágenes del arreglo de fotorreactores utilizados en el experimento de co-cultivo de <i>Scenedesmus dimorphus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> .....	76
Figura 14. Células de <i>Scenedesmus dimorphus</i> cultivada sola, en 50%PV-50%SAQ .....	79
Figura 15. Células de <i>Scenedesmus dimorphus</i> al cuarto día de co-cultivo con <i>A. brasilense</i> , en 50%PV-50%SAQ.....	79
Figura 16. Células de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , al cuarto día del experimento en co-cultivo con <i>A. brasilense</i> , en 50%PV-50%SAQ .....	79
Figura 17. Densidad celular de los cultivos microalgales de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) ...	80

Figura 18. Productividad en biomasa [ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ] de los cultivos microalgales de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas <i>Azospirillum brasilense</i> (Az).....	81
Figura 19. Contenido de nutrientes del medio de cultivo al inicio del experimento y al final del mismo para <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) .....	82
Figura 20. Demanda bioquímica de oxígeno del medio de cultivo al inicio del experimento y al final del mismo para <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (Az).....	83
Figura 21. Demanda química de oxígeno del medio de cultivo al inicio del experimento y al final del mismo para <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (Az).....	84
Figura 22. Composición bioquímica de las biomásas microalgales de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas <i>Azospirillum brasilense</i> (Az) .....	85
Figura 23. Inóculo de <i>Azospirillum brasilense</i> sembrado en placas con Rojo Congo	86
Figura 24. Crecimiento en placas con Rojo Congo a las 48 h de la mezcla 50%PV-50%SAQ crudos (izq) y luego de ser inoculado con <i>Azospirillum brasilense</i> (der).....	87
Figura 25. Estanques abiertos agitados tipo <i>raceway</i> utilizados en este estudio (izquierda) y sus dimensiones (derecha).....	99
Figura 26. Biofilm que se formaba y era removido periódicamente por cepillado (a) e insectos (b), removidos luego con una red de acuario (c) intercalada entre el tabique central y una pared lateral. Sondas de temperatura y pH (d) usadas para la medición de dichos parámetros en el líquido del cultivo .....	101
Figura 27. Temperaturas máxima (línea gruesa) y mínima (línea fina) diarias (a) e irradiancia (b) durante el período de estudio en fotobiorreactores abiertos (estanques) agitados al exterior.....	102

Figura 28. Temperaturas máxima (línea gruesa) y mínima (línea fina) diaria (a) y densidades celulares de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (rojo oscuro) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (azul oscuro) (b) en cultivos en estanques abiertos al exterior....	104
Figura 29. Densidades celulares de los cultivos microalgales de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (línea llena rojo oscuro) y de la contaminación de dicho cultivo (línea punteada rojo oscuro) (a), así como de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (línea llena azul oscuro) y de la contaminación en este cultivo (línea punteada azul oscuro) (b). .....	105
Figura 30. Apariencia de los cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> a simple vista (izquierda) y al microscopio (derecha) luego del último evento de alta temperatura.....	106
Figura 31. Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) del cultivo de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (línea llena azul oscuro) y de la contaminación en este cultivo (línea punteada azul oscuro) en la fase batch de aumentación del cultivo para conformar dos estanques .....	107
Figura 32. Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) de los cultivos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (líneas llenas) en el estanque 1 (azul oscuro) y estanque 2 (verde) y de la contaminación en cada uno (líneas punteadas de colores respectivos), en idénticas condiciones .....	108
Figura 33. Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) de los cultivos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> cultivada sola (línea llena azul oscuro) en el estanque 1 y del consorcio <i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> (línea llena celeste) cultivado en el estanque 2 y de la contaminación en cada uno (líneas punteadas de colores respectivos), en modo semicontinuo .....	110
Figura 34. Concentración en biomasa (libre de cenizas) de los cultivos semicontinuos en estanques abiertos al exterior de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sola (azul oscuro, Ch) y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (celeste, Ch + Az) en los días de cosecha .....	111
Figura 35. Ligera diferencia de color entre las muestras de los estanques de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (marcada como PA, izquierda) y del consorcio de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> (marcada como PB, derecha) en las cosechas a lo largo del ensayo en estanques agitados al exterior.....	111

Figura 36. Evolución del contenido de Fosfatos en los estanques de <i>C. pyrenoidosa</i> cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con <i>A. brasilense</i> (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ.....	114
Figura 37. Evolución del contenido de Nitratos en los estanques de <i>C. pyrenoidosa</i> cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con <i>A. brasilense</i> (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ.....	115
Figura 38. Evolución del contenido de Nitrógeno Amoniacal en los estanques de <i>C. pyrenoidosa</i> cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con <i>A. brasilense</i> (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ .....	115
Figura 39. Evolución de la DQO de los cultivos semicontinuos en estanques abiertos al exterior de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sola (azul oscuro) y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (celeste).....	116
Figura 40. Cromatografía en capa delgada (TLC), eluidas con n-hexano:acetona (izquierda), de los patrones de aceite (Ac), de Extractivo de espinacas (E), extractos de la biomasa obtenida del cultivo de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (A) y de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> (B) en estanques abiertos al exterior y la misma cromatografía en capa delgada (TLC), revelada con permanganato de potasio en medio ácido (derecha). .....	128
Figura 41. Cromatografía en capa delgada (TLC) de los patrones de aceite (Ac), de Extractivo de espinacas (E), extracto de la biomasa obtenida de los cultivos de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> cultivada en efluentes cloacales urbanos, con hexano (A), con acetona (B) y con etanol (C) y por el método Folch (F) (izquierda) y la misma cromatografía en capa delgada (TLC), revelada con permanganato de potasio en medio ácido.....	129
Figura 42. Cromatografía en columna del extracto hexánico de biomasa microalgal, donde se observan la separación de los carotenos al inicio (izq) y de astaxantina y sus ésteres, en el desarrollo de la misma (derecha).....	130
Figura 43. Biorrefinería microalgal: produciendo múltiples productos de biomasa algal.....	131

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes anuales globales de efluentes domésticos, comerciales e industriales producidos, recolectados, tratados y reusados. Resumen de datos disponibles. Fuente: (FAO/AQUASTAT 2016) .....	5
Tabla 2. Relación molar Nitrógeno: Fósforo para diferentes efluentes .....	18
Tabla 3. Estudios seleccionados de cultivos de consorcios microalgas-bacterias promotoras del crecimiento de plantas.....	23
Tabla 4. Medio Basal de Bold (Stein, 1973) .....	31
Tabla 5. Medio de cultivo NFb (para crecimiento y escalado de <i>A. brasilense</i> ) .....	32
Tabla 6. Medio Rojo Congo (para crecimiento diferencial y recuento de <i>A. brasilense</i> en placas).....	37
Tabla 7. Parámetros de diseño del Diseño Factorial Completo .....	45
Tabla 8. Perfil fisicoquímico de los dos efluentes usados en este estudio .....	52
Tabla 9. Relación molar Nitrógeno:Fósforo de los dos efluentes y las tres mezclas de efluentes usados en este estudio .....	52
Tabla 10. Luz transmitida a través de los efluentes y mezclas usados en este estudio .....	53
Tabla 11. Resultados arrojados por la herramienta de Optimización del Software estadístico Minitab .....	55
Tabla 12. Parámetros de crecimiento medidos en cultivos al exterior en mesocosmo (promedio±DS, n=3) .....	56
Tabla 13. Remoción de nutrientes en los tres mesocosmos .....	56
Tabla 14. Composición de la biomasa de los cultivos luego de 6 días de cultivo al exterior en mesocosmo (promedio±DS, n=3) .....	57
Tabla 15. Crecimiento y remoción de nutrientes en cultivos de microalgas de estudios seleccionados (efluentes similares) .....	64
Tabla 16. Comparación de la biomasa algal obtenida en este estudio con los resultados de publicaciones seleccionadas .....	67
Tabla 17. Contenido de nutrientes de los efluentes originales (Suero Ácido de Queso y Purín Vacuno) y del medio de cultivo con 50% de contenido de cada uno de ellos (v/v).....	82

Tabla 18. Remoción de compuestos del medio de cultivo al final del experimento en los cultivos de <i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc) y <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria <i>Azospirillum brasilense</i> (Az)...	84
Tabla 19. Composición de las biomásas al final del período de cultivo (promedio±DS, n=3) .....	85
Tabla 20. Esquema de dilución de cada estanque de cultivo de <i>C. pyrenoidosa</i> sola y en consorcio con <i>A. brasilense</i> para cada cosecha realizada durante el cultivo semicontinuo al exterior en estanques abiertos.....	113
Tabla 21. Composición promedio de las biomásas recuperadas en cada cosecha de los cultivos al exterior (promedio±DS, n=3) .....	118

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Tampón de carbonato .....	16
Ecuación 2. Densidad celular microalgal del cultivo .....	35
Ecuación 3. Tasa de crecimiento del cultivo ( $K'$ ) .....	36
Ecuación 4. Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) .....	36
Ecuación 5. Productividad (Pr) en modo semi-continuo .....	36
Ecuación 6. Número de Unidades formadoras de colonias por mL de muestra .....	37

## ABREVIACIONES

ác.: ácido

Az: *Azospirillum brasilense*

C:N:P : relación molar entre carbono, nitrógeno y fósforo

Ch: *Chlorella pyrenoidosa*

CO<sub>2</sub> : dióxido de carbono

DBO<sub>5</sub>: Demanda bioquímica de oxígeno en 5 días de incubación

DO<sub>600nm</sub>: Densidad óptica medida a 600 nm

DQO: Demanda química de oxígeno

DW: dry weight (por sus siglas en inglés); peso seco

HRAP: high rate algal pond, estanque de cultivo algal abierto y agitado

IAA: Indol-acetic acid (por sus siglas en inglés); ácido indol-acético

N:P : relación molar entre nitrógeno y fósforo

NFb: Caldo de cultivo sin nitrógeno (Nitrogen Free broth, por sus siglas en inglés)

NMP: número más probable

N-NH<sub>4</sub>: nitrógeno amoniacal

N-NO<sub>3</sub>: nitrógeno de nitratos

NT: Nitrógeno total

PGPB: Plant growth promoting bacteria (por sus siglas en inglés); bacterias promotoras del crecimiento de plantas

P-PO<sub>4</sub>: fósforo de fosfatos

Pr: Productividad

PT: Fósforo total

PV: Purín Vacuno

Raceway: tipo de estanque agitado abierto con un tabique central para dividir el flujo de líquido

SAQ: Suero Ácido de Queso

Sc: *Scenedesmus dimorphus*

sp.: especie

SPG: specific growth rate (por sus siglas en inglés); tasa de crecimiento específica

TLC: Thin-Layer Chromatography por sus siglas en inglés; cromatografía en capa delgada

TRH: Tiempo de Retención Hidráulico (HRT por sus siglas en inglés, Hydraulic Retention Time)

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: ultra-violeta

$\mu$ : tasa de crecimiento específica

$\mu_{\text{máx}}$  : tasa de crecimiento específica máxima

## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Existe una gran cantidad de información que indica que es factible cultivar microalgas y lograr niveles aceptables de tratamiento en aguas residuales (Hoffmann 1998), que cubren el rango de efluentes industriales, agrícolas y domésticos (Wilkie and Mulbry 2002, Chinnasamy, Bhatnagar et al. 2010, de-Bashan and Bashan 2010, Fenton and Ó hUallacháin 2012, Sivasubramanian and Muthukumaran 2012, Van Den Hende, Vervaeren et al. 2012), sin embargo, algunos desafíos para que además este cultivo sea simultáneamente rentable, permanecen sin una solución definitiva.

Muchos estudios informan sobre el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales que se centran específicamente en un solo tipo de efluente (Vidyashankar and Ravishankar 2016) y donde la dilución aparece como una necesidad para lograr medios de cultivo adecuados para el crecimiento microalgal. Un método alternativo para la dilución con agua dulce podría ser mezclar distintos efluentes con diferentes cargas de nutrientes para lograr una proporción óptima de los mismos en la corriente final a ser tratada. La mezcla de corrientes con diferentes cargas de nutrientes para lograr complementariedad y relaciones óptimas de nutrientes podría permitir un crecimiento eficiente de microalgas en sinergia con un proceso de ficorremediación efectivo (en este trabajo se hará uso del término *ficorremediación* para hacer referencia al proceso de usar microalgas para remover nutrientes de las corrientes de efluentes), además de mejorar la gestión de agua dulce de todo el proceso.

Por otro lado, aunque el cultivo de microalgas ha sido ampliamente estudiado, cada nuevo conjunto de condiciones (es decir, tipo de aguas residuales como fuente de nutrientes, la luz y la temperatura natural de la zona geográfica para cultivos al exterior, las especies de microalgas utilizadas solas o en consorcios) requiere el análisis del efecto de estos factores en el desarrollo del cultivo.

Varios estudios concluyeron que la interacción entre microalgas y bacterias no solo es beneficiosa para el crecimiento de la microalga sino que podría acelerar el tiempo de tratamiento de aguas residuales, y, en algunos casos, puede facilitar la separación de la biomasa del agua, a través de una biofloculación.

*Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. son las dos microalgas más ampliamente encontradas en las aguas residuales y, por lo tanto, las dos especies se utilizan en el tratamiento de efluentes (Zeng, Guo et al. 2015). Una de las principales razones de

esta elección es su flexibilidad para adaptarse a diferentes y variables concentraciones de los principales nutrientes, nitrógeno y fósforo. También son más resistentes a la depredación (contaminación) que otras especies (Hoffmann 1998).

Por otro lado, la bacteria *Azospirillum brasilense*, no solamente es una bacteria que ha sido denominada como promotora del crecimiento microalgal (de-Bashan, Moreno et al. 2002), sino que su extendido uso como inoculante de plantas, hace que esté disponible comercialmente en el mercado, en diferentes presentaciones, lo cual es de mucha importancia si esta tecnología aquí desarrollada ha de ser transferida a pequeños y medianos productores, que no contarán con un laboratorio para abastecerse de los inóculos.

**En función de lo antes mencionado, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad del cultivo de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*, solas y consociadas con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense*, en mezclas de Suero Ácido de Queso y Purín Vacuno 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.**

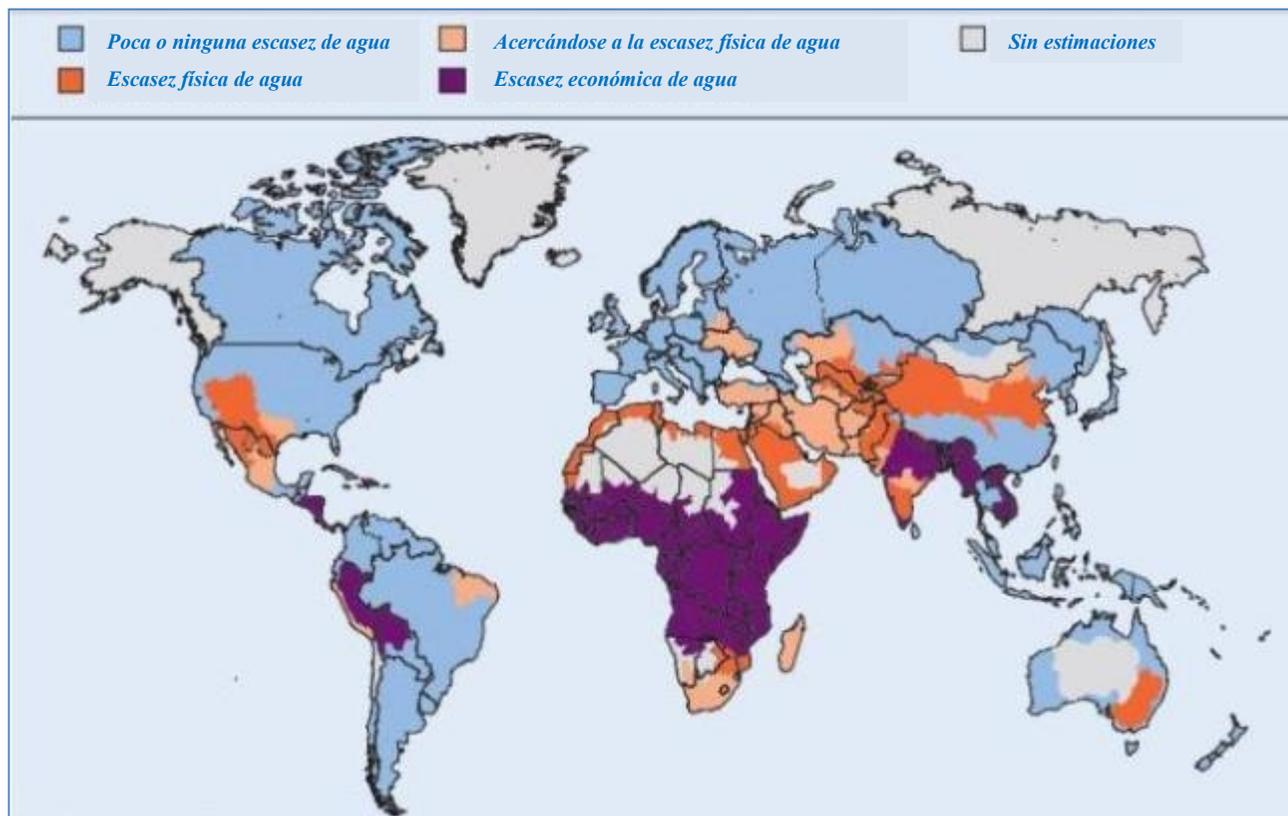
A nivel mundial, el agua, la energía y los alimentos se consideran un nexo (Walsh, Murray et al. 2015). Nuestra dependencia del agua dulce y el volumen de agua dulce que es hoy utilizada en el mundo, a la luz de nuestros comportamientos, parecen estar subestimados. Contribuir al desarrollo de estrategias sistémicas para la gestión de los recursos hídricos debe ser una prioridad de investigación para situar al mundo en un camino más sostenible y equitativo (UNESCO 2012).

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Contexto global y motivación de este estudio

La población humana está aumentando cada vez más rápidamente, con una estimación de 8.100 millones de personas para el año 2025 (OECD/FAO 2016). Este aumento de la cantidad de seres humanos habitando el planeta ejerce una gran presión sobre ciertos recursos, como los alimentos y el combustible (FAO 2012, FAO, IFAD et al. 2015). Por ejemplo, para mantener el estilo de vida actual, tendremos que generar 298.700.000 Tn extra de cereales para el año 2025, 6% de ellos para la producción de biocombustibles (OECD 2016). Además, no sólo nos enfrentamos hoy en día a una creciente demanda mundial de energía, sino también a la escasez de agua dulce, lo que amenaza la sostenibilidad del desarrollo humano.

Las proyecciones indican que, para el año 2025, 800 millones de personas vivirán en países o regiones (como el norte de África, varias partes de Asia, el oeste de México y el este de Australia (Earthscan 2007) con escasez absoluta de agua y dos tercios de la población mundial estará bajo condiciones severas de estrés hídrico (UN 2010). Las estimaciones indican que la demanda mundial de agua dulce aumentará en un 55% para 2050, principalmente debido a la creciente demanda en las actividades de manufactura (400%), la generación de electricidad térmica (140%) y el uso doméstico (130%).



#### Definiciones e indicadores

***Poca o ninguna escasez de agua.*** Abundantes recursos hídricos en relación con el uso, con menos del 25% del agua de los ríos extraída para fines humanos.

***Escasez física de agua*** (el uso de los recursos hídricos se acerca o ha superado los límites sostenibles). Más del 75% de los flujos de los ríos se retiran para fines agrícolas, industriales y domésticos (contabilizando el reciclaje de los flujos de retorno). Esta definición relaciona la disponibilidad de agua con la demanda de agua, implica que las áreas secas no son necesariamente escasas de agua.

***Acercándose a la escasez física de agua.*** Más del 60% de los flujos fluviales son retirados. Estas cuencas experimentarán escasez física de agua en un futuro cercano.

***Escasez económica de agua*** (el capital humano, institucional y financiero limita el acceso al agua aunque el agua en la naturaleza está disponible localmente para satisfacer las demandas humanas). Los recursos hídricos son abundantes en relación con el uso del agua, con menos del 25% del agua extraída de los ríos para fines humanos, pero existe desnutrición.

Figura 1. Áreas de escasez física o económica de agua dulce. Fuente: FAO. (Earthscan 2007)

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).

A lo largo de la mayor parte de la historia humana, los desechos orgánicos humanos (hoy llamados cloacales) y los purines de origen animal se han utilizado como fertilizantes para nutrir el crecimiento de las plantas y este esquema ha servido a la humanidad como tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la gran cantidad de líquidos residuales de origen agrícola-ganadero y las aguas residuales de ciudades en crecimiento donde no se ha implementado un tratamiento efectivo, que se están descargando al ambiente, están contaminando los cursos de agua más rápidamente de lo que la naturaleza puede remediarlas.

**Tabla 1. Volúmenes anuales globales de efluentes domésticos, comerciales e industriales producidos, recolectados, tratados y reusados. Resumen de datos disponibles. Fuente: (FAO/AQUASTAT 2016)**

		<b>Efluentes municipales producidos</b>	<b>Efluentes municipales colectados</b>	<b>Efluentes municipales tratados</b>	<b>Uso directo de efluentes municipales tratados (agua de reúso)</b>
<b>Volumen</b>	[10 <sup>9</sup> m <sup>3</sup> .año <sup>-1</sup> ]	299	166	163	17
<b>Porcentaje</b>	[%]	100%	56%	55%	6%

De acuerdo con los datos estadísticos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO/AQUASTAT 2016), solo la mitad del volumen de los efluentes urbanos del mundo se recolecta y trata antes de su descarga al medio ambiente (Tabla 1). Además, se reutiliza un bajo porcentaje de las aguas residuales tratadas. Esta fuente de agua dulce, comúnmente conocida como agua recuperada o de reúso, podría utilizarse para varias actividades que consumen agua dulce no potable, como el riego.

Reconocer la importancia del tratamiento de aguas residuales en la gestión del agua dulce es el primer paso para hacer frente a la creciente escasez de este recurso insustituible.

## 1.2 Tratamiento convencional de efluentes

El tratamiento convencional de efluentes involucra varios procesos físicos y químicos que se llevan a cabo en serie, uno tras otro (Doble and Kumar 2005). Generalmente se los agrupa en: tratamiento primario, secundario y terciario (Tchobanoglous and Burton 1991).

### 1.2.1 Tratamiento primario

Este proceso tiene como objetivo eliminar una porción de sólidos suspendidos y materia orgánica, sobre todo los sólidos de mayor tamaño. Los procesos de tratamiento pueden incluir: tanque de sedimentación, tanques sépticos, barridos o *skimming* de la superficie y adición de sustancias químicas para facilitar la separación de sólidos del líquido.

### 1.2.2 Tratamiento secundario

Esta etapa generalmente involucra un tratamiento biológico con una segunda decantación y debe dar como resultado la eliminación de al menos el 70% de la materia orgánica biodegradable (en solución o suspensión).

La reducción de los microorganismos causantes de enfermedades a niveles seguros también se realiza en esta parte del proceso por medios físicos o químicos. Esta etapa secundaria se conoce comúnmente como desinfección y el método habitual para lograrlo es la adición de cloro a la corriente ya tratada.

El tratamiento secundario, generalmente una digestión bacteriana, es muy eficiente en la remoción de la materia orgánica. Sin embargo, este proceso aumenta el volumen de lodos causando un problema posterior de disposición final de los mismos (Hoffmann 1998). El lodo generado se considera un fertilizante de baja calidad y no se puede utilizar para la alimentación animal. Además, debido a los productos químicos utilizados para acelerar su floculación y sedimentación, así como la alta concentración de nutrientes que posee, hacen que este lodo genere problemas secundarios de contaminación cuando es aplicado al suelo, práctica comúnmente conocida como *landfarming* (Vidyashankar and Ravishankar 2016).

### 1.2.3 Tratamiento terciario

Esta tercera parte del tratamiento tiene por objetivo eliminar de manera efectiva el nitrógeno y/o el fósforo y/o cualquier otro contaminante específico que afecte la calidad del agua. El proceso de tratamiento puede incluir: filtración por membrana (micro-; nano-

; ultra- y ósmosis inversa), infiltración / percolación, decoloración con carbón activado y precipitación química.

El tratamiento terciario, es decir, la remoción de fósforo y nitrógeno, es frecuente que se realice mediante precipitación química. Por ejemplo, la eliminación del fósforo se logra mediante la adición de compuestos inorgánicos como aluminio, hierro o calcio, lo que provoca la precipitación de fosfatos metálicos (Horan 1990). Dicho tratamiento también eleva la concentración de aluminio y otras sales metálicas en el lodo terciario, creando problemas de disposición final segura (Hoffmann 1998).

Con el fin de mantener las actividades humanas sostenidamente a través del tiempo, la reutilización de residuos y la optimización del uso del agua dulce deben ser aspectos a considerar en todo proceso de producción. De lo antes expuesto, se puede notar que la gestión convencional de tratamiento de aguas residuales genera problemas de contaminación secundaria. Estos inconvenientes precisan ser abordados si la meta es lograr un proceso sustentable de uso y recuperación (reúso) del agua dulce. Por lo tanto, la investigación sobre los temas relacionados al tratamiento de aguas residuales debe conocer y tomar en cuenta estos inconvenientes.

### **1.3 Microalgas**

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 (Graham, Graham et al. 2009, Dixon 2013). 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 (Larkum 2010). 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 (Chisti 2007). 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 (Kay 1991, Borowitzka 1992, Shimizu 1993, Laliberté, Proulx et al. 1994, Vílchez, Garbayo et al. 1997, Spolaore, Joannis-Cassan et al. 2006, Chisti 2007, Menetrez 2012, Olguín 2012).

El cultivo de microalgas también se ha propuesto para la producción de biocombustibles (Chisti 2007, Borowitzka and Moheimani 2013).

### 1.3.1 Condiciones de cultivo

En este apartado se describen las condiciones que deben tenerse en cuenta para el cultivo de microalgas, haciendo especial foco en las microalgas fotoautotróficas, que serán las utilizadas en este estudio.

#### 1.3.1.1 Luz

La luz es la principal fuente de energía de las microalgas fotoautotróficas y por ende, su presencia es de fundamental importancia para el desarrollo de estos cultivos microalgales (Borowitzka 1998). La disponibilidad de luz influye en la fisiología, el metabolismo y la productividad de biomasa de las microalgas fotoautotróficas, como las utilizadas en este estudio. Además, la intensidad de la luz tiene un efecto determinante sobre el crecimiento de las microalgas porque influye en las reacciones bioquímicas, como las relacionadas a la tasa de absorción de nutrientes (Terry, Hirata et al. 1983, Curtis and Megard 1987, Meseck, Alix et al. 2005) y el grado de saturación de lípidos (Thompson, Harrison et al. 1990, Klyachko-Gurvich, Tsoglin et al. 1999, Fábregas, Maseda et al. 2004).

Si bien la disponibilidad de luz es un componente imprescindible para el crecimiento de las microalgas fotoautotróficas, la presencia de cantidades excesivas de luz, tiene el efecto de inhibir el crecimiento (foto-inhibición) (Long, Humphries et al. 1994).

#### 1.3.1.2 Temperatura

La temperatura influye en el crecimiento de las microalgas, principalmente, debido a la influencia que tiene en la cinética enzimática (Raven and Geider 1988, Davison 1991) de procesos de degradación o síntesis y en los cambios que puede producir en las estructuras de las células, como membranas y paredes celulares (Fogg 2001).

Si bien cada especie de microalgas tiene un rango óptimo de temperatura, la mayoría de las especies son capaces de ajustar sus procesos metabólicos y adaptarse a cambios en las condiciones de temperatura, tanto en cambios cortos como de larga duración (Payer, Chiemvichak et al. 1980, Renaud, Thinh et al. 2002).

En términos generales, las microalgas que crecen en zonas polares tienen un rango óptimo de crecimiento por debajo de 10°C (Marré 1962, Teoh, Chu et al. 2004), las microalgas de clima templado se desarrollan mejor en un rango de 10-25°C (Nelson, Guarda et al.

1992, Barsanti and Gualtieri 2006), para las especies tropicales la temperatura óptima de crecimiento oscila alrededor de los 25°C (Renaud, Thinh et al. 2002) y entre 25 y 35°C para las algas que crecen en zonas desérticas (Thomas, Tornabene et al. 1984).

Aún más importante es la influencia que la temperatura tiene en la dominancia de las especies (lo que incluye a los predadores), sobre todo en los cultivos al exterior (Goldman and Ryther 1976, Karentz and Smayda 1984, Andersson, Haecky et al. 1994).

### 1.3.1.3 pH

Además de la disponibilidad de luz, el pH del medio de cultivo también tiene una influencia considerable en el crecimiento microalgal, ya que determina el grado de ionización en las especies químicas, lo que influye en su absorción y reactividad. Entre las transformaciones o reacciones químicas más importantes, que podrían ser inducidas por el pH del medio de cultivo, están la ionización de las especies de carbono inorgánico ( $CO_2 / HCO_3^- / CO_3^{2-}$ ) (Moss 1973, Azov 1982), la co-precipitación de fosfato y calcio, la co-precipitación de magnesio y carbonato, la volatilización del nitrógeno amoniacal en forma de amoníaco, lo que se conoce como *stripping* de amoníaco, y los cambios en la absorción de nutrientes esenciales como nitratos y fosfatos (Meseck 2007). La co-precipitación de fosfatos y el *stripping* de nitrógeno amoniacal se producen a un pH superior a 8,5 y 10, respectivamente.

Otro aspecto relevante influenciado por el pH del medio, es la contaminación del cultivo, ya que el pH tiene un impacto significativo en la competencia de especies (Goldman, Riley et al. 1982). Por ejemplo, la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* es capaz de crecer a un pH de más de 10, lo que la convierte en uno de los contaminantes más comunes en cultivos de microalgas mal tamponados (Goldman, Azov et al. 1982, Goldman, Riley et al. 1982).

Además, los valores bajos de pH (por debajo de 6) también inducen cambios significativos en la fisiología celular e influyen en el crecimiento (Gerloff-Elias, Spijkerman et al. 2005). Algunas especies de microalgas no pueden sobrevivir en esta condición, principalmente, porque muchas enzimas son altamente dependientes del pH y se vuelven inactivas a valores de pH ácidos (Gimmler 2001). Además, el mantenimiento de un pH citosólico neutro cuando los valores de pH del medio de crecimiento son bajos, consume energía, lo que puede explicar la disminución observada en las tasas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a esta condición (Campbel and Stokes 1985, Nixdorf, Krumbeck et al. 2003).

Es por estas razones que los valores de pH alcalino o ácido en cultivos de microalgas requieran el tamponamiento de los mismos para mantener un nivel de pH alrededor de 7.

#### 1.3.1.4 Nutrientes

Además de la luz y el dióxido de carbono, los nutrientes nitrógeno y fósforo son cruciales para el crecimiento de las microalgas, ya que son componentes esenciales de proteínas, material genético, moléculas de transferencia de energía, lípidos y carbohidratos, de los que se compone la célula.

Las microalgas pueden metabolizar diferentes especies químicas de estos nutrientes, de modo de adaptarse al medio, así como diferentes concentraciones de los mismos (Ketchum 1939, Goldman and Glibert 1982).

Pero para que estos nutrientes sean aprovechados de una manera óptima, no solamente es necesaria su presencia en el medio, sino la existencia de los mismos en una relación estequiométrica de C:N:P de 106: 16: 1 (carbono: nitrógeno: fósforo), conocida como la relación de Redfield (Redfield 1958).

La proporción de Redfield tiene validez y se usa normalmente para fitoplancton en condiciones óptimas de crecimiento.

Si la relación molar N:P es menor que 13, las microalgas quedan limitadas en nitrógeno, mientras que relaciones de N: P mayores que 22 indican una limitación de fósforo (Hillebrand and Sommer 1999). Si hay una limitación de nutrientes en el medio, el desarrollo microalgal puede ser sub-óptimo o no ser del todo factible. Sin embargo, se ha reportado que la limitación de Nitrógeno en los medios de cultivo es, a veces, favorable para la mayor producción de lípidos en la biomasa microalgal (Hena, Fatimah et al. 2015).

El estrés nutricional producido por la deficiencia de nitrógeno en el medio, aumenta el contenido de lípidos en las células de microalgas, por lo tanto, una baja proporción de N:P, como la encontrada en algunas aguas residuales, podría ser beneficiosa para la producción de una biomasa con alto contenido lipídico.

#### 1.3.2 Sistemas de cultivo de microalgas

Existen dos sistemas principales de cultivo para microalgas: estanques abiertos y fotobiorreactores cerrados.

### 1.3.2.1 Fotobiorreactores cerrados

En los sistemas cerrados o fotobiorreactores cerrados, los cultivos de microalgas no están expuestos a la atmósfera, sino cubiertos con un material transparente o contenidos dentro de un tubo o sistema de tubos transparente (Behrens 2005).

Los sistemas cerrados, que pueden ser de platos, de bolsas, tubulares verticales u horizontales, de placas, etc (se muestran algunos ejemplos en la Figura 2), tienen una alta eficiencia de utilización de la luz, lo que conduce a altas productividades, así como más posibilidades de control para el desarrollo de un cultivo limpio axénico o con contaminación limitada, la posibilidad de controlar la temperatura y la capacidad de ser utilizado en exteriores con luz natural.

Aunque los sistemas cerrados operados en el exterior pueden alcanzar concentraciones de biomasa más altas que los sistemas abiertos, el crecimiento de las microalgas sigue siendo sub-óptimo debido a las variaciones en la temperatura y la intensidad de la luz. Por otro lado, estos sistemas cerrados requieren de una inversión inicial más onerosa (Moheimani 2013) y esta es la principal razón por la que no son tenidos en cuenta para las operaciones de cultivo de microalgas en efluentes.



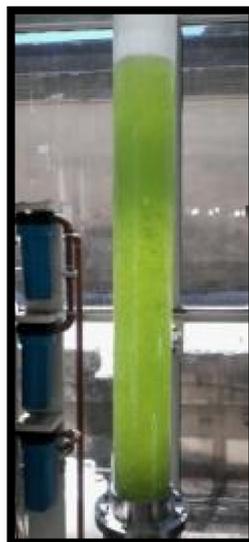
(a)



(b)



(c)

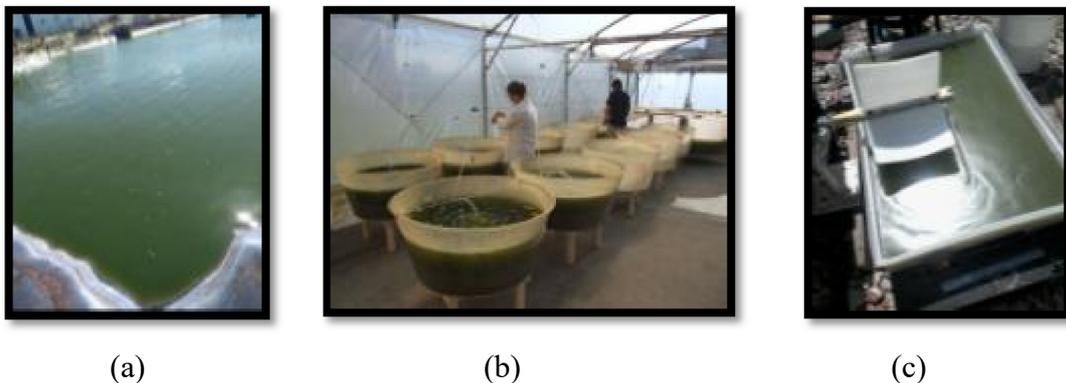


(d)

**Figura 2. Distintos tipos de fotobiorreactores cerrados. (a) y (b) Fotobiorreactores de bolsa; (c) Fotobiorreactor tubular horizontal con paredes de acrílico con bridas de plástico, cortesía de SARDI (South Australian Research and Development Institut, Adelaide), fotos tomadas por la autora durante la visita realizada en Agosto 2013; (d) Fotobiorreactor tubular vertical con paredes de acrílico y bridas de acero inoxidable, utilizado en este estudio, perteneciente a la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.**

### 1.3.2.2 Fotobiorreactores abiertos: Estanques abiertos

Los fotobiorreactores abiertos son, como su nombre lo indica, sistemas que están abiertos a la atmósfera. Estos sistemas de cultivo son más fáciles de construir y operar, son más duraderos en comparación con los fotobiorreactores cerrados y son los sistemas más utilizados para el cultivo a gran escala de microalgas al exterior. Actualmente, se reconocen en uso cuatro tipos principales de sistemas abiertos: (1) estanques grandes y poco profundos sin agitación, (2) tanques, (3) estanques circulares y (4) estanques tipo *raceway* (Borowitzka 2005). Estos últimos, son estanques rectangulares, con vértices en ángulo recto o redondeado, y poseen un tabique central para dividir el flujo, que es agitado a baja velocidad. Son reconocidos como el sistema más recomendado para el cultivo a gran escala, principalmente por su bajo costo de construcción y menor energía necesaria para el mezclado, ya que usan agitadores de paletas que giran a baja velocidad ( $20\text{cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ ). Cabe mencionar que los mismos no funcionan en todas las geografías ni son recomendables para todas las especies de microalgas.



**Figura 3. Distintos tipos de estanques abiertos. (a) Estanque grande, poco profundo y sin agitación, cortesía de Osuna Consultores; (b) Estanques circulares, cortesía Dra. Verónica Beligni; (c) Estanque tipo *raceway* perteneciente a la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, utilizado en este estudio.**

La selección de un sistema en particular está influenciada por las características de la microalga seleccionada, las condiciones climáticas locales y los costos de la tierra y el agua. Las microalgas se pueden cultivar en fotobiorreactores, ya sea de forma fotoautotrófica, heterotrófica ó mixotrófica.

Los factores que deben considerarse antes de elegir un sistema de cultivo son: la biología del alga, las características del agua a utilizar, los nutrientes disponibles, el clima local, el

costo de la tierra, la energía necesaria y el tipo de producto final que se busca obtener (Borowitzka 1994). Teniendo en cuenta estos factores, el Departamento de Energía de los Estados Unidos, como resultado del Programa de Especies Acuáticas, desarrollado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable, concluyó que los estanques abiertos del tipo *raceway* representaban la solución más viable para la producción masiva de biomasa microalgal (Sheehan, Dunahay et al. 1998).

### 1.3.3 Las microalgas en el tratamiento de aguas residuales

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.

#### 1.3.3.1 Ventajas y potencial

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 produce biomasa microalgal, puede incluso ser una alternativa de negocio agro-industrial, especialmente cuando no hay prácticas de gestión de efluentes implementadas (Fenton and Ó hUallacháin 2012).

Este enfoque se vuelve más relevante si consideramos que para un crecimiento rápido y un alto rendimiento en biomasa y productividad, el cultivo de microalgas requiere una gran cantidad de nitrógeno y fósforo (se requieren aproximadamente 50-80 kg de nitrógeno y 5 kg de fósforo por tonelada de producción de biomasa algal) (Borowitzka and Moheimani 2013). Tanto las fuentes de fósforo (roca de fosfato) como de nitrógeno (combustible fósil) son finitas y sus reservas se están agotando día a día, ya que se utilizan ampliamente como fertilizante. Además de su procedencia fósil y, por tanto, finita, utilizar fertilizantes como fuente de nutrientes hace que el cultivo de microalgas compita con los cultivos de alimentos por estos recursos (Borowitzka and Moheimani 2013). Aproximadamente el 50% de toda la energía fósil requerida para el crecimiento de microalgas para producción de biocombustibles está vinculada a los fertilizantes inorgánicos (Chisti 2007).

Por otro lado, en un proceso de ficorremediación, la economía energética que se logra en comparación con los tratamientos convencionales, como el de barros activados, también es una ventaja a ser tomada en cuenta. El principal mecanismo en la ficorremediación es la significativa generación de oxígeno debido al proceso de fotosíntesis. Esta oxigenación de origen natural (virtualmente gratuita) ayuda a la descomposición de contaminantes orgánicos e inorgánicos en tal cantidad que, cuando se acopla a un tratamiento convencional, reduce hasta un 30% la necesidad de aireación mecánica utilizada en los procesos del tratamiento secundario (Mallick 2002).

Como ejemplo para ilustrar el punto, en un proceso de barros activados, la remoción de 1 kg de  $\text{DBO}_5$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) requiere 1 kWh de electricidad para la etapa de aireación, lo que produce 1 kg de  $\text{CO}_2$  (probablemente de origen fósil) en la generación de energía. En contraste, la oxigenación resultante del proceso de fotosíntesis realizado por las microalgas fotoautotróficas, es capaz de remover 1 kg de  $\text{DBO}_5$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), sin consumir energía extra y produce suficiente cantidad de biomasa algal para generar metano (biogás) y producir 1 kWh de energía eléctrica (Oswald 2003).

Esta aplicación para el tratamiento de efluentes ha sido extensamente estudiada en los Estados Unidos de Norteamérica y su aplicación reportada en diversos estudios (Oswald and Gotaas 1957, Oswald 1988a, Oswald 1988b, Oswald 1988c). Más recientemente, la biomasa producida de este modo, empezó a ser considerada como una fuente potencial de materia prima para producción de biocombustibles u otros productos, en el marco de una biorrefinería (Mata, Martins et al. 2010, Singh and Gu 2010, Borowitzka and Moheimani 2013).

El Departamento de Energía de los Estados Unidos, ha reconocido el potencial sinérgico del tratamiento de aguas residuales y producción de biocombustibles a partir de microalgas, declarando que “inevitablemente el tratamiento de aguas residuales y reciclado debe desarrollarse en conjunto con la producción de biocombustibles a partir de microalgas” (DOE 2010). Como se mencionó antes, el uso de aguas residuales puede disminuir el costo de fertilizantes comerciales necesarios para el cultivo de microalgas y los ahorros surgidos de este tipo de tratamiento pueden contribuir a la rentabilidad de la producción de bioproductos a partir de microalgas. Parece, sin embargo, que el potencial colaborativo no ha sido suficientemente integrado en los procesos implementados de tratamiento de aguas residuales y, mientras tanto, el costo y la energía consumida por el

tratamiento terciario de efluentes, sigue siendo un problema para industrias y municipalidades, sobre todo, pequeñas y medianas.

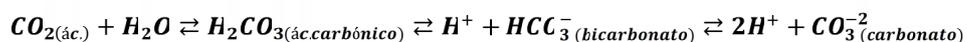
Adicionalmente hay que tener en cuenta, que las instalaciones para el tratamiento de aguas residuales ya existen en muchos casos, con lo cual, las inversiones y problemas de escalabilidad para implementar una tecnología de fitorremediación, se reducen significativamente (Christenson and Sims 2011).

Otro paso que se ve facilitado y resulta menos peligroso en la fitorremediación, es la desinfección al final del proceso. En la mayoría de las instalaciones convencionales de tratamiento de efluentes, ésta se consigue mediante una adición de cloro.

Como se describió anteriormente, este paso se realiza, convencionalmente, para garantizar la desinfección de microorganismos patógenos (Tchobanoglous and Burton 1991) pero la cloración puede provocar la formación de compuestos carcinogénicos potenciales, cuando el cloro reacciona con la materia orgánica (organoclorados). Por lo tanto, desde hace varias décadas, se vienen buscando alternativas para suplantarlo o disminuir el uso de cloro. Las alternativas tecnológicas, como la desinfección con ozono o radiación ultravioleta (UV), son en extremo costosas para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Oswald 2003).

La actividad fotosintética de las microalgas produce una desinfección indirecta del agua, que se explica por el consumo de dióxido de carbono disuelto del agua, en el proceso de fotosíntesis.

El dióxido de carbono al disolverse en agua, forma especies químicas con las que está en equilibrio, se forma un tampón de carbonato en el agua (Ecuación 1).



**Ecuación 1. Tampón de carbonato**

Cuando las microalgas consumen  $\text{CO}_2$ , el equilibrio se desplaza a la izquierda en la Ecuación 1, por ende, los iones de carbonato reaccionan en el agua en presencia de iones de hidrógeno libres, formando iones bicarbonato libres ( $\text{HCO}_3^-$ ), y consumiendo iones de hidrógeno libres, es decir, disminuyendo la concentración (actividad) del ion hidrógeno, y por definición aumentando el pH (el agua se vuelve entonces más alcalina) (Fallowfield and Garrett 1985, Craggs, McAuley et al. 1997). Este proceso biológico natural puede elevar el nivel de pH del agua a más de 9, un pH al cual las bacterias coliformes fecales,

como *Escherichia coli*, no sobreviven (Oswald 2003). Esta desinfección indirecta y la oxidación generada por acción del oxígeno fotosintético, reducen la cantidad de cloro necesaria. De acuerdo a lo demostrado por Parhad and Rao (1974), *Escherichia coli* no puede crecer a pHs superiores a 9,2 y un pH de 9,4 por 24 h produce un 100% de eliminación por muerte de la misma.

En los tratamientos convencionales la aireación para facilitar la oxidación de los contaminantes y la corrección del pH se realizan al inicio del proceso. Luego, la eliminación de la materia orgánica disuelta a través de un proceso biológico, se realiza en una segunda etapa. Por último, la eliminación de nutrientes inorgánicos se logra mediante una precipitación química, lo que provoca un importante volumen de lodo sin mayor utilidad (Oswald 2003, Park, Craggs et al. 2011). El tratamiento de aguas residuales mediado por microalgas, o ficorremediación, tiene la gran ventaja de que todos estos pasos se pueden lograr simultáneamente, por lo tanto, el proceso es más compacto y simple.

Además, no existe una generación de “lodos”, sino una producción de una valiosa biomasa como resultado del proceso. Esta biomasa podría utilizarse para la producción de biocombustibles, alimento de ganado y varios otros metabolitos comerciales en el marco de una biorrefinería (Becker 2007, Moheimani and Parlevliet 2013, Vidyashankar, Venu Gopal et al. 2014).

#### 1.3.3.2 Principales obstáculos

Aunque el tratamiento de aguas residuales y la recuperación eficiente de nutrientes a través del cultivo de microalgas es factible a escalas piloto (Oswald 1977, de la Noue and de Pauw 1988), algunos obstáculos importantes, tales como bajas productividades de biomasa, prolongados tiempos de retención hidráulica (TRH; HRT por sus siglas en inglés; la duración media de tiempo que un compuesto permanece en un biorreactor (Olguín 2012)) y la difícil separación de la biomasa del agua, son obstáculos que aún quedan por superar para el desarrollo a gran escala de esta tecnología.

La limitación del crecimiento puede ocurrir tanto por bajos contenidos de nutrientes o por exceso de los mismos (por ejemplo, toxicidad por elevado contenido compuestos amoniacales).

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 2, el problema principal con la mayoría de las aguas residuales municipales y agrícolas son las altas concentraciones de nutrientes, particularmente la concentración total de N y P, que, bajo los procedimientos

convencionales de precipitación química, requiere costosos tratamientos para eliminarlos de las aguas residuales.

**Tabla 2. Relación molar Nitrógeno: Fósforo para diferentes efluentes**

Tipo de efluente		NT	PT	N:P	Estudio
		mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	Relación molar	
Lácteo	Crudo	1210	303	8,8	
Lácteo	Digestato (Maryland, USA)	2371	240	21,8	<i>Wilkie and Mulbry (2002)</i>
Lácteo	Digestato(Florida, USA)	225	24,7	20,1	
Aves de corral	Crudo (India)	3,50%	5,64%	1,4	<i>Natarajan and Varghese (1980)</i>
Aves de corral	Crudo (Hong Kong)	2,056	261,3	0,017	<i>Cheung and Wong (1981)</i>
Porcino	Crudo (Hong Kong)	2,524	344,2	0,016	
Lácteo	Digestato (Minnesota)	3456	249,7	30,6	<i>Wang, Li et al. (2010)</i>
Lácteo	Crudo (Minnesota)	3305	266	27,5	
Lácteo	Digestato de Purín Vacuno (Florida, USA)	412	64,5	14,1	<i>Kebede-Westhead, Pizarro et al. (2004)</i>
Municipal	Efluente municipal	61,4	3,1	43,8	<i>Zhao, Zhou et al. (2014)</i>
Municipal	Lixiviados	1786	4	987	

Por otro lado, como se mencionó antes, una proporción inadecuada de nutrientes puede llevar a una baja producción de biomasa.

La mayor parte de la bibliografía indica que las microalgas son capaces de crecer efectivamente en ambientes ricos en nutrientes y de consumirlos eficientemente, pero la alta concentración de nitrógeno amoniacal en el agua puede provocar un colapso del cultivo, ya que puede resultarles tóxico. Sin embargo, recientemente, (Nwoba, Ayre et al. 2016) reportaron ciertas especies de microalgas que pueden ser cultivadas en efluentes de cerdos luego de una digestión anaeróbica, con concentraciones tan altas como 800 mg N-NH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup> con el propósito de utilizar la biomasa algal para alimentación animal o producción de biocombustibles.

Se ha reportado que la toxicidad del nitrógeno amoniacal para las microalgas resulta significativa cuando los tiempos de retención hidráulica son cortos (48 h), las concentraciones se encuentran por encima de 2 mM de NH<sub>3</sub> y valores de pH de 8,0 (Abeliovich and Azov 1976). Sin embargo, a tiempos de retención más largos, se observaron valores de pH más altos (entre 9 y 10), lo que causó la volatilización del nitrógeno amoniacal en forma de amoníaco o *stripping*. Esta condición de pH permitió un crecimiento microalgal continuo (Azov and Shelef 1987).

Estas emisiones de amoníaco se observaron en varios tipos de aguas residuales y pueden ser significativas (Barlow, Boersma et al. 1975). De todos modos, incluso si las microalgas pudieran crecer adecuadamente después de alcanzarse esta condición, es imperativo abordar la mitigación del *stripping* de amoníaco a la atmósfera (contaminación gaseosa) para lograr un proceso responsable con el cuidado del medio ambiente.

La alternativa reportada en la bibliografía para lograr con éxito un cultivo de microalgas en efluentes con alto contenido de nutrientes es su dilución. Una dilución ideal es aquella que asegura que el oxígeno producido fotosintéticamente será suficiente o superará la demanda bioquímica de oxígeno de dicho efluente (Oswald 1977). Pero si esta dilución se hace con agua dulce, todo el proceso se vuelve insostenible y compite con los cultivos alimentarios. El gran volumen de agua necesaria para el cultivo de microalgas es un obstáculo importante al que se enfrenta esta tecnología, porque el suministro de agua dulce es un factor limitante y debe utilizarse para cultivos alimentarios (Borowitzka 2008).

#### **1.4 Interacciones microalgas-bacterias**

En los ambientes naturales, las microalgas conviven con muchos otros microorganismos, entre ellos, las bacterias. La bibliografía relacionada al tratamiento de efluentes, reporta que los consorcios de bacterias y microalgas logran una remoción de nutrientes del medio a mayor velocidad que el cultivo de microalgas solas en el mismo medio (Abed 2010, Olguín 2012, Zhao, Zhou et al. 2014).

El tiempo de retención hidráulica de una etapa (o proceso) depende directamente de la eficiencia de dicha etapa (o proceso) para remover los nutrientes de las aguas residuales. Por ello, las interacciones de microalgas y bacterias desempeñan un papel clave en la reducción de tiempos de retención hidráulica en los tratamientos biológicos en los que son utilizadas.

También se ha reportado un efecto secundario del cultivo de consorcios de microalgas y bacterias, y es una promoción de la formación de agregados o *flocs* en la etapa de floculación, facilitando el proceso de cosecha y separación del medio (Lee, Cho et al. 2013).

Dentro de las interacciones cooperativas que se reportan en la bibliografía entre microalgas y bacterias, aparece el intercambio de metabolitos. Por ejemplo, tres vitaminas

(biotina, tiamina, cobalamina) son esenciales para el crecimiento de las microalgas ya que no pueden ser sintetizadas por las mismas, pero a partir de la simbiosis con bacterias, pueden ser obtenidas del metabolismo de estas últimas (Croft, Warren et al. 2006). Inversamente, las sustancias extracelulares, poliméricas microalgales o cianobacterianas y sus exudados sirven como sustratos de crecimiento bacteriano (Abed 2010).

Se ha informado que los consorcios de bacterias y microalgas o cianobacterias, son más eficientes en la degradación de compuestos orgánicos y contaminantes inorgánicos, cuando se comparan con cualquiera de los desempeños individuales de estos microorganismos (Subashchandrabose, Ramakrishnan et al. 2011, Olguín 2012, Vidyashankar and Ravishankar 2016). Las aguas residuales que contienen compuestos orgánicos complejos, como las moléculas alifáticas y aromáticas, son difíciles de tratar, aunque ciertas bacterias pueden romper estas moléculas parcial o completamente. Cuando el tratamiento se realiza mediante el co-cultivo de estas bacterias con cianobacterias o microalgas, se ha informado un aumento en la capacidad de degradación (Abed 2010), y el mecanismo reportado indica que, en una primera etapa, hay un crecimiento bacteriano a expensas de los exudados de bajo peso molecular producidos por las microalgas y cianobacterias, tales como acetato, piruvato y glucosa, que son más fáciles de asimilar que los hidrocarburos. Las bacterias que degradan el petróleo crecen inicialmente en estas sustancias orgánicas, lo que produce un aumento significativo en su número. Luego, este aumento de la comunidad bacteriana tiene mayor capacidad degradativa de los hidrocarburos presentes.

Las bacterias aeróbicas también se benefician de la utilización del oxígeno fotosintético proporcionado por las células de microalgas (Mouget, Dakhama et al. 1995). Y a la inversa, las microalgas y las cianobacterias se benefician del dióxido de carbono que se forma como producto final de la degradación, por parte de las bacterias, de los compuestos orgánicos, usándolo directamente para su fotosíntesis.

Estos y otros intercambios de metabolitos (Murray, Phillips et al. 1997, Butler 1998) desempeñan un papel fundamental en la estimulación mutua de sus capacidades degradativas cuando están juntas y que no son alcanzadas cuando se encuentran por separado.

#### 1.4.1 Bacterias promotoras del crecimiento

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).

Las PGPB son muy conocidas por sus mecanismos de interacción que dan como resultado una promoción del crecimiento de plantas (Bashan 1998) y han sido incipientemente probadas con microalgas, abriendo un nuevo campo de ingeniería de consorcios. Por ejemplo, cuando *Chaetoceros gracilis* fue co-cultivada con la PGPB con la que fue hallada en su entorno natural, *Flavobacterium* sp., mostró no sólo una mayor tasa de crecimiento sino también una fase logarítmica más larga (Suminto 1997).

Los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, un grupo conocido y ampliamente reportado en la literatura como bacterias promotoras del crecimiento de plantas, han sido halladas acompañando a las algas verdes de agua dulce (Chlorophyta) y se ha probado su efecto promotor en el crecimiento de las mismas (Kim, Ramanan et al. 2014).

Es importante notar que, aunque las microalgas ya coexisten con bacterias en las corrientes de aguas residuales, se ha informado que los consorcios construidos artificialmente (ingeniería de consorcios) logran, en ocasiones, un mayor crecimiento que los consorcios presentes naturalmente. Se encontró una cepa autóctona de *Chlorella vulgaris* asociada con la bacteria *Phyllobacterium myrsinacearum*. La microalga fue aislada y co-cultivada (co-inmovilizada) inicialmente con esta bacteria y también con *Azospirillum brasilense* Cd (Lebsky, Gonzalez-Bashan et al. 2001). No se evidenció promoción del crecimiento en el primer caso, sin embargo, cuando las microalgas fueron co-cultivadas con *A. brasilense*, no solo se promovió el crecimiento, sino que también el cultivo continuó creciendo exponencialmente cuando los consorcios originales de *Chlorella vulgaris* y *Phyllobacterium myrsinacearum* ya habían comenzado la etapa de senescencia (Gonzalez-Bashan, Lebsky et al. 2000, Lebsky, Gonzalez-Bashan et al. 2001). Estos resultados alientan aún más la experimentación de otros consorcios microalgas-bacterias PGPB.

#### 1.4.2 Interacciones de la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* con microalgas: ventajas y potencial

Esta especie de bacteria, *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 (Dobbelaere, Croonenborghs et al. 1999). El mismo mecanismo ha sido probado en la promoción del crecimiento de microalgas (de-Bashan, Bashan et al. 2002).

Además, se ha reportado que *Chlorella* sp. inoculada con *Azospirillum brasilense* Cd no sólo mostró una capacidad superior a la de la microalga sola para remover el nitrógeno amoniacal y el fósforo de aguas residuales sintéticas y municipales (de-Bashan, Moreno et al. 2002) sino también aumentó el contenido de pigmentos, lípidos y la variedad de dichos lípidos en los extractivos de la biomasa recuperada (de-Bashan, Bashan et al. 2002). En la Tabla 3 se presentan algunos de estos estudios y se comparan sus resultados.

**Tabla 3. Estudios seleccionados de cultivos de consorcios microalgas-bacterias promotoras del crecimiento de plantas**

Estudio	Microalga / Consorcio	Máxima	Tasa de	Concentración	Productividad	Contenido	Clorofila a	Clorofila b	Luteína	Violaxantina
		densidad celular	crecimiento específica	en biomasa	en lípidos	de lípidos				
		[cél. mL <sup>-1</sup> ]	[d <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> ]	[mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ]					
<b>Ma, Zhou et al. (2014)</b>	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 2714)			0,81						
	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 2714) + bacterias propias del efluente			1,3						
<b>Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010)</b>	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 2714)	7,00E+06								
	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 2714) + <i>Azospirillum brasilense</i> Cd (DMS 1843, Braunschweig, Alemania)	1,20E+07								
<b>de-Bashan, Bashan et al. (2002)</b>	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck (UTEX 2714)	1,40E+06				110 mg gDW <sup>-1</sup>	250,6	71,9	52	19,2
	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck (UTEX 2714) + <i>Azospirillum brasilense</i>	3,20E+06				390 mg gDW <sup>-1</sup>	706,23	180,4	120,4	28,3
	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 395)	5,00E+05				60 mg gDW <sup>-1</sup>	836,9	311,18	117,3	35,19
	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 395) + <i>Azospirillum brasilense</i>	1,10E+06				100 mg gDW <sup>-1</sup>	1326,87	558,45	159,34	37,16
	<i>Chlorella sorokiniana</i> Shih. et Krauss (UTEX 1602)	7,50E+05				50 mg gDW <sup>-1</sup>	1061,3	491,9	116,1	16,82
	<i>Chlorella sorokiniana</i> Shih. et Krauss (UTEX 1602) + <i>Azospirillum brasilense</i>	3,00E+06				260 mg gDW <sup>-1</sup>	1646,17	807,2	201,53	42,66
<b>Wang, Xue et al. (2015)</b>	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axénico)			2,86±0,13	67,73±2,52	21,5±0,58 %				
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axénico) + <i>Brevundimonas aurantiaca</i>			2,96±0,11	69±1,96	21,1±0,89 %				
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axenic) + <i>Rhizobium</i> sp.			3,23±0,14	74,97±2,43	21±0,76 %				
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axenic) + <i>Pseudomonas</i> sp.			3,21±0,09	79,27±1,82	22,33±0,68 %				

	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axénico) + <i>Acidovorax facilis</i>		3,57±0,12	87,7±2,15	22,26±0,46 %
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axénico) + <i>Diaphorobacter</i> sp.		3,23±0,10	86,25±2,86	24,16±0,77 %
	<i>Scenedesmus obliquus</i> (axénico) + All		2,80±0,11	65,38±1,83	21,16±0,51 %
<b>Cho, Ramanan et al. (2015)</b>	<i>Chlorella vulgaris</i> (axénico)		1,3±0,013		22,4(±3,6) %
	<i>Chlorella vulgaris</i> (xénico)		2,49±0,24		28(±4,2) %
	<i>Chlorella vulgaris</i> (axénico) + <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Hyphomonas</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp. and <i>Sphingomonas</i> sp.		3,31±0,21		28(±2,6) %
<b>Hernandez, de-Bashan et al. (2009)</b>	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck (UTEX 2714) (axénico)	4,10E+06			
	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck (UTEX 2714) (axénico) + <i>Bacillus pumilus</i> ES4 (FJ32017, NBCR)	6,30E+06			
<b>(Kim, Ramanan et al. 2014)</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (KCTC AG 20446)	5,00E+05	0,30		
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (KCTC AG 20446) + <i>Rhizobium</i> sp. (originalmente aislada de <i>C. vulgaris</i> )	8,00E+06	0,34		
	<i>Chlorella vulgaris</i> (KCTC AG 10032)	4,00E+06	0,47		
	<i>Chlorella vulgaris</i> (KCTC AG 10032) + <i>Rhizobium</i> sp. (originalmente aislada de <i>C. vulgaris</i> )	7,00E+06	0,51		
	<i>Scenedesmus</i> sp. (KCTC AG 20831)	1,25E+06	0,39		
	<i>Scenedesmus</i> sp. (KCTC AG 20831) + <i>Rhizobium</i> sp. (originalmente aislada de <i>C. vulgaris</i> )	2,50E+06	0,43		
	<i>Botryococcus braunii</i> (UTEX 572)	5,00E+05	0,31		
	<i>Botryococcus braunii</i> (UTEX 572) + <i>Rhizobium</i> sp. (originalmente aislada de <i>C. vulgaris</i> )	8,00E+05	0,35		

Por otro lado, según los resultados obtenidos por Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010), la promoción del crecimiento se evidencia en relación a la fotosíntesis. Este estudio reporta que *Azospirillum brasilense* promovió el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y una mayor remoción de fosfatos y nitrógeno amoniacal en condiciones autotróficas y mixotróficas, pero no en condiciones heterotróficas. Si la promoción de la bacteria afecta positivamente a los patrones de fotosíntesis, se pueden esperar los mismos resultados para otras especies fotoautotróficas y es importante probarlo.

### **1.5 La industria láctea y sus efluentes**

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, Carvalho et al. 2012).

Por ejemplo, una granja lechera produce una cantidad significativa de efluentes que contienen estiércol de ganado. En Argentina se generan 50 L de aguas residuales por vaca por día, según informa el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en un tambo comercial (Otero 2014) y más de 113 L de efluentes por vaca, según reporta Prajapati, Choudhary et al. (2014) a nivel mundial, 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 (Sienkiewicz and Riedel 1990). 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. Sólo el 10% de la leche se convierte realmente en queso y el 90% restante se convierte en suero de queso (Siso 1996).

Argentina procesa anualmente 4.610 millones de litros de leche, el 40% de los cuales están destinados a la elaboración de quesos. Por lo tanto, se generan diariamente alrededor de 11 millones de litros de suero de queso, principalmente en pequeñas y medianas granjas o industrias, que procesan menos de 50.000 litros de leche por día (González 2013). En este sector agrícola, los pequeños productores de queso suelen

tener integrados el procesamiento de leche y el ordeño del de ganado y generar, en el mismo lugar, aguas residuales como Purín Vacuno y 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 (González 2013).

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 (Prazeres, Carvalho et al. 2012, Prajapati, Choudhary et al. 2014), 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.

#### 1.5.1 Purín Vacuno

La corriente de aguas residuales identificada como Purín Vacuno se compone principalmente, del agua de limpieza de los espacios donde se encuentra el ganado vacuno, es decir, establos, salas de ordeño (en el caso de tambos), ingresos previos al matadero (en caso de frigoríficos), por citar algunos ejemplos, que arrastra el estiércol y orín de los animales. Debido a la diversidad de prácticas culturales en estos procesos agroindustriales, la alimentación de los animales y, sobre todo, la forma de limpieza, en particular, la cantidad y tipo de agua utilizada para ello, la variabilidad de composición de este tipo de efluente es enorme. No solamente hay diferencias significativas entre distintos establecimientos, sino entre distintas muestras estacionales de un mismo establecimiento (Cumby, Brewer et al. 1999).

De todos modos, la alta carga orgánica, expresada como Demanda Bioquímica de Oxígeno y Demanda Química de Oxígeno ( $DBO_5/DQO$ ), el alto contenido de nitrógeno amoniacal y de fosfatos, así como la gran cantidad de sólidos suspendidos, son características compartidas por este tipo de efluentes. Por todo ello, cualquier muestra de Purín Vacuno, es de un color marrón más o menos intenso, pero bien opaco (Prajapati, Choudhary et al. 2014).

Históricamente, este efluente era aplicado como fertilizante orgánico en los campos donde se generaba, pero con la creciente intensificación del confinamiento animal, se han incrementado los volúmenes de este efluente que se generan en un espacio reducido, lo que a su vez causa serios problemas de polución en aquellos lugares donde no existe un tratamiento apropiado de las aguas residuales (Fenton and Ó

hUallacháin 2012). Una alternativa de uso eficiente, es la producción de biometano a partir de la digestión anaeróbica del Purín Vacuno (Ming, Hyun et al. 2007). De todos modos, cabe destacar que esta práctica libera una gran cantidad de nitrógeno amoniacal en forma de amoníaco a la atmósfera y trae aparejado un problema de disposición final del licor remanente, por su alta carga en nitrógeno y fósforo (Prajapati, Choudhary et al. 2014).

### 1.5.2 Suero de Queso

El efluente denominado Suero de Queso es la fracción líquida obtenida después de la precipitación de la caseína de la leche durante el proceso de producción del queso. Una segunda precipitación para la producción de queso *cottage* da como resultado un segundo suero de queso, que es otro tipo de efluente. Según el procedimiento de precipitación, el suero producido puede ser ácido (pH <5) o dulce (pH 6-7) y se conocen como Suero Ácido de Queso o Suero Dulce de Queso, respectivamente.

Anualmente, se producen  $40,7 \times 10^6$  toneladas de suero de queso (Tejayadi and Cheryan 1995) que contiene aproximadamente 93-94% de agua (Prazeres, Carvalho et al. 2012).

Varias tecnologías están disponibles para la valorización de este efluente (suero de queso condensado o en polvo, proteína de suero concentrado, hidrólisis de la lactosa, fermentación controlada para la producción de ácido láctico, ácido butírico, butanol, ácido acético, etc.) (Siso 1996, Prazeres, Carvalho et al. 2012), pero los costos asociados y el consumo de energía necesario, permiten su explotación sólo para grandes empresas y aproximadamente el 50% del suero de queso del mundo se descarga al medio ambiente (Siso 1996).

### 1.5.3 Antecedentes del cultivo de microalgas en Purín Vacuno o Suero Ácido de Queso

El tratamiento de estos efluentes mediante el cultivo de microalgas presenta la ventaja de proveer una alta absorción de nutrientes, es decir, de los compuestos de nitrógeno y fósforo inorgánicos. Además, este tratamiento biológico puede combinarse, potencialmente, con la producción de una valiosa biomasa que puede ser materia prima para diversos procesos y propósitos (Abdel-Raouf, Al-Homaidan et al. 2012).

Varios estudios respaldan la factibilidad del cultivo de microalgas en Suero de Queso y Purín Vacuno.

Girard, Roy et al. (2014) sustituyeron el 40% de un medio sintético por permeado de suero de queso y lo utilizaron para el cultivo mixotrófico de *Scenedesmus obliquus*, obteniendo una tasa de crecimiento específica  $\mu_{\text{máx}}$  de 1,083 d<sup>-1</sup>. Además, bajo condiciones fotoautotróficas, encontraron que la biomasa acumulaba mayor cantidad de lípidos por peso seco que bajo condiciones mixo- o heterotróficas. Cantidades de permeado de suero superiores al 40% ocasionaron una fase *lag* o de latencia más prolongada y el cultivo requirió mayor seguimiento de la población bacteriana, para un control específico de su número y la competencia con el crecimiento microalgal.

Riaño, Blanco et al. (2016) cultivaron con éxito *Chlorella sorokiniana*, en modo semicontinuo, en suero de queso digerido anaeróbicamente, diluido al 5% y al 10%, y obtuvieron una reducción del 84-96% en nitrógeno amoniacal y una reducción del 20-71% en fósforo soluble. La remoción de la DQO fue de alrededor del 41-48%.

La revisión realizada por Fenton and Ó hUallacháin (2012) permite concluir que los cultivos de microalgas son factibles en varios tipos de aguas residuales de granjas lecheras y de la industria láctea, aunque enfatiza que varios de los estudios en los que basa su reporte, diluyeron los efluentes y destaca lo importante que resulta el control del pH para un cultivo exitoso.

Por ejemplo, Hena, Fatimah et al. (2015) cultivaron *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus* sp. en efluentes no tratados de granjas lecheras, obteniendo productividades volumétricas de biomasa de 0,201 y 0,211 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. En este estudio, las tasas más altas de remoción de nutrientes (98,8% P-PO<sub>4</sub>; 99,4% N-NO<sub>3</sub>; ~ 100% N-NH<sub>4</sub>) se obtuvieron con un consorcio de 10 microalgas cultivadas en las aguas residuales del mismo establecimiento una vez tratadas por el procedimiento convencional del lugar y la productividad volumétrica de biomasa fue de 0,191 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Kothari, Pathak et al. (2012) utilizaron el influente crudo del tratamiento de efluentes de una granja lechera (composición 66,4 mg.L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub> y 21,0 mg.L<sup>-1</sup> de P-PO<sub>4</sub>) para el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*, obteniendo una reducción del 44,8% de N-NO<sub>3</sub> después de 5 días y una reducción del 60,5% después de 10 días. Asimismo, hubo una reducción del 57,6% de P-PO<sub>4</sub> después de 5 días y del 87,1% después de 10 días. En este estudio, la concentración o rendimiento en biomasa más alta se logró

con una dilución del 75% del influente con un 25% de agua de grifo o agua corriente ( $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Como se mencionó anteriormente, una parte de los efluentes de una granja lechera o quesera proviene directamente del ganado (estiércol de vaca más aguas de lavado del mismo y limpieza de las instalaciones). Prajapati, Choudhary et al. (2014) cultivaron cuatro especies de microalgas en Purín Vacuno crudo (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* y dos cepas nativas de *Chroococcus* sp.). La cepa seleccionada fue *Chroococcus* sp., que, en cultivos al exterior, alcanzó un rendimiento en biomasa de  $4,44 \text{ g.L}^{-1}$  y una remoción de fósforo disuelto (total) del 6,34% así como del 25% de  $\text{N-NO}_3$  y 98%  $\text{N-NH}_4$  en cuatro días. Aunque lograron con éxito cultivos microalgales en estas aguas residuales crudas, informaron que la mayoría de los estudios con los que se comparan, diluyen este efluente para la producción de biomasa microalgal, debido a la alta carga de nutrientes y compuestos orgánicos que tiene este efluente, y lo que es más relevante para el cultivo de microalgas, su oscuro color.

De lo expuesto hasta aquí se evidencia que estas dos corrientes de aguas residuales agroindustriales pueden servir como fuente de nutrientes para cultivos de microalgas (Kothari, Pathak et al. 2012). Los principales inconvenientes que aparecen reportados son el color oscuro o falta de transparencia de estos efluentes, que dificultan la transmisión adecuada de la luz, y el bajo pH de algunas corrientes residuales de la industria láctea, principalmente de la industrialización de la leche para producir queso.

La dilución aparece como una necesidad para equalizar estos medios para el cultivo de microalgas, ya que la mayoría de los estudios informan sobre el uso de microalgas para el tratamiento de, específicamente, un solo tipo de efluente (Vidyashankar and Ravishankar 2016). Un método alternativo a la dilución con agua dulce, y prácticamente no reportado en la bibliografía, podría ser mezclar efluentes con diferentes cargas de nutrientes y turbidez para lograr medios de cultivo optimizados. Por ello, en el presente trabajo de Tesis, se plantea evaluar la viabilidad del cultivo de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*, solas y consociadas con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense*, en mezclas de Suero Ácido de Queso y Purín Vacuno, como se detalló en los Objetivos del Estudio.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### 2.1 Microorganismos utilizados y mantenimiento de cultivos

#### 2.1.1 Microalgas

Las especies de microalgas que se emplearon en este estudio fueron *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*. *Scenedesmus dimorphus* fue donada por la Dra. Verónica Beligni, del Laboratorio de la Universidad de Mar del Plata. Esta microalga fue originalmente aislada de las aguas residuales urbanas de Bariloche, Argentina (41°05'34,5"S 71°20'56,6"O). *Chlorella pyrenoidosa*, fue aislada del efluente de una granja lechera de Lincoln, Argentina (34°49'53,1"S 61°23'41,0"O) y está disponible en el Laboratorio de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Los cultivos inóculo se mantuvieron en Erlenmeyers de 250 ml tapados con tapones de algodón y se repicaron cada 4 ó 5 semanas en medio Basal de Bold (Stein 1973) estéril. Estuvieron mantenidos en agitación constante e iluminación en fotoperíodos de 12:12 horas de luz:oscuridad usando una lámpara fluorescente con una intensidad lumínica de 80  $\mu\text{mol de fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La temperatura ambiente fue  $22,5\pm 2,5$  °C en todo momento.

El medio Basal de Bold (Tabla 4) se usó a lo largo de este estudio para el mantenimiento de los cultivos stock o de reserva y también se usó para el escalado desde los cultivos de reserva de laboratorio hasta las cantidades adecuadas para inocular los cultivos al exterior.

**Tabla 4. Medio Basal de Bold (Stein, 1973)**

Componente	Solución Stock	Cantidad de Sol. Stock para 1L Medio
<b>Macronutrientes</b>		
	g.L <sup>-1</sup>	
NaNO <sub>3</sub>	25	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	10 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	10 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5	10 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,5	10 mL
NaCl	2,5	10 mL
EDTA	50	1 mL
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,94	1 mL
KOH	31	1 mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1mL	1 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	1 mL
<b>Micronutrientes</b>		1 mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44	
MoO <sub>3</sub>	0,71	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49	
<b>Mix de vitaminas</b>		0,5 mL
Cianocobalamina [Vit B12]	0,001	
Tiamina (Cloruro) [Vit B1]	2	
Biotina [Vit H]	0,001	

Los inóculos de los estanques al exterior se obtuvieron de los cultivos de reserva, que fueron escalados de manera gradual, a partir de volúmenes de 500 ml hasta 3 L en Erlenmeyers, en las condiciones arriba descritas, y luego, hasta un volumen de cultivo final de 40 a 60 L en un fotobiorreactor tubular vertical 70 L y 30 cm de diámetro, con paredes de acrílico (PMMA) y bridas superior e inferior de acero inoxidable, agitado mecánicamente por inyección de aire desde la parte inferior a un caudal de 12 L.min<sup>-1</sup>, sin recirculación ni adición de CO<sub>2</sub> (Figura 2d).

### 2.1.2 Bacteria

La especie de bacteria promotora del crecimiento de plantas (PGPB por sus siglas en inglés) utilizada en este estudio fue *Azospirillum brasilense* FT326, disponible en el Laboratorio de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires y gentilmente cedida por la Dra. Claudia Ribaudó.

El inóculo bacteriano fue utilizado en dos etapas del desarrollo experimental de esta tesis y cuando ello fue necesario, el mismo creció con agitación continua (150 rpm), en estufa a 33°C, en medio Nitrogen Free broth (NFb) suplementado con NH<sub>4</sub>Cl (Döbereiner, Baldani et al. 1995), según la receta detallada en la Tabla 5, hasta alcanzar la fase exponencial (DO<sub>600nm</sub> 0,8) y en volúmenes de medio adecuados según la cantidad de inóculo necesario.

**Tabla 5. Medio de cultivo NFb (para crecimiento y escalado de *A. brasilense*)**

Componente	Solución Stock g.L <sup>-1</sup>	Cantidad para 1 L de Medio
Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,871 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0,493 g
NaCl		0,058 g
Azul de bromotimol		1,249 g
EDTA Sal de Hierro (III) y Sodio (monohidrato)		1,468 g
NH <sub>4</sub> Cl		2 g
KOH		4,5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0,294 g
<b>Micronutrientes</b>		2 mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44	
MoO <sub>3</sub>	0,71	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49	
<b>Mix de vitaminas</b>		1 mL
Piridona	0,001	
Biotina [Vit H]	0,001	

Antes de ser utilizadas, las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min y se lavaron 2 veces con el mismo volumen de ClNa 0,9% p/v, para retirar toda cantidad restante de medio de cultivo que pudiera haber. Luego, el inóculo se resuspendió en una mínima cantidad del medio de cultivo a ser utilizado en el ensayo, antes de ser adicionado al cultivo microalgal correspondiente.

## 2.2 Obtención de los efluentes usados en el estudio

Las aguas residuales se recolectaron en bidones de polietileno de 60 L, opacos, y se transportaron de inmediato al laboratorio. Ambos efluentes se filtraron a través de una tela filtro de tamaño de poro de ~ 1 mm para eliminar las partículas más grandes

antes de ser almacenados. Las muestras de efluentes se mantuvieron congeladas en varios bidones de 5 L para garantizar el mantenimiento del perfil de nutrientes, en un freezer de 202 L de capacidad, en la Cátedra de Bioquímica Aplicada de la Facultad de Agronomía (UBA), lugar de realización de los ensayos.

Doce horas antes de cada experimento se descongelaron las cantidades necesarias de cada uno de los dos efluentes y se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta su utilización.

### 2.2.1 Purín Vacuno (PV)

El Purín Vacuno (PV) o estiércol líquido de vaca se recolectó de un tambo de explotación privada en Lincoln, Argentina (34°49'53,1"S 61°23'41,0"O). Este efluente crudo se colectó de pequeñas lagunas en donde se almacenaban los flujos de estiércol de vaca líquido y aguas de limpieza de ganado, equipos y pisos de toda la instalación. El pH del efluente fue de  $7,5\pm 0,5$ .

### 2.2.2 Suero Ácido de Queso (SAQ)

El Suero Ácido de Queso (SAQ) se recolectó de un pequeño productor de queso en Marcos Paz, Argentina (34°49'29,8"S 58°51'60,0"O). Fue la corriente obtenida después de la producción de requesón más aguas de lavado. Tras la recepción, el pH del efluente fue de  $6,0\pm 0,5$ .

## 2.3 Procedimientos generales de limpieza y esterilización

Todo el material de vidrio utilizado para la preparación de medios sintéticos, cultivos inóculos y de reserva y cultivos experimentales a escala de laboratorio, se lavó con detergente, se enjuagó diez veces con agua corriente, dos veces con agua destilada y, finalmente, se esterilizó en autoclave antes de usar (121°C, 15 PSI, 15 minutos).

Los sistemas de cultivo utilizados para experimentos al exterior (contenedores de policarbonato y polipropileno y estanques abiertos de tipo *raceway*) se esterilizaron químicamente. Antes de cada experimento, los sistemas de cultivo se llenaron con hipoclorito de sodio al 7% (v/v) y se dejaron reposar durante la noche. Al día siguiente, se cepillaron a fondo las paredes y piso, se drenaron por completo y se enjuagaron de siete a ocho veces con agua corriente.

## 2.4 Procedimientos analíticos

### 2.4.1 Precauciones generales

Los análisis se realizaron utilizando reactivos y solventes calidad pro análisis. Todo el material de vidrio y equipo utilizados para las extracciones fueron cuidadosamente limpiados y enjuagados con agua destilada antes de ser utilizados.

### 2.4.2 Muestreo de cultivos

La toma de muestras de los cultivos para la determinación del crecimiento celular se realizó a la misma hora cada 24 o 48 horas para los experimentos cortos (es decir, los experimentos a escala de laboratorio o en mesocosmos) y cada 48 o 72 horas para los experimentos largos (es decir, cultivos en estanques abiertos agitados operando en modo semi-continuo al exterior). El recuento celular y la filtración para la determinación del peso seco (técnicas descritas más abajo) se realizaron, en cada caso, inmediatamente después del muestreo.

Para eficientizar el uso de tiempo y materiales, los análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos en la biomasa se realizaron al final de cada experimento. Por lo tanto, las muestras (es decir, filtros y tubos de centrifuga conteniendo biomasa algal) se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 15 días hasta el análisis.

Los análisis de la composición y contenido de nutrientes de las aguas residuales y las muestras de cultivo comprendieron la determinación de  $\text{P-PO}_4$ ,  $\text{N-NO}_3$  y  $\text{N-NH}_4$ , DQO y  $\text{DBO}_5$ . Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos y luego los sobrenadantes se almacenaron a  $-14^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis (realizados en el lapso de 15 días).

### 2.4.3 Determinación del crecimiento microalgal

#### 2.4.3.1 Conteo celular

El recuento celular se llevó a cabo utilizando un hemocitómetro modificado o cámara de Neubauer. El hemocitómetro y el cubreobjetos se limpiaron, en cada ocasión, con etanol al 70% (v/v). En cada conteo, las células se contaron en (al menos) tres cuadrados separados para determinar la densidad celular. Si se encontraban agrupaciones grandes de células (flocs), se las desarmaba homogeneizando suavemente las muestras (Moheimani, Borowitzka et al. 2013).

La densidad celular se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad celular (células. mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadrados contados}} \times 10^4$$

**Ecuación 2. Densidad celular microalgal del cultivo**

2.4.3.2 Determinación de peso seco y peso seco libre de cenizas

Las determinaciones de peso seco (DW por sus siglas en inglés, dry weight) y el peso seco libre de ceniza (AFDW por sus siglas en inglés, ash free dry weight), se realizaron filtrando alícuotas de 5 ml de muestra (es decir, cultivos microalgales, Purín Vacuno, Suero Ácido de Queso o mezclas de ambas aguas residuales) con membranas de fibra de vidrio Whatman GF/D de 25 mm de diámetro y 0,7 µm de tamaño de poro, previamente pesadas. Antes de ser usados, los filtros GF/D se secaron a 100°C durante 24 horas y se almacenaron sobre sílica-gel en un desecador hasta su uso.

Para la determinación del peso seco (DW), los filtros (membranas) conteniendo la biomasa algal se colocaron en un horno de secado a 75°C durante 24 h. Los filtros se dejaron enfriar en desecador sobre sílica-gel antes de pesar. El peso seco se calculó después de restar el peso inicial del filtro al peso del filtro + la muestra seca. Para la determinación del peso seco libre de cenizas, los filtros anteriores se calcinaron a 450°C durante 7 horas y luego se dejaron enfriar durante la noche en desecador antes de volver a pesar. El peso de las cenizas se calculó después de restar el peso del filtro al peso del filtro + cenizas. Esto se restó luego adicionalmente del peso seco total de la biomasa microalgal para dar el peso seco libre de cenizas. El peso seco libre de cenizas se expresa en mg.L<sup>-1</sup> al dividir el peso resultante por 0,005 L (5 mL) de muestra (Moheimani, Borowitzka et al. 2013)

2.4.3.3 Determinación de la tasa de crecimiento específica (µ) y la productividad volumétrica

Las tasas de crecimiento, las tasas de crecimiento específicas y las productividades se calcularon utilizando los métodos descritos en Moheimani, Borowitzka et al. (2013).

Las tasas de crecimiento (K') de los cultivos se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$K' = \frac{\ln(N_{t_2} - N_{t_1})}{(t_2 - t_1)}$$

**Ecuación 3. Tasa de crecimiento del cultivo (K')**

donde  $N_1$  y  $N_2$  son las densidades celulares en el tiempo 1 ( $t_1$ ) y 2 ( $t_2$ ), respectivamente. Luego, las tasas de crecimiento específicas ( $\mu$ ) se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{K'}{\ln 2}$$

**Ecuación 4. Tasa de crecimiento específica ( $\mu$ )**

Las productividades ( $Pr_{Batch}$ ) de los cultivos en modo batch (es decir, experimentos a escala de laboratorio y mesocosmos) se calcularon considerando que durante la fase de crecimiento logarítmico  $Pr_{Batch} = \mu$ , como se indica en Moheimani, Borowitzka et al. (2013). Las productividades de los cultivos operados en un modo semi-continuo se calcularon de la siguiente manera:

$$Pr_{semi-continuo} = \frac{Y_A - Y_B}{t_A - t_B}$$

**Ecuación 5. Productividad (Pr) en modo semi-continuo**

donde  $Pr_{semi-continuo}$  es la productividad en  $g.L^{-1}.día^{-1}$ , Y es el rendimiento en biomasa o concentración en biomasa ( $g.L^{-1}$ ) y t es el tiempo (días). A y B indican los momentos posterior (A) y anterior (B) a la cosecha.

#### 2.4.4 Determinación del crecimiento bacteriano

La determinación del Número más probable (NMP) de Unidades Formadoras de colonias (UFC) presentes por unidad de volumen (mL) de muestra, se determinó por siembra y recuento en placas de Agar-agar adicionado con Rojo Congo (Tabla 6), un medio específico para la identificación y aislamiento de *Azospirillum* (Rodríguez Cáceres 1982), lo que resulta selectivo para estas cepas y facilita su recuento.

**Tabla 6. Medio Rojo Congo (para crecimiento diferencial y recuento de *A. brasilense* en placas)**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 1 L de Medio</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,015 g
Ácido málico	5 g
KOH	4,8 g
Rojo Congo	25 mL diluídos 1/400
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 1000 mL

Los efluentes utilizados fueron oportunamente sembrados en el mismo medio, para descartar la presencia de estas bacterias en los mismos.

La determinación se realizó mediante diluciones seriales por el método de recuento en placa. Se prepararon diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000 y 1/ 100.000 de la muestra a medir (inóculo o cultivo) respetando un volumen final de 1 mL. Se rotularon 10 placas (dos para cada dilución) y se sembraron 0,1 ml (con tips estériles e individuales para cada muestra y dilución) de cada dilución en una placa de Petri con Rojo Congo en Agar Nutritivo (Tabla 6) y, con ayuda de un asa de Digrafski en forma de L, se extendió por toda la placa. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas en estufa y al cabo de este tiempo se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias presentes. Para realizar el conteo se escogieron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias, dividiendo la superficie total de la placa en 4 sectores.

El resultado en UFC.mL<sup>-1</sup> se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times \text{Inversa de la dilución} \times 10$$

**Ecuación 6. Número de Unidades formadoras de colonias por mL de muestra**

## 2.4.5 Determinación de la composición bioquímica de la biomasa

### 2.4.5.1 Análisis de carbohidratos totales

El contenido total de carbohidratos se determinó mediante el método del ácido fenol-sulfúrico desarrollado por Kochert (1978), modificado por Ben Amotz, Tornabene et al. (1985), y optimizado por Mercez (1994). Para cada determinación se filtraron 5 ml de cultivo microalgal usando membranas de fibra de vidrio Whatman GF/D de 25 mm de diámetro y 0,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Cada filtro se colocó en un tubo de vidrio de centrífuga y se homogeneizó en 0,5 ml 1M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con una varilla de vidrio. El volumen final en cada tubo se completó hasta 5 ml adicionando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Luego, los tubos se taparon y se incubaron en un baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  durante 60 min. Después de eso, se los dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente (aproximadamente 30 min). Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Se transfirieron 2 ml del sobrenadante a otro tubo de ensayo de vidrio. Los estándares de glucosa se prepararon en un conjunto de tubos que contenían 0, 40, 80, 120, 160 y 200  $\mu\text{g}$  de glucosa y se completaron con 2 ml de agua destilada. Se añadió 1 ml de solución de fenol al 5% (p/v) a cada tubo y se mezcló a fondo rápidamente en un agitador Vortex. A continuación, se añadieron rápidamente 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (manteniendo la pipeta contra de la pared del tubo de ensayo para evitar salpicaduras). Después de eso, los tubos se agitaron tres veces o fueron vortereados con la tapa enroscada y se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la densidad óptica se midió a 485 nm y el contenido de carbohidratos se calculó a partir de la curva estándar.

### 2.4.5.2 Contenido lipídico total

Los lípidos se determinaron según Folch, Lees et al. (1957).

Se homogeneizó 1 g de biomasa microalgal con 20 ml de una mezcla 2:1 de cloroformo:metanol y luego se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El homogeneizado se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, la fase líquida se transfirió a otro tubo. El extracto crudo se lavó con una solución diluida de NaCl y la mezcla resultante se centrifugó para permitir que las fases se separaran. La fase superior se eliminó cuidadosamente mediante sifonando con una micropipeta. La fase inferior (cloroformo) se trasvasó a un matraz previamente

pesado y se evaporó en un evaporador rotatorio. Los lípidos totales extraídos se determinaron gravimétricamente.

#### 2.4.5.3 Contenido total de proteínas

El método utilizado para la determinación de proteínas totales fue el desarrollado por Lowry, Rosebrough et al. (1951) y modificado posteriormente por Dorsey, McDonald et al. (1978). Se filtraron 5 ml de cultivo microalgal utilizando membranas de fibra de vidrio Whatman GF/D de 25 mm de diámetro y 0,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro como se describe anteriormente. Los filtros se molturaron con una varilla de vidrio. Se añadió 1 ml de reactivo de Biuret en el tubo de vidrio de 4 ml y se mezcló bien con la varilla de vidrio. Después de mezclar, el contenido se transfirió cuidadosamente a un tubo de centrifuga de 10 ml. Se lavó el tubo de vidrio de 4 ml agregando 1 mL de reactivo de Biuret sobre la varilla de vidrio y, después de mezclar, el contenido también se transfirió al tubo de centrifuga de 10 ml. Luego, se agregaron 3 ml de reactivo Biuret al tubo de centrifuga de 10 ml.

La solución patrón de proteína estándar se preparó utilizando la fracción V de albúmina del suero bovino a una concentración de 500 mg BSA.L<sup>-1</sup>. Volúmenes apropiados del estándar de proteínas conteniendo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 g de BSA se pipetearon en tubos individuales y fueron completados hasta 0,14 ml con agua destilada. 5 ml del reactivo de Biuret fueron añadidos a cada tubo con estándar de proteínas hasta un volumen final de 5,14 ml.

Después de eso, los tubos de centrifuga con muestra y con el estándar de proteínas se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 60 minutos. Inmediatamente después de retirarse del baño de agua se añadieron 0,5 ml de reactivo de Folin-fenol a cada tubo y se mezcló en Vortex. Luego, los tubos se colocaron en un baño de agua fría (10-15°C) durante otros 15 minutos para enfriarlos y permitir el equilibrio con la temperatura ambiente. Nuevamente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Después de retirar el sobrenadante, el contenido de proteínas en él se midió a 660 nm. Luego, el contenido de proteínas de las muestras se determinó comparándolo con la curva estándar.

La solución de reactivo de Biuret se hizo fresca antes de cada uso. Se colocaron en un recipiente de vidrio de volumen adecuado 20 ml de 200 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 ml de 40 g.L<sup>-1</sup> de NaOH y 160 ml de agua destilada y mezclaron bien; luego fueron añadidos 2 ml de 200 g.L<sup>-1</sup> Tartrato doble de sodio y potasio y 2 mL de 50 g.L<sup>-1</sup>

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. La mezcla resultante se mezcló de nuevo bien. El contenido de proteínas se leyó a 660 nm y se construyó la curva estándar.

#### 2.4.6 Análisis de aguas y caracterización de nutrientes

En cada oportunidad, las muestras de aguas, de efluentes y cultivos, tratadas y transportadas como se describió en la Sección 2.4.2 (Muestreo de cultivos), fueron entregadas al Laboratorio del Grupo de Investigación sobre Temas Ambientales y Químicos (GISTAQ) de la Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional y analizadas para determinar su contenido de nitrógeno amoniacal y de nitratos, fósforo (fosfatos), así como las demandas química y bioquímica de oxígeno. Los métodos utilizados fueron los que se describen en *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, (APHA 2012):

- ❖ Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub>): “APHA 2012, SM 4500-NH3-C”
- ❖ Nitrógeno de nitratos (N-NO<sub>3</sub>): “APHA 2012, SM 4500-NO3-B”
- ❖ Fósforo de fosfatos (P-PO<sub>4</sub>): “APHA 2012, SM 4500-P-C”
- ❖ Demanda química de oxígeno (DQO): “APHA 2012, SM 5220 -B”
- ❖ Demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>): “APHA 2012, SM 5210-B”

Las concentraciones de nutrientes en las muestras analizadas se expresaron como mg.L<sup>-1</sup>.

## **CAPÍTULOS DE RESULTADOS**

### 3 CRECIMIENTO DE MICROALGAS EN MEZCLAS DE PURÍN VACUNO Y SUERO ÁCIDO DE QUESO

#### 3.1 Introducción

Las principales ventajas del tratamiento de aguas residuales con microalgas han sido resumidas en la Introducción general (Sección 1.3.3). El primer paso para el cultivo exitoso de microalgas es identificar las condiciones que maximizan su crecimiento (Richmond and Zou 1999). Además, mantener un crecimiento eficiente de estos microorganismos fotosintéticos exige optimizar la disponibilidad de luz y la utilización de nutrientes (Carvalho, Monteiro et al. 2009). Esto es especialmente importante para mejorar las tasas de remoción de nutrientes y reducir los tiempos de retención en cultivos que crecen en aguas residuales (Borowitzka 1998).

Aunque ha sido demostrado que el cultivo de microalgas es factible en diversos efluentes agroindustriales, los estudios relevados destacan constantemente la importancia del control del pH y la necesidad de dilución de los efluentes crudos debido a su opacidad como a la alta carga de nutrientes que contienen (Fenton and Ó hUallacháin 2012, Prajapati, Kaushik et al. 2013). Además, para un crecimiento óptimo, es necesario contar con una relación molar de 16:1 de Nitrógeno a Fósforo (Redfield 1958), lo que escasamente se reporta como contenido de efluentes.

Como ya se ha descrito en la Sección 1.5, el Purín Vacuno (PV) y el Suero Ácido de Queso (SAQ) son efluentes caracterizados por una alta carga orgánica, una inadecuada relación de nutrientes (N:P), un bajo pH (SAQ) y un color oscuro (PV) (Siso 1996, Cumby, Brewer et al. 1999, Ming, Hyun et al. 2007, Prazeres, Carvalho et al. 2012, Prajapati, Choudhary et al. 2014). Todas estas condiciones hacen que sea muy difícil seleccionar un tratamiento óptimo con mínimo impacto ambiental, es decir, no utilizar agua dulce para diluirlos y evitar la descarga directa al medio ambiente (Fenton and Ó hUallacháin 2012, Prazeres, Carvalho et al. 2012, Prajapati, Choudhary et al. 2014). Además, cada nuevo conjunto de condiciones (por ejemplo, el tipo de aguas residuales utilizadas como medio de cultivo, las especies de microalgas utilizadas solas o en consorcios) requiere un análisis específico de la influencia de estos factores en el desarrollo del cultivo. Un estudio de selección o *screening* es la forma más efectiva de determinar las mejores condiciones experimentales para ser escaladas y estudiadas (Bozkir and Saka 2005). Sin embargo,

la realización de este tipo de estudios toma gran cantidad de tiempo y muchos ensayos experimentales.

Afortunadamente, en la actualidad se dispone del Software que permite utilizar una técnica estadística conocida como Diseño Factorial para ayudar en el diseño de un proceso de *screening*. Esta herramienta estadística permite evaluar los efectos que tienen diferentes variables independientes en las distintas funciones objetivo o respuestas de interés, con un mínimo de ensayos.

Un diseño factorial completo permite estudiar el efecto de dos o más parámetros (factores), cada uno con posibles valores o "niveles" discretos, en una o más funciones objetivo simultáneamente, es decir, que permite la investigación de todas las posibles combinaciones de estos niveles en todos los factores. Esta técnica estadística también permite la evaluación simultánea de los efectos individuales de cada variable independiente (factor) en las funciones objetivo (variables de respuesta) así como el análisis de las interacciones entre estos factores (efectos de interacción). Por lo tanto, en el primer estudio descrito en este capítulo, se utilizó un diseño factorial completo para la planificación del *Screening*.

La autora de esta tesis cree firmemente que considerar los efluentes como materias primas para un proceso industrial, en lugar de tratarlos solo como flujos de desechos, nos permitirá aplicar todos los conocimientos de ingeniería obtenidos en el campo de la optimización de procesos para el desarrollo de una economía circular. Por ejemplo, el proceso de tratamiento de aguas residuales mediado por microalgas (ficoremediación) puede optimizarse mezclando distintas corrientes de entrada para que permitan obtener una corriente ecualizada y por consiguiente, un proceso estable para la obtención de biomasa algal. En el estudio presentado en este capítulo, esto significa mezclar Purín Vacuno con Suero Ácido de Queso, para superar los principales obstáculos reportados para el cultivo de microalgas en dichos efluentes por separado.

El objetivo general de los experimentos descritos en este capítulo fue evaluar la factibilidad de crecimiento de microalgas en los efluentes Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso crudos, y analizar la productividad en biomasa y la capacidad de remoción de nutrientes de los cultivos de microalgas tanto en los efluentes crudos como en mezclas de los mismos.

Las especies elegidas para este estudio (es decir, *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*) se seleccionaron en función de su presencia ubicua en las corrientes de aguas residuales (Zeng, Guo et al. 2015) y su capacidad probada de crecimiento en efluentes similares a los utilizados en este estudio (Kothari, Pathak et al. 2012, Prazeres, Carvalho et al. 2012, Girard, Roy et al. 2014, Prajapati, Choudhary et al. 2014, Hena, Fatimah et al. 2015, Riaño, Blanco et al. 2016). Dado que en la bibliografía se reporta que la combinación de diferentes microalgas en un cultivo logra un crecimiento más estable y también una mayor productividad en biomasa y contenido de lípidos (Corcoran and Boeing 2012, Johnson and Admassu 2013), también se realizaron ensayos con un consorcio de las dos microalgas juntas.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Diseño experimental**

Este estudio involucró dos ensayos de cultivo en serie:

1. El primero fue un ensayo de selección o *screening* en condiciones controladas de laboratorio. Este estudio se realizó para seleccionar las condiciones más convenientes para el crecimiento de microalgas en Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso.
2. El segundo ensayo se realizó para estudiar la capacidad de remoción de nutrientes por parte del cultivo, la productividad volumétrica de biomasa algal y la composición bioquímica de dicha biomasa (es decir, el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas) en volúmenes aún pequeños pero en condiciones al exterior (mesocosmos).

#### **3.2.1.1 Ensayo 1: Selección de la proporción de efluentes para un óptimo crecimiento microalgal**

Este primer experimento fue un estudio de selección o *screening* para determinar las mejores condiciones experimentales, es decir, la proporción de mezcla de cada efluente y la o las especies de microalgas, solas o en consorcio, que resultaban más convenientes para proseguir su escalado. Se utilizó la herramienta estadística Diseño Factorial Completo de la versión de prueba del software estadístico MINITAB® 17, para determinar el número de ensayos a realizar en este *screening*. De acuerdo con la cantidad de experimentos que sería posible realizar, se estudiaron dos variables de respuesta, a saber, la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) y la productividad

volumétrica de la biomasa (Pr) a través de los diferentes niveles de dos variables independientes (factores), a saber, la proporción de cada efluente en la mezcla como medio de cultivo y las microalgas. Los niveles de cada factor se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros de diseño del Diseño Factorial Completo**

Factores		Niveles	
		Purín Vacuno	Suero Ácido de Queso [% V/V]
Mezcla de efluentes	5 Niveles	0%	100%
		25%	75%
		50%	50%
		75%	25%
		100%	0%
Microalgas	3 Niveles	<i>Scenedesmus dimorphus</i> (Sc)	
		<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Ch)	
		Ambas microalgas en consorcio (ScCh)	

El espacio de diseño comprendió un total de 15 condiciones (es decir, todas las posibles combinaciones de los 5 Niveles del Factor “Mezcla de efluentes” y los 3 Niveles del Factor “Microalgas”) con 4 repeticiones de cada una de ellas, dando por resultado 60 unidades experimentales sugeridas por el software MINITAB® 17.

#### 3.2.1.1.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*. Los inóculos de estas dos especies se centrifugaron de los medios de cultivo (Medio Basal de Bold, Sección 2.1.1) en los que estaban, antes de agregarlos a cada mezcla en estudio de aguas residuales. Este paso se realizó para asegurar que los nutrientes para el crecimiento microalgal provinieran únicamente de dichos efluentes. Los inóculos se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento al momento de la inoculación. La densidad celular inicial de microalgas para cada condición de cultivo se estableció en  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> (el consorcio de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tenía  $1 \times 10^3$  cel.mL<sup>-1</sup> de cada especie).

#### 3.2.1.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron 5, a saber, Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso, sin esterilizar ni diluir, en las proporciones indicadas en la Tabla 7.

#### 3.2.1.1.3 Sistema de cultivo

Los experimentos se realizaron en frascos de vidrio de 100 ml, agitados manualmente seis veces al día e iluminados continuamente utilizando lámparas fluorescentes (Osram L 18 W / 765 Luz día fría) de un lado de los reactores y un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La intensidad de la luz fue de  $60\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medida en la superficie externa de los recipientes de cultivo utilizando una sonda LP 471 PAR (400-700nm) y un radiómetro HD 2302.0 (Delta OHM). Todos los recipientes de cultivo eran de vidrio transparente de 5 cm de diámetro y 0,3 mm de espesor de pared de vidrio.

Todos los cultivos (cada combinación de especies de microalgas con diferentes proporciones de cada efluente) se llevaron a cabo durante 6 días, según lo sugerido por (Chen, Li et al. 2012).

#### 3.2.1.1.4 Muestreo y determinaciones analíticas

La densidad celular y el peso seco libre de cenizas se determinaron diariamente. La densidad celular se determinó a través de su recuento manual utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, como se describió anteriormente (Sección 2.4.3.1).

Las dos variables de respuesta, es decir, la productividad y la tasa de crecimiento específica, se calcularon como se describe en la Sección 2.4.3.

#### 3.2.1.1.5 Análisis de resultados

Una vez que la fase experimental concluyó y se obtuvieron las variables de respuesta (Productividad y Tasa específica de crecimiento) para cada nivel de los dos factores (Mezcla de efluentes y Microalgas), se utilizó la versión de prueba del software MINITAB® 17 para el análisis de los resultados. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de confianza de  $P = 0,05$  para examinar las diferencias entre los distintos ensayos. Para estudiar el efecto de las diferentes microalgas y de las proporciones de los efluentes en el medio de cultivo, se estudió tanto el efecto

principal de cada una de las dos variables independientes en ambas respuestas como su efecto de interacción. Se usó el mismo software para graficar los resultados en superficies tridimensionales conocidas como Gráficos de Contorno. Este tipo de representaciones permite la visualización del máximo de las funciones estudiadas y esto fue especialmente útil ya que "Microalgas" no era una variable numérica.

La herramienta Optimizador de respuestas de la versión de prueba de Minitab® 17.1.0 se utilizó para confirmar las conclusiones obtenidas mediante el análisis gráfico y seleccionar tres condiciones que maximizaran simultáneamente ambos parámetros de crecimiento, a saber, la productividad volumétrica de biomasa y la tasa específica de crecimiento. Para ello, se asignaron ponderaciones iguales (desirability) a cada una de las dos respuestas y se obtuvieron tres soluciones óptimas como resultado.

#### 3.2.1.2 Ensayo 2: Remoción de nutrientes y crecimiento de microalgas en condiciones al exterior en mesocosmos

Sobre la base de los resultados del estudio antes descrito, tres de las quince condiciones se seleccionaron para ser cultivadas posteriormente al exterior. Tres réplicas de cada condición fueron cultivadas simultáneamente en mesocosmos, es decir, sistemas reducidos que se exponen sin control a las condiciones medioambientales (temperatura, radiación solar, calidad del aire, etc), para relevar la variación de algunos parámetros, simulando lo que sucedería en un cultivo a gran escala al exterior.

##### 3.2.1.2.1 *Microorganismos*

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* y fueron cultivadas en las condiciones obtenidas en el estudio anterior. La densidad celular inicial de microalgas para cada condición de cultivo se estableció en  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Los inóculos de *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento al momento de su uso. Los volúmenes de cada cultivo inóculo necesarios para lograr la densidad celular mencionada en cada mesocosmo, antes de ser inoculados, se centrifugaron para separar las células de microalgas del medio Basal de Bold en el que estaban.

#### 3.2.1.2.2 *Medios de cultivo*

Los medios de cultivo utilizados fueron Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso, sin esterilizar ni diluir, en las proporciones que resultaron óptimas en el estudio anterior.

#### 3.2.1.2.3 *Sistema de cultivo*

Cada uno de los cultivos estaba contenido en un recipiente de 5L, la agitación y mezcla era provista mecánicamente por la corriente de aire generada, en cada caso, por un aireador de acuario (9 W), el aire era distribuido desde el fondo del recipiente y a través de un material poroso para reducir el tamaño de las burbujas. Una manguera de PVC color neutro transparente (manguera cristal) de 50 cm de longitud, 4mm de diámetro interno y 6mm de diámetro externo, conectaba la boquilla del aireador con una piedra difusora de 40 mm de largo y 10 mm de diámetro, idéntica en todos los cultivos. Un caño rígido plástico de 13 cm de longitud, 8mm de diámetro interno y 8,5 mm de diámetro externo servía para que la manguera cristal que unía la piedra difusora con el aireador se mantuviera estirada. A 5 cm de la boquilla del aireador se colocaba en la manguera cristal una válvula plástica de regulación de flujo de aire, idéntica en todos los cultivos.

Para asegurar que todos los recipientes eran provistos de igual mezcla, se llenaba cada recipiente de agua de grifo hasta el volumen de trabajo, se arrojaba una gota de azul de metileno y se medía el tiempo hasta su total disolución. Luego se comparaban los tiempos de cada fotorreactor, se ajustaba el ingreso de aire con la válvula de ser necesario y se repetía la medición.

El experimento se realizó en modo *batch* durante 6 días. La profundidad de los cultivos se ajustó a 15 cm (que sería la profundidad utilizada en el futuro escalado a estanques al exterior), los mismos se incubaron a la temperatura exterior y el fotoperíodo respondió a los ciclos de luz/oscuridad natural (Moheimani 2006, Moheimani 2013).

#### 3.2.1.2.4 *Muestreo y determinaciones analíticas*

Se realizaron muestreos de cada cultivo, diariamente para el recuento celular y cada dos días para la determinación del peso seco y peso seco libre de cenizas. El crecimiento (expresado como tasa específica de crecimiento  $\mu$ , concentración de biomasa y productividad volumétrica) se determinó como se describe anteriormente

en la Sección 2.4.3. La composición de la biomasa (contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos) se determinó como se describe en la Sección 2.4.5.

Los análisis del contenido de nutrientes en los medios de cultivo de cada mesocosmo, se realizaron como se describe en la Sección 2.2. Las muestras se tomaron al principio y al final del experimento, es decir, se tomaron 90 ml de cada mezcla de efluentes al comienzo del experimento y se tomaron y centrifugaron muestras de 90 ml de cultivo microalgal de cada mesocosmo al final del experimento para el análisis de remoción de nutrientes.

Las tasas de remoción de cada nutriente se expresaron dividiendo la diferencia entre las concentraciones del primer día y el sexto día por la concentración del primer día, y luego se multiplicaron por 100. Todos los análisis de biomasa y agua se realizaron por triplicado. El pH se determinó tres veces al día a las 8 h, 12 h y 16 h usando un medidor de banco Adwa Ad1030 para pH-ORP-temperatura.

#### 3.2.1.2.5 *Análisis de resultados*

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de confianza de  $P = 0,05$  para examinar las diferencias entre los distintos ensayos.

### **3.3 Resultados**

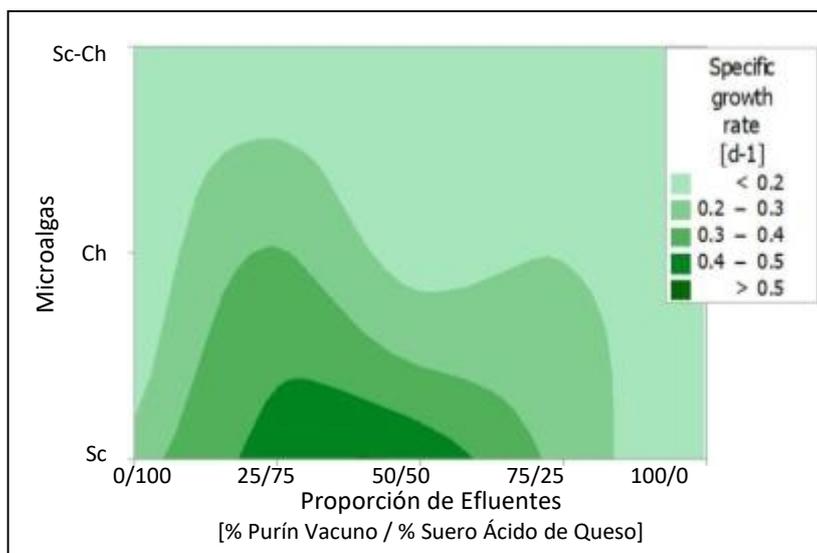
#### 3.3.1 Efecto de la proporción de efluentes en la velocidad de crecimiento y productividad de los cultivos (Ensayo 1)

El objetivo de este estudio consistió en evaluar el crecimiento de las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* y un consorcio de ambas, tanto en los efluentes Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso puros como en mezclas de ellos (Condiciones evaluadas = 15; Tabla 7).

No se observó una disminución significativa en la densidad celular durante el primer día en ninguno de los cultivos, pero las microalgas cultivadas en efluentes puros (sin mezclar), es decir, Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso, mostraron velocidades de crecimiento menores que las mismas microalgas cultivadas en cualquiera de las mezclas. En el sexto día del experimento, la densidad celular llegó a una meseta o comenzó a disminuir en todos los ensayos.

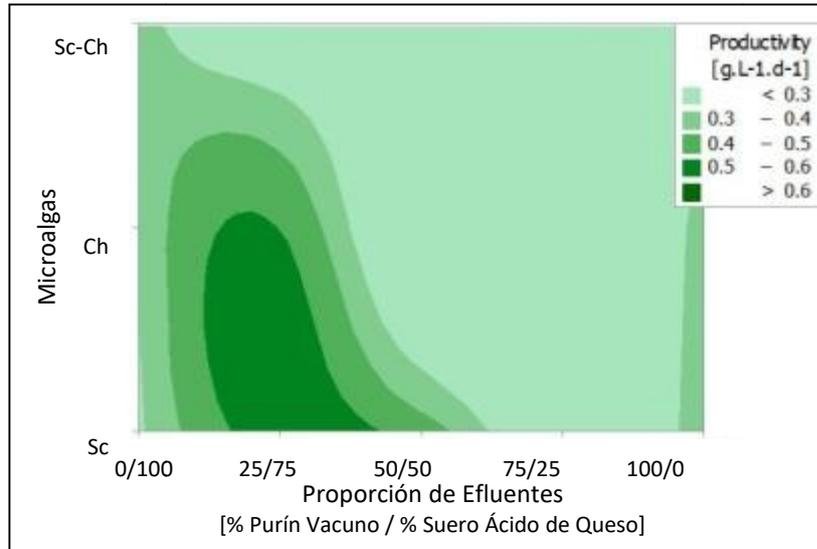
La gráfica de contorno en la Figura 4 ilustra estos resultados. La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) más alta de las quince condiciones se logró mediante *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ ( $0,48\pm 0,15 \text{ d}^{-1}$ ) seguido de *S. dimorphus* en una mezcla de 25% PV-75% SAQ ( $0,44\pm 0,08 \text{ d}^{-1}$ ).

Las tasas específicas de crecimiento de los consorcios de las dos cepas de microalgas (*S. dimorphus* y *C. pirenoidosa*) cultivadas juntas se encontraron entre los valores más bajos de los quince ensayos, sin una diferencia significativa en el crecimiento de ninguna de las dos especies.



**Figura 4. Tasa específica de crecimiento [ $\text{d}^{-1}$ ] de las 15 condiciones de cultivo testeadas en el **screening** inicial. Sc (*Scenedesmus dimorphus*); Ch (*Chlorella pirenoidosa*); Sc-Ch (ambas en consorcio). \*En esta figura el punto equivale a una coma.**

La mayor producción de biomasa fue alcanzada por *C. pirenoidosa* en una mezcla de 25% PV-75% SAQ ( $0,55\pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) seguido de *S. dimorphus* en la misma proporción de efluentes ( $0,50\pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Una vez más, la productividad de los consorcios de las dos cepas de microalgas (*S. dimorphus* y *C. pirenoidosa*) cultivadas juntas estuvo entre los valores más bajos. Sin embargo, las productividades de los cultivos de microalgas en los efluentes puros (sin mezclar) estuvieron entre los valores medios del ensayo. Aunque no se midió el volumen celular, el tamaño de las células de cada una de las dos especies de microalgas bajo el microscopio fue notablemente mayor para los cultivos en Purín Vacuno puro y Suero Ácido de Queso puros que en cualquiera de las mezclas. El gráfico de contorno en la Figura 5 ilustra estos resultados.



**Figura 5. Productividad volumétrica en biomasa [g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>] de las 15 condiciones de cultivo testeadas en el *screening* inicial. Sc (*Scenedesmus dimorphus*); Ch (*Chlorella pyrenoidosa*); Sc-Ch (ambas en consorcio). \*En esta figura el punto equivale a una coma.**

Los dos parámetros de diseño, es decir, la proporción de mezcla de efluentes y las especies de microalgas, tuvieron un efecto significativo en las dos funciones objetivo, es decir, tanto en la tasa específica de crecimiento como en la productividad volumétrica (ANOVA de dos vías  $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.1 Relación Nitrógeno:Fósforo y disponibilidad de luz

La composición química y, sobre todo, los colores de los dos efluentes utilizados en este estudio son significativamente diferentes entre sí. La Figura 6 y la Tabla 8 resumen esta información.



**Figura 6. Muestras de Purín Vacuno (izquierda) y Suero Ácido de Queso (derecha)**

**Tabla 8. Perfil fisicoquímico de los dos efluentes usados en este estudio**

Efluentes	pH	P-PO <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	DBO <sub>5</sub>	DQO	SST
Purín Vacuno (PV)	7,5	357,1	111,2	539,6	341,0	6.936,0	213,0
Suero Ácido de Queso (SAQ)	5,5	264,3	154,6	47,6	285,0	100.558,2	60,0

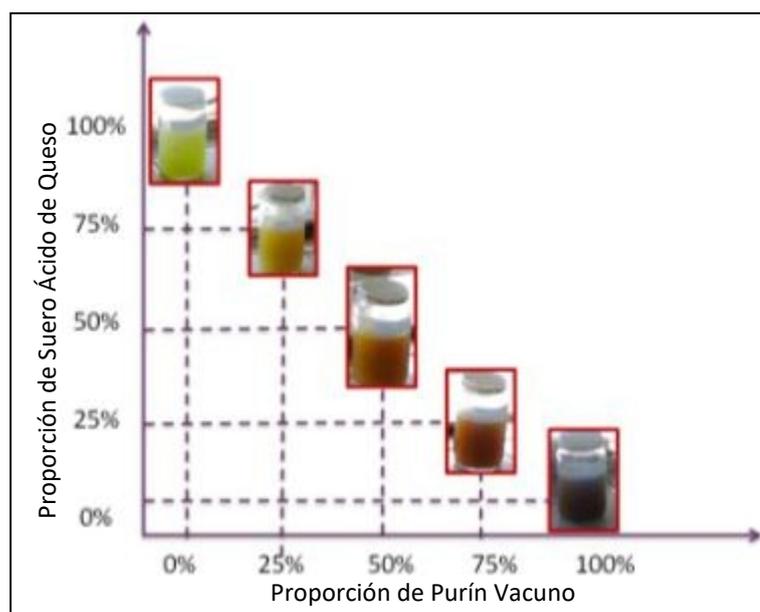
El Suero Ácido de Queso tiene un pH ácido y casi tres veces menos sólidos en suspensión (SST) que el Purín Vacuno. El SAQ también tiene una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que es catorce veces más alta que la del PV. El Purín Vacuno tiene una concentración más alta de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub>) y una relación N:P que es mucho mayor que en el Suero Ácido de Queso (Tabla 9).

**Tabla 9. Relación molar Nitrógeno:Fósforo de los dos efluentes y las tres mezclas de efluentes usados en este estudio**

Efluentes y Mezclas	N:P
	Relación molar
0% PV - 100% SAQ (Suero Ácido de Queso Puro)	1,8:1
25% PV - 75% SAQ	3,9:1
50% PV - 50% SAQ	5,6:1
75% PV - 25% SAQ	7,1:1
100% PV - 0% SAQ (Purín Vacuno Puro)	8,4:1

PV: Purín Vacuno  
SAQ: Suero Ácido de Queso

La Figura 7 ilustra la proporción de cada uno de los dos efluentes en cada uno de los cinco medios utilizados en este estudio, así como su aspecto (color) después de la inoculación. Es evidente a simple vista que la penetración de la luz en los medios de color más oscuro está obstaculizada.



**Figura 7. Mezclas de efluentes usadas en este estudio**

La luz transmitida se evaluó para cada uno de los medios de cultivo, como se describió anteriormente (3.2.1.1), antes de la inoculación. La intensidad de la luz incidente fue de  $56,97 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Los resultados se presentan en la Tabla 10 y se comparan en la Figura 8.

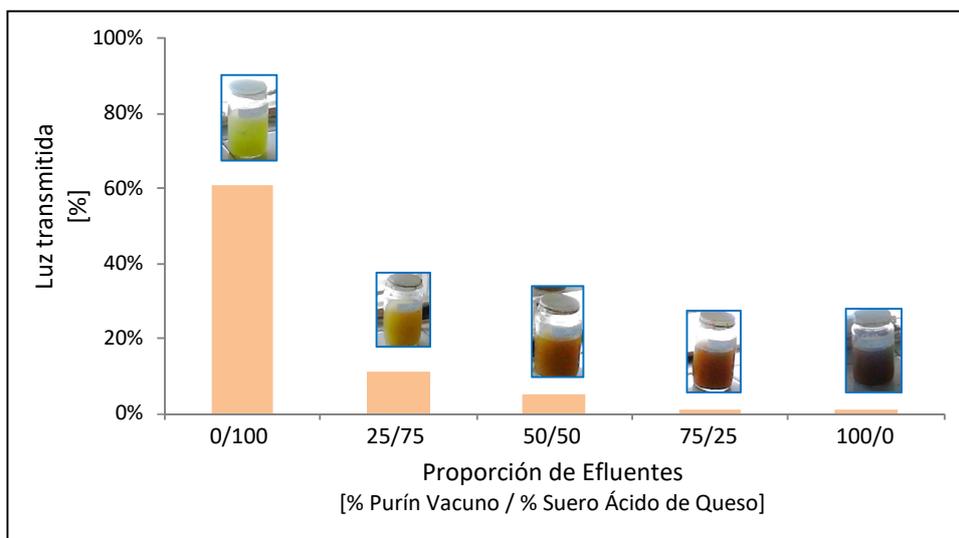
**Tabla 10. Luz transmitida a través de los efluentes y mezclas usados en este estudio**

Efluentes y Mezclas	Luz incidente	Luz transmitida*	
	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	%
0% PV - 100% SAQ (Suero Ácido de Queso Puro)	56,97	34,76	61,0
25% PV - 75% SAQ		3,38	5,9
50% PV - 50% SAQ		1,02	1,8
75% PV - 25% SAQ		0,67	1,2
100% PV - 0% SAQ (Purín Vacuno Puro)		0,51	0,9

PV: Purín Vacuno

SAQ: Suero Ácido de Queso

\* Luz transmitida a través de la muestra colocada en un recipiente de vidrio transparente de 0,3 mm de espesor y 5 cm de diámetro



**Figura 8. Comparación de la luz transmitida a través de cada una de las muestras de efluentes usados en este estudio y mezclas de ellos**

Como se mencionó anteriormente, el Suero Ácido de Queso tiene tres veces menos sólidos en suspensión que el Purín Vacuno y, por lo tanto, la cantidad de luz transmitida es significativamente mayor a través de este efluente puro que a través de cualquiera de las mezclas.

### 3.3.1.2 Optimización por diseño factorial

Las tres condiciones experimentales que simultáneamente maximizaron ambos parámetros de crecimiento, es decir, la productividad y la tasa específica de crecimiento, fueron *C. pirenoydosa* y *S. dimorphus* cultivadas en una mezcla de 25% PV-75% SAQ y *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ (Tabla 11), confirmando así los resultados obtenidos de la superposición de los gráficos de contorno previamente descritos (Figura 4 y Figura 5)

**Tabla 11. Resultados arrojados por la herramienta de Optimización del Software estadístico Minitab**

Response Optimization: Productivity, Specific Growth Rate						
Parameters						
Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
Pr	Maximum	0,0666667	0,603333		1	1
Sp GR	Maximum	0,0196312	0,726009		1	1
Solutions						
Solution	Microalgae	PV conc	Pr Fit	Sp GR Fit	Composite Desirability	
1	Sc	25	0,544437	0,435438	0,723910	
2	Sc	50	0,451598	0,468920	0,675435	
3	Ch	25	0,492740	0,297326	0,558670	

Estas tres condiciones se seleccionaron para el siguiente estudio, al exterior, de la producción de biomasa, la remoción de nutrientes y la evaluación de la composición bioquímica de la biomasa.

### 3.3.2 Comparación de las eficiencias de remoción de nutrientes y composición bioquímica de la biomasa (Ensayo 2)

Las tres condiciones seleccionadas (*C. pirenoydosa* y *S. dimorphus* cultivadas en una mezcla de 25% PV-75% SAQ y *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ), se estudiaron al exterior en mesocosmos.

El pH del cultivo se ajustó a 7 al comienzo del experimento, ya que el Suero Ácido de Queso tenía un pH muy ácido de 5,5. Se añadió una gragea de NaOH a cada cultivo de 5 L mientras se mezclaba a mano con una varilla de vidrio. Cada cultivo tenía su propia varilla de vidrio. Posteriormente, se midió el pH y se repitió el mismo procedimiento hasta que el pH alcanzara el valor de 7. Esto tomó el mismo número de grageas de NaOH (3) en cada cultivo. Una segunda corrección de pH fue necesaria para todos los replicados de los cultivos creciendo en una mezcla de 25% PV-75% SAQ en el día 2 de cultivo, debido a que el pH bajó a 5,5 en la mañana de ese día. Esto no fue necesario en ninguno de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en 50% PV-50% SAQ.

Después de esta diferencia inicial, el pH aumentó diariamente a un valor de  $7,7 \pm 0,3$  al mediodía y volvió a caer a  $7 \pm 0,5$  a la mañana siguiente en todos los cultivos.

No hubo diferencia significativa entre el crecimiento de *C. pyrenoidosa* y *S. dimorphus* en la mezcla de 25% PV-75% SAQ. Sin embargo, *S. dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ logró duplicar las tasas de crecimiento promedio de las otras dos condiciones de cultivo mencionadas.

De forma similar a los resultados anteriores, *Scenedesmus dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ mostró la mayor tasa específica de crecimiento y, en este caso, también la productividad volumétrica más alta. La Tabla 12 resume los resultados obtenidos para cada condición de cultivo.

**Tabla 12. Parámetros de crecimiento medidos en cultivos al exterior en mesocosmo (promedio±DS, n=3)**

Medios	Microalgas	Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ )	Productividad volumétrica
		$d^{-1}$	$g.L^{-1}.d^{-1}$
25% PV - 75% SAQ	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,17±0,02 <sup>a</sup>	0,33±0,04
25% PV - 75% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0,19±0,03 <sup>a</sup>	0,22±0,03
50% PV - 50% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0,38±0,03	0,41±0,03

PV: Purín Vacuno

SAQ: Suero Ácido de Queso

La diferencia es significativa entre los promedios salvo que se indique lo contrario (ANOVA con medidas repetidas  $p<0,05$ )

<sup>a</sup> No hay diferencia significativa entre los promedios

### 3.3.2.1 Remoción de nutrientes

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 nitrogenados.

La Tabla 13 resume las tasas de remoción de nutrientes después de 6 días de cultivo.

**Tabla 13. Remoción de nutrientes en los tres mesocosmos**

Medios de cultivo	Microalgas	Remoción de nutrientes		
		P-PO <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>
%				
25% PV - 75% SAQ	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	99 <sup>a</sup>	10	55
25% PV - 75% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	99 <sup>a</sup>	71	32
50% PV - 50% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	99 <sup>a</sup>	96	70

PV: Purín Vacuno

SAQ: Suero Ácido de Queso

La diferencia es significativa entre los promedios salvo que se indique lo contrario (ANOVA con medidas repetidas  $p<0,05$ )

<sup>a</sup> No hay diferencia significativa entre los promedios

Si bien la relación molar de nitrógeno a fósforo en ambas mezclas fue inferior a 16 (Redfield 1958), la mezcla de 50% PV-50% SAQ presentó una relación de 5,6:1 de N:P mayor que la relación de 3,9:1 de N:P de la mezcla de 25% PV-75% SAQ (Tabla 9).

### 3.3.2.2 Composición bioquímica de la biomasa

La biomasa obtenida del cultivo al exterior en mesocosmos 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. pirenoidosa* 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. La Tabla 14 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 14. Composición de la biomasa de los cultivos luego de 6 días de cultivo al exterior en mesocosmo (promedio $\pm$ DS, n=3)**

Medios de cultivo	Microalgas	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos
		[mg.g <sup>-1</sup> biomasa microalgal]		
25% PV - 75% SAQ	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	215 $\pm$ 13	356 $\pm$ 20	291 $\pm$ 16
25% PV - 75% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	226 $\pm$ 17	337 $\pm$ 16	111 $\pm$ 9
50% PV - 50% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	157 $\pm$ 11	367 $\pm$ 20	237 $\pm$ 10

PV: Purín Vacuno  
SAQ: Suero Ácido de Queso

*Scenedesmus dimorphus* cultivada en 50% PV-50% SAQ alcanzó el doble de la cantidad de carbohidratos que *S. dimorphus* cultivada en 25% PV- 75 % SAQ. Sin embargo, *C. pirenoidosa* cultivada también en 25% PV- 75% SAQ, logró el mayor contenido de carbohidratos de las tres condiciones.

Los valores presentados son expresados en base seca, la biomasa libre de cenizas mostró una variación de 20% para la mezcla 25% PV-75% SAQ y de 25% para la mezcla de 50% PV-50% SAQ.

### 3.4 Discusión

La valorización de los dos efluentes utilizados en este estudio es posible a través de tecnologías que existen y están disponibles (por ej. digestión anaeróbica, hidrólisis, fermentación controlada, etc.), sin embargo, los costos asociados las hacen inalcanzables para las pequeñas y medianas industrias lácteas no sólo localmente sino a nivel global (Prazeres, Carvalho et al. 2012, Prajapati, Choudhary et al. 2014, Riaño, Blanco et al. 2016). Por otro lado, son estas pequeñas y medianas empresas las que enfrentan dificultades financieras para cumplir con los requisitos legales ambientales cada vez más estrictos (Sienkiewicz and Riedel 1990, Mawson 1994, Farizoglu, Keskinler et al. 2007). En este contexto, el tratamiento de efluentes mediante el uso de microalgas ofrece una serie de ventajas sobre las tecnologías convencionales. La escasez de estudios de cultivos de microalgas en efluentes crudos, sin usar agua dulce para la dilución, refuerza aún más la necesidad de los experimentos reportados en este capítulo. El agua dulce es un recurso finito y no debe utilizarse para diluir los efluentes o aguas residuales (Ayre, Moheimani et al. 2017).

Los resultados obtenidos de los estudios presentados aquí indican que es posible cultivar microalgas en Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso y, además, que la mezcla de estas dos corrientes permite, hasta cierto punto, superar los principales obstáculos reportados para el tratamiento de cada uno de ambos efluentes, cuando se realiza por separado.

#### 3.4.1 Penetración de la luz

La importancia que tiene la disponibilidad de luz para cada proceso celular de las microalgas fotoautotróficas, y por ende para los cultivos microalgales, fue abordada en términos generales en la Sección 1.3.1.1.

A este respecto, en relación al uso de purines de ganado para el cultivo de microalgas, como el Purín Vacuno utilizado en este estudio, el cultivo de microalgas enfrenta un desafío en cuanto a la transparencia de los mismos, dado que su color oscuro podría impedir la penetración de suficiente luz para el crecimiento de las microalgas (Bhatnagar, Chinnasamy et al. 2011, Fenton and Ó hUallacháin 2012). Aunque existen reportes acerca de algunas especies de microalgas, como *Spirogyra*

sp., *Caulerpa lentillifera*, *Caulerpa scalipelliforis* y *Chlorella vulgaris*, que indican que las mismas son efectivas para eliminar el color de ciertas aguas residuales (Acuner and Dilek 2004, Marungrueng and Pavasant 2006, Aravindhana, Rao et al. 2007, Khalaf 2008), la mayoría de los estudios reportados que usaron efluentes con contenido de estiércol de ganado para el crecimiento de microalgas, han diluido este efluente. Sólo el estudio de Prajapati, Choudhary et al. (2014) utilizó Purín Vacuno puro y sin diluir para la producción de biomasa de microalgas.

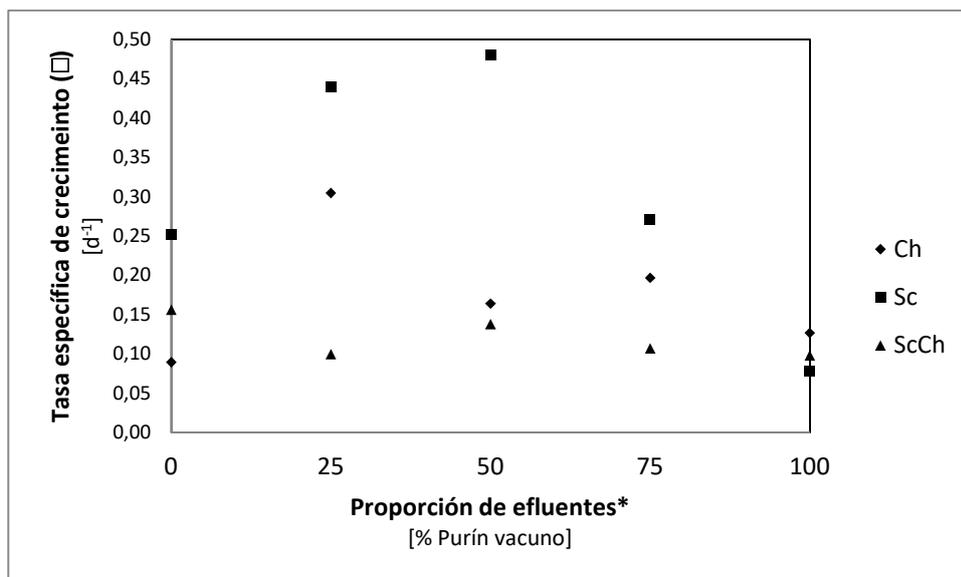
En el estudio de laboratorio informado en este Capítulo (Ensayo 1), *Scenedesmus dimorphus* cultivada en Purín Vacuno alcanzó una concentración de biomasa de 2,33 g.L<sup>-1</sup>, *Chlorella pyrenoidosa* logró un rendimiento en biomasa de 2,10 g.L<sup>-1</sup> y el consorcio de estas dos microalgas cultivadas juntas también en Purín Vacuno logró un rendimiento de 1,50 g.L<sup>-1</sup>. Prajapati, Choudhary et al. (2014) informaron que *Chroococcus* sp. obtuvo un rendimiento de 2,13 g.L<sup>-1</sup>, *Chlorella vulgaris* alcanzó una concentración de biomasa de 2,15 g.L<sup>-1</sup> y *Chlorella pyrenoidosa* alcanzó un rendimiento de biomasa de 1,50 g.L<sup>-1</sup>, cuando se cultivaron en este efluente puro, proveniente de ganado, a escala de laboratorio.

Aunque estas condiciones de cultivo (es decir, las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas en Purín Vacuno puro) no se escalaron a la siguiente etapa debido a sus bajas tasas específicas de crecimiento, entre otras condiciones, los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los informados por Prajapati, Choudhary et al. (2014).

Hena, Fatimah et al. (2015) informaron una productividad de biomasa de 0,201±0,03 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para *Chlorella saccarophila* cultivada en aguas residuales crudas (sin tratar) de lecherías, sin inyección extra de CO<sub>2</sub> (es decir, con CO<sub>2</sub> del ambiente), bajo 80 μ.mol.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> de flujo, y 0,211±0,07 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> de productividad de biomasa para *Scenedesmus* sp. cultivada en las mismas condiciones. Aunque la concentración de los nutrientes en el efluente de granja lechera utilizado por Hena, Fatimah et al. (2015) es menor que en las mezclas de efluentes utilizadas en este estudio, este es uno de los pocos estudios a escala de laboratorio utilizando aguas residuales de granja de productos lácteos sin diluir, sin tratar y sin inyección de CO<sub>2</sub> adicional y, por lo tanto, se utiliza aquí para fines de comparación. La Figura 10 muestra las productividades volumétricas obtenidas en el Ensayo 1 antes descrito, estos resultados fueron anteriormente presentados como Gráfica de Contorno; se presentan

aquí como Gráfica XY para facilitar la comparación con los resultados de otros estudios. Al comparar la Figura 10 con las productividades informadas por Hena, Fatimah et al. (2015) que se describieron en el párrafo anterior, se evidencia que estas últimas están en la media del rango de valores de los resultados obtenidos en el Estudio 1 reportado en este capítulo.

Es posible que en el presente estudio, la mayor producción de biomasa de  $0,55 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  observada en cultivos de *C. pyrenoydosa* a escala de laboratorio en una mezcla de 25% PV- 75% SAQ, seguido de  $0,50 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  observado en cultivos de *S. dimorphus* en la misma proporción de efluentes (Ensayo 1), se explique por el mayor contenido de nutrientes de estas mezclas en comparación con el contenido de nutrientes de los efluentes usados por Hena, Fatimah et al. (2015).

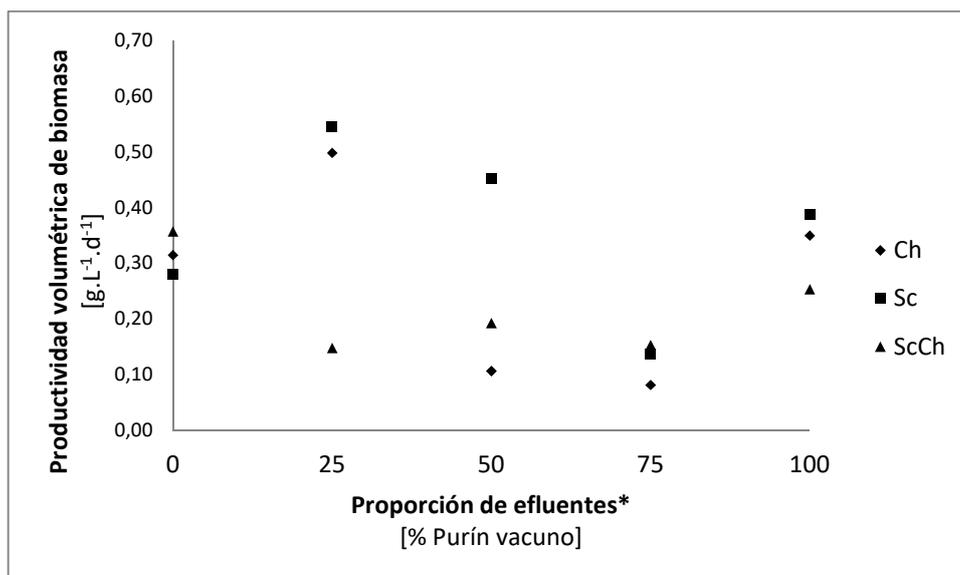


**Figura 9. Tasas de crecimiento específico obtenidos en el Ensayo 1 para las diferentes combinaciones de microalgas\*\*.**

(Ch: *Chlorella pyrenoidosa*; Sc: *Scenedesmus dimorphus*; ScCh: ambas microalgas en consorcio).

\*La proporción de efluentes está expresada como contenido porcentual de Purín Vacuno. La proporción remanente para llegar a 100% corresponde a Suero Ácido de Queso.

\*\*Estos resultados fueron anteriormente presentados como Gráfica de Contorno y se presentan aquí para facilitar la comparación con otros estudios.



**Figura 10. Productividades volumétricas de biomasa obtenidas en el Ensayo 1 para las diferentes combinaciones de microalgas\*\*.**

(Ch: *Chlorella pyrenoidosa*; Sc: *Scenedesmus dimorphus*; ScCh: ambas microalgas en consorcio).

\*La proporción de efluentes está expresada como contenido porcentual de Purín Vacuno. La proporción remanente para llegar a 100% corresponde a Suero Ácido de Queso.

\*\*Estos resultados fueron anteriormente presentados como Gráfica de Contorno y se presentan aquí para facilitar la comparación con otros estudios.

Otra posible consecuencia de la alta opacidad de los cultivos en purines de ganado, es que puede conducir a la contaminación del mismo. La baja transparencia de las aguas residuales utilizadas como fuente de nutrientes causa una limitación en la penetración y disponibilidad de la luz y, como consecuencia, las bacterias heterotróficas dominan el cultivo de microalgas (Woertz 2007). Los cultivos de los experimentos informados en este estudio siempre estuvieron dominados por microalgas, lo que podría explicarse por una combinación de factores, que son abordados en detalle a continuación.

### 3.4.2 pH

El pH del medio de cultivo determina el grado de ionización en las especies químicas, lo que influye en la reactividad, solubilidad y disponibilidad de los compuestos que han de ser nutrientes para el crecimiento microalgal, como se describió en la Sección 1.3.1.3.

Un pH superior a 8,5 trae aparejada la co-precipitación de fosfatos y un pH superior 10 produce el *stripping* de nitrógeno amoniacal; por otro lado, la contaminación del

cultivo es altamente dependiente del pH, ya que impacta significativamente en la competencia de especies.

Woertz (2007) reportó tasas de crecimiento más lentas cuando los cultivos microalgales en aguas residuales de productos lácteos alcanzaron un pH de 10. Adey and Hackney (1989) encontraron que, en Purín Vacuno, a pHs superiores a 7,5 ya se evidenciaba volatilización de nitrógeno amoniacal y precipitación de fosfatos, y que ello se daba en concomitancia con un menor crecimiento del cultivo, por lo cual, y especialmente durante la primera etapa del cultivo, la estabilidad del pH resultaba lo más importante de asegurar. Para lograrlo, Woertz (2007) reporta la necesidad de inyectar CO<sub>2</sub>, de modo de superar las lentas tasas de crecimiento a valores altos de pH.

Por otro lado, un nivel de pH inferior a 6 también puede conducir a la contaminación y dominancia bacteriana, principalmente en los efluentes ácidos de la industria láctea, como el Suero Ácido de Queso utilizado en este estudio. Girard, Roy et al. (2014) recomiendan estrictamente el pre-procesamiento del suero de queso, por ejemplo, mediante ultrafiltración, para evitar el predominio de la población bacteriana en los cultivos de microalgas.

Como ya se detalló en la Sección 1.3.1.3, los valores de pH por debajo de 6 producen cambios significativos en la fisiología celular, incluso llegando a inactivar procesos enzimáticos o a consumir mucha energía a la célula, ya que mantener un pH citosólico neutro cuando los valores de pH del medio de crecimiento son bajos, consume energía. Esto puede explicar la disminución observada en las tasas de crecimiento de los cultivos de microalgas expuestos a esta condición, lo que resulta especialmente importante en este estudio, ya que la fabricación de queso produce corrientes de desechos caracterizadas, entre otros parámetros, por un nivel de pH ácido en el rango de 4 a 7 (Slavov 2017).

Girard, Roy et al. (2014) realizaron un estudio sustituyendo hasta el 40% (v/v) del Medio Basal de Bold con permeado de suero y encontraron que estimulaba el crecimiento de *Scenedesmus obliquus*. Concentraciones iniciales de permeado de suero superiores al 40% dieron como resultado fases de latencia (*lag*) significativamente más largas.

Como ya lo recomendaran Fenton and Ó hUallacháin (2012) al estudiar diversos reportes de cultivos de microalgas en efluentes agroindustriales, las consecuencias

antes mencionadas de valores de pH alcalino o ácido en cultivos de microalgas demuestran la importancia del tamponamiento de los cultivos para mantener un nivel de pH alrededor de 7.

En este estudio, el proceso que mantuvo el valor de pH en torno a  $7\pm 1$  puede haberse logrado por la mezcla de estos dos efluentes. Por un lado, el Suero Ácido de Queso no se esterilizó de ninguna manera, por lo tanto, las bacterias lácticas presentes pueden haber seguido creciendo, aunque lentamente, y podrían haber estado reduciendo constantemente el pH incrementado por la fotosíntesis de las microalgas.

Aunque se midió un valor de pH de 4 en una muestra de Suero Ácido de Queso que se dejó desatendida en el exterior, en los cultivos experimentales el pH nunca fue inferior a 6, y es posible que esto se explique por la dominancia de las microalgas en todo momento.

Por otro lado, el color oscuro del Purín Vacuno se suavizó visiblemente con el más transparente Suero Ácido de Queso y, por lo tanto, las bacterias heterótrofas presentes en el primero podrían no haber sido capaces de dominar el cultivo e impedir la actividad fotosintética de las microalgas.

Por último, dado que el pH se mantuvo en todo momento en valores de  $7\pm 1$ , no es esperable que se haya producido volatilización o *stripping* de nitrógeno amoniacal ni precipitación de fosfatos. Un valor de pH neutro, probablemente, hizo posible la disponibilidad completa de los nutrientes, como P- $\text{PO}_4$  y N- $\text{NH}_4$ .

En condiciones fotoautotróficas, se informó que *Scenedesmus obliquus* alcanzó una tasa específica de crecimiento de  $0,267 \text{ d}^{-1}$  cuando se cultivó en una mezcla de 40% de permeado de suero de queso y 60% de Medio Basal de Bold (v/v) (Girard, Roy et al. 2014), un valor más bajo en comparación con la tasa específica de crecimiento obtenida, en el Ensayo 2 (mesocosmos) informado en este capítulo, por *Scenedesmus dimorphus* cultivada en una mezcla de 50% de SAQ y 50% de PV (v/v), que fue de  $0,38 \text{ d}^{-1}$ .

La Tabla 15 resume otros resultados obtenidos en estudios que utilizan efluentes y/o microalgas similares a los utilizados en este estudio. Como se puede observar en esta Tabla, algunos de los estudios diluyen los efluentes con agua corriente, lo que se evitó deliberadamente en los experimentos informados en este capítulo. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio son comparables o más significativos que los presentados en la Tabla 15.

Tabla 15. Crecimiento y remoción de nutrientes en cultivos de microalgas de estudios seleccionados (efluentes similares)

Medios de cultivo	Microalgas	Parámetros de Crecimiento			Remoción de nutrientes			Referencia
		$\mu_{max}$	Rendimiento	Pr	P-PO <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	
		[d <sup>-1</sup> ]	[g.L <sup>-1</sup> ]	[g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ]	[%]	[%]	[%]	
40% Suero lácteo (60% agua potable)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1,083						Girard, Roy et al. (2014)
		0,702						
		0,267						
Efluente de tambo crudo	<i>Chlorella saccharophila</i>			0,201				Hena, Fatimah et al. (2015)
	<i>Scenedesmus sp</i>			0,211				
	Consortio de 10 microalgas			0,191				
Efluente de tambo tratado	Consortio de 10 microalgas				98,8	99,4	100	
75% Efluente crudo de tambo (25% agua potable)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		6,8		57,6	44,8		Kothari, Pathak et al. (2012)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>				87,1	60,54		
75% Efluente tratado de tambo (25% agua potable)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		4,9					
Purín Vacuno	<i>Chroococcus sp</i>		2,13					Prajapati, Choudhary et al. (2014)
	<i>Chroococcus sp</i>		4,44		6,34 (TDP)	25	98	
	<i>Chlorella vulgaris</i>		2,15					
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		1,5					
5% Digestato de suero de queso (95% agua potable)	<i>Chlorella sorokiniana SAG</i>		1,1		20-71		84-96	Riaño, Blanco et al. (2016)
25%PV*-75%SAQ**	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,17±0,02	1,67	0,33±0,04	99	10	55	Este estudio (Ensayo 2)
25%PV*-75%SAQ**	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0,19±0,03	1,09	0,22±0,03	99	71	32	
50%PV*-50%SAQ**	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0,38±0,03	2,07	0,41±0,03	99	96	70	

\* PV: Purín Vacuno

\*\* SAQ: Suero Ácido de Queso

### 3.4.3 Relación N:P

Otro factor que afecta al crecimiento óptimo de microalgas en las corrientes de aguas residuales es la relación molar de nitrógeno a fósforo. Como se indicó antes, en la Sección 1.3.1.4, una relación estequiométrica óptima de C:N:P (carbono: nitrógeno: fósforo), conocida como la relación de Redfield (Redfield 1958) es de 106: 16: 1. Si la relación N: P es menor que 13, entonces las microalgas están normalmente limitadas por falta de nitrógeno, mientras que una relación N: P mayor que 22 indica limitación de fósforo (Hillebrand and Sommer 1999). Si hay una limitación de nutrientes en el medio, el desarrollo de microalgas puede no ser del todo factible y como se resumió en la Tabla 2, la mayoría de las aguas residuales están limitadas por nitrógeno o fósforo.

Aunque el Purín Vacuno crudo utilizado en este estudio evidenció la relación N:P más alta, seguido por la mezcla 75% PV - 25% SAQ (Tabla 9), ello no coincidió con las tasas de crecimiento o productividades más altas (Figura 9 y Figura 10), probablemente debido a su opacidad, como ya se indicó en esta discusión y de manera consistente con otros estudios y revisiones (Bhatnagar, Chinnasamy et al. 2011, Prajapati, Choudhary et al. 2014).

Sin embargo, se ha informado en la literatura que la limitación de nitrógeno en los medios de cultivo de microalgas puede favorecer la producción de lípidos (Hena, Fatimah et al. 2015). El estrés nutricional que causa la deficiencia de nitrógeno aumenta el contenido de lípidos en las células de microalgas. Por lo tanto, las bajas proporciones de N:P en las aguas residuales podrían ser beneficiosas para una biomasa con mayor contenido lipídico. Los resultados obtenidos en el Ensayo 2 informado en este capítulo, fueron consistentes con ello, ya que *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas en mezclas de 25% PV-75% SAQ (N:P=3,9;

Tabla 9) lograron mayores contenidos de lípidos (Tabla 14) que *Scenedesmus dimorphus* cultivada en una mezcla de 50% PV / 50% SAQ (N:P =5,6; Tabla 9). Estos resultados se presentan de nuevo y se comparan con otros estudios en la Tabla 16.

Aunque los datos informados por otros autores no pueden compararse directamente con los resultados del presente estudio, debido a que las condiciones operativas de

cada uno de los experimentos difieren, estos valores señalan el rango de valores alcanzados por microalgas cultivadas en aguas residuales. Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos en el presente estudio se lograron mediante el cultivo de microalgas en efluentes crudos, evitando la dilución con agua dulce. Por lo tanto, un menor contenido de lípidos aún podría ser valioso, si se obtuviera sin usar agua dulce como insumo del tratamiento de aguas residuales mediado por microalgas.

Sin embargo, dado que *Scenedesmus dimorphus* cultivada en mezclas de 50% PV-50% SAQ logró mayores tasas de crecimiento y remoción de nutrientes y, teniendo en cuenta que la ficorremediación fue el objetivo principal del Ensayo 2 y, en general, de esta tesis, ésta fue la condición seleccionada para ser escalada.

**Tabla 16. Comparación de la biomasa algal obtenida en este estudio con los resultados de publicaciones seleccionadas**

Medio de cultivo	Microalgas	Rendimiento en biomasa (g.L <sup>-1</sup> )	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Referencia
Digestato de pulpa de papel (dilución 1,5x)	<i>Chlorella vulgaris</i>	2,91	6,8	21,7	30,3	Tao et al. (2017)
Digestato de pulpa de papel (dilución 1,5x)	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	8,22	60,5	19,9	24,3	Tao et al. (2017)
Digestato de efluente municipal (dilución 2x)	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	2,92	44,3	35,9	28	Tao et al. (2017)
Digestato de purín de aves de corral	<i>Scenedesmus bijuga</i>	0,38	22,9	9,5	39	Singh et al. (2011)
Orina humana	<i>Chlorella sorokiniana</i>	9,3	N.R.	N.R.	N.R.	Tuantet et al. (2014)
Digestato de efluente municipal	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1,97	13,9	10,9	60,7	Tan et al. (2015)
Efluente porcino tratado anaeróbicamente	<i>Chlorella vulgaris</i>	3,24	N.R.	32	N.R.	Marjakangas et al. (2015)
Purín porcino	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> and <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,25	50	20	25	Molinuevo-Salces et al. (2016)
Digestato de aguas cloacales	<i>Scenedesmus sp. and/or Chlorella sp.</i>	0,42	N.R.	N.R.	N.R.	Viruela et al. (2016)
Digestato de Purín Vacuno	Mix of <i>Actinastrum</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i> and <i>Micractinium</i>	N,R	N,R	8-29	N.R.	Woertz et al. (2009)
Medio basal modificado	<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	7,22	50,4	N.R.	N.R.	Ho et al. (2013)
Digestato de suero de queso	<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,76	N.R.	12,3	N.R.	Riaño et al. (2015)
25%PV*-75% SAQ **	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1,67	29,1	21,5	35,6	Este estudio
25% PV *-75% SAQ **	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	1,09	11,1	22,6	33,7	Este estudio
50% PV *-50%SAQ**	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2,07	23,7	15,7	36,7	Este estudio

\* PV: Purín Vacuno

\*\* SAQ: Suero Ácido de Queso

#### 3.4.4 Uso de agua dulce

La utilización de la biomasa microalgal como materia prima para la producción de biocombustibles se ha propuesto sobre la base de la creciente demanda de energía a nivel mundial y el agotamiento de las fuentes de petróleo. En este contexto, las microalgas son una alternativa para evitar el debate que se da alrededor de si determinados cultivos de oleaginosas deben destinarse a la producción de alimentos o a la producción de biocombustibles, ya que la biomasa de microalgas también se puede producir en tierras no adecuadas para la agricultura, utilizando aguas residuales como fuente de nutrientes.

Hoy en día, sin embargo, el agua dulce es otro recurso que disminuye rápidamente y exige atención global. En este sentido, el cultivo de microalgas tiene una gran huella hídrica en términos de retorno de energía sobre el agua invertida (0,5-1,1 para sistemas cerrados y 0,05-1,0 MJ.L<sup>-1</sup> para estanques abiertos) (Bhatnagar, Chinnasamy et al. 2011). Además, los fertilizantes inorgánicos representan casi el 50% del aporte de energía fósil requerido para el cultivo de microalgas (Chisti 2007) y alrededor del 10-20% del costo de producción de la biomasa de microalgas (Bhatnagar, Chinnasamy et al. 2011).

Por lo tanto, los tratamientos de aguas residuales a base de microalgas que utilizan combinaciones de diferentes efluentes podrían resolver no solo el tratamiento adecuado de las aguas residuales y la descarga segura al medio ambiente, sino también las demandas de agua dulce y fertilizantes del cultivo de microalgas. Esto puede significar, a su vez, reducir la huella hídrica y los altos costos que tiene actualmente la producción de biomasa microalgal (Bhatnagar, Chinnasamy et al. 2011).

En este estudio se reporta el cultivo exitoso de microalgas en dos efluentes agroindustriales, sin el agregado de agua dulce, y se informa, en este capítulo, la selección de una especie, *Scenedesmus dimorphus*, en una mezcla de estos dos efluentes, 50% Purín Vacuno y 50% Suero Ácido de Queso, como las condiciones óptimas a ser escaladas en un estudio posterior al exterior y en modo semicontinuo.

### 3.4.5 Remoción de nutrientes

En este estudio, la eliminación de fósforo (P-PO<sub>4</sub>) en todos los cultivos alcanzó valores superiores al 99%. No se espera que la reducción de fósforo pueda asociarse con la precipitación, ya que el pH nunca estuvo por encima de 8. Por la misma razón, tampoco es probable que haya ocurrido la remoción del nitrógeno amoniacal por *stripping*.

La eficiencia de remoción de fósforo (P-PO<sub>4</sub>) observada en este estudio es comparable a la obtenida por Hena, Fatimah et al. (2015) después de 5 días de cultivo con un consorcio de microalgas, que fue de 98,8%. Sin embargo, dicho estudio, a diferencia del aquí presentado, utilizó aguas residuales previamente tratadas de una granja lechera como fuente de nutrientes. Kothari, Pathak et al. (2012) utilizaron un medio de cultivo con 75% de aguas residuales provenientes de la industria láctea y observó una reducción del 87,1% de P-PO<sub>4</sub>. La especie de microalgas utilizada para ese experimento fue *Chlorella pyrenoidosa* y el experimento duró 10 días. El cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en el mismo efluente durante 5 días, más comparable con los estudios descritos en este capítulo, logró solo un 57,6% de la eliminación de P-PO<sub>4</sub>. En el Ensayo 2 de esta tesis, *Chlorella pyrenoidosa* también logró una eliminación del 99% de P-PO<sub>4</sub>.

La eliminación de N-NO<sub>3</sub> del 10% observada en el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en mezclas de 25% PV-75% SAQ de este estudio, está por debajo de la tasa de remoción del 44,8% observada por Kothari, Pathak et al. (2012) en cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* en un medio de cultivo con 75% de aguas residuales de la industria láctea (25% agua del grifo) después de 5 días. Es posible que la mayor proporción de N:P en dicho estudio (N:P=4,84; calculada a partir de los datos informados en el artículo) propicie una mejor eficiencia de eliminación. De hecho, la proporción de nutrientes podría ser incluso mayor, ya que dicho estudio no informa el contenido de nitrógeno amoniacal. Otro aspecto importante a considerar es que el 25% restante del volumen de cultivo en ese estudio fue agua del grifo, un líquido transparente muy diferente del 25% de Purín Vacuno de color marrón oscuro utilizado en el Estudio 2 que se informa aquí. Es posible que la mayor disponibilidad de luz influya en un mejor crecimiento de la microalga y, por lo tanto, en una mayor eliminación de nutrientes. Esto es consistente con un rendimiento mayor de biomasa (6,8 g.L<sup>-1</sup>) obtenido por Kothari, Pathak et al. (2012) después de 5 días de cultivo,

que es cuatro veces mayor que  $1,67 \text{ g.L}^{-1}$  observado en el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en una mezcla de 25% PV-75% SAQ después de 6 días.

Sin embargo, el cultivo de *Scenedesmus dimorphus* en 50% PV-50% SAQ logró una remoción del 96% N-NO<sub>3</sub>, que es tres veces mayor que la eliminación del 25% N-NO<sub>3</sub> reportada por Prajapati, Choudhary et al. (2014) en cultivos de *Chroococcus* sp. en aguas residuales de limpieza y purines de ganado, después de 4 días. Una vez más, la disponibilidad de luz puede explicar esta diferencia, considerando que el efluente de purín de ganado es mucho más oscuro que la fuente de nutrientes utilizada aquí (50% PV-50% SAQ), que se diluye al 50% con el Suero Ácido de Queso, más transparente.

La remoción más alta de N-NH<sub>4</sub> también se observó en cultivos de *Scenedesmus dimorphus* cultivados en 50% PV-50% SAQ y aunque esta tasa de remoción es 10-30% inferior a las tasas de eliminación de nutrientes informadas por otros estudios que utilizan aguas residuales de granjas lecheras como fuentes de nutrientes (Tabla 15), las diferencias entre las condiciones o las microalgas utilizadas en esos estudios hacen que sea muy difícil compararlos y evaluar las posibles causas. Además, se informa de manera recurrente que la composición de los efluentes lácteos tiene una enorme variabilidad entre las diferentes fuentes.

Por lo tanto, realizar estudios de selección del tipo *screening* para evaluar las características de crecimiento de las microalgas en condiciones conocidas y controladas en el laboratorio y luego extrapolar los resultados a cultivos progresivamente más grandes y al exterior, se convierte en el enfoque más eficiente para el estudio del cultivo masivo de microalgas, como ya lo anticipara Burlew (1953), especialmente cuando las fuentes de nutrientes son las aguas residuales.

### **3.5 Conclusiones**

El tratamiento de efluentes agroindustriales a base de microalgas podría potencialmente lograr más eficiencia que los procesos convencionales y, también, reducir el costo de la gestión de efluentes. El cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales en la industria láctea puede evitar la descarga directa al medio ambiente de los efluentes, especialmente en las industrias lácteas pequeñas y medianas, donde no se encuentran implementados tratamientos convencionales, o de ningún tipo, de aguas residuales.

El uso de efluentes como fuentes de nutrientes para el cultivo de microalgas podría reducir potencialmente la huella hídrica y energética del proceso y, además, reducir el costo de la producción de biomasa.

Desde diferentes perspectivas, la combinación del cultivo de microalgas con el tratamiento de aguas residuales tiene ventajas. Sin embargo, cada tipo de efluente dentro de la industria láctea presenta diversos inconvenientes o dificultades que obstaculizan su tratamiento y que deben abordarse para lograr el éxito en cultivos masivos de microalgas.

Los resultados reportados en este capítulo 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. *Scenedesmus 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.

Sin embargo, las microalgas fotoautotróficas, como las que se utilizan en este estudio, pueden no consumir todas las fuentes de carbono orgánico presentes en las aguas residuales. Los requisitos legales en todo el mundo prohíben la descarga de cualquier corriente líquida que exceda cierta cantidad de fuentes de carbono orgánico, generalmente expresadas como DQO (Demanda Química de Oxígeno) al medio ambiente. Estudios sobre la combinación de microalgas con bacterias, microorganismos que naturalmente reducen la DQO, son necesarios para resolver este problema y completar el estudio. El siguiente capítulo ofrece un aporte en este sentido al desarrollar cultivos de microalgas consociadas con una bacteria heterotrófica conocida como promotora del crecimiento en plantas e incipientemente probada en combinación con microalgas.

## 4 CO-CULTIVO DE MICROALGAS Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO

### 4.1 Introducción

Las bacterias y las microalgas coexisten en los ecosistemas acuáticos y ha sido estudiado que en muchos casos esa coexistencia es sinérgica, aportándose metabolitos que favorecen el desarrollo mutuo (Croft, Warren et al. 2006, Unnithan, Unc et al. 2014, Ramanan, Kim et al. 2016). Por ejemplo, en las aguas residuales, las bacterias heterotróficas consumen el carbono orgánico del medio y como producto de su metabolismo, liberan CO<sub>2</sub>, que es a su vez consumido por las microalgas fotoautotróficas como fuente de carbono inorgánico (Olguín 2012). En particular, un grupo conocido como bacterias promotoras del crecimiento de plantas, entre ellas, los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, han sido halladas acompañando a las algas verdes de agua dulce (Chlorophyta) y se ha probado su efecto promotor en el crecimiento de las mismas (Kim, Ramanan et al. 2014). Particularmente, *Azospirillum brasilense* ha sido estudiada en co-cultivo con *Chlorella* sp. y ha sido propuesta como una bacteria promotora del crecimiento algal (Gonzalez and Bashan 2000). Estos estudios han sido hechos co-inmovilizando ambos microorganismos en una matriz de alginato. Estas pequeñas esferas de alginato conteniendo ambos microorganismos son puestas en contacto con el medio de cultivo y luego, el efecto promotor es medido dentro de cada esfera de alginato. Este sistema asegura una cercanía de ambos microorganismos, que se informa como necesaria para que la promoción exista, o al menos es lo que sucede cuando *Azospirillum brasilense* se utiliza como promotora del crecimiento de plantas y se inocula en las raíces de las mismas, formando unos nódulos como los que se muestran en la Figura 11.



Figura 11. Nódulos radicales en leguminosas (tomado de los apuntes de Bioquímica Aplicada, curso tomado por la autora, FAUBA, 2014)

De todos modos, en la bibliografía también se reportan interacciones microalgas-bacterias que se establecen en los ambientes libres, y las mismas se constituyen en la zona denominada ficosfera, un área estrecha que rodea a la célula microalgal (Kim, Ramanan et al. 2014, Ramanan, Kang et al. 2015), con lo cual es esperable que los microorganismos tengan bien desarrollada su propia capacidad de establecer cercanía para propiciar el mutualismo.

Cuando el objetivo de aplicación es el tratamiento de efluentes, minimizar los costos y aditivos es una premisa fundamental para que el mismo sea sostenible, sobre todo en las pequeñas y medianas empresas a las cuales está principalmente destinada la tecnología desarrollada en este estudio.

Si bien este es un campo de estudio relativamente nuevo, también se reconoce y reporta que los consorcios de microalgas-bacterias diseñados deliberadamente obtienen, en algunos casos, mejores resultados que los que se dan en los ambientes naturales (Cho 2015).

*Azospirillum* sp. es una de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas más estudiada y no es específica de ninguna planta en particular. Su efecto promotor se encontró relacionado a la liberación de fitohormonas y la influencia sobre el metabolismo microalgal (de-Bashan, Bashan et al. 2002) afectando al proceso de fotosíntesis (Perez-Garcia, De-Bashan et al. 2010). Además de su efecto promotor en el crecimiento de la población de microalgas, al ser una bacteria heterotrófica, es esperable que el contenido de carbono orgánico del medio sea reducido por acción de la bacteria, así como es esperable que el contenido de los nutrientes nitrógeno y fósforo sean mayormente removidos por acción del metabolismo de las microalgas. En conjunto, es esperable un efecto sinérgico que reduzca las concentraciones de especies de Nitrógeno (N-NO<sub>3</sub> y N-NH<sub>4</sub>) y Fósforo (P-PO<sub>4</sub>) así como las Demandas Química y Bioquímica de Oxígeno (DQO/DBO<sub>5</sub>) del efluente usado como medio de cultivo.

En los experimentos descritos en el Capítulo anterior *Scenedesmus dimorphus*, demostró una capacidad superior a *Chlorella pyrenoidosa* en la remoción de nutrientes y en la productividad en biomasa en concentraciones de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso y por ello fue elegida para el siguiente ensayo. El objetivo de esta etapa del estudio fue determinar el efecto de la asociación deliberada de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en consorcio con la bacteria

*Azospirillum brasilense*, respecto del crecimiento de la microalga sola y también la depuración del medio de cultivo por parte del consorcio, en comparación con el cultivo de la microalga sola.

## 4.2 Materiales y métodos

En función de los resultados obtenidos en el experimento anterior, *Scenedesmus dimorphus* fue cultivada en el medio seleccionado de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, en dos condiciones: sola y con la bacteria *Azospirillum brasilense*.

Además, dos cultivos fueron desarrollados en simultáneo en idénticas condiciones como Control: *Azospirillum brasilense* cultivada sola en el medio seleccionado de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso y *Azospirillum brasilense* cultivada con *Chlorella pyrenoidosa* en el mismo medio. Un tercer cultivo control fue añadido, es decir, *Chlorella pyrenoidosa* cultivada sola, también en 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, de modo de contrastar los resultados obtenidos al cultivar *Chlorella pyrenoidosa* con *Azospirillum brasilense* (como se indicó en la Introducción de este Capítulo, la especie *Chlorella* sp. es la única con la que, hasta el momento, esta bacteria ha sido probada, dando resultados exitosos de crecimiento). Este último sería un “Control del Control”.

### 4.2.1 Microorganismos

Las microalgas utilizadas en este estudio fueron *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa*. La bacteria utilizada para ser co-cultivada junto con cada una de las microalgas mencionadas, fue *Azospirillum brasilense* FT326. La procedencia y mantenimiento de las cepas se realizó como se describe en la Sección 2.1. El escalado del inóculo bacteriano de laboratorio hasta llegar a los volúmenes y densidades necesarios para la inoculación de los cultivos de microalgas, se realizó de la forma descrita en la Sección 2.1.2.

Los cultivos fueron inoculados de modo que las densidades celulares de inicio fueran  $7 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para las microalgas y de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para la bacteria (en el orden de lo sugerido por Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010) para el co-cultivo con microalgas), en los volúmenes de todos los cultivos.

Los inóculos de los que se partió fueron, *Azospirillum brasilense*  $2,3 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Scenedesmus dimorphus*  $8,4 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> y *Chlorella pyrenoidosa*  $7,3 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Como se detalla en la Sección 2.1.2, volúmenes apropiados de cada cultivo fueron centrifugados, enjuagados con agua destilada o solución fisiológica, centrifugados nuevamente y resuspendidos en el medio en el que iban a ser inoculados, es decir, 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso.

#### 4.2.2 Medio de cultivo

En función de los resultados obtenidos en la etapa anterior, el medio de cultivo utilizado fue la mezcla de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, sin esterilizar ni diluir.

#### 4.2.3 Sistema de cultivo (fotorreactores)

Los fotorreactores utilizados fueron frascos de vidrio transparente (0,3 mm de espesor de pared de vidrio) de 1 L de capacidad abiertos en la parte superior. El cultivo tenía una profundidad de 15 cm, dado que esta profundidad sería replicada en el escalado posterior (Capítulo 5). Los frascos fueron lavados como se describe en la Sección 2.3, la esterilización de cada frasco se realizó para que todos estuvieran en iguales condiciones al momento de realizar la inoculación; la esterilidad no es un requisito en los experimentos descritos aquí, por el mismo motivo, los frascos estuvieron abiertos por su parte superior.

La agitación de cada fotorreactor de 1 L se realizó mecánicamente por acción de la corriente de aire generada por un motor de acuario de 3 W. Una manguera de PVC color neutro transparente (manguera cristal) de 500 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 6 mm de diámetro externo, conectaba la boquilla del aireador con una piedra difusora de 40 mm de largo y 10 mm de diámetro, idéntica en todos los cultivos. Un caño rígido plástico de 130 mm de longitud, 8 mm de diámetro interno y 8,5 mm de diámetro externo servía para que la manguera cristal que unía la piedra difusora con el aireador se mantuviera estirada. A 50 mm de la boquilla del aireador se colocaba en la manguera cristal una válvula plástica de regulación de flujo de aire, idéntica en todos los cultivos.

Cada cultivo tenía un motor de acuario de la misma potencia que generaba la misma mezcla. Esta mezcla fue corroborada tomando el tiempo en que una gota de azul de metileno se diluía completamente en 800 mL de agua de grifo en cada botella. Luego se comparaban los tiempos de cada fotorreactor, de ser necesario, se ajustaba el ingreso de aire con cada válvula y se repetía la medición.

El fotoperíodo se estableció en 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La intensidad de la luz fue de  $120 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medida en la superficie externa superior de los fotorreactores de 1 L utilizando una sonda LP 471 PAR (400-700nm) y un radiómetro HD 2302.0 (Delta OHM). La iluminación fue provista desde arriba con un arreglo de 12 lámparas de luz blanca fría OSRAM DULUX Value Twist 20W/865LUMILUX, distribuidas en un bastidor de madera apoyado sobre 4 patas de madera, la altura de las patas y el tamaño del bastidor eran regulables (Figura 12).



**Figura 12. Vista superior del bastidor de luces**

La distancia entre las luces y la parte superior de los cultivos era de 30 cm. Los cultivos se realizaron por triplicado, en modo batch, por 6 días según lo sugerido por Chen, Li et al. (2012). La Figura 13 ilustra el arreglo final del experimento.



**Figura 13. Imágenes del arreglo de fotorreactores utilizados en el experimento de co-cultivo de *Scenedesmus dimorphus* y *Azospirillum brasilense***

#### 4.2.4 Muestreo y determinaciones analíticas

La determinación de los parámetros de crecimiento (densidad celular, peso seco y peso seco libre de cenizas así como rendimiento o concentración en biomasa, productividad y tasa específica de crecimiento de cada cultivo) y la medición de pH, fueron determinadas como se describe en el Capítulo 2.

El análisis de los efluentes para la determinación de la remoción de nutrientes y depuración del mismo, se realizó al inicio y al final del experimento, siguiendo los métodos descritos en la Sección 2.4.6.

La determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC.mL<sup>-1</sup>) de *Azospirillum brasilense* tanto en el inóculo inicial como en los cultivos, se realizó por medio de la siembra en placas de Rojo Congo, un medio específico para la identificación y aislamiento de *Azospirillum brasilense* (Rodríguez Cáceres 1982), como se describió en la Sección 2.4.4. Para descartar la presencia de estas bacterias en la mezcla de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, la misma fue sembrada y evaluada en placas de Rojo Congo antes de ser inoculada con cualquiera de los microorganismos utilizados.

Para el análisis de los resultados, nuevamente se utilizó la versión de prueba del software MINITAB® 17. Las diferencias entre los distintos replicados y condiciones se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó el test de comparaciones múltiples de Duncan a un nivel de confianza de P = 0,05.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Crecimiento y productividad microalgal

Este experimento tuvo como objetivo evaluar el desempeño de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense*, en comparación con el desempeño de la misma microalga sola. La microalga *Chlorella pyrenoidosa*, en este caso, fue cultivada sola y en consorcio con dicha bacteria como cultivos control. A su vez, la bacteria *Azospirillum brasilense* se cultivó sola, también como control, para evaluar su desempeño en la depuración del efluente por separado de las microalgas.

En resumen, 5 condiciones fueron simultáneamente evaluadas, a saber:

- *Scenedesmus dimorphus* + *Azospirillum brasilense*,
- *Scenedesmus dimorphus*,

- *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense* (control),
- *Chlorella pyrenoidosa* (control),
- *Azospirillum brasilense* (control),

todas ellas desarrolladas en el mismo medio de cultivo, es decir, mezcla de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, y con tres fotorreactores por cada una de las condiciones en estudio (triplicado).

Es importante destacar, que este experimento fue iniciado dos veces, la segunda vez fue llevado exitosamente hasta su finalización y se reporta en este Capítulo. En la primera oportunidad, y si bien el cultivo se desarrolló en laboratorio, el arreglo de la largada del experimento terminó de noche, y por ende las luces quedaron apagadas (ciclo 12:12). Al día siguiente los cultivos de *Scenedesmus* sp. estaban marrones en un proceso de evidente senescencia. Este dato se retomará al momento de la discusión.

En la segunda oportunidad que se realizó este experimento, el inicio se realizó alrededor de las diez de la mañana (las luces se encendían de 8h a 20h). Durante el segundo y tercer día del período de cultivo, se observaron al microscopio muchos microorganismos ciliados, transparentes y móviles, desplazándose alrededor de las células de *Scenedesmus* sp., en el cultivo en el que estaba sola, y en el cultivo que estaba consociada con *A. brasilense*, se observó una gran cantidad de agrupaciones de células (flocs), que requerían homogeneizar nuevamente las muestras para realizar el conteo. Al cuarto día de cultivo, si bien no se midió el volumen de las células, las células de *Scenedesmus* sp. en el cultivo en consorcio con *A. brasilense* eran distinguiblemente más grandes, bajo el microscopio, que las células del cultivo microalgal solo (Figura 14 y Figura 15) y al sexto día de cultivo, los tres replicados de este cultivo estaban amarronados.

Esto no ocurrió con las células de *Chlorella* sp. en ninguno de los cultivos.

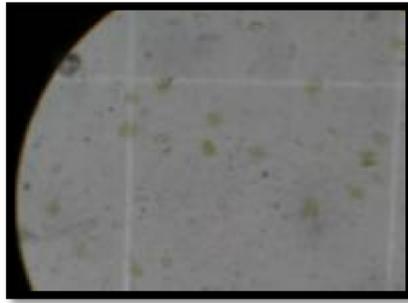


Figura 14. Células de *Scenedesmus dimorphus* cultivada sola, en 50%PV-50%SAQ

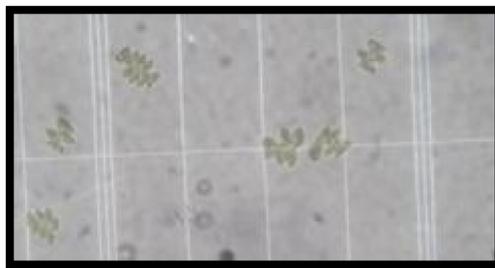


Figura 15. Células de *Scenedesmus dimorphus* al cuarto día de co-cultivo con *A. brasilense*, en 50%PV-50%SAQ

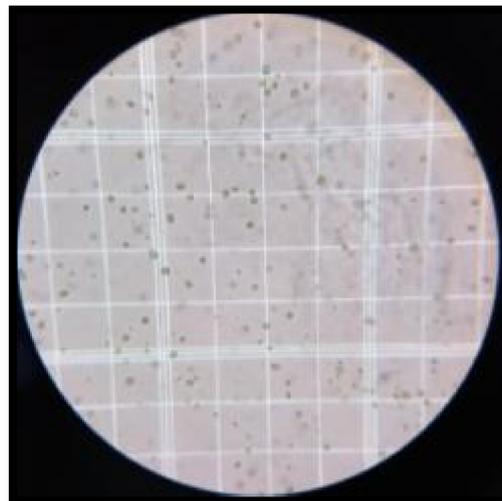


Figura 16. Células de *Chlorella pyrenoidosa*, al cuarto día del experimento en co-cultivo con *A. brasilense*, en 50%PV-50%SAQ

En esta oportunidad no se hizo ninguna corrección del pH en los cultivos, y los mismos estuvieron alrededor de  $7\pm 0,7$  a lo largo de todo el experimento.

No se observaron células microalgales en los cultivos que fueron inoculados solamente con *A. brasilense* en ningún momento del estudio.

Como se observa en la Figura 17, el crecimiento microalgal de los cultivos conteniendo *Chlorella* sp. tuvo mejor desempeño que los de *Scenedesmus* sp. a partir del tercer y cuarto día del ensayo. Independientemente de la densidad celular alcanzada, los cultivos de *Scenedesmus* sp., con y sin la bacteria, alcanzaron la fase estacionaria a partir del cuarto día de cultivo y comenzaron la senescencia entre el quinto y sexto día de cultivo. En cambio, los cultivos de *Chlorella* sp., con y sin la bacteria, aún continuaban creciendo al sexto día.

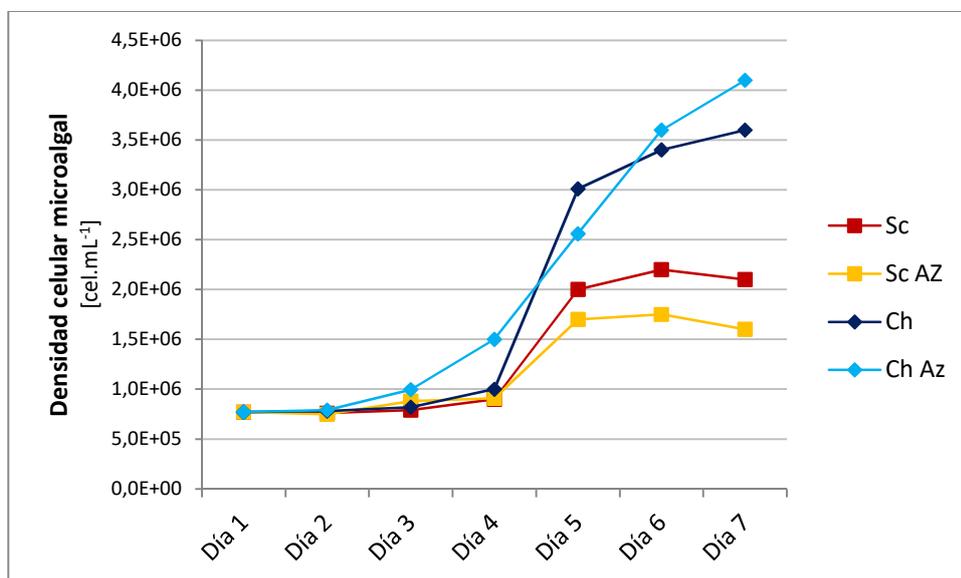


Figura 17. Densidad celular de los cultivos microalgales de *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* (Az)

Las productividades de ambos cultivos de *Scenedesmus* sp. también fueron inferiores a los de *Chlorella* sp. al tercer día y significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) al quinto día de cultivo (Figura 18). En el caso del consorcio *Scenedesmus dimorphus* + *Azospirillum brasilense*, la productividad obtenida en el día 3 del cultivo, no se corresponde con un aumento de la densidad celular de la microalga, sino, como se mencionó antes acerca de la observación al microscopio, de su tamaño.

En el mismo gráfico se evidencia que no hubo desarrollo de biomasa para el cultivo de *Azospirillum brasilense* en la mezcla de efluentes, ya que, como se indicará más adelante, no hubo crecimiento bacteriano en este medio.

Los valores representados en la Figura 18 se determinaron utilizando la Ecuación 5, y el muestreo fue realizado cada 48 h, por lo cual, cada punto representa la variación en biomasa en esas 48 h. Por lo mismo, los valores negativos implican que la biomasa obtenida en ese día por unidad de volumen fue inferior a la obtenida 48 h antes. Como se visualiza, hacia el final del experimento hubo un decremento en la producción de biomasa de todos los cultivos, a excepción del cultivo de *Chlorella sp.* y *A. brasilense* en consorcio que, si bien tuvo un aumento de biomasa significativamente menor que en el día 5, aún seguía creciendo.

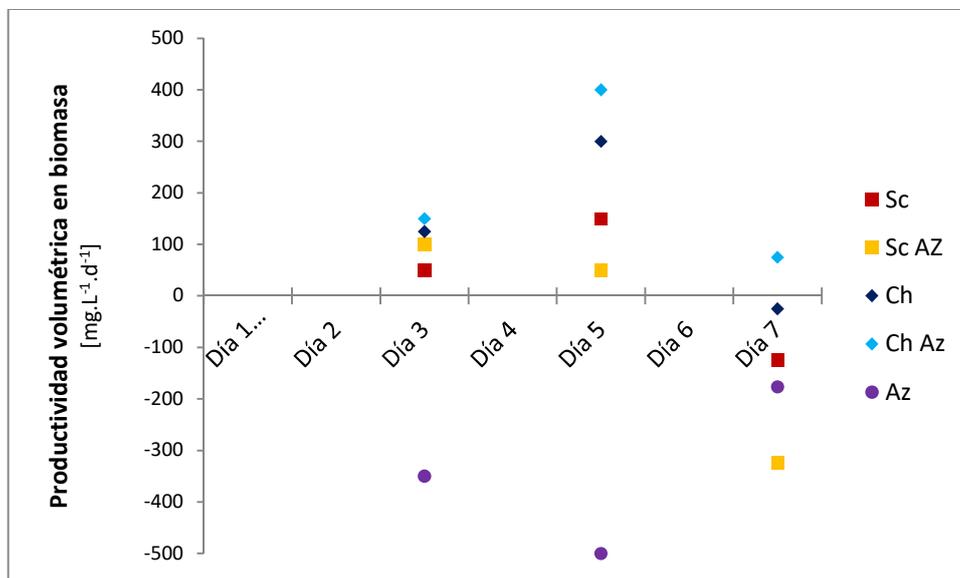


Figura 18. Productividad en biomasa [ $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ] de los cultivos microalgales de *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* (Az)

\*Se omiten las barras de error para mayor claridad del gráfico

#### 4.3.2 Capacidad de remoción de nutrientes

La mezcla 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, utilizada como medio de cultivo en este estudio, presentaba la composición que se detalla en la Tabla 17, al inicio del experimento.

Tabla 17. Contenido de nutrientes de los efluentes originales (Suero Ácido de Queso y Purín Vacuno) y del medio de cultivo con 50% de contenido de cada uno de ellos (v/v)

	SAQ	PV	Medio de cultivo 50% PV - 50% SAQ
	mg.L <sup>-1</sup>		
<b>P-PO<sub>4</sub></b>	264,3	357,1	310,7
<b>N-NO<sub>3</sub></b>	154,6	111,2	132,9
<b>N-NH<sub>4</sub></b>	47,6	539,6	293,6
<b>DBO<sub>5</sub></b>	285,0	341,0	626,0
<b>DQO</b>	100.558,2	6.936	53.747,1

PV: Purín Vacuno  
SAQ: Suero Ácido de Queso

En la Figura 19 se muestran, comparativamente, los contenidos de las especies de nitrógeno y fósforo medidas en el efluente (medio de cultivo) al inicio del estudio y al finalizar los 6 días de cultivo (día 7) en modo batch. El mejor desempeño respecto de la reducción de nutrientes lo alcanzó el cultivo del consorcio de *Chlorella pyrenoidosa* con *Azospirillum brasilense*, y la menor reducción ocurrió en el cultivo control de *A. brasilense* sola en la mezcla 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso.

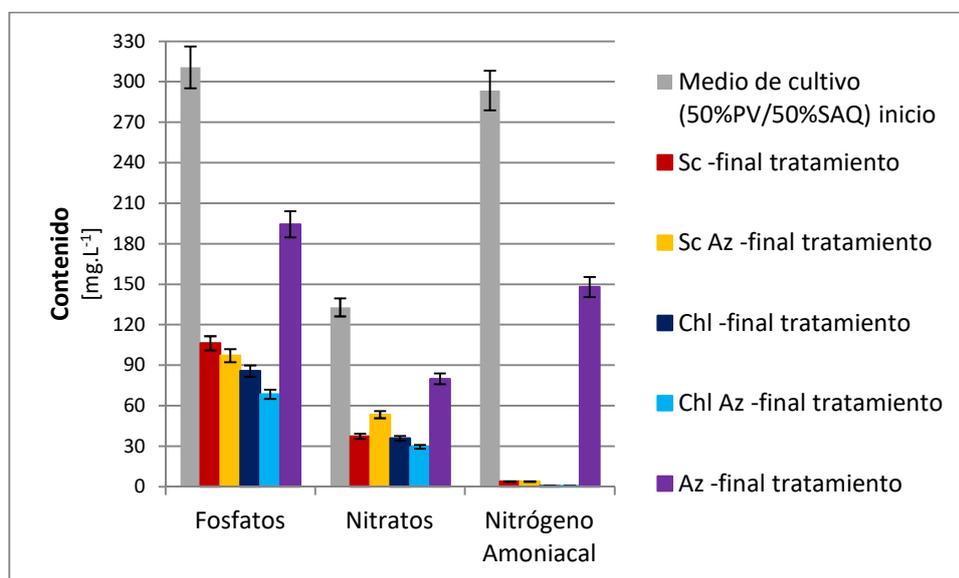


Figura 19. Contenido de nutrientes del medio de cultivo al inicio del experimento (barras en gris) y al final del mismo para *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (Az)

La menor demanda bioquímica de oxígeno al final del período de cultivo fue lograda por el cultivo control de *A. brasilense* sola (Figura 20) y la remoción de DBO<sub>5</sub> en los cultivos de microalgas (con o sin la bacteria) estuvo en promedio en un 46%±8%.

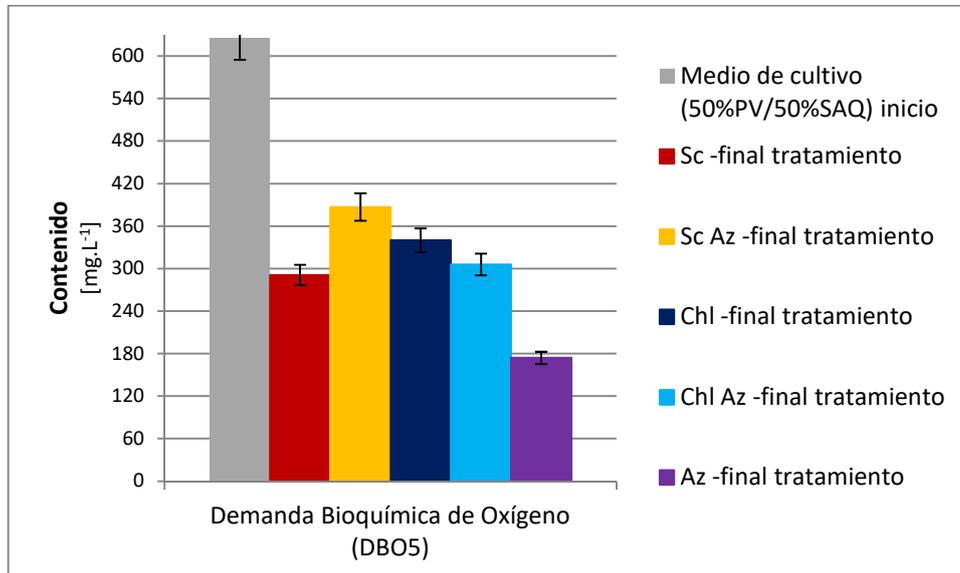
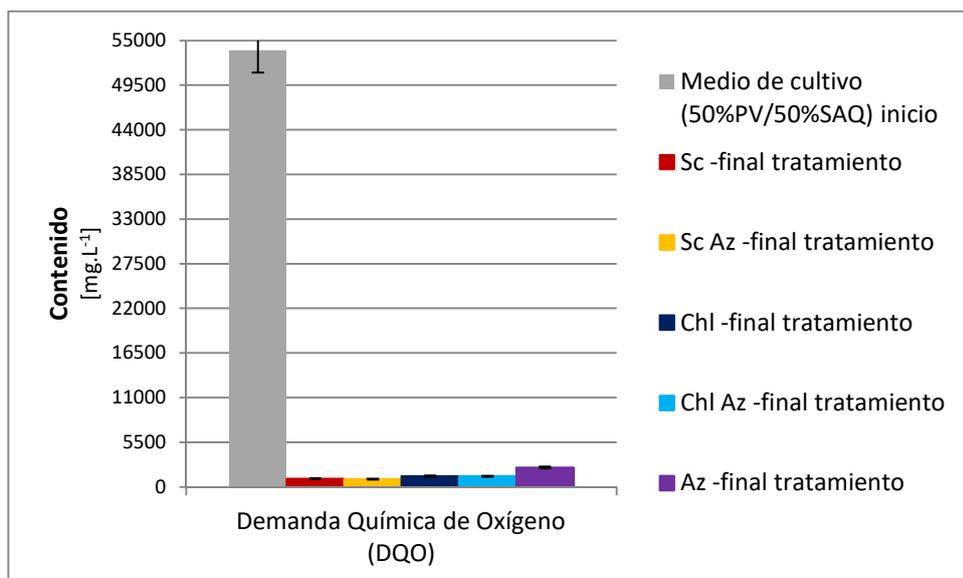


Figura 20. Demanda bioquímica de oxígeno del medio de cultivo al inicio del experimento (barra en gris) y al final del mismo para *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (Az)

Sin embargo, la reducción de DQO fue en todos los cultivos superior al 90% (Figura 21) y, aunque con poca diferencia, la menor remoción de DQO fue registrada en el cultivo donde se encontraba la bacteria sola.



**Figura 21.** Demanda química de oxígeno del medio de cultivo al inicio del experimento (barras en gris) y al final del mismo para *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (Az)

La Tabla 18 resume las remociones alcanzadas por cada cultivo de cada parámetro medido.

**Tabla 18.** Remoción de compuestos del medio de cultivo al final del experimento en los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (Az)

Medio de cultivo	Microorganismos	Remoción de				
		P-PO <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub>	DBO <sub>5</sub>	DQO
		%				
50% PV - 50% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	65,8	71,9	98,6 <sup>a</sup>	53,5	98,1 <sup>b</sup>
	<i>Scenedesmus dimorphus</i> + <i>A. brasilense</i>	68,7	59,8	98,7 <sup>a</sup>	38,2	98,2 <sup>b</sup>
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	72,4	72,9	99,8 <sup>a</sup>	45,7	97,5 <sup>c</sup>
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>A. brasilense</i>	77,9	77,7	99,8 <sup>a</sup>	51,1	97,6 <sup>c</sup>
	<i>Azospirillum brasilense</i>	37,4	39,8	49,6	72,2	95,6

PV: Purín Vacuno

SAQ: Suero Ácido de Queso

Diferencias significativas a menos que se indique lo contrario (ANOVA medidas repetidas p<0,05)

<sup>a</sup> No hay diferencia significativa entre las medias

<sup>b,c</sup> No hay diferencia significativa entre medias con igual letra

### 4.3.3 Composición bioquímica de la biomasa

Las biomásas de los cultivos, recuperadas al final de los experimentos, presentaban la composición de proteínas, carbohidratos y lípidos que se detalla en la Tabla 19.

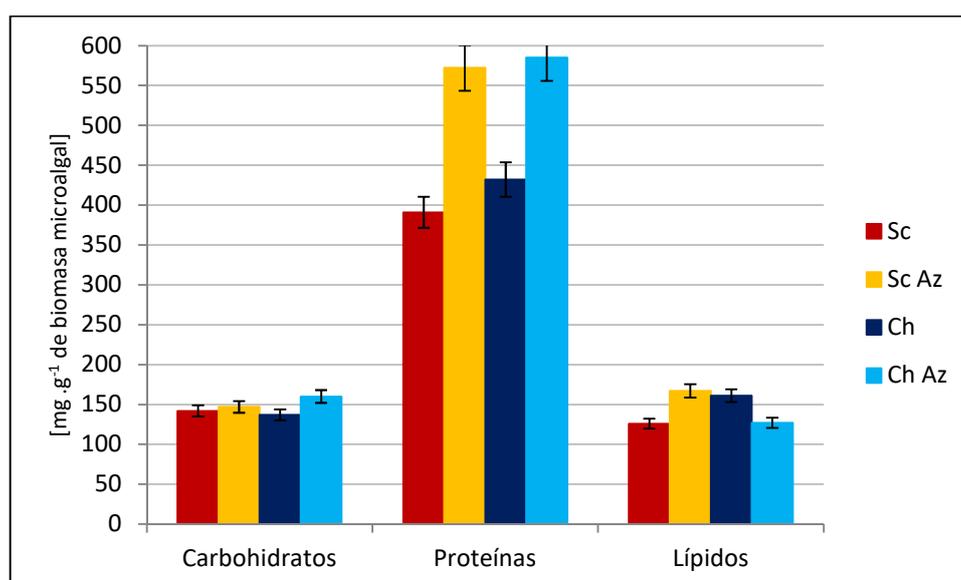
El contenido de proteínas del Suero Ácido de Queso utilizado en este estudio, ha sido proporcionalmente descontado de la producción expresada en la tabla.

La cantidad de lípidos contenidos en la biomasa de *Scenedesmus dimorphus* cultivada en consorcio con la bacteria, es significativamente superior a su composición cultivada sola. Lo opuesto sucede entre los cultivos de *Chlorella sp.* con y sin la bacteria.

**Tabla 19. Composición de las biomásas al final del período de cultivo (promedio±DS, n=3)**

Medio de cultivo	Microorganismos	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos
		[mg.g <sup>-1</sup> biomasa microalgal]		
50% PV - 50% SAQ	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	126±7	391±31	142±7
	<i>Scenedesmus dimorphus</i> + <i>A. brasilense</i>	167±9	572±26	147±8
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	161±12	432±22	137±7
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>A. brasilense</i>	127±8	585±22	160±11

En la Figura 22 se comparan gráficamente estas cantidades.

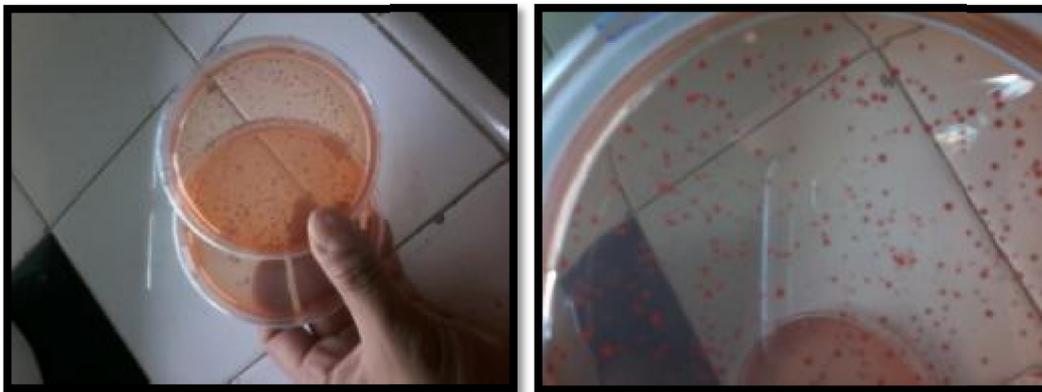


**Figura 22. Composición bioquímica de las biomásas microalgales de *Scenedesmus dimorphus* (Sc) y *Chlorella pyrenoidosa* (Ch) cultivadas solas y en consorcio con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* (Az)**

#### 4.3.4 Crecimiento bacteriano

Si bien hubo crecimiento de *Azospirillum brasilense* en las placas sembradas con muestras de la largada de los cultivos (sembradas en día 1 y observadas 48 h después), la siembra de las muestras de los cultivos en los que *A. brasilense* había sido inoculada, tomadas al final del experimento, no dieron crecimiento alguno.

La siembra en Rojo Congo facilita la determinación de *Azospirillum* sp., como ya lo describiera Rodríguez Cáceres (1982), ya que se forman colonias distinguibles de color escarlata (Figura 23).



**Figura 23.** Inóculo de *Azospirillum brasilense* sembrado en placas con Rojo Congo

Como se observa en la Figura 18, no hubo un aumento de la biomasa del cultivo donde la bacteria fue cultivada sola, de hecho, hubo un decremento que ocurrió desde el día 3.

Los efluentes fueron sembrados en este medio selectivo de *Azospirillum* sp. (Rodríguez Cáceres 1982) para ver si existía esta especie de bacteria en el efluente y las pruebas no dieron ningún crecimiento de la típica colonia redondeada color escarlata (Figura 24). Las placas que fueron sembradas al momento del inicio del experimento permitieron cotejar las densidades (en UFC.mL<sup>-1</sup>) inoculadas.

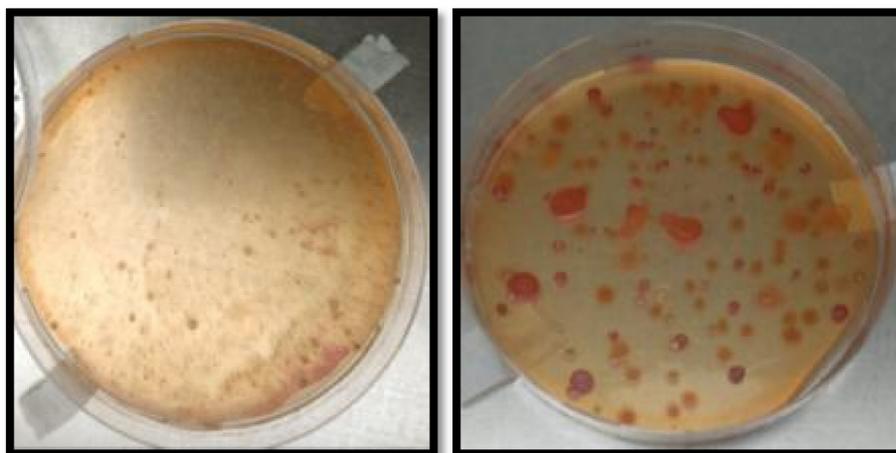


Figura 24. Crecimiento en placas con Rojo Congo a las 48 h de la mezcla 50%PV-50%SAQ crudos (izq) y luego de ser inoculado con *Azospirillum brasilense* (der)

#### 4.4 Discusión

La utilización de cultivos microalgales, para cualquier propósito, trae aparejada la necesidad, o al menos la conveniencia, de contar con cultivos densos, es decir, del mayor crecimiento microalgal posible.

En la aplicación de ficorremediación, es decir, cultivos de microalgas en aguas residuales, es esperable que un mayor crecimiento microalgal redunde en una mayor remoción de los nutrientes en dichos efluentes, ya que el desarrollo del cultivo ocurre a expensas del metabolismo de los compuestos presentes en dichas aguas residuales.

Una forma de incrementar la densidad poblacional de las microalgas en los cultivos puede ser inocularlas con otros microorganismos, una estrategia que es ampliamente conocida en agricultura (Gonzalez and Bashan 2000). Como ya se indicó en la Sección 1.4, hay numerosos reportes de la interacción sinérgica entre microalgas y bacterias, y específicamente, con la bacteria *Azospirillum brasilense*, incipientemente utilizada como promotora del crecimiento microalgal.

Sin embargo, en la bibliografía, esta bacteria solamente fue probada con la especie microalgal *Chlorella* sp., y, en dichas pruebas, fue co-inmovilizada en microcápsulas de alginato.

Dado que el tratamiento de efluentes no es una actividad productiva por sí misma y frecuentemente es llevada a cabo por personal no especializado, es preciso que las tecnologías utilizadas tengan bajos costos y alta simplicidad, sobre todo cuando la aplicación esté siendo pensada para pequeñas y medianas empresas. Por ello, la co-

inmovilización aparece como una tecnología inviable y es preciso probar la utilidad de los consorcios de la forma más sencilla posible.

Si bien, como ya se indicó, en los ambientes libres existe un área estrecha que rodea a la célula microalgal denominada ficoesfera, en la cual los microorganismos interactúan, un reporte más actual relacionado al estudio de la bacteria *Azospirillum brasilense*, refiere y comprueba, en términos generales, la inducción remota (sin contacto físico, sin co-inmovilización) del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* y *Bacillus pumilis* (Amavizca, Bashan et al. 2017).

Aunque ninguna de las muestras sembradas al final del período de cultivo (día 7) dio positivo a la presencia de *A. brasilense*, las diferencias significativas que los cultivos con y sin la bacteria mostraron, en términos de crecimiento hacia el final del período de cultivo así como en la productividad de biomasa y en la remoción de compuestos y composición de la biomasa permiten coincidir con Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010), quienes cultivaron *Azospirillum brasilense* en un efluente sintético y en diferentes condiciones (heterotrófica, mixotrófica y autotrófica), con la microalga *Chlorella* sp., y reportaron que no hubo aumento de la densidad poblacional de la bacteria y que al tercer día, comenzó la senescencia de la misma. Sin embargo, en el mismo estudio y dependiendo de las condiciones (mixotrófica o autotrófica), los efectos de promoción de la bacteria en el crecimiento de la microalga se evidenciaron a partir del tercer día de cultivo. Por otro lado, y muy relevante, es la situación del no crecimiento de *A. brasilense* cuando fue cultivada sola. Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010) también reportaron que no se detectaba crecimiento de la bacteria (aumento de la población de *A. brasilense* Cd) y la población declinaba a partir del segundo día de cultivo. Esta declinación ya había sido indirectamente reportada por de-Bashan, Bashan et al. (2002), quienes tampoco notaron incremento en la población de *A. brasilense*, cuando fue cultivada en efluente sintético co-inmovilizada con tres cepas de *Chlorella* sp., que se mantuvo entre  $1,1-2,3 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, aun cuando el inóculo inicial contenía cuatro órdenes más de bacterias (aproximadamente  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, según reportan), lo que evidencia además que la población bacteriana estaba en fase de senescencia hacia el final del período de 6 días de cultivo. Esto coincide con el mecanismo propuesto de acción de *Azospirillum brasilense* sobre *Chlorella pyrenoidosa* (De-Bashan, Antoun et al. 2008, Meza, de-

Bashan et al. 2015) acerca de que es la presencia de una fitohormona, el ácido indolacético (IAA por sus siglas en inglés), independientemente de la población bacteriana presente, lo que afecta la actividad fotosintética de la microalga, lo que influye en sus procesos metabólicos y se evidencia en mayor capacidad de consumo de nutrientes y mayor crecimiento.

En el estudio descrito en este Capítulo no se evidenció un mayor crecimiento de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* en consorcio con *A. brasilense*, 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% PV – 50% SAQ, que había tenido el desempeño óptimo en el estudio descrito en el capítulo 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 consociada con *A. brasilense* (Tabla 18).

Es importante destacar que la medición de DBO<sub>5</sub> en muestras con producción de oxígeno, como es el caso de muestras de cultivos de microalgas, donde generalmente la cantidad de oxígeno disuelto es superior a la saturación, en la práctica, suele estar reportada como poco confiable, por parte de los profesionales con experiencia en tratamiento de efluentes, y en general, la medición de DQO es más utilizada. En este estudio, la remoción de DQO por parte de los cultivos microalgales fue superior al 97%, siendo incluso superior al 95% de remoción para los ensayos donde se encontraba la bacteria sola. En este caso es preciso recordar que los efluentes usados ya contienen una comunidad bacteriana heterotrófica y es indiscutible que la misma ha contribuido significativamente a la reducción de los compuestos orgánicos de carbono que son una fracción de la DBO<sub>5</sub> o DQO medidas.

Al respecto del desempeño de *Scenedesmus dimorphus* en el estudio descrito en este capítulo y como se mencionó antes, en el primer intento de realizar este experimento, los cultivos aparecieron marrones, en un proceso de evidente senescencia y con un pH por debajo de la neutralidad en cada caso. Tao, Kinnunen et al. (2017) reportaron que mientras *Chlorella vulgaris* creció desde el inicio sin inconvenientes en el medio de cultivo elegido el estudio, cuyo pH luego de la preparación es de 6,5, *Scenedesmus acuminatus* no creció a dicho pH de 6,5 y siguiendo las observaciones de Xu, Shen et al. (2015), recomiendan agregar hidróxido de sodio hasta lograr un pH de 8 para dar inicio al cultivo de *Scenedesmus acuminatus*. Difusa, Talukdar et al. (2015) evaluaron, entre otros, el crecimiento de dos especies de *Scenedesmus* (ADIITEC-II y GUBIOTJT116) en un rango de pH de 5 a 9, encontrando que no hubo crecimiento alguno sino una ligera declinación del mismo en el período de 10 días cuando los medios de cultivo se ajustaban a pHs de 5 y 6 en el inicio.

Nalewajko, Colman et al. (1997) y Ahmad Latiffi, Radin Mohamed et al. (2017) también reportan menor tolerancia a pHs por debajo de 7,5 para varias especies de *Scenedesmus* sp. Si bien en los ensayos que se presentan aquí el pH fue seguido a lo largo del estudio, la sonda con la que se realizaron las mediciones no es una sonda que permita la medición continua, por lo cual, y según lo evaluado en el capítulo anterior, Sección 3.4.2, es probable que durante la noche el pH haya descendido por debajo de los valores óptimos de crecimiento de *Scenedesmus dimorphus*, y aunque el mismo se elevaba hasta valores de pH cercanos a 8 (pH  $7\pm 0,7$ ), la capacidad de adaptación y recuperación de esta especie parece ser menor, ante un pH fluctuante, que la de la especie *Chlorella* sp.

En este estudio, el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* consociada con la bacteria *Azospirillum brasilense*, en comparación con la microalga cultivada sola no mostró una diferencia tan significativa como la informada por Gonzalez and Bashan (2000), en dicho estudio, el crecimiento de la microalga consociada fue casi 4 veces superior a la microalga sola. Cabe de todos modos señalar que dicho experimento no solamente fue hecho con medio sintético y estéril, sino que los microorganismos fueron co-inmovilizados juntos. Es posible que, como indica dicho estudio, para un mutualismo óptimo sea necesaria la proximidad máxima que se genera en las microcápsulas de alginato. La máxima densidad celular al cabo de 6 días en dicho estudio fue entre  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  [cél *Chlorella*.microcápsula alginato<sup>-1</sup>] para la

microalga cultivada en consorcio con la bacteria (en cada microcápsula de alginato). En el estudio descrito aquí, la densidad celular de *Chlorella pyrenoidosa* fue  $4,10 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> cuando se cultivó en conjunto con *A. brasilense*, en donde los microorganismos no estaban co-inmovilizados, sino libres en una mezcla de efluentes sin diluir ni esterilizar. Si bien los volúmenes son incomparables, dado que Gonzalez and Bashan (2000) no informan el volumen de las esferas de alginato, la autora de este trabajo entiende que los obtenidos aquí, en una comparación cualitativa de resultados, complejidad y costos, son excelentes resultados.

La remoción de nitrógeno amoniacal fue superior al 98% para *S. dimorphus* como *C. pyrenoidosa* cultivadas solas o con *A. brasilense*, sin diferencias significativas entre los cultivos. En todas las otras especies químicas de nitrógeno y fósforo o mediciones de DQO, las diferencias fueron significativas, siendo el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* + *A. brasilense* el que mostró el mejor desempeño, respecto de la misma microalga cultivada sola y respecto de la mayoría de los otros cultivos, con la excepción de la remoción de DBO<sub>5</sub> y DQO por parte de *Scenedesmus dimorphus* cultivada sola (Tabla 18).

Algo destacable y sorprendente, aun así, coherente con los resultados de crecimiento obtenidos, es que el desempeño de *Scenedesmus dimorphus* sola fue prácticamente igual (NH<sub>4</sub> y DQO) o ligeramente inferior (PO<sub>4</sub>) y significativamente superior (NO<sub>3</sub> y DBO<sub>5</sub>) que el desempeño de la microalga consociada con la bacteria *A. brasilense*. Lo que refuerza aún más la idea que *A. brasilense* no es una bacteria promotora de crecimiento de todas las especies de microalgas como se ha propuesto por (Gonzalez and Bashan 2000) y que es preciso desarrollar los experimentos preliminares que respalden el uso de consorcios diseñados.

Por otro lado, el desempeño de los consorcios presentados en este estudio fue de todos modos ampliamente superior a los reportados por las publicaciones en las que se realizó el cultivo de microalgas con *A. brasilense*. Cabe destacar que, en dichos estudios, el efluente no solamente era artificial (sintético) y estaba esterilizado, sino que además el contenido de nutrientes era muy inferior a lo que se encuentra en los efluentes reales, con lo cual, la utilidad de dichos resultados es preciso ser tomada con cautela.

de-Bashan, Moreno et al. (2002) reportaron una disminución de Nitrógeno amoniacal del 99% para el cultivo de *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* y de 86% cuando la

microalga fue cultivada sola, en un efluente artificial de origen sintético con un contenido inicial de  $3\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4$ . El contenido inicial del efluente usado aquí (mezcla de 50% Purín Vacuno y 50% Suero Ácido de Queso, ambos sin esterilizar ni diluir) fue casi 98 veces superior al del estudio mencionado, con una concentración de  $293,6\text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4$ , y las remociones obtenidas fueron superiores al 99% (Tabla 18). Del mismo modo, en el estudio de de-Bashan, Moreno et al. (2002) se menciona que concentraciones de fosfatos de  $12\text{ mg.L}^{-1}$  fueron removidas en un 75% por el consorcio, en comparación con una remoción del 77,9% alcanzado en este estudio, en este último caso, partiendo de una concentración inicial de  $310\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{P-PO}_4$ .

El crecimiento de microalgas y sus capacidades depuradoras dependen de varios factores, por lo que sus capacidades deben ser verificadas bajo las condiciones ambientales locales (Park, Craggs et al. 2011, Rawat, Ranjith Kumar et al. 2011), y las comparaciones con otros estudios que no sean realizados en condiciones muy similares, puede carecer de relevancia. Las comparaciones antes citadas surgen de la necesidad de enfatizar la importancia que tienen los estudios en los que las condiciones experimentales se asemejen a las condiciones reales o naturales del medio donde será aplicada la tecnología. Es la opinión de la autora de este trabajo que, es preciso tomar con mucha cautela los resultados surgidos de estudios realizados con medios sintéticos, estériles y con concentraciones muy inferiores a las encontradas en los efluentes agro-industriales. Dicho lo anterior, es preciso volver a mencionar que en los efluentes usados hay otros microorganismos que seguramente contribuyen al consumo de los nutrientes presentes. En este estudio el objetivo es encontrar un diseño de microorganismos y mezclas de efluentes que permitan una depuración óptima y un aprovechamiento de la biomasa, por ello, la presencia y actividad de otros microorganismos es reconocida, aunque no evaluada a lo largo de este estudio.

Aunque no se agregó un Control de fotobiorreactores conteniendo la mezcla de efluentes sin ningún microorganismo, es esperable que la biota presente en dicha mezcla, la aireación provista por el sistema de mezclado y la misma apertura al aire, tenga participación en la remoción de compuestos, ya que, por ejemplo, el nitrógeno amoniacal no es la fuente de nitrógeno preferida de *A. brasilense* (Perez-Garcia, De-Bashan et al. 2010), y sin embargo se verifica una disminución del mismo en el

cultivo de la bacteria sola. Por lo mismo, es esperable que el crecimiento de *A. brasilense* se haya visto afectado por la competencia e interacción de las otras bacterias presentes.

La composición bioquímica de la biomasa obtenida al final de los cultivos, si se compara con los valores obtenidos con los resultados de diferentes estudios de microalgas cultivadas en diversos efluentes, resumidos en la Tabla 16, se encuentra dentro de los rangos informados, para proteínas, carbohidratos y lípidos. Como también se puede ver en dicha tabla, la variabilidad de resultados que se encuentran en la bibliografía, incluso para la misma especie de microalgas, dependiendo del efluente usado como medio de cultivo, es amplísima.

En este ensayo, si bien el contenido de proteínas de la biomasa de *Scenedesmus dimorphus* cuando fue cultivada sola en mezclas de 50%PV-50%SAQ, fue similar a la obtenida en el ensayo descrito en el capítulo anterior y resumido en la Tabla 14, el contenido de lípidos y carbohidratos fue inferior. Por otra parte, el contenido de lípidos, fue mayor cuando la microalga fue cultivada con la bacteria, aunque aun así fue inferior a lo antes obtenido.

Del mismo modo, el contenido de lípidos y carbohidratos en la biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada sola o en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense*, está por debajo de los resultados obtenidos en otros estudios en los que una microalga de la misma especie fue cultivada con alguna bacteria denominada de crecimiento de plantas, como se puede visualizar al comparar los resultados de la Tabla 19 de este capítulo, con la Tabla 3, anteriormente presentada.

Si bien el objetivo principal de este estudio es encontrar las condiciones que maximicen la remoción de nutrientes, la evaluación de la composición bioquímica de la biomasa permite ir conociendo el rango esperable de cada compuesto de valor agregado de la biomasa que es posible lograr en estos efluentes de la industria láctea, ya que si bien hay diferencias significativas entre los resultados, permiten conocer un rango que no excede en mucho los 200 mg.g de biomasa<sup>-1</sup>, pero que tampoco bajan de los 100mg.g de biomasa<sup>-1</sup>. Una vez alcanzada la última etapa de este estudio, será momento de evaluar la utilidad de la biomasa obtenida, luego del proceso de fitorremediación.

## 4.5 Conclusión

La finalidad de este estudio fue determinar el efecto de la asociación deliberada de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, que había demostrado una capacidad superior a *Chlorella pyrenoidosa* en la remoción de nutrientes y en la productividad en biomasa en concentraciones de 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, con la bacteria *Azospirillum brasilense* para ser luego escaladas y cultivadas en modo semicontinuo en estanques abiertos agitados al exterior. El resultado obtenido no indica que exista promoción significativa del crecimiento de *S. dimorphus*, sin embargo, y coincidiendo con la bibliografía relevada, *Chlorella* sp. sí muestra un mayor crecimiento y performance en general cuando es cultivada en consorcio con *A. brasilense*.

Por ello, esta última condición fue seleccionada para ser escalada a la próxima etapa. De todos modos, y a pesar del menor desempeño obtenido en el ensayo descrito en este Capítulo por *Scenedesmus dimorphus*, cultivada en 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso en comparación con el desempeño que mostró en el estudio descrito en el Capítulo 3, y en función de tal desempeño en mesocosmos al exterior, también esta condición fue escalada a la próxima etapa, para determinar cuál es la condición que, en grandes volúmenes y en modo semicontinuo (que es lo que sucedería en la aplicación real en campo de esta tecnología), presenta los mejores resultados.

## 5 CULTIVO SEMICONTINUO AL EXTERIOR

### 5.1 Introducción

La situación ideal para los cultivos de microalgas en estanques abiertos al aire libre es aquella en la que se opera a altas densidades celulares, de modo de mantener la dominancia de especies por parte de las microalgas deseadas, para, además, maximizar la productividad en biomasa y facilitar su cosecha (Richmond and Zou 1999). Por ello, como se describió en el Capítulo 1 de este trabajo, las especies o cepas a utilizar deberán tolerar y desarrollarse en las condiciones inestables que ocurren al aire libre e, idealmente, presentar contenidos altos de componentes celulares valiosos en la biomasa producida, como por ejemplo lípidos, proteínas y carbohidratos para permitir un aprovechamiento posterior de la misma.

La producción de microalgas a gran escala o “cultivo masivo” al exterior se asemeja más a la agricultura extensiva, donde el cultivador de algas tiene un control limitado sobre muchos de los factores ambientales, que al modelo de operación dentro de un laboratorio. Y en este sentido, si bien la "agricultura" a gran escala de microalgas tiene casi 60 años, queda mucho por aprender en comparación con los cientos de años de la agricultura terrestre de cultivos de cereales, como el trigo y el arroz, por citar dos ejemplos.

Los aprendizajes que el escalado de cultivos unialgales en sistemas abiertos al aire libre imponen, tienen que ver con la compleja interacción y el fino equilibrio de las condiciones climáticas, la química del agua (salinidad, turbidez, pH, oxígeno disuelto, productos químicos), la contaminación biológica y los factores operativos (diseño de estanques, hidrodinámica y mezcla, frecuencia de dilución / cosecha) (Burlew 1953, Goldman and Mann 1980). Esta complejidad ocasiona que las productividades de biomasa obtenidas durante largos períodos de tiempo, en cultivos abiertos al exterior, sean bajas, los problemas de contaminación sean comunes y, como consecuencia, el cultivo se encuentre, con frecuencia, en riesgo de colapso.

Dicho “colapso”, cuando sucede, se asocia a una mala calidad del agua o medio de cultivo que resulta de: (1) la acumulación de metabolitos celulares, (2) el desequilibrio en nutrientes y minerales, (3) el aumento de la turbidez y floculación de las células microalgales, el polvo, el polen y las partículas extrañas en el aire y los insectos, (4) pH inadecuado y (5) contaminación por otras microalgas, zooplancton y patógenos como hongos, virus y bacterias (Grobbelaar 2000), que, para el caso de

cultivos de microalgas en efluentes crudos, cabe recordar que estos microorganismos competidores ya están presentes en los efluentes. Todas estas condiciones mencionadas se dan en la mezcla de Suero Ácido de Queso (bajo pH, presencia de bacterias lácticas, relación N:P subóptima) y Purín Vacuno (alta turbidez, presencia de otras bacterias y microorganismos), propuesta como medio de cultivo en esta parte del estudio, por lo cual, es necesario comprobar la estabilidad de cultivo algal en el exterior y en el modo de operación en el que funcionan los sistemas en las aplicaciones reales, es decir, modo continuo o semicontinuo.

Como se describió en la Sección 1.3.2, los sistemas de cultivo de microalgas se pueden dividir en fotobioreactores abiertos agitados (comúnmente llamados estanques abiertos o estanques tipo *raceway*) y fotobioreactores cerrados. Los primeros operan, usualmente, con tiempos de retención hidráulica de 2 a 6 días (Mara and Pearson 1986, Muñoz and Guieysse 2006) y son reconocidos como el sistema más recomendado para el cultivo a gran escala, principalmente por su bajo costo de construcción y menor energía necesaria para el mezclado, ya que usan agitadores de paletas que giran a baja velocidad ( $20\text{cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ ) (Borowitzka and Moheimani 2013). Teniendo en cuenta que la tecnología descrita en este estudio se orienta hacia el tratamiento de efluentes, sobre todo agro-industriales provenientes de la producción de pequeñas y medianas empresas, utilizar el sistema que tenga el menor costo de mantenimiento y la menor inversión inicial es imperativo, y por ello fue el sistema elegido para los ensayos aquí descritos.

A partir de los resultados obtenidos e informados en los capítulos anteriores, se desprende que *Scenedesmus dimorphus*, así como el consorcio microalga-bacteria *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, son candidatos adecuados para el subsiguiente cultivo en estanques abiertos al exterior en la ficorremediación de una mezcla de 50% en volumen de cada uno de los efluentes Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso. Por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de experimentos en estanques abiertos agitados de tipo *raceway* para investigar la tolerancia a la tensión en condiciones de crecimiento al aire libre, por períodos prolongados, de los microorganismos mencionados. Al hacerlo, también fue posible investigar algunos de los parámetros más importantes y prácticos que limitaban el crecimiento en los cultivos.

El objetivo de este capítulo fue, por lo tanto, explorar los factores que limitan el crecimiento y la productividad de la biomasa algal en fotobiorreactores abiertos tipo *raceway* al exterior, usando, por un lado, la microalga *Scenedesmus dimorphus* y por el otro, el consorcio microalga-bacteria *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, y comparar su capacidad de depuración de la mezcla de efluentes en estudio (50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso ) así como su productividad en biomasa.

## 5.2 Materiales y métodos

Los ensayos descritos en este capítulo se desarrollaron entre el verano 2017 y otoño 2018, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, en las instalaciones al exterior de la Cátedra de Bioquímica Aplicada de la Facultad de Agronomía (Universidad de Buenos Aires), (34°35'29,4"S 58°28'58,8"O).

### 5.2.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados provienen de las mismas fuentes que se describen en la Sección 2.1, las microalgas utilizadas fueron *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* y la bacteria utilizada para ser co-cultivada junto con *Chlorella pyrenoidosa* fue *Azospirillum brasilense*. El escalado para la obtención de volúmenes adecuados de cada inóculo se realizó como se describe en las Secciones 2.1.1 y 2.1.2, las particularidades que fueron surgiendo del desarrollo de este ensayo están descritas a lo largo de este Capítulo. En general, los cultivos al exterior fueron inoculados de modo que las densidades celulares microalgales de inicio fueran de entre  $7 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>; y de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para la bacteria, en los volúmenes finales de los cultivos. Los inóculos de los que se partió fueron, *Azospirillum brasilense*  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, *Scenedesmus dimorphus*  $4 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> y *Chlorella pyrenoidosa*  $1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup>.

En el caso de las microalgas, el inóculo de *Chlorella* sp., al tener mayor densidad celular que *Scenedesmus* sp., fue diluido con agua de grifo para llegar a un volumen inicial de 46 L a la misma densidad celular.

En el caso de la bacteria, un volumen apropiado fue centrifugado, enjuagado con agua destilada, centrifugado nuevamente y resuspendido en una porción del cultivo en el que iba a ser inoculado.

### 5.2.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, sin esterilizar ni diluir.

Si bien los volúmenes usados en los ensayos descritos en los Capítulos 3 y 4, por ser menores, fueron almacenados como se describe en la sección 2.2, en esta etapa del cultivo se utilizaron más de 250 L de cada uno de los efluentes de la mezcla. En virtud de la importancia de evitar perder nutrientes o favorecer procesos bacterianos durante el almacenamiento, se procedió de la siguiente manera. Casi 400 L de Suero Ácido de Queso fueron separados, envasados en bidones de 10 L y congelados en las cámaras de las mismas instalaciones industriales, amablemente por el señor Javier Oillataguerre. En tres oportunidades se transportaron un tercio de estos bidones (congelados) hacia la Facultad de Agronomía, lugar de realización del estudio, con el transporte también a cargo de este productor. Una parte fue usada en cada momento (previo descongelado y atemperado), y el resto de los bidones fueron guardados en uno de los freezer de la Cátedra de Bioquímica Aplicada, en el edificio Arata de la Facultad de Agronomía (202 L de capacidad).

En el caso del Purín Vacuno, el mismo era recolectado directamente previo al pedido de la autora de este trabajo, por el Ing. Agr. Juan Veiga, de su propio establecimiento, y amablemente acercado a la Facultad, ya que es profesor de la casa y venía semanalmente.

De todos modos, en cada oportunidad que se agregó efluente a los estanques durante el período de estudio de las curvas de decontaminación (cosechas), una muestra de 500 mL fue tomada del cultivo una vez homogeneizado con el nuevo efluente, centrifugada, separado el líquido sobrenadante y el mismo congelado para su posterior análisis de cada parámetro en estudio, como una muestra “tiempo 0” o de concentraciones de inicio de cada ciclo de cultivo.

### 5.2.3 Sistema de cultivo (estanques abiertos agitados)

Cada cultivo se desarrolló en un fotobiorreactor abierto tipo *raceway*, (también llamado “piletón” o estanque) de plástico, con un tabique central divisor del flujo de líquido, agitado continuamente por paletas de plástico girando a 18 vueltas por minuto, movidas por un motor de tipo “spiedo” de 4 W, de modo que la velocidad lineal de una porción diferencial de líquido era de  $20\text{cm}\cdot\text{seg}^{-1}$  en la superficie del

cultivo. Las dimensiones de cada piletón o estanque eran de 56 cm de ancho, 100 cm de largo y una vez establecido, el cultivo se mantuvo siempre a una profundidad de 15 cm (Figura 25).

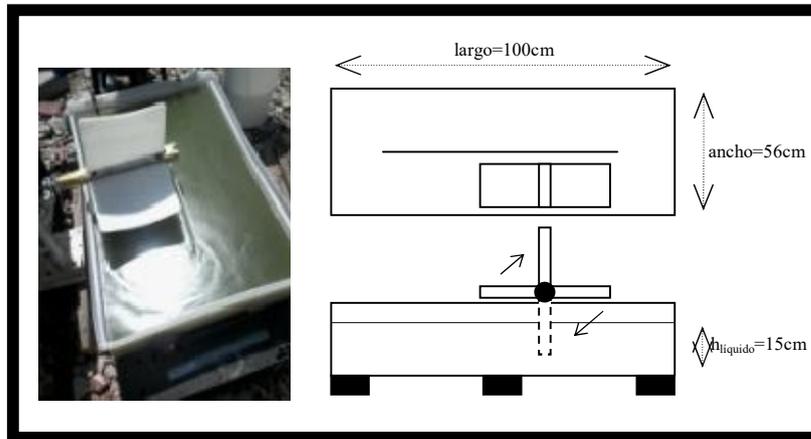


Figura 25. Estanques abiertos agitados tipo *raceway* utilizados en este estudio (izquierda) y sus dimensiones (derecha)

#### 5.2.4 Muestreo y determinaciones analíticas

La determinación de los parámetros de crecimiento de los microorganismos se realizó como se describe en el Capítulo 2. El muestreo para la determinación de la densidad celular se realizaba siempre a la misma hora (10 de la mañana). La cosecha, es decir la remoción de una porción de cultivo y agregado de nuevo medio (mezcla de efluentes), cuando correspondía, se realizaba siempre a las 15h.

El análisis de los efluentes y las muestras de líquido en diferentes etapas del cultivo, se realizaron siguiendo los métodos descritos en la Sección 2.4.6.

#### 5.2.5 Inoculación de estanques abiertos agitados

Previo a la inoculación, los estanques se limpiaron de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.3. Luego, los mismos se llenaron con alrededor de 40%-50% de cultivos establecidos de los cultivos *indoor* o de un cultivo ya existente en otro estanque. La profundidad inicial del cultivo se estableció en 10 cm hasta lograr suficiente biomasa para la experimentación, y entonces más medio de cultivo fue agregado hasta alcanzar la profundidad deseada de 15 cm finales, a los que se operó el cultivo durante la fase de experimentación.

### 5.2.6 Modo batch y semicontinuo

El cultivo se arrancó siempre en modo batch, ya sea para evaluar la duración de la fase logarítmica y el comienzo de la fase estacionaria de modo de confirmar las frecuencias diseñadas de cosecha, o para producir suficiente cultivo para inocular otro estanque.

Luego, el modo de operación era semicontinuo, es decir, una cosecha se realizaba cada 7 días (salvo en los casos que por una particularidad operativa surgida durante el ensayo se requiriera de otro modo, lo cual se describe en Resultados), es decir, una parte del cultivo era removida y nuevo medio era agregado en igual cantidad (descripción detallada en el siguiente punto) y continuaban las actividades diarias de gestión de cultivo hasta la próxima cosecha.

En las figuras en las que se grafican las densidades celulares de los cultivos microalgales, los momentos de cosecha aparecen como líneas casi verticales de disminución de la densidad celular en un mismo día. Aunque por claridad el eje de abscisas se exprese como fecha, los datos de los gráficos fueron tomados con fecha y hora. Como se mencionó antes, las densidades celulares se evaluaban a las 10h y las cosechas se realizaban a las 15h de los días correspondientes.

### 5.2.7 Gestión del cultivo

Cada día, a primera hora, se controlaba la pérdida de líquido por evaporación chequeando la altura del cultivo con una regla de plástico, y se igualaba a 15 cm agregando agua del grifo para compensar la evaporación del día anterior.

Cada dos días, se realizaba la limpieza del fondo y las paredes internas de cada piletón, con un cepillo tipo limpiatubos grande, para remover el biofilm formado (Figura 26a). Una red de acuario se intercalaba entre el tabique central y una de las paredes (Figura 26c), durante 30 minutos, para que los insectos (Figura 26b), hojas y otras suciedades quedaran atrapados y pudieran ser removidas de los estanques.

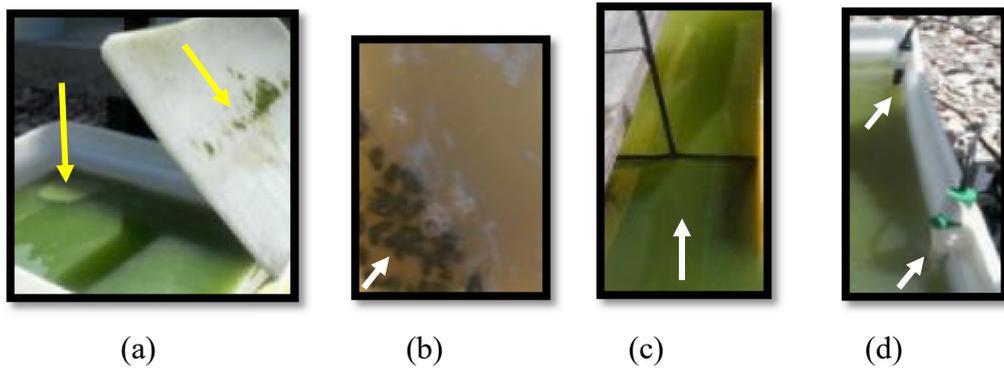
Cada piletón tenía su regla de plástico, cepillo y red idénticos, individuales e identificados.

En los días de monitoreo, se tomaban muestras para realizar las determinaciones de densidad celular y de peso seco, como se detalla en las Secciones 2.4.2 y 2.4.3.

Un pHímetro + MV/ °C HANNA HI 221 fue utilizado para la medición de pH y temperatura, las sondas se colocaban en cada estanque (Figura 26d) y las lecturas se

registraban en un cuaderno con regularidad durante el día. La sonda hacía una medición on-line pero no permitía su almacenamiento en una memoria, por lo que el registro se realizaba manualmente.

Las sondas eran limpiadas frecuentemente con una solución de alcohol al 70% y calibradas con los patrones de pH 4-7-10 del instrumento.



**Figura 26. Biofilm que se formaba y era removido periódicamente por cepillado (a) e insectos (b), removidos luego con una red de acuario (c) intercalada entre el tabique central y una pared lateral. Sondas de temperatura y pH (d) usadas para la medición de dichos parámetros en el líquido del cultivo**

En los días de cosecha, se realizaban los mismos monitoreos y se calculaba el volumen de cultivo a retirar (dilución) para restablecer los cultivos a la densidad de operación (que estuvo, en general, entre  $1$  y  $5 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>, salvo que por una particularidad operativa surgida durante el ensayo se requiriera de otro modo, lo cual se describe en Resultados) y consistía en evaluar a las 10 de la mañana la densidad celular, calcular la cantidad de litros a ser removidos para lograr la densidad celular final deseada en el cultivo y en función de la superficie del estanque, calcular cuántos “centímetros” debería bajar el nivel del líquido (desagote del cultivo) en el mismo. En cada cosecha se drenó el volumen apropiado de cultivo (hasta la altura definida antes) con las paletas del agitador en movimiento para mantener las células en suspensión. Después de descartar casi todo el volumen de cultivo requerido, se detuvo la agitación para poder determinar correctamente el nivel del líquido (cultivo) y se usó el medio de cultivo descrito en la Sección 5.2.2 para completar el cultivo al volumen requerido (15 cm altura de líquido). La mezcla uniforme del cultivo se logró al poner las paletas del agitador en movimiento nuevamente.

### 5.3 Resultados

La irradiancia diaria más alta del período de cultivo al exterior, fue de  $1267,6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  y se observó a finales de diciembre de 2017, en la estación de verano; irradiancias puntuales hasta 90% menores fueron observadas a finales de marzo de 2018, en otoño (Figura 27b). Las temperaturas máximas diarias del aire se observaron en diciembre 2017 y enero de 2018, y las temperaturas mínimas diarias del aire se alcanzaron a principios de abril de 2018 (Figura 27a) (Servicio Meteorológico Nacional 2018).

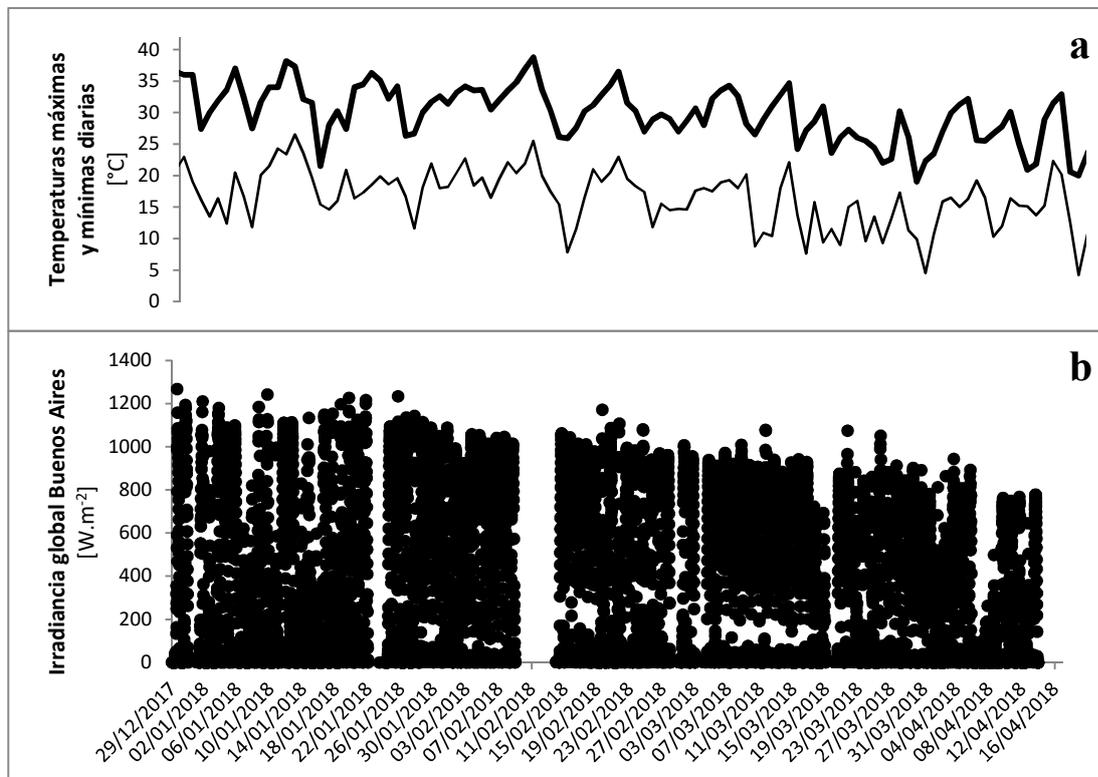


Figura 27. Temperaturas máxima (línea gruesa) y mínima (línea fina) diarias (a) e irradiancia (b) durante el período de estudio en fotobiorreactores abiertos (estanques) agitados al exterior.

Fuente: Catálogo de Datos Abiertos, SMN.

La experimentación en cultivos al exterior comenzó con la inoculación de *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* en dos estanques adyacentes el 27 de diciembre de 2017. Los inóculos provenientes de cultivos en fotobiorreactores cerrados en medio Basal de Bold, escalados como se describió anteriormente, fueron trasvasados a cada estanque abierto agitado. En cada caso, 46 litros de inóculo de cada especie fueron completados con mezcla de los efluentes en estudio en una

proporción de 50% de cada uno, hasta una altura de 10 cm. Dos días después, se agregó nuevamente mezcla de efluentes hasta completar la altura de experimentación de 15 cm, con una densidad de  $2 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>, en cada caso. Los dos cultivos se mantuvieron en modo batch hasta evaluar el momento en el que alcanzaban la fase estacionaria para determinar la máxima densidad celular que podía ser mantenida en un cultivo en modo semicontinuo en fase logarítmica. A seis días del inicio del cultivo, la temperatura superó los 37°C, a partir de lo cual declinó significativamente durante tres días la densidad celular de *S. dimorphus* (Figura 28, línea rojo oscuro). Luego comenzó a recuperarse, a menor velocidad que la demostrada en laboratorio, mientras *C. pyrenoidosa*, cuya diferencia de crecimiento fue apenas significativa luego del día de 37°C de temperatura, se recuperó y continuó creciendo, alcanzando densidades celulares tres veces superiores a *S. dimorphus*.

Diez días después del inicio, el 9 de enero de 2018, se realizó una cosecha de ambos estanques y agregado de nuevo efluente. Ambos cultivos quedaron con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Al día siguiente, la temperatura ambiente alcanzó los 39°C y el cultivo de *S. dimorphus* nuevamente comenzó a declinar (Figura 28, línea rojo oscuro), por lo que al día siguiente se realizó una reinoculación del cultivo de *Scenedesmus dimorphus*, para aumentar la densidad celular hasta valores iguales a los del momento posterior a la cosecha, con inóculo nuevo, proveniente de los cultivos de laboratorio, en virtud del gran crecimiento de protozoos en este cultivo al exterior (Figura 29a, línea de puntos rojo oscuro). *C. pyrenoidosa*, nuevamente, continuó creciendo con densidades celulares significativamente superiores a *S. dimorphus*.

Ambos cultivos continuaron creciendo por cuatro días más, a medida que la temperatura disminuía hasta los 28°C de temperatura máxima el 15 de enero de 2018.

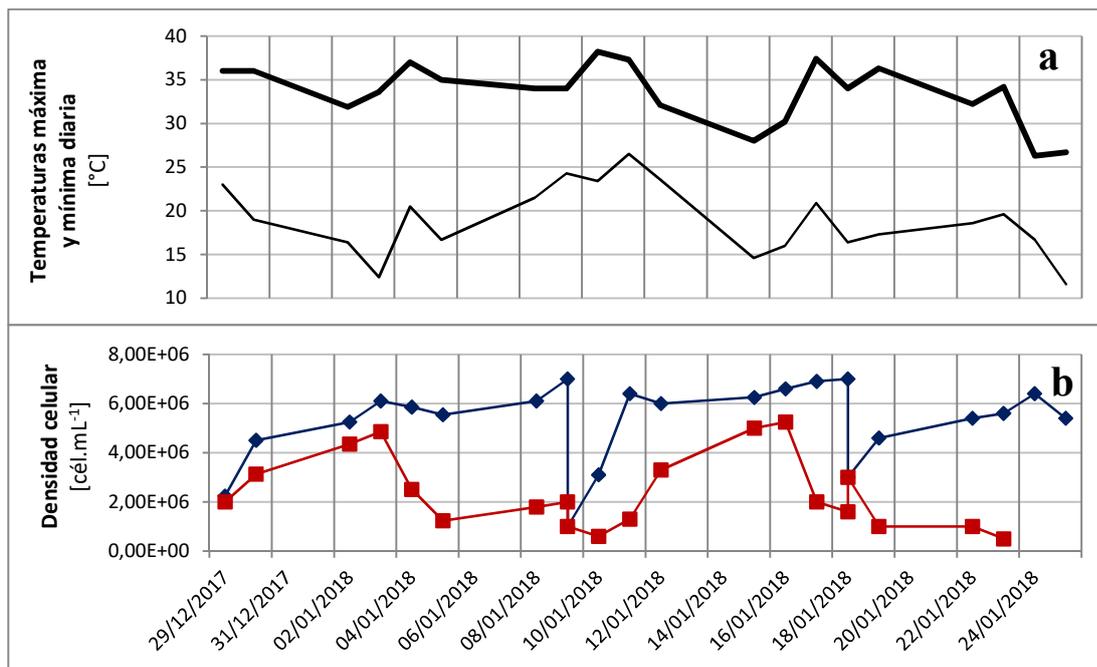


Figura 28. Temperaturas máxima (línea gruesa) y mínima (línea fina) diaria (a) y densidades celulares de *Scenedesmus dimorphus* (rojo oscuro) y *Chlorella pyrenoidosa* (azul oscuro) (b) en cultivos en estanques abiertos al exterior

Nuevamente, el 17 de enero de 2018, la temperatura del día superó los 37°C. El cultivo de *S. dimorphus* declinó, y nuevamente se realizó una suplementación del cultivo con inóculo fresco para levantar en  $0,6 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> la densidad del cultivo. El cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*, cuyo crecimiento tampoco declinó en esta oportunidad, fue cosechado ese día y ambos cultivos fueron emparejados en una densidad celular de  $3 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>. *S. dimorphus* continuó declinando muy rápidamente en los días subsiguientes y la contaminación aumentó con la misma rapidez en dicho estanque (Figura 29a, línea de puntos rojo oscuro) y al cabo de 4 días el cultivo fue tomado por *C. pyrenoidosa*.

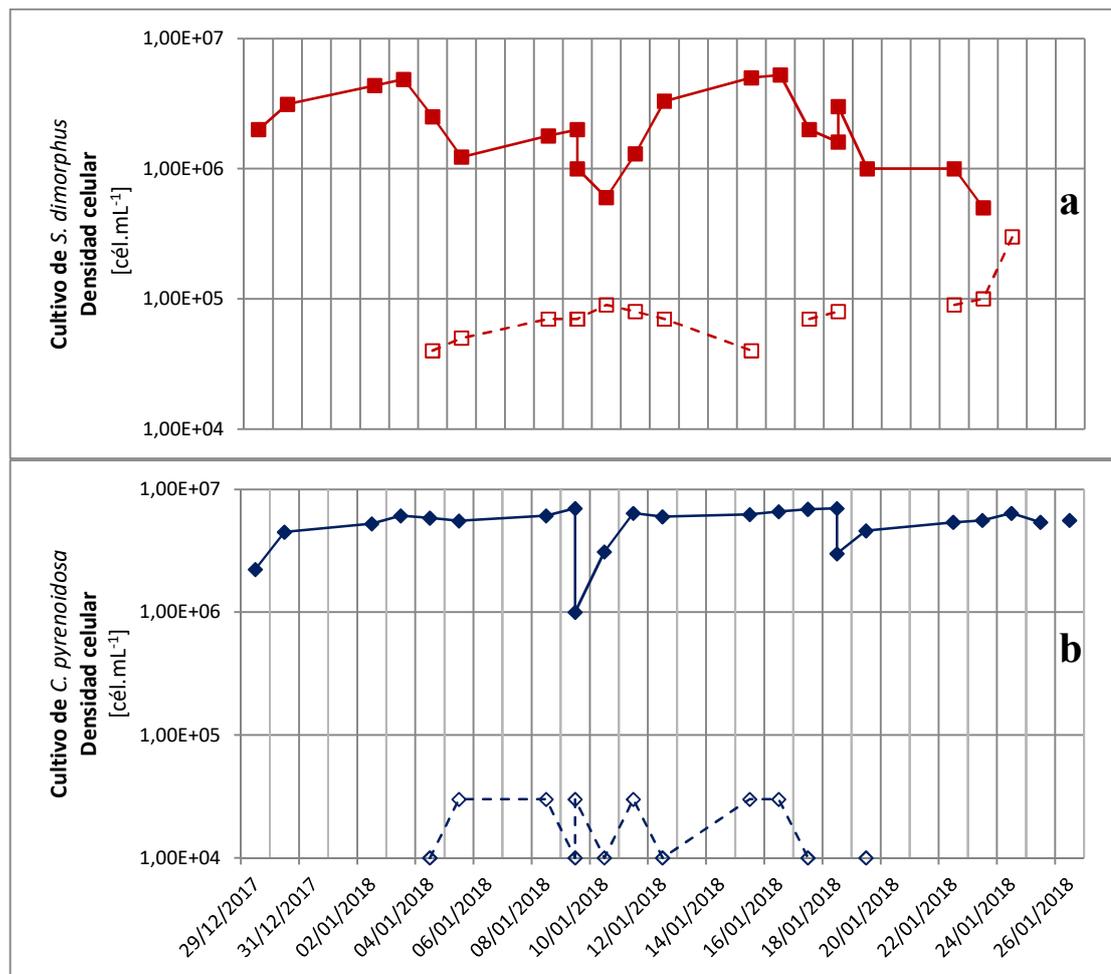


Figura 29. Densidades celulares de los cultivos microalgales de *Scenedesmus dimorphus* (línea llena rojo oscuro) y de la contaminación de dicho cultivo (línea punteada rojo oscuro) (a), así como de *Chlorella pyrenoidosa* (línea llena azul oscuro) y de la contaminación en este cultivo (línea punteada azul oscuro) (b).

En el período de un mes, cada vez que hubo un aumento de la temperatura por encima de los 37°C, *Scenedesmus dimorphus* declinó en el crecimiento, y pese a los intentos de reinoculación o suplementación del cultivo con cultivos frescos y densos de laboratorio, finalmente el cultivo de *S. dimorphus* no solamente fue siendo progresivamente dominado por predadores sino incluso y finalmente, por *Chlorella* sp. (Figura 29a).

En el caso de los inóculos que eran cultivados al exterior, pero en fotobiorreactores cerrados de 6 L, las células aparecieron completamente blancas en las oportunidades que declinó el crecimiento luego de las altas temperaturas. No se observó material intracelular disperso en la muestra evaluada al microscopio, sino que las paredes celulares se veían conservadas (Figura 30) y el pH de la misma era de 8.



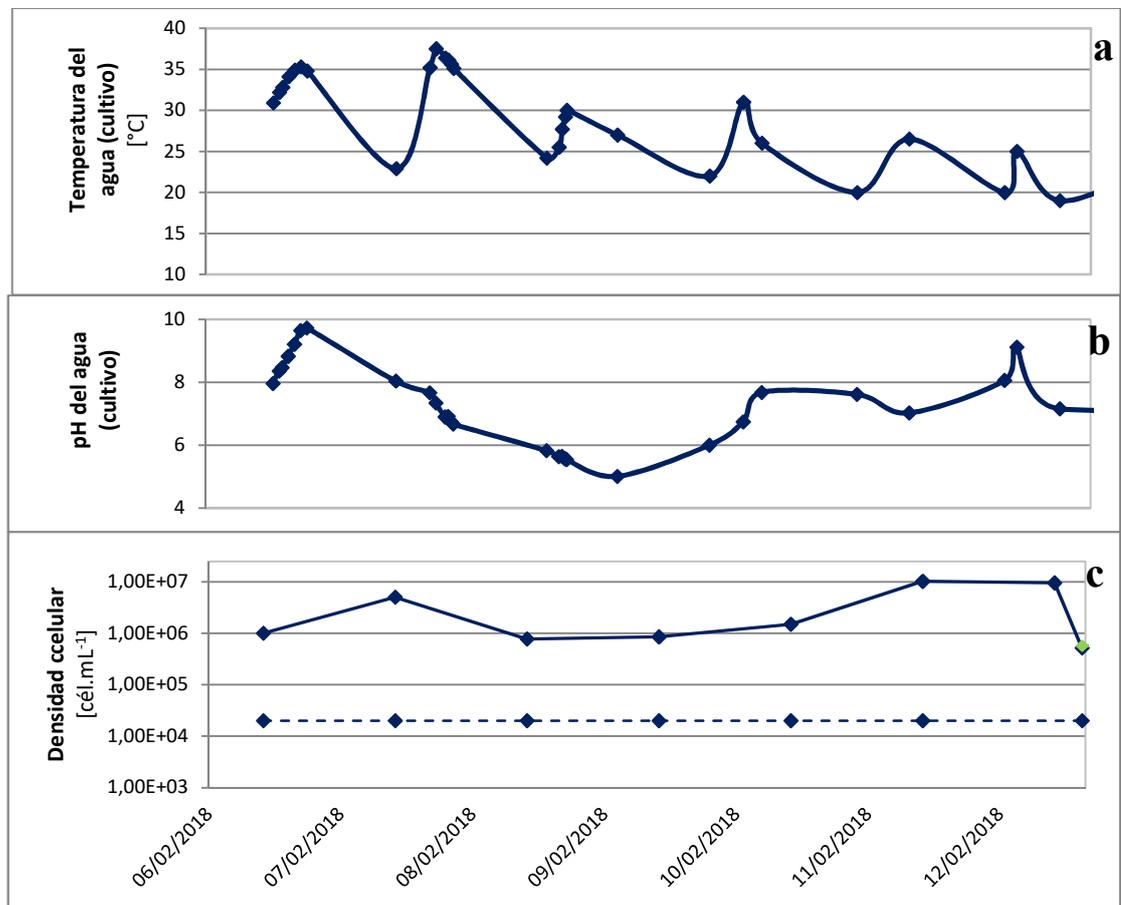
Figura 30. Apariencia de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* a simple vista (izquierda) y al microscopio (derecha) luego del último evento de alta temperatura

Lo anteriormente descrito llevó a la reconsideración de *Scenedesmus dimorphus* como microorganismo idóneo para este proceso, y en su lugar, el resto de la investigación, fue realizada con *Chlorella pyrenoidosa*.

Dado que el estudio planificado para esta etapa consistía en comparar el crecimiento y la productividad en biomasa algal en fotobiorreactores abiertos tipo *raceway* al exterior, de la microalga *Scenedesmus dimorphus* y el consorcio microalga-bacteria *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, recientemente estudiados en experimentos anteriores, así como comparar su capacidad de depuración de la mezcla de efluentes en estudio, los dos cultivos con los que se siguió adelante la experimentación, fueron *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, en un estanque, y *Chlorella pyrenoidosa* sola, en el estanque adyacente.

Como primer paso, el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* que estaba en uno de los estanques, fue removido del mismo en baldes de 20 L agitados por aireadores de pecera, momentáneamente, y ambos estanques fueron profundamente limpiados del modo que se describe en la Sección 2.3. Luego, el 6 de febrero, el cultivo de *C. pyrenoidosa* fue trasvasado a uno de los estanques abiertos agitados y se mantuvo en modo batch entre el 6 y el 12 de febrero de 2018, con agregado de nuevo medio (50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso) hasta tener suficiente cultivo para dar inicio a la experimentación en ambos estanques (Figura 31c). En este período, entre el 8 y el 10 de enero hubo una disminución del pH (Figura 31b) del cultivo, la diferencia entre la temperatura máxima del 7 de enero y mínima del 8 de enero (temperatura del líquido del cultivo, Figura 31a) superó los 22°C. No se registra ningún otro evento que pudiera relacionarse con la disminución del pH, de todos

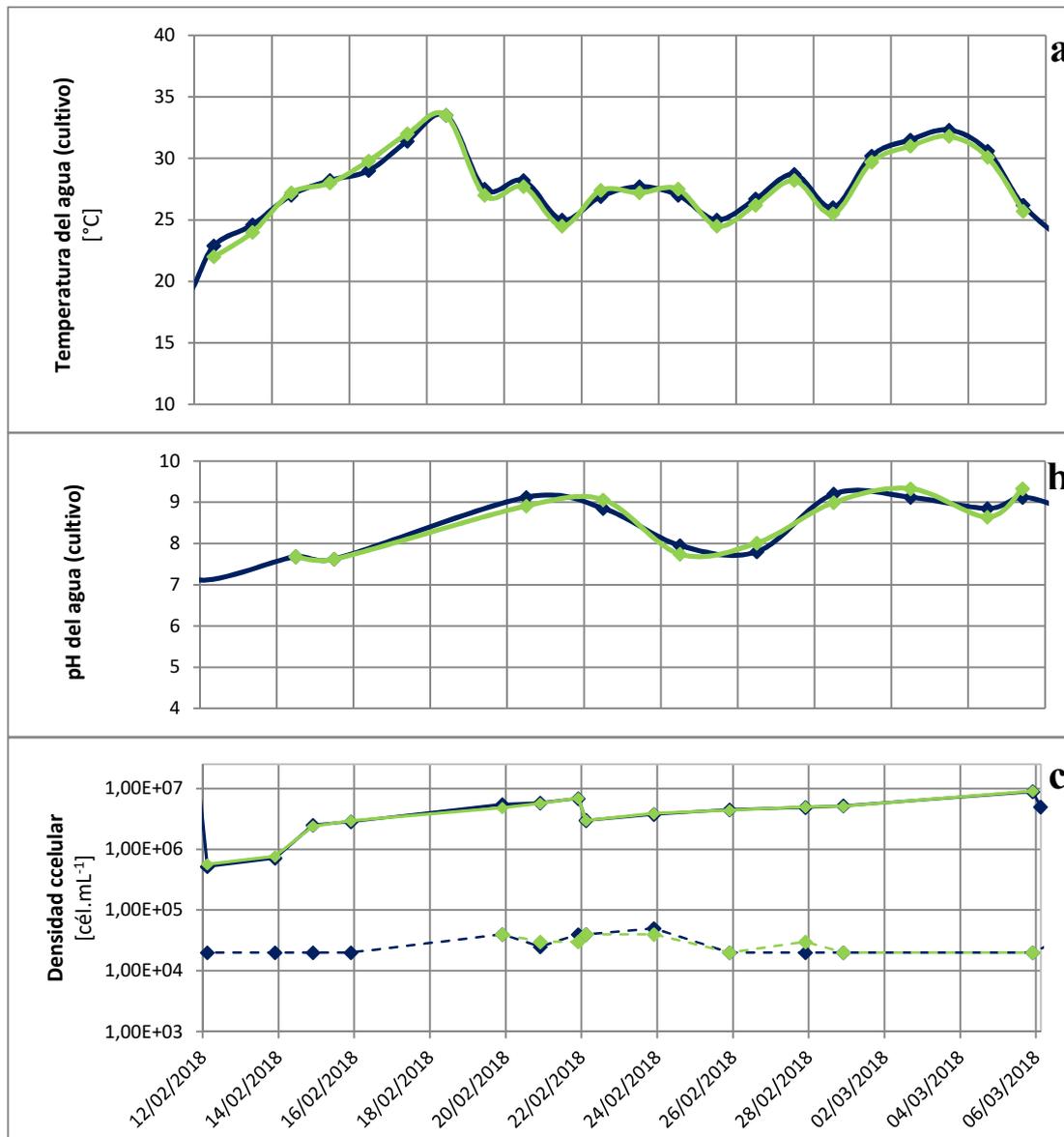
modos, el cultivo se adaptó recuperándose de inmediato, sin aumento de la contaminación (Figura 31c).



**Figura 31. Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (línea llena azul oscuro) y de la contaminación en este cultivo (línea punteada azul oscuro) en la fase batch de aumentación del cultivo para conformar dos estanques**

Una vez que se contó con suficiente inóculo para dar inicio a dos estanques, se cultivó en modo semicontinuo *Chlorella* sp. en los dos estanques, entre el 12 de febrero de 2018 y el 6 de marzo de 2018 (Figura 32), para asegurar que el crecimiento fuera idéntico en ambos estanques, antes de inocular uno de ellos con la bacteria *A. brasilense*.

El crecimiento fue idéntico en ambos estanques, incluso la densidad de predadores (expresados como protozoos) se mantuvo, en promedio, entre  $2 \times 10^4$  y  $4 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> en todo el período (Figura 32c).



**Figura 32.** Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) de los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* (líneas llenas) en el estanque 1 (azul oscuro) y estanque 2 (verde) y de la contaminación en cada uno (líneas punteadas de colores respectivos), en idénticas condiciones

El 22 de febrero se realizó una cosecha de cada cultivo, de modo que las densidades celulares disminuyeran hasta  $3 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup> (Figura 32c), luego de eso, los cultivos siguieron creciendo de igual manera, con la especie microalgal dominando el cultivo en todo momento, incluso ante la presencia de protozoos en el medio. Dos cosechas fueron realizadas a lo largo de esta etapa, los días 22 de febrero y 6 de marzo.

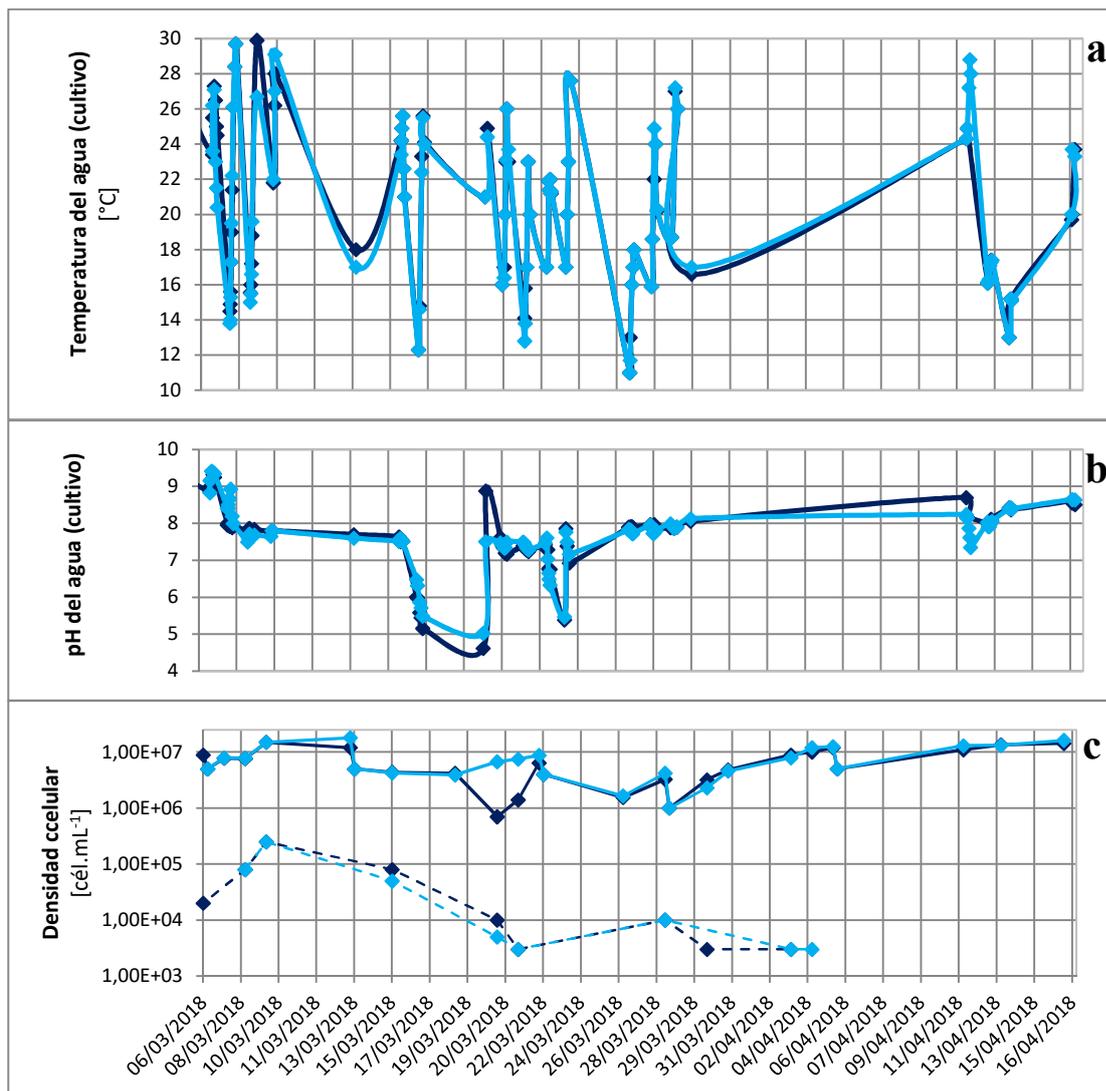
Una vez determinado que el crecimiento era igual en los dos estanques, se procedió a inocular uno de ellos con *A. brasilense*.

### 5.3.1 Comparación del crecimiento y la productividad de *Chlorella pyrenoidosa* con y sin *Azospirillum brasilense*

El 6 de marzo de 2018 ambos estanques fueron cosechados y luego del agregado de nuevo efluente, la densidad celular microalgal en ambos cultivos fue de  $5 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>. En el estanque “B”, 840 mL de un inóculo de *Azospirillum brasilense*, con densidad  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, fueron centrifugados y resuspendidos en una porción del efluente a ser agregado. De este modo, la concentración de bacterias en el estanque fue de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Las cosechas fueron regularmente realizadas los días 13, 22, 28 de marzo y 5 de abril, removiendo entre el 40 y 60% del cultivo (Tabla 20), según correspondiera, para dejar la densidad celular de cada estanque entre 1 y  $5 \times 10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>.

Al principio del ensayo, la contaminación por protozoos en cada cultivo fue mayor que hacia el final, donde, en algunos días de monitoreo, no se observó contaminación.

Entre el 16 y el 19 de marzo de 2018, se registró un descenso de pH en ambos cultivos, que ocasionó, inicialmente, un estancamiento del crecimiento en ambos estanques y un posterior detrimento en la densidad celular del estanque en el que se encontraba el cultivo de la microalga *Chlorella pyrenoidosa* sola. En cambio, el estanque donde se estaba cultivando el consorcio, se comenzó a recuperar a pesar del bajo pH. El día 19 de marzo, alrededor del mediodía, se diluyeron algunas grageas de NaOH en ambos estanques, hasta alcanzar la neutralidad. En las horas posteriores de ese día, el estanque de *Chlorella pyrenoidosa* hizo un pico de pH hasta el valor de 9 y volvió a descender a los valores promedio de  $7 \pm 0,5$  (Figura 33b). El cultivo del consorcio se mantuvo más estable, recuperando progresivamente las densidades celulares (Figura 33c) previas. Los días anteriores a este evento, hubo una disminución brusca de la temperatura del aire, lo cual ocasionó una disminución en la temperatura del líquido de cada cultivo (Figura 33a), como único evento diferencial registrado. Cabe recordar al lector, que el Suero Ácido de Queso contiene bacterias lácticas y que, el mismo, no fue esterilizado.



**Figura 33.** Temperatura (a) y pH (b) del agua, y densidades celulares (c) de los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada sola (línea llena azul oscuro) en el estanque 1 y del consorcio *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense* (línea llena celeste) cultivado en el estanque 2 y de la contaminación en cada uno (líneas punteadas de colores respectivos), en modo semicontinuo

También se observó, que tanto el 13 de marzo como el 28 de marzo, es decir, en el recuento de las 10h de las fechas de cosecha, el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* sola, mostró un detrimento o estancamiento del crecimiento, mientras el cultivo donde se encontraba el consorcio, seguía creciendo (Figura 33c). En el resto de las mediciones, no hubo diferencias significativas entre las densidades celulares microalgales de los cultivos.

En lo que respecta al rendimiento volumétrico en biomasa, si bien en cada cosecha la cantidad de biomasa producida en el cultivo de *Chlorella* sp. sola por unidad de volumen fue mayor a la biomasa producida por el consorcio (Figura 34),

estadísticamente no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) a lo largo del período de estudio. De todos modos, esta repetida diferencia llama la atención y se entiende que está más relacionada al tamaño de las células que a la densidad celular. En general, al microscopio, las células de *Chlorella* sp. cultivada sola, se veían más grandes y menos verdes (Figura 35) que las células microalgales de la misma cepa en el consorcio con la bacteria, sobre todo, en los momentos de cosecha. En la Figura 34 se registran los valores de concentración en biomasa libre de cenizas en cada cosecha para cada cultivo al exterior.

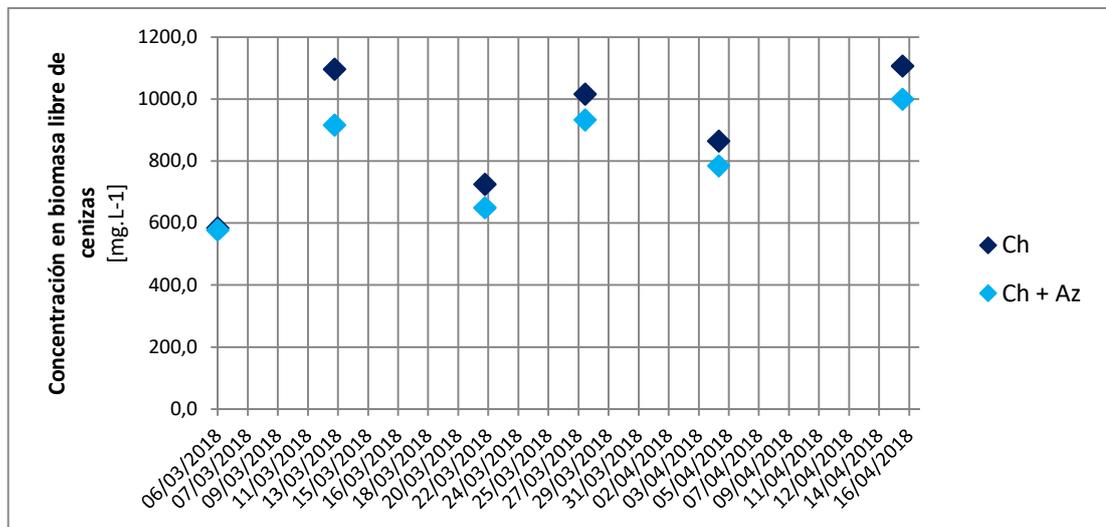


Figura 34. Concentración en biomasa (libre de cenizas) de los cultivos semicontinuos en estanques abiertos al exterior de *Chlorella pyrenoidosa* sola (azul oscuro, Ch) y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (celeste, Ch + Az) en los días de cosecha

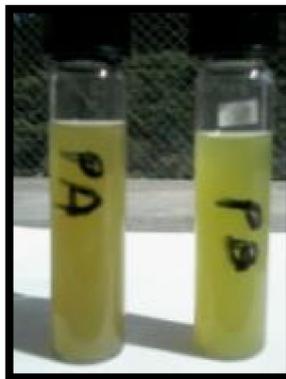


Figura 35. Ligera diferencia de color entre las muestras de los estanques de *Chlorella pyrenoidosa* (marcada como PA, izquierda) y del consorcio de *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense* (marcada como PB, derecha) en las cosechas a lo largo del ensayo en estanques agitados al exterior

La productividad promedio a lo largo del período de estudio, desde el 6 de marzo de 2018 al 16 de abril de 2018, fue de  $30 \pm 22 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. cultivada sola y de  $41 \pm 11 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. en co-cultivo con *A. brasilense*. La mayor variabilidad en los resultados del cultivo de la microalga sola, se explican por una alta productividad entre el inicio del ensayo y la primera cosecha ( $73 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) y una evidente declinación del cultivo entre el 16 y 20 de marzo (disminución de pH y de la densidad celular del cultivo, Figura 33c) donde la productividad en ese período corto fue de tan solo  $0,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , con una leve recuperación hacia el momento de cosecha, donde la productividad entre el 20 y 22 de marzo fue de  $15 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . En cambio, para el cultivo donde la microalga fue inicialmente inoculada con la bacteria, el promedio de productividad se mantuvo más estable durante todo el período, siendo la productividad entre el arranque del cultivo y la primera cosecha de  $48 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , entre el 16 y 20 de marzo de  $39 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , y entre el 20 y 22 de marzo de  $49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ .

Al desestimar los valores obtenidos para el período en que los cultivos estuvieron sometidos a la tensión ambiental descrita, la productividad promedio de los mismos es prácticamente la misma, siendo de  $37 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. cultivada sola y de  $38 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. en co-cultivo con *A. brasilense*.

### 5.3.2 Remoción de nutrientes y tiempo de retención hidráulica

En tres oportunidades de las cinco cosechas realizadas durante el estudio en modo semicontinuo, se realizó un seguimiento diario de las concentraciones de nitratos, fosfatos y nitrógeno amoniacal, en ambos estanques.

Las muestras se tomaron a las 24h, 48h, 72h, 96h, 120h y 144h, lo que equivale a 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días luego del agregado de nuevo medio (dilución) al cultivo. En primer lugar este límite de tiempo se tomó, como ya se especificara anteriormente, en función de los tiempos de retención hidráulica más comunes o recomendados en estanques abiertos agitados al exterior del tipo *raceway*, por un lado, y por otro lado, debido a que en la bibliografía consultada, las concentraciones de estos nutrientes no disminuyen más sino que, incluso, comienzan a incrementarse, en general, en los estanques con microalgas y en particular, cuando las bacterias que acompaña son del estilo de *A. brasilense*, es decir, fijadoras de nitrógeno (Perez-Garcia, De-Bashan et al. 2010)

El contenido de fosfatos en el cultivo donde se encontraba la microalga *Chlorella pyrenoidosa* sola, disminuyó en promedio en un 65% a las 48h del agregado de medio nuevo y luego hubo un ligero incremento del contenido de fosfatos en el medio al tercer día, que volvió a disminuir a las 96h y 120h y nuevamente se elevó a las 168h acumulando, en este punto, una reducción promedio del 80% en promedio de la concentración de fosfatos original (Figura 36, azul oscuro). Cabe destacar que en cada caso, el valor inicial de la curva de evolución de cada uno de los nutrientes, constituye el valor medido en una muestra tomada en el tiempo 0, como se indicó antes (Sección 5.2.2), dado que cada estanque se cosechaba hasta la misma densidad celular y, sin embargo, las densidades celulares alcanzadas hasta el momento justo previo a la cosecha eran diferentes, es por ello que la cantidad de litros de nuevo medio agregado (50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso) fueran diferentes para cada estanque. La Tabla 20 resume la cantidad de litros agregados en cada cosecha.

**Tabla 20. Esquema de dilución de cada estanque de cultivo de *C. pyrenoidosa* sola y en consorcio con *A. brasilense* para cada cosecha realizada durante el cultivo semicontinuo al exterior en estanques abiertos**

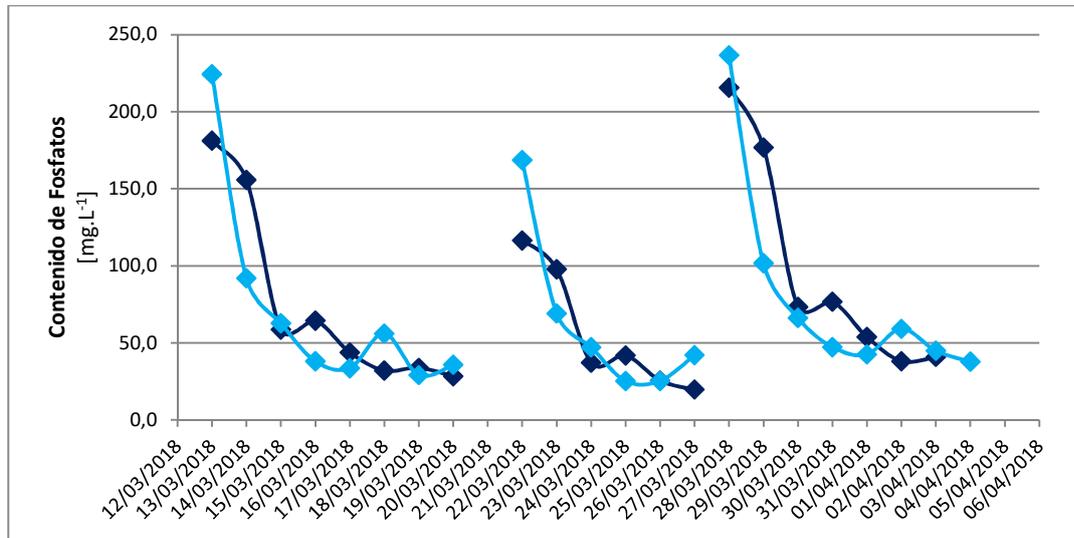
Fecha y hora de la cosecha	Estanque <i>C. pyrenoidosa</i>				Estanque <i>C. pyrenoidosa</i> + <i>A. brasilense</i>			
	Densidad celular antes de la cosecha	Densidad celular después del agregado de nuevo efluente	Porcentaje de cultivo removido	Volumen de mezcla 50%PV-50% SAQ agregada	Densidad celular antes de la cosecha	Densidad celular después del agregado de nuevo efluente	Porcentaje de cultivo removido	Volumen de mezcla 50%PV-50% SAQ agregada
	[cél microalgales.mL <sup>-1</sup> ]	[cél microalgales.mL <sup>-1</sup> ]	[%]	[Litros]	[cél microalgales.mL <sup>-1</sup> ]	[cél microalgales.mL <sup>-1</sup> ]	[%]	[Litros]
06/03/2018 15:00	8,9E+06	5,0E+06	44%	37	9,1E+06	5,0E+06	45%	38
13/03/2018 15:00	1,2E+07	5,0E+06	58%	49	1,8E+07	5,0E+06	72%	61
22/03/2018 15:00	6,4E+06	4,0E+06	38%	32	8,8E+06	4,0E+06	54%	46
28/03/2018 15:00	3,3E+06	1,0E+06	69%	58	4,2E+06	1,0E+06	76%	64
05/04/2018 15:00	1,2E+07	5,0E+06	58%	49	1,3E+07	5,0E+06	60%	50

PV: Purín Vacuno

SAQ: Suero Ácido de Queso

Por otro lado, la curva de decrecimiento de la concentración de fósforo, expresado como contenido de fosfatos, en el medio, en el cultivo donde estaba presente el consorcio de *Chlorella pyrenoidosa* y *Azospirillum brasilense*, mostró una disminución continuada hasta una remoción promedio del 80% a las 96h de realizada la dilución (cosecha), luego un ligero aumento a las 120h y nuevamente una

disminución y estancamiento hasta los valores alcanzados a las 96h (Figura 36, curva celeste).



**Figura 36. Evolución del contenido de Fosfatos en los estanques de *C. pyrenoidosa* cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con *A. brasilense* (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ**

En el caso de la evolución de nitratos en las aguas residuales (Figura 37), al cabo de 48h, el consorcio de microalga-bacteria logró un 92% promedio de remoción contra un 86% promedio de remoción por parte de la microalga cuando está sola, aunque en el caso del consorcio, se da un notable incremento de los nitratos entre las 72h y 96h, que luego decrece a los valores antes mencionados. En el caso de la microalga cultivada sola, el incremento es comparativamente mucho menor y se da a las 72h, aunque luego de ello, permanece en valores de nitratos por encima de los alcanzados a las 48h.

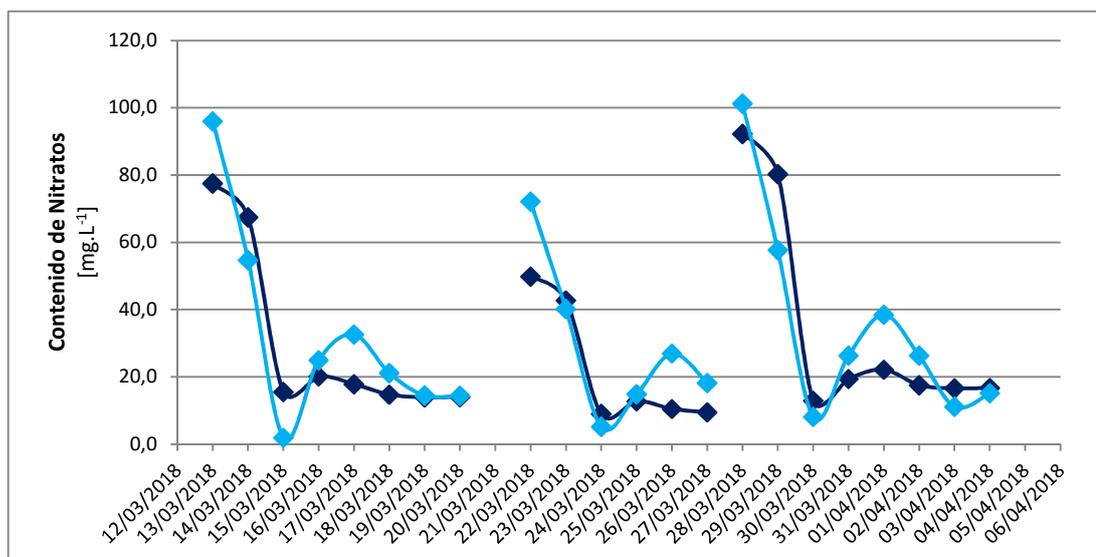


Figura 37. Evolución del contenido de Nitratos en los estanques de *C. pyrenoidosa* cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con *A. brasilense* (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ

Por último, la reducción de nitrógeno amoniacal (Figura 38) es significativamente superior por parte de la microalga sola (93% promedio de remoción a los cuatro días luego de la reposición de efluente nuevo) que en el cultivo de la microalga con la bacteria (78% promedio de remoción a los tres días luego de la reposición de efluente nuevo). En ambos casos, la concentración de esta especie química aumenta durante los días posteriores a alcanzar la máxima remoción.

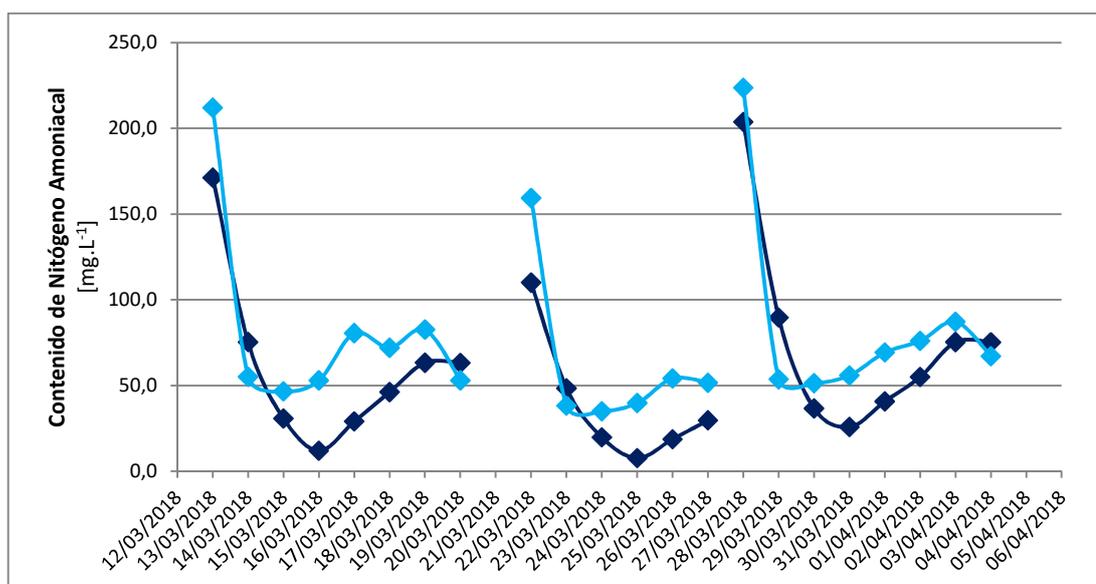
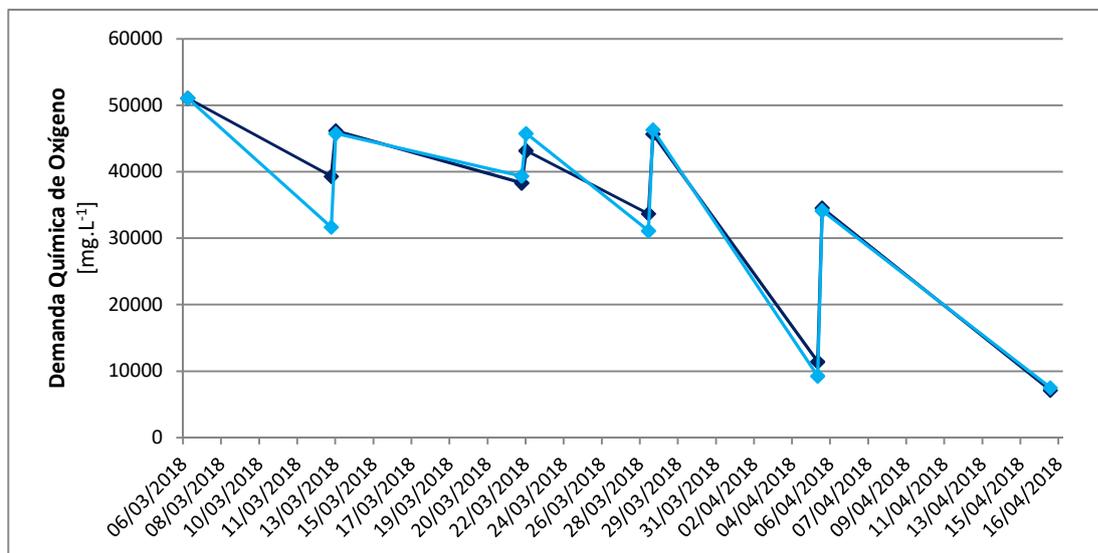


Figura 38. Evolución del contenido de Nitrógeno Amoniacal en los estanques de *C. pyrenoidosa* cultivada sola (azul oscuro) y en consorcio con *A. brasilense* (celeste) en mezclas de efluentes 50%PV-50%SAQ

La Demanda Química de Oxígeno se determinó en muestras tomadas al inicio de cada ciclo de cultivo semicontinuo y justo antes de cada cosecha, es decir, previo al agregado de nuevo medio. Por ello, en la Figura 39, para las fechas 13/03, 22/03, 28/03, 06/04 y 16/04, se puede observar que el valor “se levanta” en el mismo día, ya que a las 10 h se realizaba la toma de muestras para evaluar los distintos parámetros, incluida la DQO, y a las 15 h, una vez agregado el nuevo medio, se tomaba la muestra que corresponde al inicio del siguiente ciclo.

La diferencia de DQO removida en promedio a lo largo de todo del período de cultivo al exterior no mostró diferencias significativas entre ambos estanques, sin embargo, se puede observar que, en los períodos donde el cultivo de la microalga sola sufrió una disminución de la población (Figura 33), el desempeño del cultivo del consorcio fue mejor que el de la microalga sola, es decir, la remoción de DQO al final del ciclo fue mayor para el cultivo del consorcio.

Se observa que en los sucesivos ciclos, la capacidad de remoción de DQO por parte de los cultivos va en aumento, no obstante, aún al final del experimento, los valores de DQO estuvieron muy por encima de cualquier valor de descarga de un efluente tratado a un cuerpo de agua.



**Figura 39.** Evolución de la DQO de los cultivos semicontinuos en estanques abiertos al exterior de *Chlorella pyrenoidosa* sola (azul oscuro) y en consorcio con la bacteria *Azospirillum brasilense* (celeste)

### 5.3.3 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano fue seguido como se indicó en la Sección 2.4.4 por diluciones sucesivas de las muestras y sembrado en placas de Rojo Congo. En la primera cosecha (inicio de la etapa de experimentación con *Chlorella pyrenoidosa* en un estanque y el consorcio en el otro estanque), la muestra sembrada al momento de la cosecha dio un crecimiento bacteriano distinguible y de una densidad en UFC.mL<sup>-1</sup> ligeramente inferior a la inoculada. A las 48h de la inoculación inicial, la densidad en UFC.mL<sup>-1</sup> era dos órdenes inferior, y entre las 72 y 96 h no se detectaba crecimiento en ninguna de las placas sembradas, en diferentes diluciones.

Por ello, al momento de la siguiente cosecha, se volvió a inocular el estanque con la bacteria, de modo de obtener una densidad de  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. En el siguiente ciclo, nuevamente, no se detectó crecimiento bacteriano sino un decremento de la población bacteriana, y no hubo detección al día 6 desde el momento de cosecha. Como se discutió en la Sección 4.4 y se retoma más abajo, esto coincide con la bibliografía disponible acerca de *A. brasilense* co-cultivada con microalgas. En función de los objetivos de este estudio, posteriormente a las siguientes dos cosechas, se repitió la operación de reinocular el estanque con la bacteria una vez adicionada la mezcla de efluentes fresca (dilución).

### 5.3.4 Composición bioquímica de la biomasa algal

En cada cosecha, la biomasa algal de las muestras tomadas, una vez separadas del líquido, fueron analizadas para determinar su composición en lípidos, proteínas y carbohidratos.

Los resultados obtenidos, que se resumen en la Tabla 21, fueron comparados mediante un análisis de varianza, de lo que se desprende que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de proteínas y carbohidratos de la biomasa algal de los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* sola o cultivada en consorcio con *A. brasilense*. Sin embargo, el contenido de lípidos sí presenta una diferencia significativa entre las muestras de cada cosecha, en donde, el contenido del cultivo de la microalga sola es más del doble del contenido en el cultivo donde la microalga crecía en co-cultivo con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *A. brasilense*.

**Tabla 21. Composición promedio de las biomásas recuperadas en cada cosecha de los cultivos al exterior (promedio±DS, n=3)**

Medio de cultivo	Microorganismos	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos
		[mg.g <sup>-1</sup> biomasa microalgal]		
50% PV - 50% SAQ	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	161±36	236±48	107±18
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> + <i>A. brasilense</i>	68±17	239±99	112±9

## 5.4 Discusión

El objetivo principal de los ensayos descritos en este capítulo era concluir el estudio que se vino desarrollando a lo largo de la tesis, en el sistema de cultivo y condiciones que son pasibles de ser transferidas a los establecimientos de las pequeñas y medianas empresas de la industria quesera/láctea, es decir, condiciones externas y fotobiorreactores abiertos.

Como ya se discutió detalladamente en la Sección 3.4, acerca de cada parámetro relevante en un cultivo microalgal en general (pH, relación N:P, penetración de luz, disponibilidad de nutrientes, temperatura del medio) y de los cultivos propuestos aquí en particular, eran muchos los factores que debían mantener un complejo equilibrio para que el cultivo fuera exitoso, ya en laboratorio, aún más, en las cambiantes e incontrolables condiciones al exterior. Aun así, de acuerdo a las conclusiones arribadas en los ensayos previos, la microalga *Scenedesmus dimorphus* y el consorcio microalga-bacteria *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, eran los candidatos a evaluar en la fitorremediación de una mezcla de efluentes de la industria láctea, es decir, 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, en la que se balanceaban muchos de los factores antes mencionados.

El primer aspecto que se puso de manifiesto en los cultivos al exterior, es la diferente susceptibilidad de las microalgas a contaminaciones por otros organismos, sobre todo, cuando las condiciones ambientales y/o del medio varían. Como se describió, el cultivo de *Scenedesmus dimorphus* colapsó en cada caso en que la temperatura superó los 37°C. Como ya se discutió en la Sección 4.4, es probable que la acidez del Suero Ácido de Queso, que compone el 50% en volumen de la mezcla usada como medio de cultivo tenga una influencia muy grande en el desarrollo de esta microalga. Por otro lado, Hodaifa, Martínez et al. (2010) estudiaron la influencia de la temperatura en el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* cultivada en efluentes de un

establecimiento de procesamiento de aceitunas y reportan que el crecimiento era incremental a medida que se aumentaba la temperatura, siendo el máximo crecimiento que se registró, a una temperatura de 30°C, el cual tuvo un decrecimiento del 37% cuando la temperatura del medio fue establecida en 35°C.

Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa et al. (2010), también reportaron que *Scenedesmus* sp. tuvo un mejor desempeño que *Chlorella* sp. en los ensayos de tratamiento de efluentes realizados en laboratorio (batch), sin embargo, cuando el cultivo fue escalado y operado en un régimen semicontinuo, el mismo declinó y colapsó después de 4 ciclos, posterior a lo cual, por cuestiones prácticas, el resto de los ensayos prosiguieron con *Chlorella* sp. García Cubero (2014) reportó que, aunque *Scenedesmus vacuolatus* fue la microalga elegida para ser cultivada al exterior en función de los resultados de laboratorio, los ensayos se vieron primero limitados y luego impedidos, debido a la frecuente contaminación del cultivo hasta el colapso, por lo que, los ensayos al exterior prosiguieron con *Chlorella vulgaris*.

En coincidencia con estos resultados, en comunicaciones personales, el ecólogo Lic. Diego Osuna, quien forma parte de la Red de Microalgas (Ministerio de Agricultura 2015) y posee una consultora de tratamiento de efluentes (Osuna 2019), en la cual utiliza la tecnología de microalgas como última etapa en los establecimientos que tienen suficiente espacio para cultivos al exterior, me transmitió que en su experiencia, en los estanques microalgales, predomina la especie *Chlorella* sp. en la época estival y *Scenedesmus* sp., en la época invernal de la zona centro de nuestro país.

Independientemente de otros estudios académicos o experiencias laborales con los cuales se pueda comparar para entender los resultados aquí obtenidos, lo más relevante es insistir con la importancia de realizar los estudios preliminares en escala piloto, sobre todo cuando se trata de proponer esta tecnología para la depuración de efluentes crudos.

Durante el cultivo simultáneo de las dos especies de microalgas, una en cada estanque, y durante la primera etapa del cultivo de *Chlorella* sp., sola, en modo batch, una vez que se continuó el estudio desestimando la utilización de *Scenedesmus* sp., hubo eventos de alta temperatura y/o de bajo pH, a los que *Chlorella pyrenoidosa* respondió adaptándose y nunca llegó a estar cerca de un colapso del cultivo. Este detalle es muy importante cuando la aplicación final será en condiciones

al exterior, cambiantes, y en efluentes crudos cuya composición y características fisicoquímicas muchas veces cambian de repente, en función de cambios aguas arriba, es decir, adentro del proceso productivo y, en general, sin tener en cuenta el efecto que pueden causar en el sistema de tratamiento de efluentes.

Por otro lado, la principal razón de incorporar una bacteria en este estudio, fue la de poder armar un consorcio que permitiera reducir el valor de DQO final del efluente en mayores proporciones que lo alcanzado por el cultivo microalgal solo. Y si bien hay diferencias en la remoción de nutrientes que llegan a ser estadísticamente significativas, no representan una utilidad en el caso de aplicaciones reales, ya que *Azospirillum brasilense* se vuelve un insumo más para el proceso de tratamiento de efluentes. Como se discutió en el capítulo anterior, este medio de cultivo no es el medio de cultivo más favorable para el crecimiento bacteriano, si bien se evidencia la afectación que hace sobre la capacidad fotosintética de la microalga. Como se describió en el capítulo anterior, Secciones 4.3.4 y 4.4, este efecto fue reportado por Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010), quien cultivó el consorcio en un efluente sintético y, aún allí, no hubo aumento de la población bacteriana, sino un amesetamiento de la curva de crecimiento.

Como estudió y reportó prolíficamente Yoav Bashan y su equipo (Gonzalez and Bashan 2000, de-Bashan, Moreno et al. 2002, De-Bashan, Antoun et al. 2008), y comprobaron Perez-Garcia, De-Bashan et al. (2010) al comparar el crecimiento hetero-, mixo- y fotoautotrófico de *Chlorella* sp. con y sin *Azospirillum brasilense*, el mecanismo de interacción entre ambos microorganismos tiene que ver con afectar el sistema fotosintético, mediante al menos el ácido indol-acético liberado por la bacteria (Meza, de-Bashan et al. 2015), con lo cual, no es necesario que el crecimiento de esta última sea exponencial para poder afectar al desempeño de la microalga. Y esto se evidencia en la capacidad de la microalga de recuperarse ante una situación subóptima del medio de cultivo (como fue el descenso de pH) o de seguir creciendo cuando los nutrientes en el medio han disminuido significativamente (momentos previos a la cosecha).

En la introducción de este capítulo se mencionó al cultivo masivo de microalgas como una “agricultura” en crecimiento y la necesidad de sumar aprendizajes que permitan alcanzar los resultados que hoy alcanza la agricultura de cereales. La autora entiende que, en esa dirección, las observaciones recién descritas tienen una gran

importancia, ya que el agregado de *A. brasilense* puede ser una práctica que complementa el cultivo de la especie *Chlorella*, cuando las condiciones de cultivo sean subóptimas, tal como un cultivo extensivo de plantas superiores se complementa con fertilizantes o antibióticos ante la necesidad de recuperar el crecimiento promedio del mismo. De hecho, en el Centro de Investigación QUIMOBÍ, en situación de estar cultivando *Chlorella pyrenoidosa* en un efluente urbano (dentro del PFIP-MAE 2016 "BIOREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES MUNICIPIO GRAL. SAN MARTIN", RESOL-2018-511-APN-MCT, S.A.M.E.E.P. de la Provincia de Chaco), y ante la caída abrupta de la densidad celular del cultivo como consecuencia de una muy alta temperatura ambiente y el agregado de un efluente ácido, fue el agregado de *Azospirillum brasilense* lo que permitió levantar dicho crecimiento, cuando ni el agregado de medio sintético y estéril, agregado de CO<sub>2</sub>, ni otras maniobras funcionaron. Este comentario sirve solamente de muestra y es preciso realizar diseños específicos tendientes a obtener más información del efecto de *A. brasilense* cuando los cultivos microalgales de al menos *Chlorella* sp., “caen” por debajo de su desarrollo óptimo. Aunque esta bacteria tiene la ventaja de poder ser adquirida comercialmente en vejigas de diferentes volúmenes, con concentraciones de 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, por los mismos canales que se compran insumos agropecuarios, debido a que es utilizada como bio-inoculante de plantas terrestres hace mucho tiempo (Bashan, Holguin et al. 1993), es probable que el agregado de concentraciones adecuadas de ácido indol-3-acético (IAA), sea suficiente para promover el consumo y remoción de nutrientes del medio y favorecer el crecimiento microalgal (De-Bashan, Antoun et al. 2008, Meza, de-Bashan et al. 2015).

de-Bashan, Moreno et al. (2002) encontraron que la asociación de los microorganismos *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato, en un medio sintético y estéril, lograba remover cerca de 91% de N-NH<sub>4</sub> a las 48 h de iniciado el tratamiento en modo continuo, luego de lo cual, no solamente no se registraba mayor remoción sino una acumulación de N-NH<sub>4</sub>. Por otro lado, cuando la microalga estaba inmovilizada sola en las esferas de alginato, la remoción alcanzaba el 59% a las 24 h y luego se registraba una acumulación de esta especie química en el medio.

En este estudio, es probable que la presencia de otras bacterias para las cuales el nitrógeno amoniacal sea una fuente preferida de nitrógeno, permita lograr una mayor

remoción en 72 h, aunque también aquí sucede que existe una acumulación de N-NH<sub>4</sub> en el medio, lo que cuando *Chlorella pyrenoidosa* y *Azospirillum brasilense* son cultivadas juntas, comienza a suceder a las 48 h posteriores a la cosecha.

de-Bashan, Moreno et al. (2002) también reportaron que no hubo remoción de fósforo luego de 72 h, sino una fluctuación alrededor de los valores iniciales, sin llegar a estar por debajo de ellos. En el estudio descrito en este capítulo se observa tal fluctuación reportada por los autores mencionados. Por otro lado, se observa que si bien el consorcio microalga-bacteria logra una mayor remoción en las primeras 24 h, el porcentaje de fosfatos removidos a las 48 h no muestra diferencias significativas entre ambos cultivos, y teniendo en cuenta la importancia de realizar un cultivo con los menores tiempos de retención posibles (ya que implican menores inversiones iniciales y mantenimiento), se evidencia que la mayor remoción, en cualquier caso, se da a las 48 h y es probable que la diferencia en remoción que se logra a las 168 h no sea relevante para repagar un 250% de aumento en el tamaño de los estanques y los tiempos de retención.

En función de los resultados obtenidos en este estudio, es posible sostener que la microalga sola tiene una alta capacidad de remover los compuestos de nitrógeno y fósforo y que el tiempo de permanencia óptimo es de 48 a 72 h, dado el desbalance de especies químicas que en cada caso ocurre después.

Si consideramos que para aumentar el tiempo de retención hidráulico de 48 h a 72 h para un mismo caudal de ingreso es preciso aumentar en un 33% las dimensiones del estanque y para aumentarlo aún a 96 h el aumento de las dimensiones pasa a ser un 50%, y además recordamos que los mismos, para que la penetración de la luz sea efectiva, deben ser poco profundos, el incremento en el espacio físico que se requiere para extender el tiempo de retención hidráulica, hace que sea prohibitivo para muchos establecimientos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, para un tiempo de retención de 48 h es posible remover, en promedio, 115±32 mg.L<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub>, 61±19 mg.L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub>, 133±39 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub>, y 43% de DQO (23% en la primer cosecha y 79% en la última cosecha) de la mezcla 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso en 48 h, mediante el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en dicha mezcla. Cuando *Chlorella pyrenoidosa* y *Azospirillum brasilense* son cultivadas juntas en este medio, al cabo de 48 h es posible remover, en promedio, 151±26 mg.L<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub>,

85±15 mg.L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub>, 154±26 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub>, y 48% de DQO (38% en la primer cosecha y 78% en la última cosecha).

De todos modos, y dado que el tratamiento propuesto aquí no consigue remover los principales contaminantes evaluados por debajo de la legislación vigente para su descarga a cursos de agua, Ley N° 24.051 sobre la generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos (PEN 1993), es imperativo proseguir las investigaciones con otros microorganismos o etapas, que permitan la remoción de los contaminantes hasta sus límites permitidos de descarga. En este sentido, las bacterias *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, también reportadas como promotoras del crecimiento vegetal (Lee, Lee et al. 2014, Stritzler, Diez Tissera et al. 2018), son especies utilizadas en los procesos de bioaumentación para el tratamiento de efluentes (Semrany, Favier et al. 2012, Tuo, Yan et al. 2012). El uso de estas especies en un tratamiento de efluente municipal aumentó la eficiencia del mismo entre un 6 y 16% respecto de otras especies de bacterias comúnmente utilizadas en los procesos de digestión aeróbica (Hesnawi, Dahmani et al. 2014). Por ende, seguir en esta línea de investigación aparece como el próximo paso a dar en la búsqueda de soluciones sencillas y compactas para la depuración de efluentes agro-industriales de las pequeñas y medianas empresas.

## 5.5 Conclusión

En los ensayos descritos en este capítulo se demuestra que el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en una mezcla de efluentes de 50% PV – 50% SAQ es posible en cultivos abiertos al exterior y la utilización de la bacteria *Azospirillum brasilense* como inoculante del mismo, sobre todo en condiciones medioambientales desfavorables para los cultivos, permite una recuperación del mismo en menor tiempo que en el cultivo donde se encuentra la microalga sola.

Si bien la disminución de DQO fue significativa, los valores remanentes al final incluso, de varios ciclos de cultivo, se encuentra aún muy por encima de lo que establecen las regulaciones vigentes (PEN 1993) y por ello es preciso proseguir con ensayos que logren consorcios o condiciones de cultivo que permitan una mayor reducción y un tratamiento compacto, que pueda ser transferido a las pequeñas agro-industrias que requieren sencillez.

## **6 APROVECHAMIENTO DE LA BIOMASA ALGAL GENERADA**

### **6.1 Introducción**

Los conceptos de “bioeconomía circular” y “biorrefinería de desechos”, con la biomasa microalgal cultivada en efluentes siendo observada como una promisoría materia prima en este contexto, ya son parte de las soluciones que la comunidad científica está planteando para lograr que el crecimiento y la sustentabilidad de los procesos humanos sean simultáneamente posibles (Venkata Mohan, Dahiya et al. 2019).

El extendido uso de microorganismos en biotecnología, se debe, principalmente, a su activo metabolismo y a la posibilidad que tienen éstos de crecer en condiciones simples y de bajo costo (Vílchez, Garbayo et al. 1997), en particular, la utilización de microalgas está recibiendo hoy mucha atención. Ello se debe, como se ha indicado en la Introducción de este trabajo, a su eficiencia en convertir la energía solar en un gran número de metabolitos de interés comercial (por ejemplo, lípidos y carbohidratos para la producción de biocombustibles) pudiendo crecer en tierras no aptas para la agricultura y usando agua no potable, incluso efluentes, para su desarrollo (Chisti 2007). Inicialmente, el biodiesel era el producto principal buscado, pero desde el año 2012, un gran número de compañías comenzaron a orientarse al desarrollo de estrategias de producción, tanto de biocombustibles como de otros productos derivados de microlagas, a los efectos de alcanzar negocios rentables. Estos productos involucran nutraceuticos, productos químicos especiales y para el cuidado personal elaborados a partir de carotenos y xantófilas, proteínas y carbohidratos microalgales para diferentes usos, así como suplementos dietarios para diferentes especies animales (Borowitzka 1994).

El abanico de productos posibles de obtener, se debe, por un lado, a que la composición bioquímica de la biomasa algal puede ser manipulada variando las condiciones de crecimiento, induciendo el enriquecimiento de determinada fracción biomolecular en el cultivo que después será extraído. Por ejemplo, la limitación en el suministro de nutrientes, especialmente nitrógeno, puede aumentar el contenido de lípidos o de carbohidratos que luego pueden ser convertidos en biocombustibles (biodiesel de aceites microalgales o bioetanol de sus carbohidratos) (Hena, Fatimah et al. 2015). Por otro lado, la biomasa extraída, agotada, puede ser utilizada para

suplementar biofertilizantes o alimento animal, agregando un porcentaje de rentabilidad mayor al proceso.

Algunos de estos compuestos, conocidos como carotenos y xantófilas, son un grupo de moléculas ampliamente utilizadas como pigmentos, que en recientes estudios comenzaron a destacarse por sus propiedades antioxidantes (Singh, Kate et al. 2005, Guedes, Amaro et al. 2011, Rodic, Simonovska et al. 2012) y las microalgas son una fuente natural de éstos.

Pero para que este concepto de biorrefinería microalgal (Bharathiraja, Chakravarthy et al. 2015) acoplada al saneamiento ambiental sea posible, es necesario estudiar y establecer la mejor secuencia en el procesamiento de la biomasa para obtener máximo rendimiento de los productos que son posibles obtener de dicha biomasa (Trivedi, Aila et al. 2015).

En una primera aproximación a una biorrefinería de microalgas cultivadas en efluentes, en este capítulo se informa sobre la evaluación del rendimiento de la biomasa algal obtenida en cultivos abiertos al exterior de *Chlorella pyrenoidosa*, en la producción de lípidos (aceites, carotenoides), carbohidratos y proteínas en las condiciones del tratamiento de los efluentes de la presente tesis, así como la extracción de los lípidos utilizando solventes de bajo costo y toxicidad, ampliamente utilizados en la industria (hexano, acetona y etanol en forma secuencial). El método logra la extracción de lípidos totales de microalgas y la separación de diferentes fracciones lipídicas simultáneamente.

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Mircoorganismos (Biomasa)**

La biomasa utilizada provino de los cultivos realizados en estanques abiertos agitados al exterior, en modo semicontinuo, descritos en el Capítulo 5 de este trabajo. La misma fue obtenida luego de la separación del líquido tratado en los momentos de cosecha de los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* sola en 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso y del consorcio *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*, en el mismo medio.

También fue utilizada para esta etapa del estudio, biomasa proveniente de un cultivo de la misma cepa de *Chlorella pyrenoidosa* en estanques agitados y abiertos al exterior, utilizando efluentes cloacales urbanos del municipio de General San Martín

(Chaco), estudio que se llevó adelante simultáneamente en el Centro de Investigación QUIMOBÍ (dentro del PFIP-MAE 2016 "BIOREMEDIACIÓN DE LOS EFLUENTES MUNICIPIO GRAL. SAN MARTÍN", RESOL-2018-511-APN-MCT, S.A.M.E.E.P. de la Provincia de Chaco), de modo de comparar los perfiles de los extractivos de las diferentes biomásas (cultivadas en diferentes efluentes).

### 6.2.2 Extracción de lípidos

El contenido lipídico de la biomasa algal seca se determinó por el método de Folch, Lees et al. (1957), según se describe en la Sección 2.4.5.2.

El secado de la biomasa, previo a su extracción, se llevó a cabo en estufa de vacío a 60°C hasta obtener un peso constante. La extracción de lípidos de la biomasa algal seca, se llevó a cabo en proceso batch con solventes n-hexano, acetona y etanol calidad pro-análisis, en este orden. Consistió en colocar 1g de biomasa en un tubo de ensayo y 50mL del primer solvente en cuatro porciones, molturando la biomasa con una varilla de vidrio, luego del agregado de cada porción. La mezcla de solvente y compuestos extraídos (extractivo) obtenida con este primer solvente es separada de la biomasa y el solvente de cada extracción, recuperado mediante rotavapor. El extracto libre de solvente obtenido fue pesado y el contenido de extraíbles, en cada solvente, se expresa en porcentaje en base seca. Sobre la biomasa algal residual se repite este procedimiento con el segundo solvente y finalmente con el tercero.

La secuencia de solventes presentada, fue estudiada y puesta a punto en un trabajo que fue realizado simultáneamente al avance de esta tesis (Pila, Cuello et al. 2019), donde se realizaron extracciones de la misma biomasa con todas las posibles combinaciones de secuencia para los tres solventes. Los rendimientos del extractivo obtenido en cada caso fueron evaluados, resultando más eficiente la extracción realizada como se describió aquí.

### 6.2.3 Caracterización y separación de lípidos

La caracterización de los diferentes grupos de componentes presentes en los extractivos se realizó por cromatografía en placa delgada (TLC por sus siglas en inglés), por comparación con muestras patrón conocidas y con TLCs publicadas en la bibliografía consultada (Jaime, Rodríguez-Meizoso et al. 2010).

Los patrones adquiridos comercialmente fueron:  $\beta$ -caroteno (DRE-C11045800) y astaxantina (DRE-CA10307000) obtenidos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg,

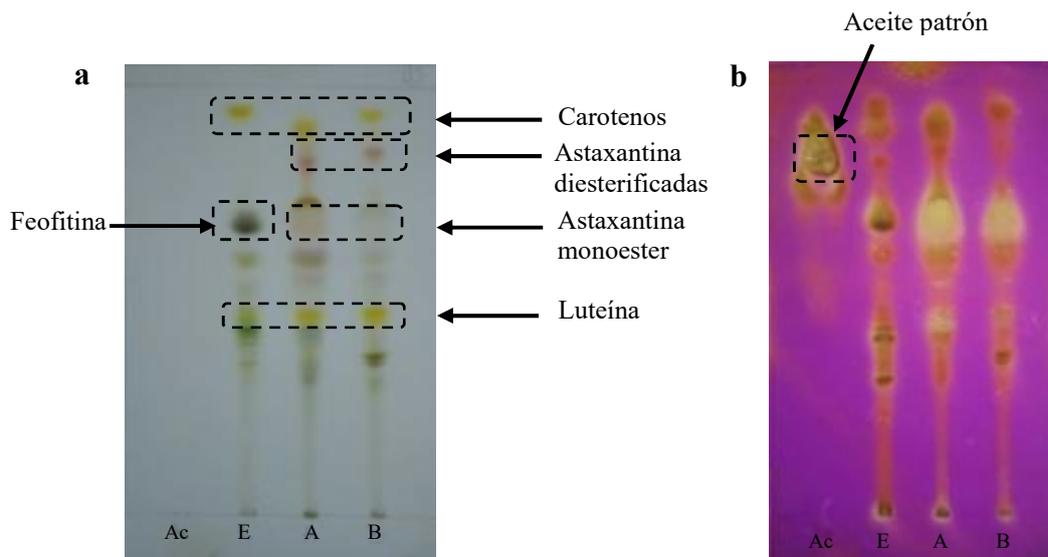
Germany). Los patrones obtenidos de sus fuentes naturales más frecuentemente mencionadas en la bibliografía fueron: licopeno, del extracto de tomate; luteína, del extracto de huevo; clorofilas y feofitina, del extracto de espinaca, y para su obtención, la metodología de extracción fue la misma que se mencionó anteriormente para las muestras, pero en este caso se separaron los patrones por cromatografía en columna (Abbott and S. 1970, Ault 1998). El patrón de aceite provino de una muestra de aceite girasol.

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

### 6.3 Resultados

Como se informó en el Capítulo anterior, en la Tabla 21, el contenido lipídico promedio, obtenido por el método de Folch, de la biomasa algal de *Chlorella pyrenoidosa*, cultivada sola en 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, fue de  $161 \pm 36 \text{ mg.g}^{-1}$  de biomasa seca, mientras que el de *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense* fue de  $68 \pm 17 \text{ mg.g}^{-1}$  (Tabla 19), en el mismo efluente, ambas cultivadas en las condiciones descritas en la Sección 6.2.1.

Esta significativa diferencia entre los contenidos lipídicos de ambas biomasas, se visualiza claramente en la Figura 40, donde se muestran las cromatografías en capa delgada (TLC), que permiten observar los componentes del extractivo lipídico de las biomasas de *Chlorella pyrenoidosa* y de *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense*. En la TLC sin revelar (Figura 40a, placa blanca) se aprecia la presencia de una gran variedad de lípidos que, como se mencionó en la Introducción de este Capítulo, tienen un alto valor comercial, por lo cual, la separación de los mismos de la biomasa, tiene un gran potencial de desarrollo; sobre todo teniendo en cuenta que la misma ha sido obtenida a partir de un proceso de depuración de efluentes. La misma TLC revelada con permanganato de potasio (Figura 40b, placa rosada) permite observar la fracción incolora de lípidos saponificables (aceites) presentes en el patrón y ausentes en estas muestras.



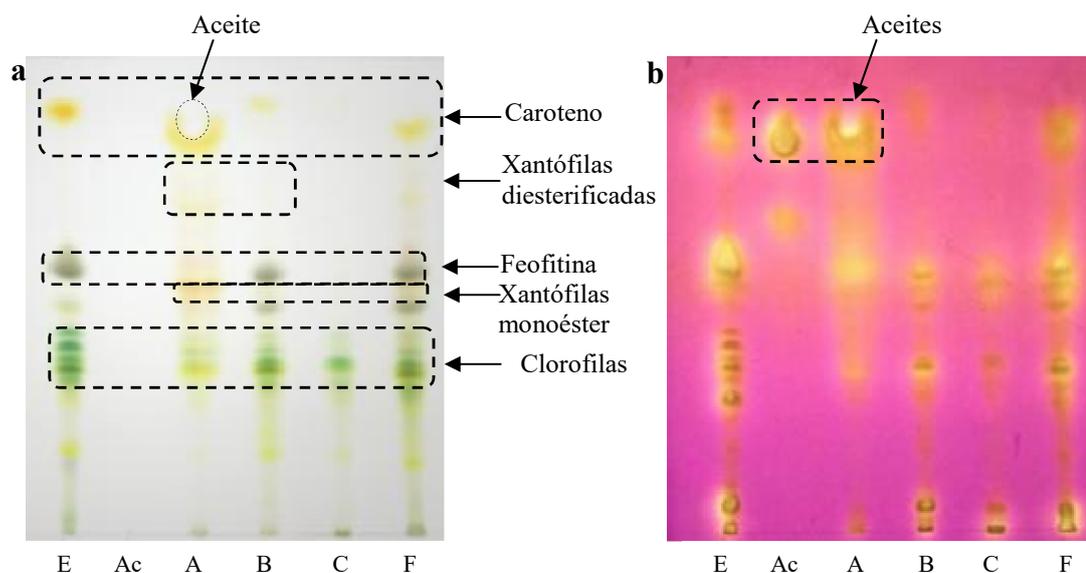
**Figura 40.** Cromatografía en capa delgada (TLC), eluidas con n-hexano:acetona (izquierda), de los patrones de aceite (Ac), de Extractivo de espinacas (E), extractos de la biomasa obtenida del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (A) y de *Chlorella pyrenoidosa* + *Azospirillum brasilense* (B) en estanques abiertos al exterior y la misma cromatografía en capa delgada (TLC), revelada con permanganato de potasio en medio ácido (derecha).

De la misma manera, como se indicó en la Sección 6.2.1, se estudió la biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en efluentes cloacales urbanos, los cuales tienen un perfil de especies químicas contaminantes distinto, alto contenido de fósforo respecto del nitrógeno, que se traduce en una relación molar de N:P = 1:93 (la relación molar de N:P de la mezcla 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso = 5,6:1.

Tabla 9). Se muestra en la Figura 41 la composición de lípidos extraídos de esta biomasa por el método de Folch y también por la técnica de extracción secuencial con solventes de diferente polaridad, detalladas en la Sección 6.2.2.

La placa revelada con permanganato de potasio (Figura 41b, placa rosada) permite observar la fracción de lípidos saponificables (aceites) presentes en las muestras que, por ser incoloros, se observan en las placas sin revelar como una esfera incolora rodeada por los carotenos (Figura 41a, placa blanca, círculo línea de puntos).

Puede observarse entonces, al comparar la Figura 40 con la Figura 41, la diferente composición, sobre todo, en el contenido de triglicéridos, prácticamente ausente en las biomásas producidas en esta tesis, en estanque abiertos al exterior y en medio 50% PV - 50% SAQ, respecto al correspondiente a la biomasa producida en efluente cloacal como medio de cultivo.



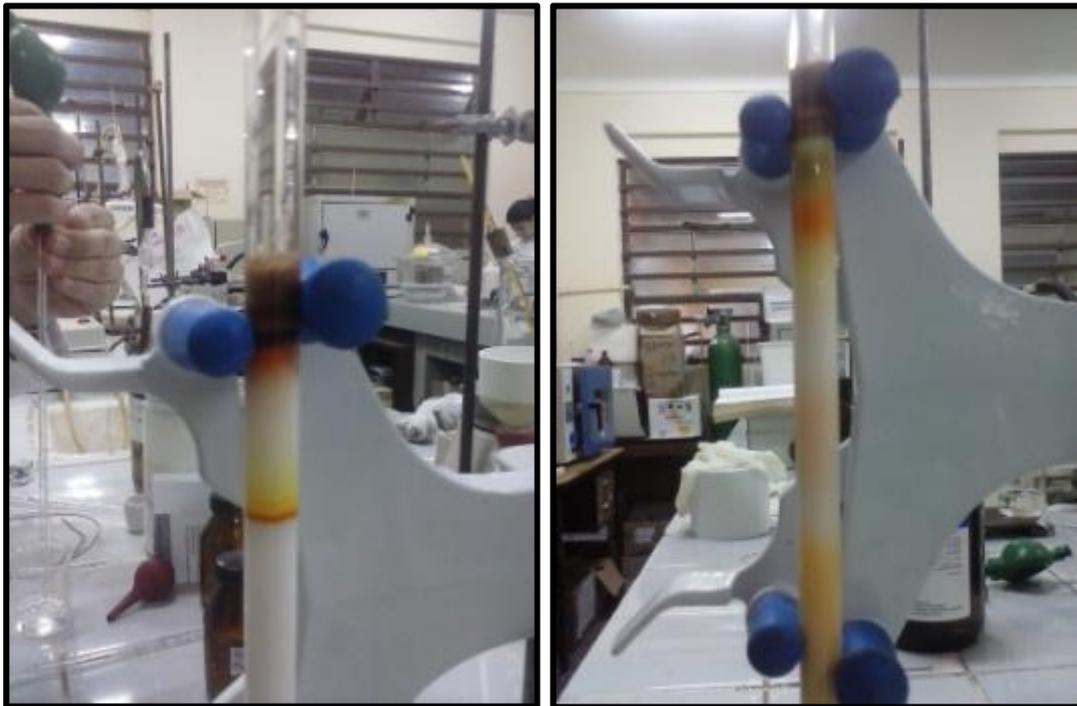
**Figura 41. Cromatografía en capa delgada (TLC) de los patrones de aceite (Ac), de Extractivo de espinacas (E), extracto de la biomasa obtenida de los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en efluentes cloacales urbanos, con hexano (A), con acetona (B) y con etanol (C) y por el método Folch (F) (izquierda) y la misma cromatografía en capa delgada (TLC), revelada con permanganato de potasio en medio ácido.**

La fracción extraída con hexano contiene principalmente los lípidos neutros, es decir aquellos que pueden ser utilizados para la generación de biocombustibles, la obtención de los tan preciados ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, los carotenos y las xantinas esterificadas. Sobre la biomasa restante, la acetona y el etanol disolvieron los lípidos polares, como la xantófilas (astaxantina, luteína), las clorofilas, los fosfolípidos y los glicolípidos, en mayor o menor grado, que se visualizan en las mismas placas sin revelar (Figura 40a y Figura 41a).

En promedio, la fracción hexánica extraída de la biomasa de *Chlorella pyrenoidosa*, cultivada sola en 50% Purín Vacuno – 50% Suero Ácido de Queso, fue de 19%, mientras que la fracción hexánica de la biomasa de *Chlorella pyrenoidosa*, cultivada en efluente cloacal, correspondió al 29% del extractivo lipídico total.

La extracción con solventes de polaridad creciente, hexano, acetona y etanol, permite lograr en simultáneo con la extracción de lípidos de la biomasa, una primera separación de las diferentes familias de lípidos presentes, de modo que el posterior fraccionamiento de cada uno de ellos, por cromatografía en columna, quede facilitado. Como se observa en la Figura 42, la separación cromatográfica de los

componentes de la fracción hexánica, permite obtener estos compuestos de alto valor, individualmente. Esta técnica ha sido desarrollada y probada en el Centro de Investigación QUIMOBIO, con biomasa microalgal, a escala laboratorio (Dagnino, Medina et al. 2014), aunque el escalamiento de la misma a nivel industrial de la Química Fina (industrias farmacéuticas, alimenticias, etc.), no difiere metodológicamente.



**Figura 42. Cromatografía en columna del extracto hexánico de biomasa microalgal, donde se observan la separación de los carotenos al inicio (izq) y de astaxantina y sus ésteres, en el desarrollo de la misma (derecha).**

En cuanto a los carbohidratos informados anteriormente, Sección 3.3.2.2 Tabla 14 y Sección 5.3.4 Tabla 21, es necesario señalar que consisten principalmente en celulosa y almidones sin lignina, por ello, pueden ser una fuente directa de carbono para la industria de la fermentación (Yen, Hu et al. 2013), como por ejemplo, la obtención de bioetanol. Por otro lado, como se informa en las Tablas mencionadas, la biomasa contiene un alto contenido de proteínas que, en conjunto con los carbohidratos, pueden servir para alimentación animal.

## 6.4 Discusión

Los contenidos lipídicos, de proteínas y carbohidratos, de las biomásas de cultivos microalgales en efluentes informados en este Capítulo, se encuentran dentro del rango reportado en la bibliografía existente (Tabla 16).

Los grupos de sustancias obtenidas por extracción secuencial de biomasa microalgal de *Chlorella pyrenoidosa* con los solventes n-hexano, acetona y etanol, evidenciaron cuali- y cuantitativamente diferentes grupos de sustancias lipídicas de interés bioenergético, alimenticio, farmacéutico y cosmético. Mediante la extracción con hexano se favoreció la recuperación de los lípidos saponificables (aceites y ésteres de xantinas) y la fracción de carotenos.

Los ésteres de astaxantina, de elevado valor comercial hoy en día, debido a sus múltiples propiedades antioxidantes, son principalmente obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Kang and Sim 2008). Pero en el caso de este estudio, las muestras del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* en 50% PV - 50% SAQ mostraron una acumulación significativa de los mismos (Figura 40a).

La biomasa agotada aún puede ser fuente de carbohidratos para la obtención de bioetanol o complemento del alimento animal (Chen, Zhao et al. 2013).

Una síntesis del diseño de proceso buscado en este trabajo, dentro del concepto de biorrefinería microalgal asociada a la depuración de efluentes, se expresa en la Figura 43.

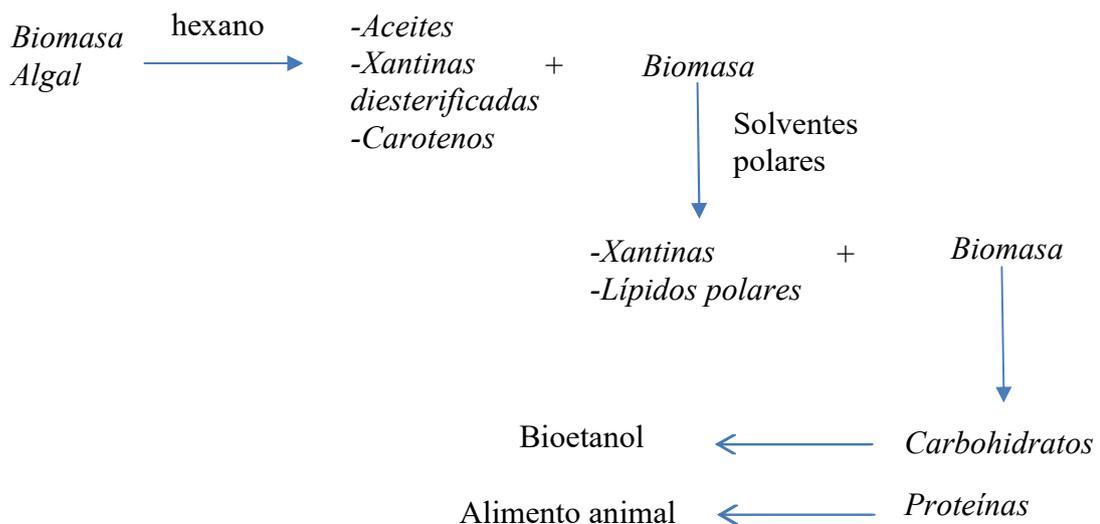


Figura 43. Biorrefinería microalgal: produciendo múltiples productos de biomasa algal

Si bien en este capítulo se presenta solamente una evaluación de la composición y el potencial de utilización de biomasa microalgales provenientes de procesos de fitorremediación de distintos efluentes, es importante expresar que, para que se alcancen los objetivos más altruistas de la bioeconomía circular en la práctica, es decir, que los bioproductos provenientes de biorrefinerías de desechos puedan competir con los productos petroquímicos, ya posicionados, es imperativo que exista un debate responsable pero disruptivo, que genere la normativa que lo permita (Venkata Mohan, Dahiya et al. 2019). Por un lado, será necesario revisar a qué efluentes llamamos peligrosos, de modo que sea posible cultivar microalgas en ellos para la utilización posterior de la biomasa, por ejemplo, es claro que no podrán utilizarse como suplemento animal microalgas que provengan de efluentes con metales pesados (Zhou, Zhang et al. 2015), sin embargo, los efluentes utilizados en este estudio, son actualmente aplicados directamente a la tierra como fertilizantes (Purín Vacuno) o como suplemento proteico de alimento animal (Suero de Queso), por lo cual es esperable, que las microalgas cultivadas allí, puedan ofrecer una biomasa con el potencial de uso para el mismo mercado.

Por ejemplo, los carotenos y xantófilas, son utilizados hoy para colorear aves y peces (salmones, canarios) de criadero, con un alto valor en el mercado.

## **6.5 Conclusión**

Dado que gran parte de nuestro país pertenece al denominado “Cordón Solar” (IEA 2012), es decir, que recibe radiación directa de entre 2000 y 3000 Kw-h.m<sup>-2</sup> por año, adecuada para el cultivo de microalgas, y que las mismas pueden ser utilizadas para alcanzar objetivos conjuntos de remoción de nutrientes de aguas residuales y obtención de metabolitos de interés comercial a partir de la biomasa algal allí cultivada, el diseño de procesos integrados donde los sistemas de tratamiento de efluentes sean productores de la materia prima de una biorrefinería microalgal es parte de un enfoque de integración para que Producción y Ambiente no sean dos ámbitos excluyentes del otro.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que *Chlorella pyrenoidosa* cultivada en efluentes de la industria láctea y en efluentes urbanos, puede proveer una biomasa rica en carotenoides, xantófilas y aceites, y que los mismos pueden ser obtenidos a partir de las fracciones de lípidos neutros y polares que se logran separar

con el método de extracción propuesto en este Capítulo, con solventes de uso comercial.

Estos resultados son muy alentadores en este momento en que, mundialmente, se persigue la producción de compuestos orgánicos de valor comercial, mediante procesos integrados, sustentables ecológicamente y rentables económicamente.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La obtención y aprovechamiento de biomasa microalgal asociados a la depuración de efluentes es una propuesta atractiva ya que puede atender varios problemas ambientales y socio-económicos globales obteniendo un rédito económico.

Este estudio, por lo tanto, se enfocó en evaluar especies microalgales y condiciones de cultivo que permitan el desarrollo de cultivos en condiciones al exterior, en dos efluentes de la industria láctea, Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso, sin esterilizar ni diluir.

En función del análisis de los resultados obtenidos en los diferentes estudios que componen la etapa experimental de esta tesis, se concluye que:

Las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella pyrenoidosa* son dos especies adecuadas para destinarlas al cultivo en mezclas de Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso y la utilización de los mismos en una mezcla de 50% de cada uno en volumen, permite equilibrar los parámetros, de cada uno, que hacen difícil o costoso su tratamiento por separado y que dificultan el crecimiento microalgal

El resultado óptimo de crecimiento microalgal y depuración simultáneas, se alcanzó en mezclas de 50% Purín Vacuno y 50% Suero Ácido de Queso (v/v).

*Chlorella pyrenoidosa* tiene una mayor resistencia a las altas temperaturas exteriores superiores a 37°C que la especie *Scenedesmus dimorphus*, cuyo cultivo al exterior, finalmente es dominado por los predadores naturales presentes (protozoarios).

El consorcio diseñado de microalga-bacteria *Chlorella pyrenoidosa*-*Azospirillum brasilense* tiene un alto potencial de complementariedad, sobre todo cuando las condiciones del ambiente no son favorables para el desarrollo de la microalga. El consorcio *Scenedesmus dimorphus*-*Azospirillum brasilense* no desarrolla un mutualismo que se evidencie en un mayor crecimiento microalgal o remoción de nutrientes.

Los resultados obtenidos luego del cultivo durante el período de un mes, en estanques abiertos agitados de 84 L y en modo semicontinuo, mostraron que la diferencia entre el cultivo de la cepa de *Chlorella pyrenoidosa* consociada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*, no es significativa en la reducción de DBO<sub>5</sub>/DQO en comparación con el cultivo control de *Chlorella pyrenoidosa* sola en una mezcla de 50% Purín Vacuno y 50% Suero Ácido de Queso.

Las cromatografías en placa (TLC) realizadas a los extractivos lipídicos de las biomásas obtenidas de los cultivos al exterior muestran una mayor producción de ésteres de astaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno para las muestras del cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* sola, en comparación con la biomasa obtenida cuando esta microalga creció consociada con la bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*. 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.

Por lo anteriormente expuesto, se ha logrado llevar a cabo exitosamente un cultivo de una cepa de microalgas que consociada 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.

Aunque este estudio muestra claramente que es posible remover cantidades significativas de especies de nitrógeno y fósforo de los efluentes Purín Vacuno y Suero Ácido de Queso, las cantidades removidas de DQO y DBO<sub>5</sub>, aún están muy por encima de la legislación vigente y por ello es preciso estudiar estas microalgas en consorcio con otras bacterias heterotróficas que puedan causar una promoción del crecimiento microalgal y de su capacidad de remoción de nutrientes del medio pero aumentando la remoción de DQO y DBO<sub>5</sub>, de modo de poder contar con un sistema compacto para las pequeñas y medianas agroindustrias.

Por otro lado, es necesario aislar las fracciones o metabolitos de interés comercial de los extractivos lipídicos para evaluar su rendimiento, en primer lugar, y la rentabilidad del proceso, en segundo lugar.

Por último y muy importante, el estudio y generación de legislación que permita la existencia y operación de una biorrefinería microalgal asociada a la depuración de efluentes, es un paso crucial a dar si hemos de avanzar en la dirección de la bioeconomía circular.

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.

Estos resultados han sido publicados en parte, entre otros, en los siguientes artículos y eventos científicos:

- M. C. Cuello, J. I. Gori, N. R. Moheimani, E. R. Chamorro (2016). "Producción de compuestos orgánicos de valor comercial a partir de la biomasa microalgal de *Scenedesmus dimorphus*". Revista Tecnología y Ciencia, Universidad Tecnológica Nacional. 30:281-289. ISSN 1666-6933.
- N. A. Pila, M. C. Cuello, E. R. Chamorro (2019). "Microalgae lipid extraction within a biorefinery approach (Fractionation)". Applied Biochemistry and Biotechnology (en prensa).
- ❖ M. C. Cuello, E. R. Chamorro, N. R. Moheimani. "Análisis preliminar del comportamiento de *Azospirillum brasilense* como promotora del crecimiento de *Scenedesmus dimorphus* para el tratamiento de efluentes combinados". Presentado (póster) en el V Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Viña del Mar (Chile). 25 al 29 de octubre de 2015. Publicado en Libro de Resúmenes (no indexado). Página 199.
- ❖ M. C. Cuello, E. R. Chamorro, N. R. Moheimani. "Culture of microalgae in mixed wastewater Streams". Presentado (oral) en el "6th Congress of the International Society for Applied Phycology". Nantes (Francia). 18 al 24 de junio de 2017. Publicación de Resumen en actas de Congreso. Print ISSN 0921-8971. Página 191.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, D. and A. R. S. (1970). Introducción a la cromatografía. Madrid, Alhambra.
- Abdel-Raouf, N., A. A. Al-Homaidan and I. B. Ibraheem (2012). "Microalgae and wastewater treatment." Saudi Journal of Biological Sciences **19**(3): 257-275.
- Abed, R. M. M. (2010). "Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons." International Biodeterioration & Biodegradation **64**(1): 58-64.
- Abeliovich, A. and Y. Azov (1976). "Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds." Applied and Environmental Microbiology **31**(6): 801-806.
- Acuner, E. and F. B. Dilek (2004). "Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*." Process Biochemistry **39**(5): 623-631.
- Adey, W. H. and L. Hackney (1989). The composition and production of tropical marine algal turf in laboratory and field experiments. The biology, ecology and mariculture of *Mithrax spinosissimus* utilizing cultural algal turfs. D. F. Farrier. Los Angeles, California, The Mariculture Institute: 1-80.
- Ahmad Latiffi, N. A., R. M. S. Radin Mohamed, N. M. Apandi and R. M. Tajuddin (2017). "Experimental assessment on effects of growth rates microalgae *Scenedesmus* sp. in different conditions of pH, temperature, light intensity and photoperiod." Key Engineering Materials **744**: 546-551.
- Amavizca, E., Y. Bashan, C.-M. Ryu, M. A. Farag, B. M. Bebout and L. E. de-Bashan (2017). "Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*." Scientific Reports **7**(1): 41310.
- Andersson, A., P. Haecky and Å. Hagström (1994). "Effect of temperature and light on the growth of micro- nano- and pico-plankton: impact on algal succession." Marine Biology **120**(4): 511-520.
- APHA (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, 22 edition.
- Aravindhan, R., J. R. Rao and B. U. Nair (2007). "Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*." Journal of Hazardous Materials **142**(1): 68-76.
- Ault, A. (1998). Chromatography. Techniques and experiments for organic chemistry. U. S. Books. U.S. **6th. ed.**: 109-136.
- Ayre, J. M., N. R. Moheimani and M. A. Borowitzka (2017). "Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations." Algal Research **24, Part A**: 218-226.
- Azov, Y. (1982). "Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures." Applied and Environmental Microbiology **43**(6): 1300.
- Azov, Y. and G. Shelef (1987). "The effect of pH on the performance of high-rate oxidation ponds." Water Science and Technology **19**(12): 381-383.
- Barlow, E., L. Boersma, H. Phinney and J. Miner (1975). "Algal growth in diluted pig waste." Agriculture and Environment **2**(4): 339-355.
- Barsanti, L. and P. Gualtieri (2006). Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Ratón, Florida, CRC Press.

- Bashan, Y. (1998). "Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture." Biotechnology Advances **16**(4): 729-770.
- Bashan, Y., G. Holguin and R. Lifshitz (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting Rhizobacteria. Methods in plant molecular biology and biotechnology. B. R. Glick and J. E. Thompson. Boca Raton, Florida, CRC Press: 331-345.
- Becker, E. W. (2007). "Micro-algae as a source of protein." Biotechnology Advances **25**(2): 207-210.
- Behrens, P. W. (2005). Photobioreactors and fermentors: The light and dark sides of growing algae. Algal culturing techniques. R. A. Andersen, Elsevier Academic Press: 189-204.
- Ben Amotz, A., T. G. Tornabene and W. H. Thomas (1985). "Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids." Journal of Phycology **21**(1): 72-81.
- 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.
- Bhatnagar, A., S. Chinnasamy, M. Singh and K. C. Das (2011). "Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters." Applied Energy **88**(10): 3425-3431.
- Borowitzka, M. (2005). Culturing microalgae in outdoor ponds. Algal culturing techniques. R. A. Andersen, Elsevier Academic Press: 205-218.
- Borowitzka, M. A. (1992). "Algal biotechnology products and processes — matching science and economics." Journal of Applied Phycology **4**(3): 267-279.
- Borowitzka, M. A. (1994). Products from algae. Algal Biotechnology in the Asia-Pacific Region. P. S.M., L. K., B. M.A. and W. B. Kuala Lumpur, Institute of Advanced Studies, University of Malaya. **1**: 5-15.
- Borowitzka, M. A. (1998). Limits to growth. Wastewater treatment with algae. Y.-S. Wong and N. Y. Tam, Springer Berlin Heidelberg: 203-226.
- Borowitzka, M. A. (2008). "Marine and halophilic algae for the production of biofuels." Journal of Biotechnology **136**, **Supplement**: S7.
- Borowitzka, M. A. and N. R. Moheimani (2013). Open pond culture systems. Algae for Biofuels and Energy. M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, Springer Netherlands. **5**: 133-152.
- Borowitzka, M. A. and N. R. Moheimani (2013). "Sustainable biofuels from algae." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 13-25.
- Bozkir, A. and O. M. Saka (2005). "Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies." Il Farmaco **60**(10): 840-846.
- Burlew, J. S. (1953). Algal culture: From laboratory to pilot plant. Washington, DC, Carnegie Institution of Washington.
- Butler, A. (1998). "Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms." Science **281**(5374): 207-210.
- Campbel, P. G. C. and P. M. Stokes (1985). "Acidification and toxicity of metals to aquatic biota." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **42**(12): 2034-2049.

Carvalho, A., C. Monteiro and F. Malcata (2009). "Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*." Journal of Applied Phycology **21**: 543-552.

Corcoran, A. A. and W. J. Boeing (2012). "Biodiversity increases the productivity and stability of phytoplankton communities." PLOS ONE **7**(11): e49397.

Craggs, R. J., P. J. McAuley and V. J. Smith (1997). "Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway." Water Research **31**(7): 1701-1707.

Croft, M. T., M. J. Warren and A. G. Smith (2006). "Algae need their vitamins." Eukaryot Cell **5**(8): 1175-1183.

Cumby, T. R., A. J. Brewer and S. J. Dimmock (1999). "Dirty water from dairy farms, I: biochemical characteristics." Bioresource Technology **67**(2): 155-160.

Curtis, P. J. and R. O. Megard (1987). "Interactions among irradiance, oxygen evolution and nitrite uptake by *Chlamydomonas* (Chlorophyceae)." Journal of Phycology **23**(4): 608-613.

Chen, C.-Y., X.-Q. Zhao, H.-W. Yen, S.-H. Ho, C.-L. Cheng, D.-J. Lee, F.-W. Bai and J.-S. Chang (2013). "Microalgae-based carbohydrates for biofuel production." Biochemical Engineering Journal **78**.

Chen, J.-J., Y.-R. Li, M.-Z. Xie, C.-Y. Chiu, S.-W. Liao and W.-L. Lai (2012). "Factorial design of experiment for biofuel production by *Isochrysis galbana*." International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering (IPCBE) **33**: 91-95.

Cheung, Y. H. and M. H. Wong (1981). "Properties of animal manures and sewage sludges and their utilisation for algal growth." Agricultural Wastes **3**(2): 109-122.

Chinnasamy, S., A. Bhatnagar, R. W. Hunt and K. C. Das (2010). "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications." Bioresource Technology **101**(9): 3097-3105.

Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnology Advances **25**(3): 294-306.

Cho, D.-H., R. Ramanan, J. Heo, J. Lee, B.-H. Kim, H.-M. Oh and H.-S. Kim (2015). "Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal-bacterial community." Bioresource Technology **175**: 578-585.

Christenson, L. and R. Sims (2011). "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts." Biotechnology Advances **29**(6): 686-702.

Dagnino, E., C. Medina, M. Beligni and E. Chamorro (2014). "Evaluación de lípidos extraídos de microalgas *Nannochloropsis oculata* para la producción de biodiesel." Revista Tecnología y Ciencia, Universidad Tecnológica Nacional **26**(1): 87-92.

Davison, I. R. (1991). "Environmental effects on algal photosynthesis: temperature." Journal of Phycology **27**(1): 2-8.

De-Bashan, L. E., H. Antoun and Y. Bashan (2008). "Involvement of indol-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*." Journal of Phycology **44**(4): 938-947.

de-Bashan, L. E. and Y. Bashan (2010). "Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects." Bioresource Technology **101**(6): 1611-1627.

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.

de-Bashan, L. E., M. Moreno, J.-P. Hernandez and Y. Bashan (2002). "Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*." Water Research **36**(12): 2941-2948.

de la Noue, J. and N. de Pauw (1988). "The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae." Biotechnology Advances **6**(4): 725-770.

Difusa, A., J. Talukdar, M. C. Kalita, K. Mohanty and V. V. Goud (2015). "Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus species*." Biofuels **6**(1-2): 37-44.

Dixon, R. K. (2013). "Algae based biofuels." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 1-4.

Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, A. Vande Broek and J. Vanderleyden (1999). "Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat." Plant and Soil **212**(2): 153-162.

Döbereiner, J., V. L. D. Baldani and J. I. Baldani (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Embrapa-SPI.

Doble, M. and A. Kumar (2005). Biotreatment of Industrial Effluents. Burlington, MA, USA, Elsevier/Butterworth-Heinemann.

DOE, U. S. (2010). National algal biofuels technology roadmap. Biomass Program. United States, Department of Energy. Report No.: DOE/EE-0332.

Dorsey, T. E., P. McDonald and O. A. Roels (1978). "Measurements of phytoplankton-protein content with the heated biuret-Folin assay." Journal of Phycology **14**(2): 167-171.

Earthscan (2007). Water for Food, Water for Life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. Map 2: Areas of physical and economic water scarcity. London, International Water Management Institute.

Fábregas, J., A. Maseda, A. Domínguez and A. Otero (2004). "The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture." World Journal of Microbiology and Biotechnology **20**(1): 31-35.

Fallowfield, H. J. and M. K. Garrett (1985). "The photosynthetic treatment of pig slurry in temperate climatic conditions: A pilot-plant study." Agricultural Wastes **12**(2): 111-136.

FAO (2012). Coping with water scarcity. An action framework for agriculture and food security. FAO Water Reports. Rome.

FAO, IFAD and WFP (2015). The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. FAO. Rome.

FAO/AQUASTAT. (2016). "Municipal wastewater production, collection, treatment and use database. AQUASTAT Main Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations." (FAO) Retrieved 2016/07/10.

Farizoglu, B., B. Keskinler, E. Yildiz and A. Nuhoglu (2007). "Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR)." Journal of Hazardous Materials **146**(1-2): 399-407.

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.

Fogg, G. E. (2001). Algal adaptation to stress -some general remarks. Algal adaptation to environmental stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms. L. C. Rai and J. P. Gaur. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1-19.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." Journal of Biological Chemistry **226**(1): 497-509.

García Cubero, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>. PhD Tesis Doctoral, Repositorio de la Universidad de Sevilla. <http://hdl.handle.net/11441/56164>.

Gerloff-Elias, A., E. Spijkerman and T. Pröschold (2005). "Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6)." Plant, Cell & Environment **28**(10): 1218-1229.

Gimmler, H. (2001). Acidophilic and acidotolerant algae. Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. L. C. Rai and J. P. Gaur. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 259-290.

Girard, J.-M., M.-L. Roy, M. B. Hafsa, J. Gagnon, N. Faucheux, M. Heitz, R. Tremblay and J.-S. Deschênes (2014). "Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production." Algal Research **5**: 241-248.

Goldman, J. C., Y. Azov, C. B. Riley and M. R. Dennett (1982). "The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **57**(1): 1-13.

Goldman, J. C. and P. M. Glibert (1982). "Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton." Limnology and Oceanography **27**(5): 814-827.

Goldman, J. C. and R. Mann (1980). "Temperature-influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **46**(1): 29-39.

Goldman, J. C., C. B. Riley and M. R. Dennett (1982). "The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **57**(1): 15-24.

Goldman, J. C. and J. H. Ryther (1976). "Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton." Biotechnology and Bioengineering **18**(8): 1125-1144.

Gonzalez-Bashan, L. E., V. K. Lebsky, J. R. Hernández, J. J. Bustillos and Y. Bashan (2000). "Change in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*." Canadian Journal of Microbiology **46**: 653-659.

Gonzalez, L. E. and Y. Bashan (2000). "Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*." Applied and Environmental Microbiology **66**(4): 1527-1531.

González, M. (2013). Utilización actual del suero de quesería. Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea. I. N. d. T. I. (INTI). Buenos Aires.

Graham, J., L. Graham and L. Wilcox (2009). Algae. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.

Grobbelaar, J. U. (2000). "Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures." Journal of Applied Phycology **12**(3): 201-206.

- Guedes, A. C., H. M. Amaro and F. X. Malcata (2011). "Microalgae as sources of carotenoids." Marine Drugs **9**(4): 625-644.
- 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.
- Hernandez, J.-P., L. E. de-Bashan, D. J. Rodriguez, Y. Rodriguez and Y. Bashan (2009). "Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils." European Journal of Soil Biology **45**(1): 88-93.
- Hesnawi, R., K. Dahmani, A. Al-Swayah, S. Mohamed and S. A. Mohammed (2014). "Biodegradation of municipal wastewater with local and commercial bacteria." Procedia Engineering **70**: 810-814.
- Hillebrand, H. and U. Sommer (1999). "The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal." Limnology and Oceanography **44**: 440-446.
- Hodaifa, G., M. E. Martínez and S. Sánchez (2010). "Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium." Engineering in Life Sciences **10**: 257-264.
- Hoffmann, J. P. (1998). "Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae." Journal of Phycology **34**(5): 757-763.
- Horan, N. J. (1990). Biological wastewater treatment systems, theory and operation. Chichester, England, John Wiley and Sons.
- IEA (2012). Water for Energy, Is Energy Becoming a Thirstier Resource? World Energy Outlook. Paris, France, International Energy Agency.
- Jaime, L., I. Rodríguez-Meizoso, A. Cifuentes, S. Santoyo, S. Suarez, E. Ibáñez and F. J. Señorans (2010). "Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae." LWT-Food Science and Technology **43**(1): 105-112.
- Johnson, K. and W. Admassu (2013). "Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **88**: 992-998.
- Kang, C. D. and S. J. Sim (2008). "Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils." Biotechnology Letters **30**(3): 441-444.
- Karentz, D. and T. J. Smayda (1984). "Temperature and seasonal occurrence patterns of 30 dominant phytoplankton species in Narragansett Bay over a 22-year period (1959-1980)." Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER **18**: 277-293.
- Kay, R. A. (1991). "Microalgae as food and supplement." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **30**(6): 555-573.
- Kebede-Westhead, E., C. Pizarro and W. W. Mulbry (2004). "Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: elemental composition of algal biomass at different manure loading rates." Journal of agricultural and food chemistry **52**(24): 7293-7296.
- Ketchum, B. H. (1939). "The development and restoration of deficiencies in the phosphorus and nitrogen composition of unicellular plants." Journal of Cellular and Comparative Physiology **13**(3): 373-381.
- Khalaf, M. A. (2008). "Biosorption of reactive dye from textile wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp." Bioresource Technology **99**(14): 6631-6634.

- Kim, B.-H., R. Ramanan, D.-H. Cho, H.-M. Oh and H.-S. Kim (2014). "Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction." Biomass and Bioenergy **69**: 95-105.
- Klyachko-Gurvich, G. L., L. N. Tsoglin, J. Doucha, J. Kopetskii, I. B. Shebalina and V. E. Semenenko (1999). "Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity." Physiologia Plantarum **107**(2): 240-249.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Physiological and Biochemical Methods. Handbook of phycolgical methods. J. Stein. London, Cambridge University Press. **2**: 95-97.
- Kothari, R., V. V. Pathak, V. Kumar and D. P. Singh (2012). "Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production." Bioresource Technology **116**(0): 466-470.
- Laliberté, G., D. Proulx, N. De Pauw and J. de la Noüe (1994). "Algal technology in wastewater treatment." Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse der Limnologie **42**: 283-302.
- Larkum, A. W. (2010). "Limitations and prospects of natural photosynthesis for bioenergy production." Current Opinion in Biotechnology **21**(3): 271-276.
- Lebsky, V., L. Gonzalez-Bashan and Y. Bashan (2001). "Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*." Canadian Journal of Microbiology **47**: 1-8.
- Lee, J., D. H. Cho, R. Ramanan, B. H. Kim, H. M. Oh and H. S. Kim (2013). "Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*." Bioresource Technology **131**: 195-201.
- Lee, S.-W., S.-H. Lee, K. Balaraju, K.-S. Park, K.-W. Nam, J.-W. Park and K. Park (2014). "Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions." Acta Physiologiae Plantarum **36**(6): 1353-1362.
- Long, S. P., S. Humphries and P. G. Falkowski (1994). "Photoinhibition of photosynthesis in nature." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **45**(1): 633-662.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." Journal of Biological Chemistry **193**(1): 265-275.
- Ma, X., W. Zhou, Z. Fu, Y. Cheng, M. Min, Y. Liu, Y. Zhang, P. Chen and R. Ruan (2014). "Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system." Bioresource Technology **167**: 8-13.
- Mallick, N. (2002). "Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review." Biometals **15**(4): 377-390.
- Mara, D. D. and H. Pearson (1986). Artificial freshwater environment: waste stabilization ponds. Biotechnology. H. J. Rehm and G. Reed, Verlagsgesellschaft: 177-206.
- Marré, E. (1962). Temperature. Physiology and biochemistry of algae. R. A. Lewin. New York, Academic Press: 541-550.
- Marungrueng, K. and P. Pavasant (2006). "Removal of basic dye (Astrazon Blue FGRL) using macroalga *Caulerpa lentillifera*." Journal of Environmental Management **78**(3): 268-274.

- Mata, T. M., A. A. Martins and N. S. Caetano (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(1): 217-232.
- Mawson, A. J. (1994). "Bioconversions for whey utilization and waste abatement." Bioresource Technology **47**(3): 195-203.
- Menetrez, M. Y. (2012). "An overview of algae biofuel production and potential environmental impact." Environmental Science & Technology **46**(13): 7073-7085.
- Mercz, T. (1994). A study of high lipid yielding microalgae with potential for large-scale production of lipids and polyunsaturated fatty acids. PhD Thesis, Murdoch University.
- Meseck, S. L. (2007). "Controlling the growth of a cyanobacterial contaminant, *Synechococcus* sp., in a culture of *Tetraselmis chui* (PLY429) by varying pH: implications for outdoor aquaculture production." Aquaculture **273**(4): 566-572.
- Meseck, S. L., J. H. Alix and G. H. Wikfors (2005). "Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429)." Aquaculture **246**(1): 393-404.
- Meza, B., L. E. de-Bashan and Y. Bashan (2015). "Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*." Research in Microbiology **166**(2): 72-83.
- Ming, T. T., K. T. Hyun and J. L. Myun (2007). "Characterization of livestock wastewater at various stages of wastewater treatment plant." Malaysian Journal of Analytical Sciences **11**: 23-28.
- Ministerio de Agricultura, G. y. P., Presidencia de la Nación. (2015). "<https://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/microalgas/>." Antena de Vigilancia Tecnológica en Microalgas.
- Moheimani, N. (2013). "Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) in bag photobioreactors." Journal of Applied Phycology **25**(1): 167-176.
- Moheimani, N. R., M. A. Borowitzka, A. Isdepsky and S. Fon Sing (2013). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. Algae for Biofuels and Energy. M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, Springer Netherlands. **5**: 265-284.
- Moheimani, N. R. and D. Parlevliet (2013). "Sustainable solar energy conversion to chemical and electrical energy." Renewable and Sustainable Energy Reviews **27**(0): 494-504.
- Moss, B. (1973). "The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: III. effects of temperature, vitamin requirements and inorganic nitrogen compounds on growth." Journal of Ecology **61**(1): 179-192.
- Mouget, J.-L., A. Dakhama, M. C. Lavoie and J. de la Noüe (1995). "Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?" FEMS Microbiology Ecology **18**(1): 35-43.
- Muñoz, R. and B. Guieysse (2006). "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review." Water Research **40**(15): 2799-2815.
- Murray, R., P. Phillips and J. Bender (1997). "Degradation of pesticides applied to banana farm soil: comparison of indigenous bacteria and a microbial mat." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(1): 84-90.

Nalewajko, C., B. Colman and M. Olaveson (1997). "Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus strains*." Environmental and Experimental Botany **37**(2): 153-160.

Natarajan, M. and T. J. Varghese (1980). "Studies on the effects of poultry manure, digested sewage sludge cake and cow-dung on the growth rate of *Catla catla* (Hamilton) and *Cyprinus carpio* var. communis (Linnaeus)." Agricultural Wastes **2**(4): 261-271.

Nelson, J. R., S. Guarda, L. E. Cowell and P. B. Heffernan (1992). "Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30 °C." Aquaculture **106**(3): 357-377.

Nixdorf, B., H. Krumbeck, J. Jander and C. Beulker (2003). "Comparison of bacterial and phytoplankton productivity in extremely acidic mining lakes and eutrophic hard water lakes." Acta Oecologica **24**: S281-S288.

Nwoba, E. G., J. M. Ayre, N. R. Moheimani, B. E. Ubi and J. C. Ogbonna (2016). "Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion pigery effluent." Algal Research **17**: 268-276.

OECD (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook. OECD Agriculture statistics (database); Version 1 - Last updated: 02-Jun-2016.

OECD/FAO (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. OECD Publishing. Paris.

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.

Osuna, D. O. (2019). "<http://www.efluentes.com/>."

Oswald, W. J. (1977). Determinants of feasibility in bioconversion of solar energy. Research in Photobiology. A. Castellani. Boston, MA, Springer US: 371-383.

Oswald, W. J. (1988a). Large-scale algal culture systems (engineering aspects). Microalgal biotechnology. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka. Cambridge, Cambridge University Press. **1**: 357-394.

Oswald, W. J. (1988b). Micro-algae and waste-water treatment. Microalgal biotechnology. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka. Cambridge, Cambridge University Press. **1**: 305-328.

Oswald, W. J. (1988c). Role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. Algae and Human Affairs. C. A. Lembi and J. R. Waaland. Cambridge, Cambridge University Press. **1**: 255-281.

Oswald, W. J. (2003). "My sixty years in applied algology." Journal of Applied Phycology **15**(2-3): 99-106.

Oswald, W. J. and H. B. Gotaas (1957). "Photosynthesis in sewage treatment." Transactions of the American Society of Civil Engineers **122**(1): 73-97.

Otero, A. (2014). Tratamiento de efluentes en un tambo comercial. EEA. General Villegas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Parhad, N. M. and N. U. Rao (1974). "Effect of pH on Survival of *Escherichia coli*." Journal (Water Pollution Control Federation) **46**(5): 980-986.

Park, J. B. K., R. J. Craggs and A. N. Shilton (2011). "Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production." Bioresource Technology **102**(1): 35-42.

Payer, H. D., Y. Chiemvichak, K. Hosakul, C. Kongpanichkul, L. Kraidej, M. Nguitragul, S. Reungmanipytoon and P. Buri (1980). Temperature as an important climatic factor during mass production of microscopic algae. Algae Biomass. G. Shelef and C. J. Soeder. Amsterdam, Elsevier/North- Holland Biomedical Press. **1**: 389-399.

PEN (1993). Ley N° 24.051. Residuos peligrosos. Argentina, Poder Ejecutivo Nacional. **Ley N° 24.051**.

Perez-Garcia, O., L. E. De-Bashan, J.-P. Hernandez and Y. Bashan (2010). "Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*." Journal of Phycology **46**(4): 800-812.

Pila, N. A., M. C. Cuello and E. R. Chamorro (2019). "Microalgae lipid extraction within a biorefinery approach (Fractionation)." Applied Biochemistry and Biotechnology (**en prensa**).

Prajapati, S. K., P. Choudhary, A. Malik and V. K. Vijay (2014). "Algae mediated treatment and bioenergy generation process for handling liquid and solid waste from dairy cattle farm." Bioresource Technology **167**(0): 260-268.

Prajapati, S. K., P. Kaushik, A. Malik and V. K. Vijay (2013). "Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges." Biotechnology Advances **31**(8): 1408-1425.

Prazeres, A. R., F. Carvalho and J. Rivas (2012). "Cheese whey management: A review." Journal of Environmental Management **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.

Ramanan, R., B.-H. Kim, D.-H. Cho, H.-M. Oh and H.-S. Kim (2016). "Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications." Biotechnology Advances **34**(1): 14-29.

Raven, J. A. and R. J. Geider (1988). "Temperature and algal growth." New Phytologist **110**(4): 441-461.

Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda and F. Bux (2011). "Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production." Applied Energy **88**(10): 3411-3424.

Redfield, A. C. (1958). "The biological control of chemical factors in the environment." American Scientist **46**: 205-221.

Renaud, S. M., L.-V. Thinh, G. Lambrinidis and D. L. Parry (2002). "Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures." Aquaculture **211**(1): 195-214.

Riaño, B., S. Blanco, E. Becares and M. C. García-González (2016). "Bioremediation and biomass harvesting of anaerobic digested cheese whey in microalgal-based systems for lipid production." Ecological Engineering **97**: 40-45.

Richmond, A. and N. Zou (1999). Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms, Dordrecht, Springer Netherlands.

Rodic, Z., B. Simonovska, A. Albrecht and I. Vovk (2012). "Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements." Journal of Chromatography A **1231**: 59-65.

- Rodríguez Cáceres, E. A. (1982). "Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp." Applied and Environmental Microbiology **44**(4): 990-991.
- Ruiz-Marin, A., L. G. Mendoza-Espinosa and T. Stephenson (2010). "Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater." Bioresource Technology **101**(1): 58-64.
- Semrany, S., L. Favier, H. Djelal, S. Taha and A. Amrane (2012). "Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs)." Biochemical Engineering Journal **69**: 75-86.
- Servicio Meteorológico Nacional, S. (2018). "Descarga del Catálogo de Datos Abiertos del SMN." Retrieved Consultado por última vez 30/10/2019.
- Sheehan, J., T. Dunahay, J. Benemann and P. Roessler (1998). "A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from algae." National Renewable Energy Laboratory Report NREL/TP-580-24190.
- Shimizu, Y. (1993). "Microalgal metabolites." Chemical Reviews **93**(5): 1685-1698.
- Sienkiewicz, T. and C.-L. Riedel (1990). Whey and whey utilization. Germany, Verlag Th. Mann.
- Singh, J. and S. Gu (2010). "Commercialization potential of microalgae for biofuels production." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(9): 2596-2610.
- Singh, S., B. N. Kate and U. C. Banerjee (2005). "Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview." Critical Reviews in Biotechnology **25**(3): 73-95.
- Siso, M. I. G. (1996). "The biotechnological utilization of cheese whey: A review." Bioresource Technology **57**(1): 1-11.
- Sivasubramanian, V. and M. Muthukumar (2012). "Large scale phycoremediation of oil drilling effluent." Journal of Algal Biomass Utilization **3**(4): 5-17.
- Slavov, A. K. (2017). "General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater. A review." Food Technology & Biotechnology **55**(1): 14-28.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert (2006). "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and Bioengineering **101**(2): 87-96.
- Stein, J. R. (1973). Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods, Cambridge University Press.
- Stritzler, M., A. Diez Tissera, G. Soto and N. Ayub (2018). "Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* FR1 secretes a novel type of extracellular polyhydroxybutyrate polymerase involved in abiotic stress response in plants." Biotechnology Letters **40**(9-10): 1419-1423.
- Subashchandrabose, S. R., B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu and R. Naidu (2011). "Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential." Biotechnology Advances **29**(6): 896-907.
- Suminto, H. K. (1997). "Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae." Hydrobiologia **358**: 223-230.
- Tao, R., V. Kinnunen, R. Praveenkumar, A.-M. Lakaniemi and J. A. Rintala (2017). "Comparison of *Scenedesmus acuminatus* and *Chlorella vulgaris* cultivation in liquid digestates from anaerobic digestion of pulp and paper industry and municipal wastewater treatment sludge." Journal of Applied Phycology **29**(6): 2845-2856.

Tchobanoglous, G. and F. L. Burton (1991). Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse. New York, McGraw-Hill.

Tejayadi, S. and M. Cheryan (1995). "Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor." Applied Microbiology and Biotechnology **43**(2): 242-248.

Teoh, M.-L., W.-L. Chu, H. Marchant and S.-M. Phang (2004). "Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae." Journal of Applied Phycology **16**(6): 421-430.

Terry, K. L., J. Hirata and E. A. Laws (1983). "Light-limited growth of two strains of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **68**(3): 209-227.

Thomas, W. H., T. G. Tornabene and J. Weissman (1984). Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. Final subcontract report, ; Solar Energy Research Inst., Golden, CO (USA): Medium: ED; Size: Pages: 54.

Thompson, P. A., P. J. Harrison and J. N. C. Whyte (1990). "Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton." Journal of Phycology **26**(2): 278-288.

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.

Tuo, B.-h., J.-b. Yan, B.-a. Fan, Z.-h. Yang and J.-z. Liu (2012). "Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil." Bioresource Technology **107**: 55-60.

UN (2010). Water Scarcity and Humanitarian Action: Key Emerging Trends and Challenges. Occasional Policy Briefing Series. UN Office for the Coordination of Humanitarian Affairs (OCHA), Policy Development and Studies Branch.

UNESCO (2012). Managing water under uncertainty and risk. . The United Nations World Water Development Report 4. Paris, France. **1**.

Unnithan, V. V., A. Unc and G. B. Smith (2014). "Mini-review: A priori considerations for bacteria-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters." Algal Research **4**(0): 35-40.

Van Den Hende, S., H. Vervaeren and N. Boon (2012). "Flue gas compounds and microalgae:(Bio-) chemical interactions leading to biotechnological opportunities." Biotechnology advances **30**(6): 1405-1424.

Venkata Mohan, S., S. Dahiya, K. Amulya, R. Katakajwala and T. K. Vanitha (2019). "Can circular bioeconomy be fueled by waste biorefineries — A closer look." Bioresource Technology Reports **7**: 100277.

Vidyashankar, S. and G. A. Ravishankar (2016). Algae-based bioremediation: bioproducts and biofuels for biobusiness. Bioremediation and Bioeconomy. M. N. V. Prasad, Elsevier: 457-493.

Vidyashankar, S., K. S. Venu Gopal, V. S. Chauhan, S. P. Muthukumar and R. Sarada (2014). "Characterisation of defatted *Scenedesmus dimorphus* algal biomass as animal feed." Journal of Applied Phycology **27**(5): 1871-1879.

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.

- Walsh, B. P., S. N. Murray and D. T. J. O'Sullivan (2015). "The water energy nexus, an ISO50001 water case study and the need for a water value system." Water Resources and Industry **10**(0): 15-28.
- Wang, L., Y. Li, P. Chen, M. Min, Y. Chen, J. Zhu and R. R. Ruan (2010). "Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp." Bioresource Technology **101**(8): 2623-2628.
- Wang, R., S. Xue, D. Zhang, Q. Zhang, S. Wen, D. Kong, C. Yan and W. Cong (2015). "Construction and characteristics of artificial consortia of *Scenedesmus obliquus*-bacteria for *S. obliquus* growth and lipid production." Algal Research **12**: 436-445.
- Wilkie, A. C. and W. W. Mulbry (2002). "Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae." Bioresource Technology **84**(1): 81-91.
- Woertz, I. (2007). Lipid productivity of algae grown on dairy wastewater as possible feedstock for biodiesel. M.Sc. Thesis, California Polytechnic University.
- Xu, X., Y. Shen and J. Chen (2015). "Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production." Electronic Journal of Biotechnology **18**: 46-50.
- Yen, H.-W., I. C. Hu, C.-Y. Chen, S.-H. Ho, D.-J. Lee and J.-S. Chang (2013). "Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products." Bioresource Technology **135**: 166-174.
- 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.
- Zhao, X., Y. Zhou, S. Huang, D. Qiu, L. Schideman, X. Chai and Y. Zhao (2014). "Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production." Bioresource Technology **156**(0): 322-328.
- Zhou, Q., P. Zhang, G. Zhang and M. Peng (2015). "Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: effects of photoperiod." Bioresource Technology **190**: 196-200.