

Doctorado en Ingeniería

Mención en Ciencia y Tecnología de Alimentos



Universidad Nacional
de **Entre Ríos**

Resumen extendido de Tesis

"Ficorremediación de efluentes de la industria avícola mediante el empleo de la microalga *Scenedesmus obliquus* aislada del Embalse de Salto Grande"

Doctoranda: M.Sc. Ing. Mariana Jiménez Veuthey

Directora: Dra. María Luján Flores

Co-directora: Dra. Luz Marina Zapata

Los efluentes de la actividad avícola presentan altas concentraciones de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, los que provocan eutrofización de aguas superficiales y subterráneas, además de afectar la calidad atmosférica y poner en peligro la salud de las personas. Las plantas depuradoras de agua residual cuentan con distintos tratamientos para disminuir la materia orgánica presente en el agua de desecho. Sin embargo, la remoción de nitrógeno y fósforo requiere de procesos adicionales que implican mayores costos energéticos. Una alternativa a las tecnologías convencionales es la ficorremediación, que consiste en el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO₂ del agua residual. Esta tecnología es más económica, versátil y sencilla. En este contexto, el objetivo de la tesis doctoral fue evaluar la capacidad de crecimiento y de ficorremediación de la microalga *Scenedesmus obliquus* en efluentes de la industria avícola con el fin de obtener agua apta para su vertido a las cuencas receptoras.

Para ello, considerando los objetivos particulares que constituyeron las metas a alcanzar durante la tesis, se realizó el aislamiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* a partir del Embalse Salto Grande, generando y optimizando las condiciones operacionales de cultivo apropiadas para su crecimiento a escala laboratorio empleando efluente avícola como medio de cultivo, buscando maximizar la producción de biomasa; se evaluó la capacidad de la especie en la ficorremediación de efluentes de la industria avícola empleando un fotobiorreactor raceway a escala piloto; se caracterizó la biomasa microalgal obtenida, se evaluó su citotoxicidad y su capacidad antimicrobiana.

En el estudio se utilizó como inóculo la microalga *Scenedesmus obliquus* (IOAC081F), aislada por nuestro grupo de investigación del Embalse Salto Grande, en Entre Ríos, República Argentina (Jiménez-Veuthey et al., 2018). La identidad de la cepa aislada fue confirmada mediante claves taxonómicas y técnicas moleculares (análisis de secuencias del fragmento codificante para el ARNr 18S, Macrogen, Korea), mostrando una correspondencia de identidad del 99 % con *S. obliquus*.

Las condiciones apropiadas de crecimiento se obtuvieron simulando a escala laboratorio, las condiciones ambientales naturales de dónde provino la microalga. Para ello, primero se caracterizaron los parámetros ambientales y físicoquímicos de muestras de agua del Embalse Salto Grande. Con esa información se formuló el medio de cultivo Allen y Arnon enriquecido con nitrato de sodio, adaptando las condiciones de temperatura, humedad e irradiancia/fotoperiodo en la cámara de cultivo (MGC-400H, China). Las condiciones de cultivo optimizadas fueron: 25±1 °C, HR 65 %, iluminación con 6 lámparas fluorescentes de 36 W y ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad. Bajo estas condiciones, mediante repiques periódicos, se conservó la cepa que constituyó el inóculo para los ensayos.

El efluente avícola que se utilizó como medio de cultivo para la microalga y se remedió, provino de la industria avícola “Las Camelias S.A.” ubicada en la ciudad de San José, Entre Ríos, Argentina (32°11'45,2" S, 58°11'02,5" O), con quién se firmó un convenio único de colaboración entre la FCAL (UNER) y la Empresa. La caracterización del efluente incluyó ensayos físicoquímicos y microbiológicos: determinación de Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, DQO, carbono orgánico total, nitrógeno total, NTK, nitrógeno amoniacal, nitrato, fósforo total, fósforo reactivo disuelto, pH, conductividad eléctrica, recuento de bacterias coliformes totales y de *Escherichia coli*. Una vez caracterizado el efluente, se evaluó la capacidad de ficorremediación de *Scenedesmus obliquus* y se determinaron las condiciones operacionales, esto es tiempo de retención hidráulica (TRH) y tasa de dilución ($D = \text{TRH}^{-1}$), para alcanzar un sistema de cultivo continuo. Para ello, se diseñó una batería de 12 biorreactores tipo columna de burbujeo en las que se ensayaron 4 tasas de

dilución, desde 0,20 a 0,35 día⁻¹. Cada biorreactor, conteniendo el efluente avícola, fue inoculado al 20 % con la cepa microalgal y se observó la evolución de acuerdo al recuento celular, densidad óptica, nitrógeno total, fósforo total, DQO, recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*, pH y conductividad eléctrica (Jiménez-Veuthey et al., 2019, 2020). Con las mejores condiciones obtenidas en cuanto a productividad de biomasa y eficiencia de remediación, se procedió al escalado a planta piloto. Los resultados de esta etapa demostraron que la mayor productividad de biomasa (0,57 g_{biomasa} L⁻¹día⁻¹) se alcanzó con la tasa de dilución D= 0,30 día⁻¹. Sin embargo, la mayor eficiencia de eliminación de nutrientes se obtuvo a una D= 0,20 día⁻¹, alcanzando una remoción superior al 80 % para NT y PT, 90 % para DQO y 99 % para *E. coli*. Utilizando la D= 0,20 día⁻¹, se lograron rendimientos de coeficiente de nutrientes de hasta 41 mg_N/g_{biomasa} y 32,32 mg_P/g_{biomasa} (Jiménez-Veuthey et al., 2020).

Como se indicó antes, el escalado a planta piloto se realizó en un biorreactor raceway de 60 m³ de capacidad localizado en las instalaciones de la Planta de Tratamiento de Efluentes de “Las Camelias S.A.”, previo escalado a un biorreactor raceway más pequeño de 6 m³ de capacidad, localizado en la misma industria. Las muestras de efluentes que alimentaron el biorreactor fueron colectadas cada 3 meses, durante un año, de la laguna facultativa N° 2 de “Las Camelias S.A.”, con el fin de simular las cuatro estaciones anuales. En cada lote se cuantificó Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, DQO, carbono orgánico total, nitrógeno total, NTK, nitrógeno amoniacal, nitrato, PT, fósforo reactivo disuelto, pH, conductividad eléctrica, bacterias coliformes totales y *Escherichia coli*.

Antes de comenzar el experimento semicontinuo, el reactor raceway se operó en modo discontinuo durante una semana para aclimatar las microalgas en el biorreactor. La agitación del cultivo, a razón de 0,2 m s⁻¹, se realizó empleando una rueda con paletas accionada por un motor eléctrico. La radiación solar (PAR) incidente sobre el cultivo se obtuvo a partir de mediciones de radiación solar *in situ*, mientras que la temperatura exterior media se registró de la “Estación Meteorológica Automática San José”, Entre Ríos. El control del caudal del efluente avícola a la entrada del raceway se realizó a razón de 12 m³ día⁻¹ durante 12 h, empleando una válvula de control automático (Cepex L10, España). Así, durante el período semicontinuo, la tasa de dilución fue de 0,20 día⁻¹, equivalente a un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 5 días. La misma tasa de dilución fue empleada en las 4 estaciones. La evaporación en el reactor se compensó con la adición diaria de medio fresco. Las condiciones operativas de cada estación se mantuvieron hasta alcanzar un estado estacionario estable (valores constantes de peso seco de biomasa y absorbancia a 680 nm). En cada estado estacionario, se tomaron muestras a la salida del raceway y se filtró el cultivo obteniéndose dos corrientes: el efluente depurado y la biomasa microalgal. Al primero se le realizaron las mismas determinaciones que al efluente de entrada, lo que permitió evaluar la calidad del agua de salida, además de conocer el consumo de nutrientes (Jiménez-Veuthey et al., 2022). La biomasa microalgal obtenida en todos los casos, fue liofilizada y conservada para su caracterización química y evaluación de citotoxicidad y actividad antimicrobiana. Los resultados de este ensayo anual a escala piloto evidenciaron una importante influencia estacional sobre el tratamiento terciario y la productividad de biomasa. Así, las condiciones óptimas para la remoción de contaminantes y bacterias en el efluente avícola fueron observadas en verano, siendo el pH promedio de 7,5, la irradiancia de 5078 μE m⁻²s⁻¹ y la temperatura de 21,0 °C. Bajo estas condiciones, la productividad máxima de biomasa fue de 17 ± 2 g m⁻²d⁻¹ y la reducción máxima de NT, PT y DQO del 90, 53 y 77 %, respectivamente. En cuanto a la eficiencia de eliminación de bacterias, resultó superior al 95 % (Jiménez-Veuthey et al., 2022).

La caracterización de la biomasa y determinación de actividad biológica, se realizó estacionalmente según la **Figura 1**.

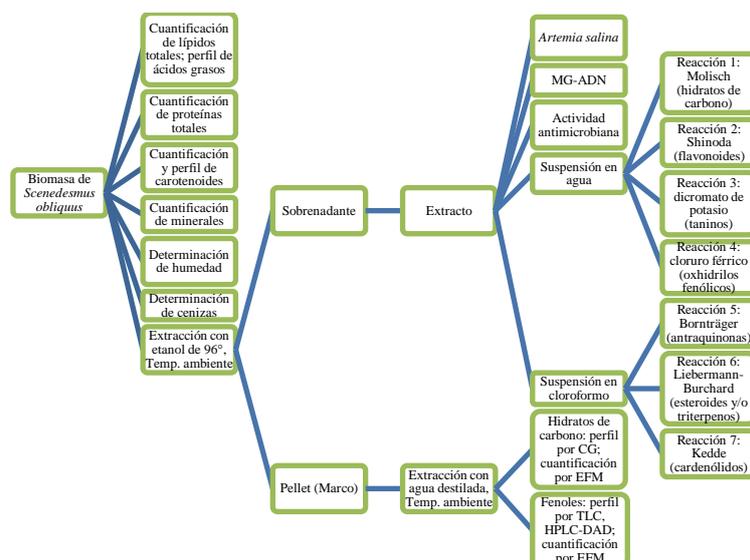


Figura 1. Protocolo de caracterización y determinación de actividad biológica de *Scenedesmus obliquus*.

La composición química de la biomasa mostró variaciones estacionales; los resultados se expresan en g/100 g. El contenido total de lípidos fue del 6,8, 5,7, 5,3 y 6,0 %, en primavera, verano, otoño e invierno, respectivamente. De los principales ácidos Omega-3, se identificó el ácido α -linolénico (ALA), el cual se destacó en otoño, 2,2 %, y no se detectó en primavera. Las proteínas representaron un 33, 30, 32 y 20 %, en primavera, verano, otoño e invierno, respectivamente. Para esas estaciones, los carotenoides totales representaron el 0,20, 0,10, 0,05 y 0,12 %, mostrando el perfil en orden decreciente de contenido, luteína, β -caroteno, zeaxantina, violaxantina. En otoño no se detectó β -caroteno; en cambio, al igual que en verano, se cuantificó cataxantina.

Con respecto a los hidratos de carbono, representaron 25, 14, 9 y 15 % en primavera, verano, otoño e invierno. En primavera el perfil por CGL, previa hidrólisis y derivatización, mostró ramnosa, 66 %, acompañada de galactosa, xilosa, glucosa, arabinosa y manosa; en verano prevaleció la fucosa, 36 %, seguida de ramnosa, manosa, galactosa, glucosa y xilosa (16, 17, 12, 11 y 8 %); en otoño fucosa y ramnosa fueron los principales (42 y 25 %), y en invierno se destacó ramnosa, 36 %, además de fucosa, manosa, galactosa con restos de arabinosa, glucosa, xilosa. Los fenoles representaron 3,7, 3,1, 0,9 y 2,5 %, en primavera, verano, otoño e invierno, destacándose ácidos fenólicos y flavonoides en los perfiles cromatográficos planares (TLC) y de HPLC-DAD.

El contenido de Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe y Mn, expresados en mg L⁻¹, fueron: primavera: 659, 9162, 11720, 3404, 171, 1211 y 103; verano: 766, 5996, 10527, 3253, 417, 7318 y 307; otoño: 896, 1231, 4249, 2317, 292, 3986 y 192; invierno: 3417, 6445, 10187, 2254, 1074, 11332 y 932.

La citotoxicidad sobre la *Artemia salina*, bioensayo monitor para la búsqueda de sustancias antitumorales, fue importante en todas las estaciones con una DL₅₀ entre 19,3 y 63,6 μ g/ml; además en otoño se destacó intercalación en el ADN de tipo dosis dependiente. Ramnosa y fucosa así como los principales fenoles evidenciados, guardan relación con estos resultados. En cambio, la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (29213), *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) y *Enterococcus faecalis* (29212), resultó negativa en todas las estaciones.

Los resultados de esta Tesis constituyen bases sólidas para la producción de *Scenedesmus obliquus* a escala semi-industrial. La recuperación de nutrientes de las aguas de desecho mediante la biotransformación de contaminantes, genera una biomasa de alto valor para múltiples aplicaciones; a la vez, permite el tratamiento de los efluentes industriales antes de su disposición final contribuyendo así al cumplimiento de las normas de vertido.