

BIORREMEDIACIÓN DEL LAGO LUGANO DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES POR ALGAS UNICELULARES – ESTUDIOS PRELIMINARES

Andrea Trentini¹, María Daniela Groppa², Myriam Zawoznik³, Roxana Bigi⁶, Patricia Eleonora Perelman⁴ y Patricia Laura Marconi⁵

¹ becaria CONICET, Univ. Maimónides, Hidalgo 775, C1405BCJ, Buenos Aires, Argentina TE 4905-124.9 trentini.andrea@maimonides.edu

^{2, 3 y 4} jefe de trabajos prácticos FFyB, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. TE 4982-8797. mgroppa@ffyb.uba.ar; myriamz@ffyb.uba.ar

^{2 y 5} Investigadoras adjuntas CONICET,

⁴ Profesional Principal CONICET, Museo Argentino de Ciencias Naturales, A. Gallardo 470, DJR 1405, Buenos Aires, Argentina, UCES. Directora de la Maestría en Estudios Ambientales. Paraguay 1338. patriperelman@gmail.com

⁵ Profesora titular CEBBAD, Univ. Maimónides, Hidalgo 775, C1405BCJ, Buenos Aires, Argentina TE 4905-1249, marconi.patricialaura@maimonides.edu

⁶ APRA-CIFA Av. Castañares y Escalada s/n. Villa Soldati, Buenos Aires, Argentina; roxanabigi@gmail.com

Resumen

La biorremediación consiste en el uso de diferentes organismos para el saneamiento ambiental. El presente trabajo investiga la utilización de microalgas como sistema modelo de biorremediación del agua contaminada proveniente del lago Lugano en la Ciudad de Buenos Aires.

Durante esta primera etapa de desarrollo experimental, se optimizó el crecimiento de cultivos de *Chlorella vulgaris*, libres o inmovilizadas en sustratos inertes, para el tratamiento del agua contaminada en escala de laboratorio. También se analizó el cocultivo con una bacteria que promueve el crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense*) en sistemas de inmovilización, y se estudió el escalado a biorreactores. El escalado del cultivo de *Chlorella* inmovilizada en perlas de alginato a biorreactor utilizando agua del lago Lugano permitió la disminución de la concentración de fósforo total, plomo, cadmio, cobalto y cromo, mostrando su potencial para ser empleada en procesos integrados que busquen la remoción de solutos de estas aguas.

Palabras clave: biorremediación, *Chlorella*, *Azospirillum*, bioreactor, microalgas

Abstract

Bioremediation relies on the use of different organisms for environmental sanitation. This work investigates the use of microalgae as a model system for the bioremediation of contaminated water from Lugano Lake, in the City of Buenos Aires.

During this first stage of our experimental approach, the growth of *Chlorella vulgaris*, free or immobilized inside alginate beads, was optimized for the treatment of contaminated water at a laboratory scale. The cocultivation of the microalgae in the inert substrate with the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* was also studied, as well as the scaling to bioreactors. We found that *Chlorella vulgaris* cells immobilized in alginate beads allowed a strong decrease in total phosphorus, lead, cadmium, cobalt and chromium concentrations in Lugano lake water, showing the potential of this microalgae to be used in integrated processes intended to remove solutes from contaminated waters.

Keywords: bioremediation, *Chlorella*, *Azospirillum*, bioreactor, microalgae

Resumo

A biorremediação consiste no uso de diferentes organismos para o saneamento ambiental. O presente trabalho investiga o uso de microalgas como um sistema modelo de biorremediação de água contaminada do Lago de Lugano, na cidade de Buenos Aires. Durante este primeiro estágio de desenvolvimento experimental, o crescimento de culturas de *Chlorella vulgaris*, livres ou imobilizadas em substratos inertes, foi otimizado para o tratamento de água contaminada em escala laboratorial. O cocultivo também foi analisado com uma bactéria que promove o crescimento de plantas (*Azospirillum brasilense*) em sistemas de imobilização, ea escalada para biorreatores foi estudada. Dimensionamento da cultura de *Chlorella* imobilizada em esferas de alginato de bioreactor utilizando Lugano lago água permitiu diminuição total de fósforo, o chumbo, o cádmio, o cobalto e o crômio, mostrando o seu potencial para ser usado em processos integrados que procuram remoção solutos dessas águas.

Palavras-chave: biorremediação, *Chlorella*, *Azospirillum*, biorreator, microalgas

Introducción

La actividad antropogénica genera grandes cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos no biodegradables, que a menudo son desechados sin tratamiento previo al medio ambiente. En la Ciudad de Buenos Aires, la Agencia de Protección Ambiental - APRA- dependiente del Gobierno de la Ciudad ha detectado en el lago Lugano desperdicios provenientes de efluentes industriales y contaminación cloacal, así como diversos compuestos inorgánicos; todo ello impacta negativamente sobre este espejo de agua.

El lago Lugano es clave en el marco de un proyecto del Gobierno porteño para desarrollar un área protegida dentro de la Ciudad, con un centro educativo y de investigación. Se trata del parque Lugano, sito en el barrio de Villa Soldati: este comprende 40 hectáreas con senderos y el lago artificial, que se conecta con el arroyo Cildáñez, el cual integra la cuenca Matanza-Riachuelo.

Los monitoreos periódicos del APRA indican que este lago es hipereutrófico, con gran cantidad de nutrientes, en particular, de fósforo y nitrógeno, lo que favorece el desarrollo de grandes floraciones algales, con el consiguiente agotamiento de los niveles de oxígeno disuelto. En las últimas décadas, se ha tomado conciencia de la importancia de aumentar la protección de los recursos naturales y de remediar los sitios contaminados, a fin de mantener los servicios ecosistémicos.

Numerosos autores han estudiado esta problemática y cómo abordarla (He et al., 2013, Chekroun et al., 2014, Bashan et al. 2008 y 2010). Entre las tecnologías a probar, la inmovilización de biomasa se presenta como una alternativa potencialmente aplicable a espacios abiertos para su posterior remoción, evitando la eutrofización del sistema. Los soportes que se han utilizado para la inmovilización de biomasa microbiana son diversos; cabe citar entre ellos el alginato, el agar, la celulosa y el sílica-gel entre otros. El alginato es una matriz de polisacáridos especialmente útil para la elaboración de cápsulas esféricas, comúnmente denominadas “perlas”. Tras el período de biorremediación, estas perlas pueden removerse con facilidad del sitio contaminado (Covarrubias et al., 2012).

Por otra parte, se han obtenido resultados interesantes en el tratamiento de aguas residuales combinando bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum* con microalgas del género *Chlorella* (Bashan et al., 2008, 2010).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar si estas tecnologías basadas en el aprovechamiento de diversos tipos de microorganismos podrían ser útiles en la biorremediación del lago Lugano de la Ciudad de Buenos Aires.

Métodos

Microorganismos: Cultivo unialgal de *Chlorella vulgaris*, provisto por la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. *Azospirillum brasilense* cepa Az39 cedido por el IMYZA, INTA- Castelar.

Evaluación de medios de cultivo para Chlorella vulgaris

Cultivos mixotróficos: medio salino Detmer (DM) para algas verdes (Watanabe, 1960) con la adición de sacarosa (1 % o 5 %) o medio Bristol modificado (MBM) sin nitratos, con sacarosa (3 %) y diferentes combinaciones de extracto de levadura y/o cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (Watanabe, 1960).

Cultivo heterotrófico: medio salino MS, con el agregado de sacarosa (3 %) y suplementado con el regulador de crecimiento AIA (ácido indol acético, 1 mg/L), en oscuridad (Murashigue y Skoog, 1962).

Los diferentes medios de cultivo se dispensaron en Erlenmeyers de 250 mL (50 mL en cada uno) y se mantuvieron en agitación constante (100 rpm) para su oxigenación. Las incubaciones se realizaron a 24 ± 2 °C, con fotoperíodo de 16 horas en iluminación PAR para los cultivos mixotróficos. El crecimiento se evaluó mediante peso fresco de biomasa y recuento en cámara de Neubauer.

Coinmovilización y multiplicación microbiana

Se analizó la cinética del crecimiento de *Chlorella* y de *Azospirillum* en medio DM suplementado con 5 % de sacarosa, inmovilizados por separado o juntos en perlas de alginato, efectuando recuentos y estimaciones de biomasa, para el cálculo de la tasa relativa de crecimiento (RGR), la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (dt) (Marconi et al., 2014).

Coinmovilización como estrategia de biorremediación

Para estudiar la posible ventaja de coinmovilizar células de *Azospirillum brasilense* junto con células de *Chlorella vulgaris* en perlas de alginato en la biorremediación de

aguas residuales, se preparó un “agua residual sintética”, obtenida mediante el agregado de 30 µg NH₄/mL y 8 µg P/mL al DM con 5 % de sacarosa. Luego, en esta agua se probaron los siguientes tratamientos:

- (i) células de *C. vulgaris* inmovilizadas en perlas de alginato.
- (ii) células de *A. brasilense* cepa Az39 inmovilizadas en perlas de alginato.
- (iii) coinmovilización de células de *C. vulgaris* y de *A. brasilense* Az39 en perlas de alginato.
- (iv) perlas de alginato sin microorganismos (control negativo).

En cada ensayo se utilizaron 100 perlas de alginato cada 100 mL de agua residual sintética. El experimento se desarrolló en condiciones mixotróficas durante 12 días, a 24± 2°C. Periódicamente se realizaron recuentos de células en las perlas y análisis químicos (amonio y fósforo) en el agua, a fin de determinar la supervivencia de los microorganismos y su eficiencia en la eliminación de estos contaminantes inorgánicos. El amonio se determinó espectrofotométricamente utilizando el kit para determinación de urea en sangre (Wiener, Argentina); el fósforo se determinó mediante una modificación del método de Kurtz y Bray (1945).

Técnica de inmovilización de células en perlas de alginato

Para obtener las perlas de alginato con microorganismos, se mezcló una solución de alginato de sodio al 2 % con una suspensión celular de *Chlorella vulgaris* (2x10⁶ cél/mL) crecida en MS con sacarosa y/o de *Azospirillum brasilense* cepa Az39 (1x10⁶ cél/mL) crecida en medio OAB en relación 1:1:20 (alga:bacteria:alginato). Las mezclas así obtenidas se hicieron gotear sobre una solución de CaCl₂ (0.1M) utilizando una jeringa de 50 mL, con una salida de 2 mm de diámetro. Las esferas formadas se incubaron durante 1 h, para luego lavarlas con solución fisiológica antes de ser agregadas a los erlenmeyers. En la elaboración de las perlas que actuarían como control negativo se empleó agua destilada estéril en reemplazo del volumen de suspensión celular.

Crecimiento en biorreactor del alga inmovilizada en perlas de alginato

Estos estudios se efectuaron en fermentador tipo tanque agitado (Minifors, Infors HT®, Switzerland) con un vaso de 2 L y agitación por propeler marino (100 rpm), con sistema de control de pH y aireación por burbujeo (sparger), con agua autoclavada (ALL-a) y no autoclavada (ALL). El autoclavado se efectuó a 1 MPa, 20 min. A los 14 días se estimó

la velocidad de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (dt) y la tasa relativa de crecimiento (RGR) según Marconi y col. (2014), que se compararon con los observados en medio MS suplementado con sacarosa (3 %), en heterotrofía. Estos sistemas se desarrollaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. En todos los casos, las muestras de agua se tomaron del sector correspondiente a las coordenadas $34^\circ40'50.80''\text{S}$ y $58^\circ26'44.10''\text{O}$.

Para determinar el número final de células del alga, se disolvieron 10 perlas de alginato de cada tratamiento en bicarbonato de sodio al 4 % (p/v) a temperatura ambiente, con posterior centrifugación a 2500 rpm. En alícuotas de 200 μL de sobrenadante se cuantificó el número de células de *Chlorella vulgaris* en una cámara de Neubauer (Bashan et al., 2008).

Efecto biorremediador del alga sobre el agua del lago Lugano

Para evaluar el efecto biorremediador se analizaron los siguientes parámetros en el agua: turbidez (NTU), nitritos (mg/l), nitrógeno amoniacal (mg/l), fósforo total ($\mu\text{g/l}$), conductividad ($\mu\text{S/cm}$), pH, fosfatos y nitratos. Todos ellos fueron dosados utilizando las técnicas estándar descritas por APHA (1998), antes y después del tratamiento con *Chlorella*. Los metales pesados fueron analizados a partir de muestras digeridas con ácido nítrico concentrado (relación 10:1) y destilado en un digestor por microondas (Speedwave de Berghof). Los digestos se analizaron mediante espectrometría de absorción atómica (Analyst 800 de Perkin Elmer). Para determinar plomo, cadmio y arsénico se empleó la técnica electrotérmica o de horno de grafito; para cromo, cobre y zinc, la técnica de espectrometría de llama.

Se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se aplicó el test de Tukey (1953) con un nivel de significancia del 95 %. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

Los primeros ensayos tendieron a optimizar las condiciones de cultivo del alga. El crecimiento poblacional en medio de cultivo DM suplementado con 5 % sacarosa permitió duplicar el cultivo en 1 día, esta fue la mayor tasa de multiplicación obtenida (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo diferentes condiciones de cultivo.

	CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO						HETEROTRÓFICO
	DM		MBM sin nitrato				MS 3%
sacarosa (%)	1 %	5 %	3%	3% +EL ^(a)	0%+ EL+ 0,125 g N ^(b) / L	0%+ EL + 0,5 g N ^(b) /L	
μ (d ⁻¹)	0,202*	0,930*	0,163*	0,403*	0,328	0,351	0,219
td (d)	3	1	4	2	2	2	3

DM: medio Detmer

MBM: medio Bristol modificado, sin nitrato

^(a)EL: extracto de levadura (0,1 g/L)

^(b)N: nitrógeno suministrado como NH₄Cl

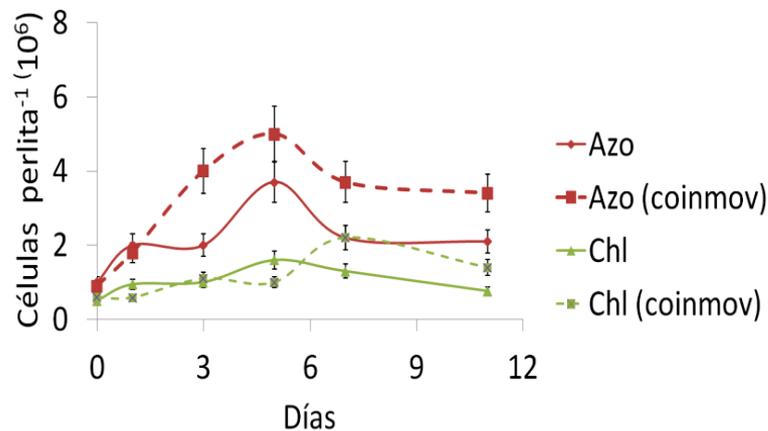
Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Aunque el cultivo puede fotosintetizar, el efecto de agregar un suplemento carbonado mejoró sensiblemente el rendimiento, siendo mayor cuanto más sacarosa se agregó al medio. De este modo, se observó que el tiempo necesario para duplicar la biomasa fue 3 veces mayor en el medio con menor contenido de sacarosa.

Se verificó que el extracto de levadura, en ausencia de sacarosa, se comportó como una fuente de carbono (además de nitrógeno) para *Chlorella*, aumentando solo en un día el tiempo de duplicación con respecto al observado en DM con sacarosa 5%. La adición de cloruro de amonio en distintas concentraciones no afectó mayormente la multiplicación del alga, demostrando que el factor crítico es la disponibilidad de carbono (tabla 1). Se advierte, por otra parte, que bajo heterotrofia la multiplicación del alga es más lenta que en cultivo mixotrófico (misma tabla).

Una vez definido el DM con sacarosa (5 %) como medio óptimo para el crecimiento del alga, se realizó una cinética de crecimiento para evaluar el crecimiento de *Chlorella* y de *Azospirillum* inmovilizados en perlas de alginato, juntos o separados, durante 11 días (Fig. 1).

Figura 1: Cinética de crecimiento de *C. vulgaris* y *A. brasilense* inmovilizados en perlas de alginato.
Las perlas se colocaron en DM suplementado con 5 % de sacarosa, bajo mixotrofia

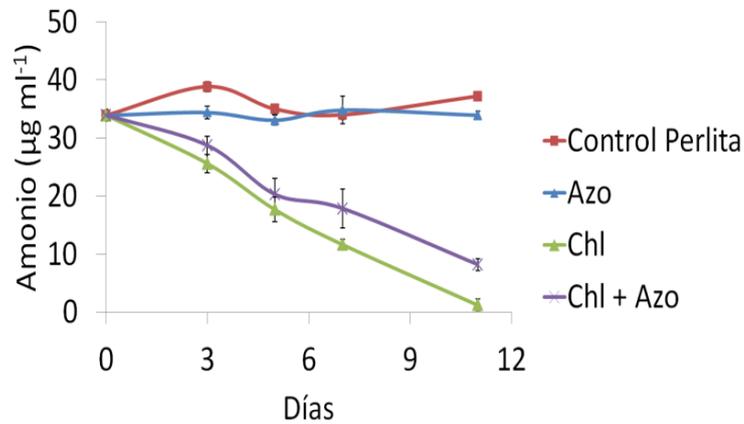


Azo: *Azospirillum brasilense*
Chl: *Chlorella vulgaris*

Las algas se multiplicaron en DM suplementado con 5 % de sacarosa, alcanzando su máximo número alrededor del día 5 en el monocultivo y en el día 7 en el sistema coimovilizado. *Azospirillum* también pudo multiplicarse en dicho medio alcanzando el máximo en el día 5 de incubación, tanto en el monocultivo como coimovilizado (Fig. 1). Ambos microorganismos alcanzaron la mayor concentración bajo el sistema de coimovilización, lo que demuestra un efecto estimulador mutuo, no sólo de la bacteria sobre el alga.

La figura 2 muestra que la concentración de amonio no se vio modificada por la presencia de la bacteria o el control negativo (perlas de alginato). En cambio, el monocultivo del alga o la coimovilización del alga con la bacteria permiten disminuir en forma significativa la concentración de amonio en el agua residual de manera sostenida desde el inicio del ensayo. La asociación entre ambos microorganismos es menos efectiva para la remoción del amonio que el cultivo del alga sola en las perlas de alginato. La determinación de fosfato no tuvo la sensibilidad necesaria para generar conclusiones válidas.

Figura 2. Remoción de amonio del agua residual sintética en condiciones mixotróficas, en presencia de células inmobilizadas en perlas de alginato.



Control perlita: perlas sin microorganismos

Azo: *Azospirillum brasilense*

Chl: *Chlorella vulgaris*

Teniendo en cuenta la eficiencia que demostró el alga inmobilizada en este sustrato inerte para eliminar el amonio presente en el agua sintética, se llevaron a cabo ensayos en biorreactores. La cinética de crecimiento se basó en muestreos diarios de 10 perlas de alginato a lo largo de 14 días, donde se cuantificó el número de células inmobilizadas en cada bioproceso (Tabla 2).

Tabla 2: Parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris* inmobilizada en perlas de alginato, en biorreactores.

	MS 3% sacarosa	ALL-a	ALL
RGR	73,3*	17,6*	9,7*
μ (d ⁻¹)	0,214*	0,122*	0,090*
dt (d)	3	6	8

Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

RGR: Tasa específica de crecimiento (μ),

μ : velocidad de crecimiento

dt: tiempo de duplicación

ALL-a: agua del lago Lugano autoclavada (mixotrofia)

ALL: agua del lago Lugano sin autoclavar (mixotrofia).

El medio de cultivo MS con 3% de sacarosa fue el más adecuado para generar biomasa en condiciones heterotróficas, con un tiempo de duplicación de 3 días. La cinética de crecimiento en el biorreactor fue la misma que la obtenida en erlenmeyers con el mismo medio (Tablas 1 y 2). Este resultado era esperado, ya que el escalado se realizó siguiendo el cociente de transferencia de oxígeno (kLa) previamente calculado en condiciones ideales.

El agua proveniente del lago Lugano permitió el crecimiento del alga, y cuando esta fue primero autoclavada (ALL-a), el alga llegó a números mayores que en el agua sin autoclavar (ALL), posiblemente debido al efecto competitivo por los nutrientes disponibles por parte de la microbiota presente en el último caso, o bien por otras interacciones. Estos resultados se reflejan en los valores de tasa de crecimiento relativo de biomasa (RGR), tasa de crecimiento absoluto (μ) y tiempo de duplicación (dt) (Tabla 2). La tasa de producción de biomasa en el ALL-a fue del 24% respecto de la obtenida en el medio MS con sacarosa (datos no mostrados). El tratamiento del agua del lago Lugano (autoclavada o no autoclavada) con el alga no modificó significativamente los parámetros fisicoquímicos estudiados, a excepción del contenido de fósforo, que disminuyó alrededor de 5 veces en el agua autoclavada y no se detectó en el agua no autoclavada (Tabla 3). Esta diferencia podría deberse al consumo de este nutriente por parte de la microbiota presente en el agua.

Finalmente, se pudo observar que en presencia de *Chlorella* hubo una reducción en la concentración de plomo (90%); cadmio (65%); cobalto (más de 50%) y cromo (50%). De esta manera, el contenido de metales en el agua queda dentro de los valores admisibles propuestos por la American Public Health Association (APHA, 2005) (Tabla 3).

Tabla 3: Evaluación del efecto biorremediador de *Chlorella vulgaris* sobre el agua del lago Lugano en biorreactores.

	bioproceso en biorreactor		ALL (valores iniciales)	Valores de referencia
	ALL-a	ALL		
pH	8.3	8.4	9	
Nitritos (mg/L)	9.6	9.8	1.5	
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	0.8	1.1	1.5	
Fòsforo total (µg/L)	152	12	724	
Hierro (ppm)	0,1	0,3	0,30	0,3
Cobalto (ppm)	<0,05	ND	0,08	ND
Plomo (ppm)	16,0	6,0	165,00	50,0
Cadmio (ppm)	<2	<2	4,00	10,0

ALL: agua del lago Lugano sin autoclavar (mixotrofia).

ALL-a: agua del lago Lugano autoclavada (mixotrofia)

Conclusiones

Los resultados de esta investigación muestran el potencial de *Chlorella vulgaris*, una microalga aislada de un ambiente natural de nuestro país, para ser empleada en procesos integrados que busquen la remoción de solutos de aguas residuales y la posible generación de energías renovables.

Bibliografía

APHA (2005). Standard methods for the examination of water and waste water, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC.

Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K. y Bustillos J.J. (2002) Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae

Chlorella spp. when coimmobilized in alginate beads with the microalgae-growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol* 48: 514–521

Bashan L.E. & Bashan Y. (2008) Joint Immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant–bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol* 74: 6797–6802

Bashan L.E & Bashan Y. (2010) Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technol* 101: 1611–1627

Covarrubias S.A., LE. de-Bashan, M.M. y Bashan Y. (2012) Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2669–2680

Chekroun Kaoutar, B., Sánchez, E. y Baghour. M. (2014) The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *International Research Journal of Public and Environmental Health* 1: 19-32

He P.J., Mao B., Lü F., Shao L.M., Lee D.J. y Chang J.S The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters *Bioresource Technology* 146 (2013) 562–568

Kurtz, L.T. & Bray R.H. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45

Marconi P.L., Alvarez M. A., Klykov S. P. y Kurako V. V. (2014) Application of a mathematical model for production of recombinant antibody 14D9 by *Nicotiana tabacum* cell suspension batch culture. *BioProcess International*, 12: 42-49

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497

Tukey J.W. (1953). Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans NY Acad Sc Ser II* 16:88-97

Watnabe A. (1960) List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol 6.