



## Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado

Roa Parra Alba Lucía <sup>1</sup>, Cañizares Villanueva Rosa Olivia <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Facultad de Salud. Universidad de Pamplona. Colombia.

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México

### Resumen

El uso de las microalgas, como sistema biológico alternativo para el tratamiento de las aguas domésticas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su capacidad de remover cantidades significativas de nitratos, fosfatos y materia orgánica. Además la biomasa producida representa una fuente potencial de alimento, químicos y pigmentos, entre otros productos de interés. En este trabajo se estudió la remoción de nitratos y fosfatos del medio de cultivo Bold utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado en alginato de calcio, como una nueva alternativa tecnológica de remoción. Se trabajó con dos fotorreactores air-lift en condiciones controladas de temperatura (20°C), flujo de aire (1 L/min), a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 250  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , durante un periodo de 8 días. Para el seguimiento del crecimiento se llevaron a cabo determinaciones diarias de nitratos, fosfatos y pigmentos. Así mismo, se verificó la viabilidad de la microalga en las microesferas de alginato a lo largo del proceso. Mediante el sistema en estudio se logró en el día 8, una remoción del 60% de la cantidad inicial de nitratos, mientras que los fosfatos disminuyeron en un 47%. En el día 2 se alcanzó la mayor producción de clorofila a (6.5 mg/l) y para carotenos el valor más alto también se alcanzó este mismo día (12.7 mg/L). El examen de viabilidad de la microalga mostró resultados positivos al observarse al microscopio formación de un número importante de cenobios, tres días después de la inoculación en medio Bold de las células extraídas de las microesferas, concordante con un color verde intenso en los cultivos.

**Palabras clave:** *Scenedesmus incrassatulus*, nitratos, fosfatos, biorremediación, inmovilización,

### Bio-remediation of water with phosphates and nitrates using immobilized *Scenedesmus incrassatulus*

### Abstract

The use of microalgae, as an alternative biological system for the treatment of domestic water has been the subject of numerous investigations due to their ability to remove significant amounts of nitrates, phosphates and organic matter. Besides, the produced biomass represents a potential source of food, chemicals and pigments, among other products of interest. In this research, it was studied the removal of nitrates and phosphates from the cultivation medium "Bold" using immobilized *Scenedesmus incrassatulus* in calcium alginate as a new alternative removal technology. Two air-lift photo-reactors were used under controlled conditions of temperature (20 °C), air flow (1 L / min), a photon flux density (PFD) from 250  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , over a period of 8 days. To monitor the growth, daily determinations of nitrates, phosphates and pigments were carried out. Thus, it was also verified the feasibility of microalgae in microspheres alginate throughout the process. Through the system under study, it was achieved on day 8, a removal of 60% of the initial amount of nitrates while phosphates decreased by 47%. On day 2, the highest production of chlorophyll a (6.5 mg / l) was reached and the highest value of carotenoids (12.7 mg / L) was also reached. Three days after the inoculation in the Bold's Basal Medium of the cells extracted from the microspheres, the feasibility test of Microalgae showed positive results by



72

observing under the microscope the formation of large number of cenobies with a bright green on the cultivation.

**Keywords:** *Scenedesmus incrassatulus* , nitrates, phosphates immobilization, bioremediation.

### **Biorremediação de águas com fosfatos e nitratos usando imobilizado *Scenedesmus incrassatulus***

#### **Resumo**

O uso de micro-algas, como sistema alternativo para o tratamento biológico de águas residuais domésticas tem sido objecto de numerosos estudos devido à sua capacidade para remover quantidades significativas de nitratos, fosfatos e matéria orgânica. Além disso, a biomassa produzida é uma potencial fonte de alimentação, produtos químicos e pigmentos, entre outros produtos de interesse. Neste trabalho, a remoção de nitratos e fosfatos do meio de cultura usando *Scenedesmus incrassatulus* Negrito imobilizada em alginato de cálcio como uma tecnologia alternativa para a remoção. Photoreactors trabalhou com dois air-lift com temperatura controlada (20 ° C), o fluxo de ar (1 l / min), uma densidade de fluxo de fótons (PFD) 250  $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante um período de 8 dias. Para o acompanhamento do crescimento foram realizadas determinações diárias de nitratos, fosfatos e corantes. Do mesmo modo, verificada a viabilidade da microalga em microesferas de alginato durante o processo. Utilizando o sistema em estudo foi realizado no dia 8, a remoção de 60% da quantidade inicial de nitratos, fosfatos, enquanto diminuiu em 47%. No dia 2 de produção aumentada alcançada clorofila a (6,5 mg / l) e para a maior caroteno também alcançar esse mesmo dia (12,7 mg / L). O teste de viabilidade mostrou microalga resultados positivos observados microscopicamente a formação de um número significativo de coenobia, três dias após a inoculação do meio de células em negrito extraído a partir das microesferas, concordante com uma cor verde em culturas.

**Palavras-chave:** *incrassatulus Scenedesmus*, nitratos, fosfatos, biorremediação, imobilização

\*Para citar este artículo: Roa Parra AL., Cañizares Villanueva RO. Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2012. 10(1): 71-79

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Alba Lucía Roa Parra. Departamento de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Facultad de Salud. Universidad de Pamplona. Colombia. email: albalurp19@gmail.com

Recibido: Abril 15 de 2011 Aceptado: Septiembre 10 de 2011

### Introducción

Las diversas actividades del hombre producen importantes residuos industriales y domésticos que son vertidos a los cuerpos de agua ocasionando graves problemas de contaminación y procesos de eutrofización que pueden llevar a la destrucción completa de ecosistemas, al superar la capacidad normal de autodepuración de los mismos. Para recuperar el papel fundamental que cumplen las comunidades microbianas en los distintos ciclos tróficos se hace necesario realizar tratamientos de tipo primario (mecánico) y secundario (bacteriano). Sin embargo este último ocasiona la descarga de efluentes ricos en nitratos y fosfatos que pueden ser posteriormente removidos por microalgas, con la consecuente producción de biomasa que puede ser utilizada como complemento nutricional para animales y el hombre (1). Los primeros estudios sobre la posibilidad de utilizar microalgas como microorganismos depuradores de aguas residuales, debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos, fueron reportados por Caldwell 1946 (2). Posteriormente Oswald en 1957 (3), introduce un nuevo concepto al hablar de producción masiva de microalgas. Luego en California se cultivan masivamente microalgas en reactores con células en suspensión (4). Sin embargo estos sistemas presentan dificultades para recuperar la biomasa presentándose como solución el diseño de sistemas que utilizan microalgas inmovilizadas en diferentes medios de soporte tales como: carragenina, quitosano, alginato y agar. Ya desde 1982 (5), realizaron estudios microscópicos que permitían argumentar que el efecto de la inmovilización sobre la morfología de las células era

despreciable. En 1985 (6), demostraron un incremento de la producción de hidrocarburos empleando *Botryococcus brauni* inmovilizado.

De la Noue J., Proulx D (7) son considerados los pioneros de la utilización de la inmovilización como tecnología de remoción de fósforo y nitrógeno, al utilizar *Phormidium spp* para biorremediar aguas residuales urbanas. Las ventajas de la inmovilización microalgal fueron planteadas por (8,9) argumentando la aceleración de las reacciones bioquímicas por incremento de la densidad celular presentada por el atrapamiento, el aumento en la permeabilidad del substrato y las pocas pérdidas celulares, con la consiguiente mayor estabilidad operacional del bioproceso.

Estudios realizados por (10) utilizando *Spirulina máxima* inmovilizada en K-carragenina para el tratamiento terciario de residuales porcinos diluidos al 50%, mostraron remociones entre el 70 y 80% para amonio en 100 días. Así mismo se realizaron estudios comparativos de tratamientos terciarios entre el empleo de células libres e inmovilizadas, presentando mejores resultados estas últimas (11). En la actualidad ha despertado un gran interés la utilización de biomasa microalgal inmovilizada para remoción de metales pesados por los serios problemas que éstos pueden acarrear a la salud y porque los métodos convencionales (electrodialisis, precipitación, etc.) resultan muy costosos y menos efectivos (12); aunque ya (13), indicaron como las microalgas pueden acumular metales y en algunos casos transformarlos en especies menos nocivas. Por otra parte (14) demostraron el incremento significativo de remoción de fósforo y amonio al inmovilizar de

74

forma conjunta *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense*, esto comparativamente con el alga inmovilizada sola. Otros estudios de biorremediación de aguas residuales domésticas utilizando microalgas inmovilizadas y coinmovilizadas, demostraron porcentajes de eliminación superiores al 90% de amonio, nitrato y fósforo en tiempos inferiores a 10 días(15,16).

La inmovilización es pues, un proceso que consiste en la localización de una enzima o un microorganismo completo en un espacio definido sin perder su actividad catalítica ó viabilidad en el caso de las células. Esto supone la selección de un soporte que no afecte el metabolismo celular, albergue cantidades importantes de células, posea estabilidad a la temperatura y el pH, además de transparencia y porosidad para permitir la difusión de los nutrientes así como un bajo costo (17,18). Este trabajo pretende realizar un estudio preliminar de remoción de nitratos y fosfatos por parte de *Scenedesmus incrassatulus* utilizando el medio de cultivo Bold, que sirva como base para el diseño de un proceso de bioremediación de aguas residuales domésticas, con la obtención de biomasa microalgal de alto valor agregado para alimentación animal como un subproducto.

### Materiales y Métodos

#### Microorganismo

La microalga utilizada *Scenedesmus incrassatulus* fue obtenida de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas perteneciente al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV.

#### Preparación del inóculo

*Scenedesmus incrassatulus* fue cultivado en el medio Bold (19) durante 7 días hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Luego la biomasa fue filtrada utilizando una membrana Millipore® de  $0.45 \mu\text{m}$  y resuspendida en medio Bold carente de fosfatos y nitratos.

#### Inmovilización

El método de inmovilización empleado fue microencapsulación con alginato en condiciones de esterilidad. La figura 1 muestra un esquema general del procedimiento, suministrado por el Laboratorio de Microalgas del CINVESTAV

#### Fotobioreactores

Se trabajó con reactores air lift de 2 litros de volumen, 300 ml de microesferas por reactor, flujo de aire de  $1\text{L}/\text{m}$  y una DFF de  $250 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  con fotoperiodo de 12-12. La figura 2 muestra los reactores instalados.

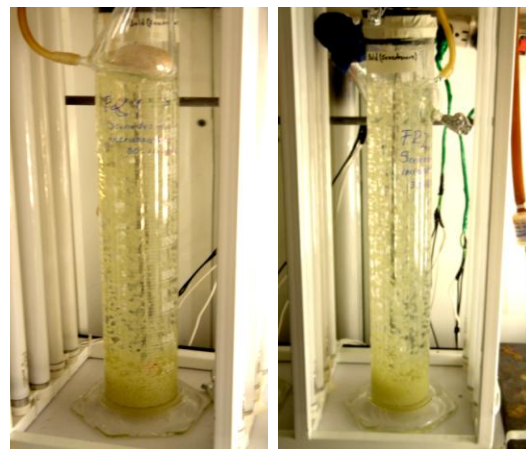


Figura 2. Fotobioreactores I y II con células de *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizadas

#### Determinaciones analíticas

Los métodos siguientes fueron realizados para seguir las cinéticas de consumo de nutrientes y el crecimiento:

- Determinación de nitratos: Método de Griess Ibsvay (20)
- Determinación de fosfatos: Método modificado de (21)
- Determinación de pigmentos: Método de (22)

### Prueba de viabilidad de *Scenedesmus incrassatulus* en las microesferas de alginato de sodio

Para determinar la viabilidad de las microalgas en las microesferas, después del proceso de biorremediación, se realizó la prueba de viabilidad. Se tomaron aseptícamente 3 mililitros de microesferas, las cuales fueron resuspendidas en citrato de sodio 0.1 M estéril hasta su completa disolución, posteriormente fueron lavadas e inoculadas en medio Bold. El sistema fue expuesto a una intensidad de luz de  $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con un flujo de 0.5 L/m, realizándose observaciones microscópicas diariamente.

### Resultados y Discusión

#### Determinaciones analíticas

Los resultados de consumo de nitratos se muestran en la figura 3, en la que se puede apreciar en el día 8 una remoción del 60%. La cinética de remoción de fosfatos se presenta en la figura 4, donde se puede observar una remoción del 47% a los 8 días. La producción de pigmentos se muestra en las figura 5. En el día 2 se alcanzó la mayor producción de clorofila a (6.5 mg/l). Los máximos valores de carotenoides se observaron en el día 2 (12.7 mg/L), esto muy probablemente

como consecuencia del estrés debido a la inmovilización. Esta situación disminuye posteriormente posiblemente por la adaptación que hace la microalga a su nuevo microclima.

### Determinación de Nitratos

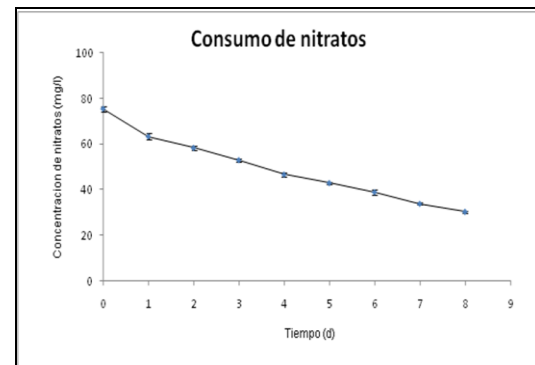


Figura 3. Consumo de nitratos por *Scenedesmus incrassatulus*

### Determinación de Fosfatos

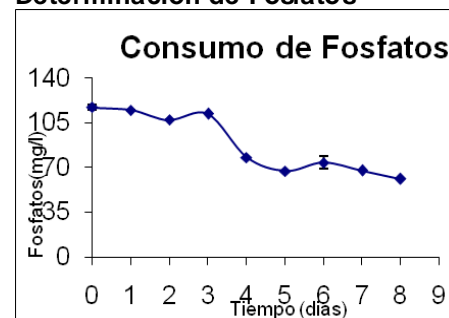


Figura 4. Consumo de fosfatos por *Scenedesmus incrassatulus*

### Determinación de Pigmentos

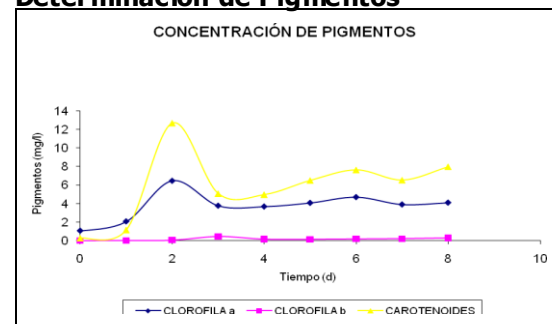


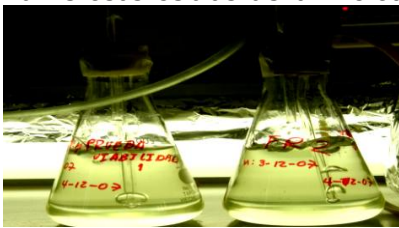
Figura 5. Producción de diferentes pigmentos por *Scenedesmus incrassatulus* en el medio Bold

#### Prueba de viabilidad

Los resultados de la prueba de viabilidad son mostrados en las figuras 6 y 7.

La figura 6 muestra la evolución del color de los cultivos: el cuadro A muestra el inóculo inicial; el cuadro B, muestra el color presentado por el cultivo a los tres días de inoculado y cuadro C, muestra el color presentado por el cultivo a los 5 días. También se muestran las observaciones microscópicas de cada uno de los cultivos a través del tiempo, en los que se aprecia un incremento en el número de cenobios a medida que transcurría la fermentación.

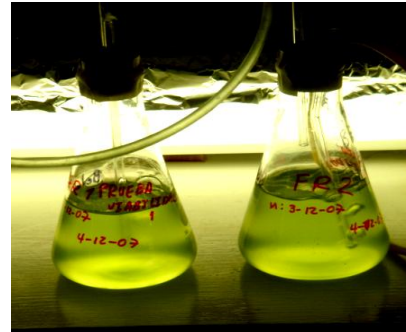
La figura 7 muestra los reactores con las microesferas a intervalos del bioproceso y la observación microscópica de las mismas con un aumento de 100x: microesferas iniciales (matriz completamente homogénea y sin microalgas); con tres días del bioproceso (matriz con escasos puntos verdes) y con 5 días del bioproceso (matriz con numerosas células de la microalga).



A



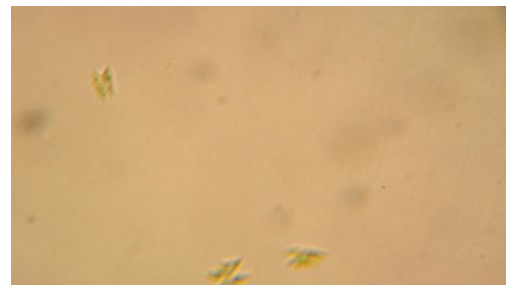
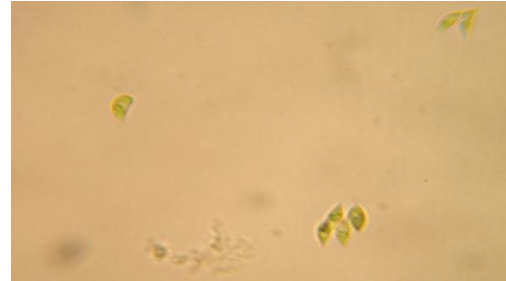
B



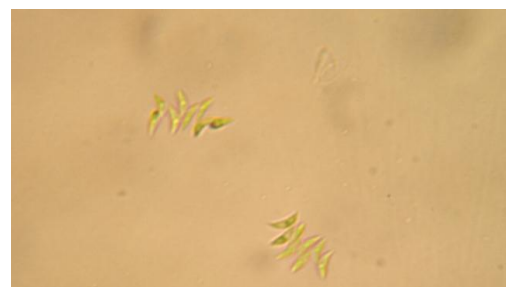
C

Figura 6. Arriba.Cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* procedentes de las microesferas (A. iniciales, B. 3 días del bioproceso, C. 7 días del bioproceso).

A



B



C

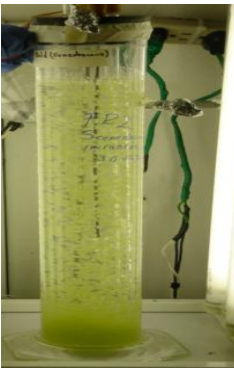
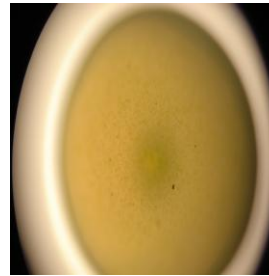
Figura 6.Las respectivas observaciones microscópicas. Aumento en 50x

77

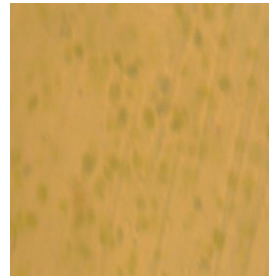
A



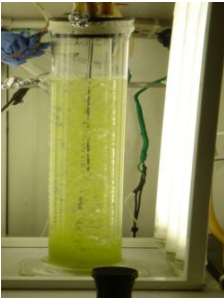
C



C1



B



C

Figura 7. Fotoreactores con microesferas de *Scenedesmus incrassatulus* (A. iniciales, B. 3 días del bioproceso, C. 5 días del bioproceso).

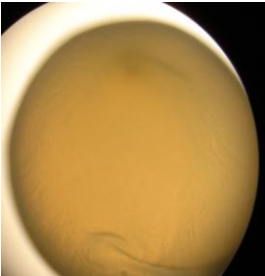
Figura 7.  
Fotoreactores con microesferas de *Scenedesmus incrassatulus* (A. iniciales, B. 3 días del bioproceso, C. 5 días del bioproceso). Las respectivas observaciones microscópicas de las microesferas. C1 acercamiento. 5x

### Conclusiones

De acuerdo a los resultados de los experimentos realizados se puede concluir que:

*\*Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado representa una de las microalgas de elección en la aplicación de procesos de bioremediación de aguas ricas en fosfatos y nitratos, debido al poder de remoción de estos compuestos en tiempos relativamente cortos. Lo anterior se evidenció por los resultados obtenidos: se presentó una remoción de nitratos del 60% y una remoción de fosfatos del 47%, a los ocho días del bioproceso, comparado con la remoción obtenida para células de *Chlorella pyrenoidosa* libres (eficiencia del 70-80%) en un período de 14 días (23); y aproximadamente similar a la registradas

A



B





78

en cultivos de *Scenedesmus sp* y *Chlorella sp* libres (eficiencia de 45-55%) en un periodo de 9 días (24,25)

\*La viabilidad observada de la microalga en las microesferas de alginato podría suponer su reutilización en procesos posteriores, con una mayor adaptación al efluente a tratar y la consecuente mayor eficiencia del bioproceso.

\*El buen crecimiento celular en el medio de cultivo Bold, como medio que contienen alta disponibilidad de nutrientes de interés (fosfatos y nitratos), sirve de base para la utilización de sustratos como aguas sintéticas y aguas residuales domésticas con importante cantidad de nutrientes para el desarrollo de la microalga y la remoción de las sustancias de interés.

### Agradecimientos

Las autoras agradecen al Grupo de Trabajo del Laboratorio de microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-México por la colaboración prestada

### Referencias Bibliograficas

1. Salazar M., (2006) Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, **59**:64-70
2. Caldwell I, D.H.(1946) Sewage oxidation ponds-performance operation and design. *Sewage Works J.*, **18**: 453-458
3. Oswald W.J., Gotaas H.B., (1957) Photosynthesis in sewage treatment. *Am.Soc.Civ.Eng*, **122**:73-105
4. Richmond A., (1988) Handbook of Microalgal Culture. *Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science. 566 p.
5. Musgrave S.C., Kerby N.W., Cold G.A., Stewart W.,(1982). Sustained ammonia production by immobilized filaments of the nitrogen fixing cyanobacteria *Anabaena sp*. *Biotechnol Let.* **4**:647-652
6. Baille C., Largeau C., Casadewall E.,(1985) Growth and hydrogen production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**:99-105
7. De la Noue J., Proulx D.,(1988) Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium sp*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**:292-297
8. Brouers M., Dejong H., Shi D., and Hall D.,(1989) Immobilized cells: An appraisal of the methods and applications of cell immobilization techniques. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*, 272-293 p.
9. Garzón C, Barragán B., (2008) Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, **2**:23-34
10. Cañizares R.O., et al., (1994) Aerated swine-wastewater treatment with k - carrageenan - immobilized *Spirulina maxima*. *CINVESTAV-IPN-CNIC. Short Communication. Bioresource Technology*, 89-91p.
11. Cañizares R.O., et al., (1993) Free and immobilized cultures of *Spirulina máxima* for swine waste treatment. *CINVESTAV-IPN-CNIC. Short Communication. Biotechnology letters*, **15**: 321-326
12. Ferrari S.G., et al., (2004) Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamentosa). *Acta Toxicol. Argent.*, **12** **1**:19-22.
13. Nagase H.D., and Miyamoto K., (1994) The use of photosynthetic microorganisms in bioremediation. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, **40**(**6**):479-485
14. Bashan L.E., Moreno M., Hernandez J.P., Bashan Y., (2002) Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-



79

promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Research, **36**:2941-48

15. Mallick N., (2002) Biotechnological potencial of immobilized algae for wastewater N,P and metal removal: A review. Agricultural and Food Engineering Department, Indian Institute of Technology. BioMetals, **15**:377-390

16. Hernández J., (2004). Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas .IPN. CICIMAR. Tesis de grado de maestría en Ciencias. 22-24 p.

17. Kolot F., (1981) Microbial carriers strategy selection. Part II. Process Biochem. Aug-Sept 2-9

18. Trevan,M.P., and Mak A. 1988.Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. Trends in Biotechnology. **6**:68-72

19. Stein J, 1973 Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. 31 p

20. Keeney D.R., Nelson D.W.,(1982) Nitrogen inorganic forms. Methods of soil analysis part 2: Chemical and microbiological properties .American Society of Agronomy, Soil Science Society, 643-698 p.

21. Taussky H., and Shorr E., (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus, J. Biol. Chem, 202:675

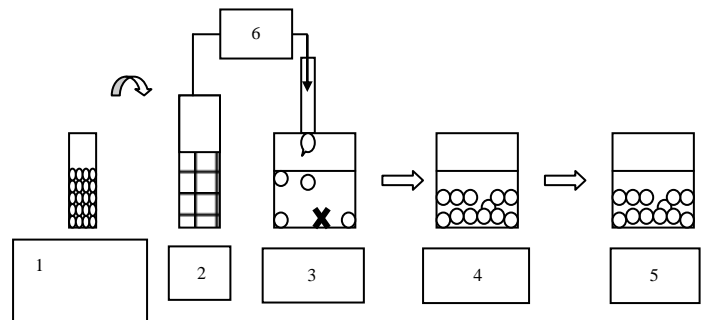
22. Wellbur A.R., (1994) The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution, J.Plant.Phys., **144**:307-313

23. Tam N.,Wong Y., (1989) Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus sp*. Environmental Pollution,**58**:19-24

24. Gonzalez L., Cañizares R., (1997) Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombial agroindustrial wastewater by the

microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology, **60**:259-262

25. Chacón C., Andrade C., Cárdenas C., Araujo I., Morales E., (2004) Uso de *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas del Maracaibo, Venezuela. J. Plant, Physiol., **144**:307-313



- 1.- *Scenedesmus incrassatulus*.  $1 \times 10^6$  células/ml en NaCl al 0.85%
  - 2.- Alginato de sodio
  - 3.- Cloruro de Calcio 0.1 M
  - 4.-Refrigeración por 24 horas a 4° C
  - 5.Lavados con agua destilada
  - 6.-Bomba peristáltica
- Figura 1. Esquema para la inmovilización de *Scenedesmus incrassatulus*

