

# CULTIVO DE CONSORCIOS FOTOSINTÉTICOS DULCEACUÍCOLAS ACUMULADORES DE LÍPIDOS RLD4 Y RLD11, EN AGUAS RESIDUALES

Niza Michelle Sevilla Valenzuela (1), Jaquelina González Castañeda (2)

1 [Ingeniería Ambiental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [nm\_seva@hotmail.com]

2 [Departamento de Ciencias Ambientales, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [jaquegc1@hotmail.com]

## Resumen

El agua residual proveniente de rastro contiene altos niveles de materia orgánica, sólidos y nutrientes, los cuales pueden ser propicios para el crecimiento de microorganismos. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de las consorcios RLD4 y RLD11, en aguas residuales de dos rastros, con incubación a 25°C, fotoperiodos de 12:12 horas (luz/oscuridad), irradiancia de 38  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{s}$ , aireación de 1.2 L/min, durante dieciséis días y con ajuste de pH cada 48h, el cual varió entre 7.5 y 8.9. Los experimentos se realizaron por triplicado. La evaluación de crecimiento se realizó mediante recuento celular y el contenido de clorofila por medio de espectrofotometría, además la caracterización fisicoquímica que se desarrolló conforme a las Normas Mexicanas. Los resultados mostraron una producción mayor de clorofila en RLD4-RLD11 en R1 al día 16, con 3.7  $\mu\text{g}/\text{L}$ , los mayores valores de población celular y  $\text{DBO}_5$  correspondieron a RLD11 en R1, 188600 cel/mL y 6180  $\text{mgO}_2/\text{L}$ , respectivamente. El agua residual de los rastros afecta el crecimiento de RLD11, el mejor crecimiento se obtienen en R1, manteniendo el pH a 8.0 cada 48h. De igual forma se observó una notoria disminución del olor fétido y menor turbiedad del agua.

## Abstract

The slaughterhouse wastewater contains high levels of organic matter, solids and nutrients, which may be enabling environments for the growth of microorganisms. In this work RLD4 and RLD11 consortia was evaluated the growth in wastewater from two slaughterhouse, with incubation at 25 ° C, photoperiod of 12:12 hours (light/dark), irradiance of 38  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{s}$ , with aeration of 1.2 L/min, for sixteen days and pH adjusted every 48h, which varied between 7.5 and 8.9. Experiments were performed in triplicate. The growth evaluation was performed using cell count and chlorophyll content by spectrophotometry, in addition, the physicochemical characterization that was developed in accordance with the Mexican Standards. The results showed increased production of chlorophyll in R1, RLD4-RLD11 day 16 with 3.7  $\mu\text{g}/\text{L}$ , the highest values of cell population and  $\text{BOD}_5$  corresponded to RLD11 in R1, 188600 cells/mL and 6180  $\text{mg O}_2/\text{L}$ , respectively. The slaughterhouse wastewater affects the RLD11 growth, the best growth is obtained in R1, maintaining the pH of 8.0 at 48h intervals. In the same way a notable decrease foul odor and less turbidity was observed.

## Palabras Clave

Agua Residual; Rastro; Fotobiorreactor; Microalgas-bacterias; Clorofila

## INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales se pueden definir como el agua que ha sido utilizada por hogares, industrias, y establecimientos comerciales, si no son tratadas, no tienen un propósito de reutilización y puede generar problemas de contaminación [1]. Las aguas residuales de los rastros se caracterizan por altas concentraciones de materia orgánica, sólidos suspendidos, nitrógeno y fosfatos [2]. Los contribuyentes de carga orgánica a estos efluentes son grasa, alimentos no digeridos, sangre, material en suspensión, orina, residuos de carne, proteínas solubles, excremento, arena, partículas coloidales, entre otros [3]. Estos desechos agroindustriales al poseer una alta concentración de materia orgánica, son un entorno adecuado que favorece el cultivo de microorganismos heterótrofos, donde el nitrógeno (N) y fósforo (P) se encuentran en las relaciones adecuadas, como, carbono/nitrógeno (C/N) y nitrógeno/fósforo (N/P), que favorecen el crecimiento [4]. Los biorreactores de microalgas heterótrofas se proponen como la forma más rentable para eliminar la materia orgánica en las aguas residuales. Estos sistemas requieren entrada de bajo consumo de energía y se produce una biomasa, que puede utilizarse para la alimentación animal y la producción de bioenergía [4]. Así mismo, la capacidad de las microalgas de mitigar emisiones de CO<sub>2</sub> y producir lípidos, las convierte en una alternativa para la generación de energía renovable, con baja emisión de carbono [5].

### Justificación

Actualmente, el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de la División de Ciencias de la Vida, cuenta con una colección de consorcios fotosintéticos dulceacuícolas de microalgas-bacterias, nativos del Estado de Guanajuato, con los cuales se han evaluado diferentes parámetros cinéticos y acumulación de lípidos en medio de cultivo de Dubos, sin embargo se requiere realizar mayor investigación sobre las condiciones de cultivo en aguas residuales, ya que contienen materia orgánica y minerales, que pudieran favorecer el crecimiento del consorcio, con potencial para producir biomasa de valor agregado.

### Hipótesis

Los consorcios fotosintéticos RLD11 y RLD4-RLD11, crecen en aguas residuales de dos rastros, lo que favorece la producción de biomasa con valor agregado.

### Objetivo:

El objetivo de ésta investigación fue evaluar el crecimiento y la producción de biomasa con valor agregado, de los consorcios fotosintéticos dulceacuícolas RLD11 Y RLD4-RLD11, cultivados en aguas residuales de dos rastros, a pH 8.0, con aireación y una intensidad lumínica de 38  $\mu\text{Mol/m}^2\text{s}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización del agua residual al día cero y a los diferentes periodos de incubación

Determinación de pH, con un potenciómetro marca CONDUCTRONIC PC45 [6]. Para la demanda química de oxígeno (DQO), se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro marca Biospectrometer Eppendorf Kinetic a 620 nm [7]. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>), por titulación, con una disolución estándar de tiosulfato de sodio 0,025 M [8,9]. Determinación de fósforo total, por el método vanadomolibdofosfórico, se midió la absorbancia a 470 nm [10].

### Condiciones del Cultivo

Se inocularon 500 mL del consorcio RLD4, en 2500 mL de agua residual proveniente de cada uno de los rastros, en cada biorreactor, se incubaron a 25°C, con fotoperiodos de 12:12 horas (luz/oscuridad), a una irradiancia de 38 $\mu\text{Mol/m}^2\text{s}$ , con una aireación de 1.2 L/min durante un periodo de dieciséis días con ajuste de pH cada 48h.

## Conteo de células

Cada 48h, durante dieciséis días, con cámara de Neubauer marca Brand. Los ensayos se realizaron por triplicado [11].

## Determinación de Biomasa

Se realizaron muestreos los días cero, cuatro, nueve y dieciséis, de cada uno de los biorreactores. La determinación se hizo por diferencia de peso.

## Determinación de Clorofila a

Se realizó mediante la técnica de Gómez [11], a los días cero, cuatro, nueve y dieciséis. El contenido se determinó con la siguiente ecuación: Clorofila a =  $(11.6 (\text{Abs } 665\text{nm} - \text{Abs } 750) - 1.31 (\text{Abs } 645 - \text{Abs } 750 \text{ nm}) - 0.14 (\text{Abs } 630 - \text{Abs } 750 \text{ nm})) (\text{vol extracto}) / (\text{vol filtrado}) (\text{long cubeta})$   
Dónde: Abs : Absorbancia

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La IMAGEN 1, muestra la variación de pH en los biorreactores RLD11 Y RLD4-RLD11, con R1 y R2, como se observa varió entre 7.5 y 8.9.

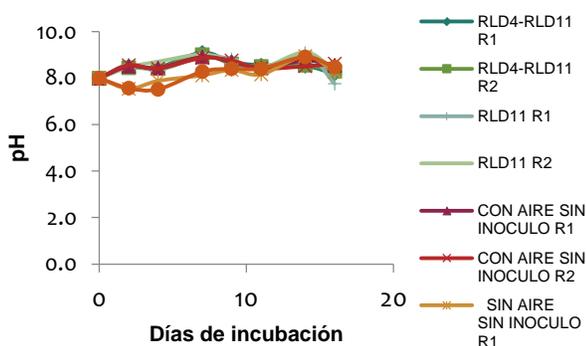


IMAGEN 1: Comportamiento del pH durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 Y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

En este estudio se mantuvo el pH a 8.0, cada 48h, con el fin de mantener las mejores condiciones para el crecimiento de los consorcios.

Algunos nutrientes necesarios para el crecimiento de microalgas, son N, P, y K, [12], las

concentraciones de fósforo en los biorreactores, se muestra en la IMAGEN 2, se observa que RLD4-RLD11 en R2, la disminución de fósforo es mayor que en el resto de los tratamientos (37%). Lo cual indica que este es un proceso viable para la remoción de fósforo.

Otros investigadores reportan el efecto del crecimiento, por concentración de nutrientes, calidad y cantidad de luz, el O<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub>, el pH, factores operacionales, como, mezclado y la edad del cultivo [13], los resultados de ésta investigación concuerdan con lo reportado.

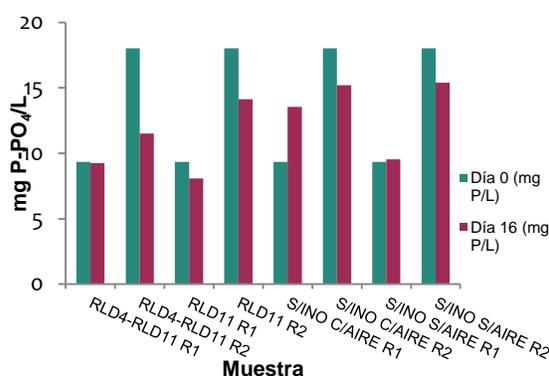


IMAGEN 2: Fosfatos durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

La producción de biomasa proporciona una medida de la eficiencia de la fotosíntesis y del cultivo [14]. La IMAGEN 3, muestra la biomasa de los biorreactores en las aguas R1 y R2, en comparación con los testigos. Como puede observarse RLD11 en R2 presenta mayor producción de biomasa al día nueve con un valor de 1.7g/L. El testigo sin inóculo y sin aire desarrolla mayores niveles de biomasa, cabe aclarar que los biorreactores con RLD11 y RLD4-RLD11 permiten el crecimiento del consorcio en tanto que en los testigos está ausente y por ende la calidad de la biomasa es diferente, lo cual se puede observar en las IMÁGENES 4 y 5.

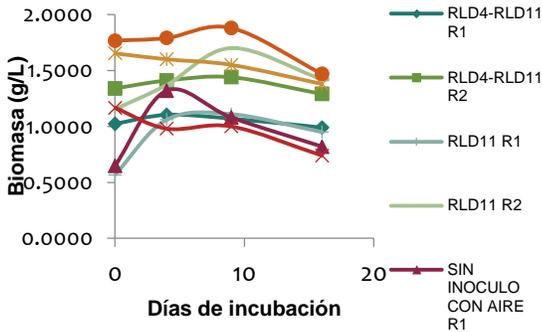


IMAGEN 3: Biomasa durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

La IMAGEN 4, muestra la abundancia de microorganismos en los consorcios fotosintéticos RLD11 y RLD4-RLD11, en las aguas residuales de los rastros R1 y R2. Se puede observar que el consorcio RLD11 mostró el mayor crecimiento exponencial en el rastro R1, a los 16 días con un valor de 188600 Núm. cel/mL, en cambio en el rastro R2 manifestó una rápida disminución en el día once al igual que el consorcio RLD4-RLD11 del rastro R1 (43400 Núm. cel/mL). Como era de esperarse los testigos permanecen constantes durante los dieciséis días de incubación.

Las tasas de incremento de biomasa son aparentemente simples de medir, tienen la desventaja de que pueden generar incertidumbre respecto a las diferencias de biomasa inicial, el número de células o el peso total [15] por lo tanto, es esencial la comparación entre estos parámetros, resultados similares se encontraron en ésta investigación.

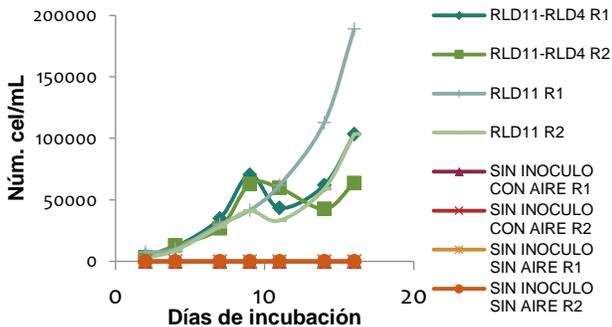


IMAGEN 4: Cinética de crecimiento por conteo de células durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

Contreras *et al* 2003 [16] menciona que la clorofila es un indicador de la integridad de los fotosistemas. El color de los biorreactores cambia entre los dos y diez días de incubación, de un verde pálido a una tonalidad más verde, como se observa en la IMAGEN 5. El consorcio con mayor contenido de clorofila fue RLD4-RLD11 en R1, seguido por RLD11 en R1 a pesar que en el día 4 tuvo una rápida disminución. Al comparar el contenido de clorofila de uno de los testigos con RLD4-RLD11 se registró un 93 % menos por parte del testigo, cotejando esta relación con Hena *et al* (2015) [17] se puede observar que en este estudio el contenido de clorofila del consorcio RLD4-RLD11 en R1, alcanzó al día 16 un valor de 3.7 µg/L.

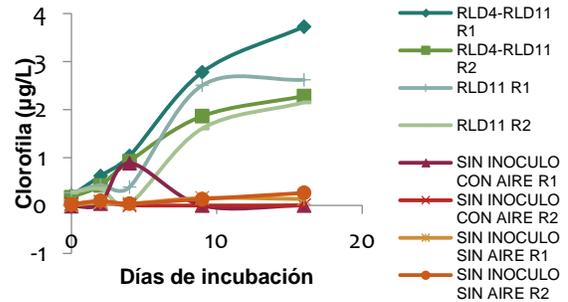


IMAGEN 5: Clorofila a durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

La DQO es la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica por medios químicos y convertirla en CO<sub>2</sub> y agua. En la IMAGEN 6, se observa que los biorreactores RLD11 y RLD4-RLD11 en R2, tienen los valores más altos en el día cuatro.

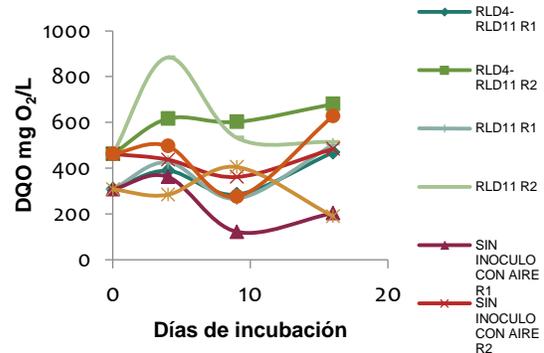


IMAGEN 6: DQO durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

La DQO y DBO<sub>5</sub> se utiliza para medir el grado de contaminación de las muestras, en la IMAGEN 7, podemos observar que a medida que los microorganismos aumentan, la DBO<sub>5</sub> sigue la misma tendencia, éste parámetro proporciona de manera aproximada la materia orgánica biodegradable presente en las aguas residuales, microorganismos como, bacterias, hongos, algas y plancton, consumen oxígeno, durante la degradación de las sustancias orgánicas contenidas en la muestra. Las Normas Oficiales Mexicanas establecen Límites Máximos Permisibles de 200 mgO<sub>2</sub>/L, como puede observarse en las gráficas se observan valores entre 2000 y 7000 mgO<sub>2</sub>/L, lo que puede explicarse con el crecimiento del consorcio o la propia flora microbiana presente en las aguas residuales, recordando que la diferencia es, la calidad de la biomasa presente [18].

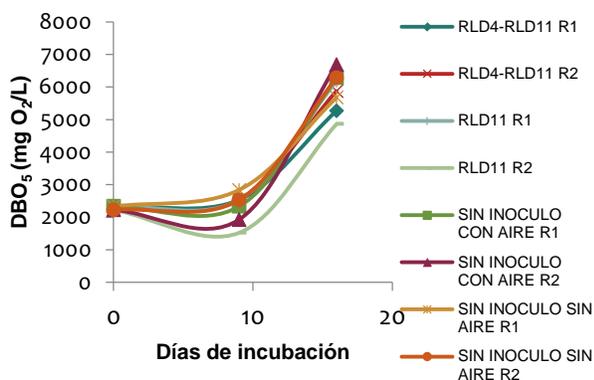


IMAGEN 7: DBO<sub>5</sub> durante los dieciséis días de incubación de los consorcios RLD11 y RLD4-RLD11 en las dos aguas residuales R1 y R2.

## CONCLUSIONES

La composición del agua residual de los rastros afecta el crecimiento de RLD11 y RLD4-RLD11, la mayor producción de clorofila se produce en RLD4-RLD11 en R1, en tanto que, el mayor número de células se obtiene en RLD11, en R1, manteniendo el pH de 8.0 cada 48 horas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), UG. División de Ciencias de la

Vida, Campus Irapuato-Salamanca, por darme la oportunidad de realizar el Verano de Investigación. Asimismo, agradezco a todas las personas que me acompañaron y apoyaron en el trayecto, Dra. Jaquelina González Castañeda, Rastro 1 y Rastro 2; compañeros de laboratorio, M. Micaela Vargas Z., Martha V. Almanza E., Jazmín A. Sánchez R., Bruno Pérez A.; Dr. Cesar A. Angel Sahagún, Aarón A. Hernández R., Jonathan E. Ortega P., Laboratorio de Parasitología y Control Biológico; y especialmente a mi familia y mis amigos.

## REFERENCIAS

- [1]Malik, O., Hsu, A., Johnson, L., Sherbinin, A. (2015) A global indicator of wastewater treatment to inform the Sustainable Development Goals (SDGs). *Environmental science & policy* (48), 172-185
- [2]Liu, Y., Kang, X., Li X., Yuan, Y. (2015)Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor for slaughterhouse wastewater treatment. *Bioresour Technol.* (190), 487-491
- [3]Tezcan, U., Koparal A, Bakir U (2009) Hybrid processes for the treatment of cattle-slaughterhouse wastewater using aluminum and iron electrodes. *J Hazard Mater* (164), 580-586.
- [4]Manzoni, M., Smanioto, J., Ragagnin, C., Queiroz, M., Queiroz, L., Jacob-Lopes, E. (2014) Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Scientia Agricola*. 71 (6), 521-524
- [5]Arias, M. y Roldán, M. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta biol. Colomb.* 18 (1), 43-68
- [6]Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2011
- [7]Norma Mexicana NMX-AA-030/1-SCFI-2012
- [8]Norma Mexicana NMX-AA-012-SCFI-2001
- [9]Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001
- [10]Norma Mexicana NMX-AA-029-SCFI-2001
- [11]Quevedo O, C., Morales V, S.P., Acosta C.A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *VITAE*, revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 15(1), pp. 25-31
- [12]Handler, R., Canter, C., Kalnes, T., Stephen, F., Kholiqov, O., Shonnard, D., Blowers, P. (2012) Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: Analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts. *Algal Research*. (1) 83-92
- [13]Arias, M., Martínez, A., Cañizares, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta biol. Colomb.*, 18 (1), 43- 68.
- [14]Suaili, E., Sarbatly, R. (2012) Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (16), 4316-4342

- [15] Sacristán, M., Luna, V., Cadena, E., Alva, A. (2014) Producción de biodiesel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*. 48 (3), 271-284
- [16] Contreras, C., Peña, J., Flores, L., Cañizares, R. (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28(8), 450-456
- [17] Hena, S., Fatimah, S., Tabassum, S. (2015) Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry* (10), 1-14
- [18] Norma Ecológica NOM-ECOL-003-1997