

# EVALUACIÓN DE MEMBRANAS BASADAS EN CELULOSA MICROFIBRILADA Y ARCILLAS NATURALES COMO SOPORTE PARA LA GENERACIÓN DE BIOFILMS DE MICROALGAS PARA REMEDIAR METALES PESADOS. ESTUDIO METABÓLICO

M. M. Areco<sup>a</sup>, G.A. de Titto<sup>b</sup>, S. Perrone<sup>b</sup>, D. Wallace, P. Eisenberg<sup>a,b</sup> y G. Curutchet<sup>a</sup>  
a) 3ia. UNSAM, b) INTI Plásticos  
patsy@inti.gov.ar

## Introducción

La biotecnología de microalgas es un área de estudio de gran interés en el mundo debido a su potencial uso como fuente de compuestos utilizados en la industria farmacéutica, de los pigmentos, carbohidratos y otros compuestos químicos. En las últimas décadas la utilización de las microalgas para el tratamiento de aguas contaminadas ha cobrado especial interés. En Argentina, una de las principales fuentes de contaminación de los cursos de aguas naturales son los efluentes industriales que en muchos casos contienen metales pesados, como el cinc, comúnmente presente en efluentes de galvanoplastías, metalurgias, entre otras. La remediación de metales pesados a partir de la utilización de biomasa algal viva respecto de biomasa muerta se ve favorecida por los procesos metabólicamente acoplados que permiten una mayor eficiencia de remediación, por lo que el estudio del metabolismo asociado al proceso es de sumo interés; así como el diseño de un sustrato adecuado que permita contener a la biomasa en dónde la eficiencia de remoción no se vea afectada. En trabajos anteriores, hemos demostrado la capacidad de *Botryococcus braunii*, microalga de agua dulce, de remover metales pesados presentes en solución.

## Objetivo

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y evaluación de materiales soporte para biomasa microalgal a partir de la inclusión de arcillas naturales (Montmorillonita sódica, MMTNa) en membranas de celulosa microfibrilada (CMF-MMTNa) y estudiar el metabolismo de respiración y fotosíntesis de *B. braunii* libre en solución, y soportada sobre los materiales obtenidos (CMF-MMTNa) tanto en presencia como en ausencia de Zn(II) metal.

## Descripción

Una suspensión de  $\alpha$ -celulosa (Sigma C8002), 1% m/v en agua destilada, se procesó en un Microfluidizador M-110P (Microfluidics Corp) a 1500 bar para producir la microfibrilación de las

fibras. A la suspensión de CMF se le incorporó 5 % m/m de MMTNa (Southern Clay Cloisite Na+) respecto de CMF se la colocó en placas de Petri y se dejó evaporar a 40°C de manera de obtener películas de aproximadamente 80 mg/cm<sup>2</sup>. Se evaluó la superficie de las mismas utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (FEI Quanta 250 FEG).

Se obtuvieron 4 matrices con características distintas: matriz de celulosa + 5 % de arcilla + Na: (MFC-MMTNa); matriz de celulosa (MFC); MFC liofilizado + 5 % arcilla Na: (MFCL-MMTNa) y MFC liofilizada: (MFCL), de superficies y masa conocidas, las cuales fueron resuspendidas en distintos erlenmeyers con 100 ml de Bold Basal Medium (BBM), a los que se los inoculó con 5 ml de un cultivo concentrado de *Botryococcus braunii*; se los incubó a temperatura ambiente, en constante agitación orbital (30 rpm) a lo largo de 90 días. Luego, se tomó una muestra de una porción de 1 cm<sup>2</sup> de cada uno de los biofilms formados (Fig. 1.A) sobre la matriz de celulosa sin liofilizar (MFC-MMTNa y MFC), se observó el recubrimiento de la biomasa sobre la superficie en microscopio óptico, y se resuspendió la biomasa en agua destilada para determinar crecimiento por recuento de células (cámara Thoma) y espectrofotometría (DO: 680 nm).

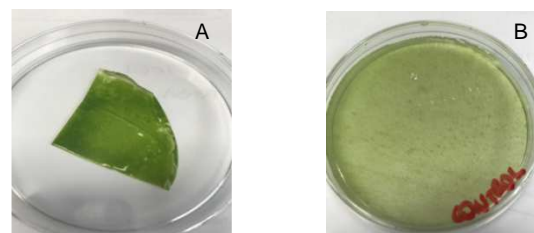


Figura 1: A) Biofilm de *B. braunii* soportado en CMF-MMTNa y B) *B. braunii* libre en suspensión.

Utilizando un respirómetro (Micro-Oxymax) se evaluó a lo largo de 24 hs. en condiciones de luz (1000 lux) y oscuridad (18:8 horas), la tasa (mg/hora) y la cantidad acumulada (mg) de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de: 1) biofilm sobre soportes de CMF-MMTNa; 2) biofilm sobre soportes de CMF-MMTNa en presencia de 40 ppm de Zn; 3) *B. braunii* libre en suspensión en presencia y

ausencia del metal (Fig. 1.B); y 4) matrices de CMF-MMTNa, libres de biomasa en presencia y ausencia de Zn. Luego de 24 hs. las matrices de CMF-MMTNa se secaron (60°C) hasta peso constante. Se determinó la cantidad inicial y final de carbono orgánico total (TOC) en solución en cada experiencia, así como la concentración de glucosa (Wiener lab.), y las concentraciones de Zn(II) cuando correspondiese, por absorción atómica.

## Resultados

A lo largo del tiempo (90 días) se observa el crecimiento de la biomasa de *B. braunii* sobre las distintas matrices de celulosa (CMF, CMFL, CMF-MMTNa y CMFL-MMTNa), aquellas que previamente fueron liofilizadas luego de ser sumergidas en solución son difíciles de manipular sin que se rompan (Fig. 2A), mientras que las matrices CMF y CMF-MMTNa presentan una mayor resistencia (Fig. 2B). La Figura 3 muestra la micrografía SEM de la matriz CMF.MMTNa, donde se observa la distribución homogénea de las partículas de arcilla en la matriz CMF.

Se evaluó por microscopía óptica el recubrimiento de la biomasa que se forma sobre las matrices de CMF-MMTNa, respecto de CMF, observándose un mayor recubrimiento de la biomasa sobre la matriz CMF-MMTNa (Fig. 4A y 4B).

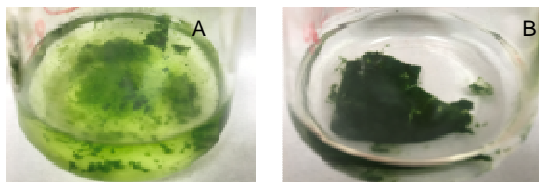


Figura 2: Matriz de CMFL-MMTNa (A) y de CMF-MMTNa (B) recubiertas con biofilm luego de ser trasvasadas.

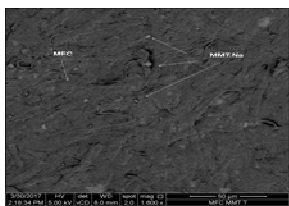


Figura 3: Micrografía SEM de CMF-MMTNa

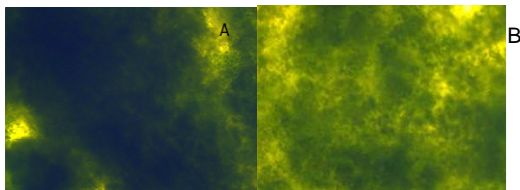


Figura 4: Recubrimiento sobre las matrices sin liofilizar CMF-MMTNa (A) y CMF (B), respectivamente.

Los resultados obtenidos para crecimiento de la biomasa demuestran que el crecimiento de *B.*

*braunii* sobre CMF-MMTNa fue mayor luego de 90 días (3.208 mg alga/cm<sup>2</sup>), respecto del crecimiento de la biomasa sobre CMF (2.236 mg alga/cm<sup>2</sup>). Este resultado demostraría que la presencia de la arcilla favorece la formación del biofilm sobre la matriz de CMF-MMTNa y la resistencia del biofilm a cambios en la agitación. Se evaluó por gravimetría, la hidrólisis de la matriz de CMF-MMTNa sola y con el biofilm formado sobre su superficie a lo largo de 8 días. Los resultados demostraron que durante este período se degradó más del 10 % de la matriz libre de biomasa, mientras que la matriz recubierta por el biofilm de microalgas sufre una degradación menor al 5%. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por TOC, en donde la cantidad de carbono orgánico total medida para el biofilm (CMF-MMTNa + alga) se mantiene constante a lo largo de las experiencias (27 ± 2 mg/l) y en cambio el valor de TOC se duplica para la matriz de CMF-MMTNa (64 ± 3 mg/l). Estos resultados demostrarían que la matriz al estar cubierta por el biofilm de microalgas es menos susceptible a la degradación por hidrólisis, siempre que la velocidad de degradación de los compuestos en solución sea la misma en ambos casos.

Se estudió el metabolismo de respiración y fotosíntesis de la biomasa de *B. braunii* en BBM y a lo largo de 24 hs. Los resultados de espirometría mostraron que el biofilm formado sobre CMF-MMTNa, presentó una velocidad de producción de O<sub>2</sub> equiparable a la velocidad de producción de O<sub>2</sub> por la biomasa libre en suspensión. La presencia de Zn(II) parecería afectar la fijación de CO<sub>2</sub> (ciclo de Calvin) por la biomasa libre en suspensión. Para el control (CMF-MMTNa libre de algas y de metal) se observa una marcada disminución en la velocidad de producción de O<sub>2</sub> y un aumento en la velocidad de producción del CO<sub>2</sub>, posiblemente debido a la hidrólisis de la CMF, liberando al medio distintos monosacáridos ((CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>), utilizados como fuente de carbono en el metabolismo de las bacterias consumiendo O<sub>2</sub> y liberando al medio CO<sub>2</sub>, compensando los aportes y consumos de ambos gases generados por el biofilm. La presencia de glucosa en el medio fue determinada y los resultados demostraron que luego de 24 horas la concentración de este monosacárido en el medio BBM pasó de 0 mg/l a 24±3 mg/l. La presencia de Zn(II) no parecería afectar el ciclo de Krebs, dado que la velocidad de aporte de CO<sub>2</sub> al medio en presencia y ausencia del metal es la misma. La velocidad de consumo de O<sub>2</sub> por la biomasa libre en suspensión es mayor que la del biofilm, y no parecería verse afectada la cadena respiratoria por la presencia del metal.