

9.3

Tecnologías de biorremediación implementadas hasta el momento en Lago Lugano y arroyo Cildáñez

M. Daniela Groppa, Patricia L. Marconi

CULTIVO DE ALGAS INMOVILIZADAS EN PERLAS DE ALGINATO

El crecimiento demográfico con la consecuente urbanización, industrialización y el desarrollo de la agroindustria en las cuencas de los alrededores de la Cdad. de Buenos Aires (CABA) y conurbano de la Prov. de Bs. As. (AMBA) son los principales factores de producción de residuos y desechos. La actividad antropogénica genera grandes cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos no biodegradables, que a menudo son desechados al medio ambiente sin tratamiento previo. En CABA, la Agencia de Protección Ambiental -APRA- dependiente del Gobierno de la Ciudad, realiza monitoreos ambientales sobre los cuerpos de agua de la ciudad. Así, ha detectado en el lago Lugano y arroyo Cildáñez desperdicios provenientes de efluentes industriales y contaminación cloacal, diversos compuestos inorgánicos que impactan de forma negativa sobre el medio ambiente (APRA 2017). Estos cuerpos de agua desembocan en el Riachuelo a la altura de los barrios de V. Lugano y V. Soldati. En particular, el lago Lugano es clave en el marco de un proyecto del Gobierno porteño ya que es un área protegida dentro de la Ciudad, con un centro educativo y de

investigación. En el parque Lugano, un predio de 40 hectáreas con senderos se encuentra el lago artificial que se conecta con el arroyo Cildáñez integrando la cuenca Matanza-Riachuelo (Parte A y cap. 9.2).

Por su parte, el arroyo Cildáñez es un arroyo entubado hasta casi su desembocadura junto al Lago Lugano en el Riachuelo. La Lic. Susana Boragno describe como era al arroyo Cildáñez previo a la conquista española en un artículo para el diario La Nación (14/04/2018): “...un conjunto de zanjas que serpenteaban en un vasto territorio y en tiempo de lluvias, desaguaban en forma natural en el Riachuelo. Integraba un bañado con una belleza natural propia con sus lagunitas bordeadas de sauces y ceibos, junto a una fauna acuática de anguilas, bagres, tarariras y pobladas de patos, teros, ranas, nutrias.” Sin embargo, en la época colonial este arroyo comienza a sufrir un alto índice de contaminación debido al vertido masivo de sangre desde los mataderos ubicados en sus márgenes. Por muchos años se lo denominó en forma despectiva “arroyo de la sangre”, con el consiguiente problema sanitario que ello producía. En 1919, se decide entubar el arroyo con la esperanza de controlar las inundaciones que sufría esta zona de la ciudad. Además, la aparición de los frigoríficos hacia fines del siglo XIX controló el vertido de desperdicios hacia el arroyo. Aunque no del todo, ya que se describe que el cauce natural del arroyo iba por la Av. Gral. Eugenio Garzón pero durante el entubamiento (1939/1940) lo desviaron hacia la calle Remedios para empalmar el desagote de un frigorífico, “... y así podían verter mejor los desperdicios”.

La cuenca del Cildáñez es un buffer para las inundaciones por lluvias o por las crecidas cuando hay sudestadas. En este último caso, la corriente del arroyo puede ser revertida desde el Riachuelo hacia la cuenca alta. Estos cambios en las corrientes generan, también, cambios bruscos en los contaminantes que pueden hallarse en esta zona (ver Capítulo 9.2). Para biorremediar tanto el lago Lugano como el Ao. Cildáñez, se propuso una estrategia de fitorremediación. Más precisamente en el campo de la fitorremediación, se le asigna un valor creciente a la bioaumentación, es decir, a la adición de microorganismos especializados, exógenos al medio, con el fin de optimizar la remediación. Estos microorganismos tienden a hacer más eficiente la biorremediación a través de diferentes mecanismos, entre los que se pueden incluir mecanismos directos, como la capacidad de acumular metales (en el exterior de las células adheridos a la pared celular o en matrices poblacionales complejas, como biofilms) o de utilizar compuestos orgánicos como fuente de nutrientes, o bien por mecanismos indirectos, como la posibilidad de promover el crecimiento (Shao y col., 2014; Zhou y col., 2016; Long y col., 2016; Lema y Martínez, 2017; Yao y col., 2019).

Dentro de estas biotecnologías surge la ficorremediación, la utilización de cultivos de macro y microalgas para remediar ambientes contaminados. Aunque hace ya muchos años que se sugiere el uso de microalgas para el tratamiento terciario de aguas contaminadas (Ledda y col., 20415; Wang y WU, 2016; Lema y Martínez. 2017; Ferraro y col., 2018; Moghazy, 2019), en los últimos tiempos se ha reactivado su estudio debido al incremento de contaminantes como nitrato, amonio y fosfato derivados de desechos industriales, por el uso de agroquímicos y/o por descargas de desagües cloacales. Las microalgas en particular, presentan la ventaja de remover los contaminantes ricos en N y P para transformarlos en biomasa con beneficios adicionales como el secuestro de CO₂ y la liberación de O₂, de y hacia la atmósfera, ayudando a mitigar el efecto invernadero. De los primeros trabajos reportados se encuentra el de Tuantet y col. (2014) con cultivos de *Chlorella sorokiniana* en un fotobiorreactor de funcionamiento continuo (8 meses) alimentado con orina humana como sustrato. En estas condiciones, la productividad de biomasa llegó a 14,8 g/L d, con una tasa de eliminación de N de 1,3 g/L d y P de 0,15 g/L d. Así, *Chlorella* sp. se ha transformado en la especie de preferencia, seguida de *Scenedesmus* sp., a ser utilizadas en el tratamiento avanzado de aguas residuales de diferentes orígenes: aguas municipales, tratamientos de aguas vertidas en criaderos de ganado, avícolas, lácteas finalizando con su uso a partir de la biomasa generada para la producción de biodiesel o proteínas y la recuperación de nutrientes (revisión de Wang y col., 2019).

CULTIVO DE ALGAS LIBRES O INMOVILIZADAS EN PERLAS DE ALGINATO

A partir de la experiencia recabada en la Bibliografía se iniciaron una serie de ensayos para estudiar una cepa nativa de *Chlorella vulgaris* (Chl) y ver si era posible utilizarla para biorremediar aguas del Lago Lugano y el Ao. Cildáñez. En una primera etapa, se realizaron cultivos con el alga en suspensión en Erlenmeyers con condiciones controladas de luz y temperatura y medios de cultivo sintéticos. El crecimiento de los cultivos se estimó por múltiples parámetros como peso seco, peso fresco o contenido de clorofila (Fig. 1), densidad óptica medida a 600 nm de longitud de onda, número de células utilizando la cámara de Neubauer entre otras (Trentini y col., 2017; Groppa y col., 2019).

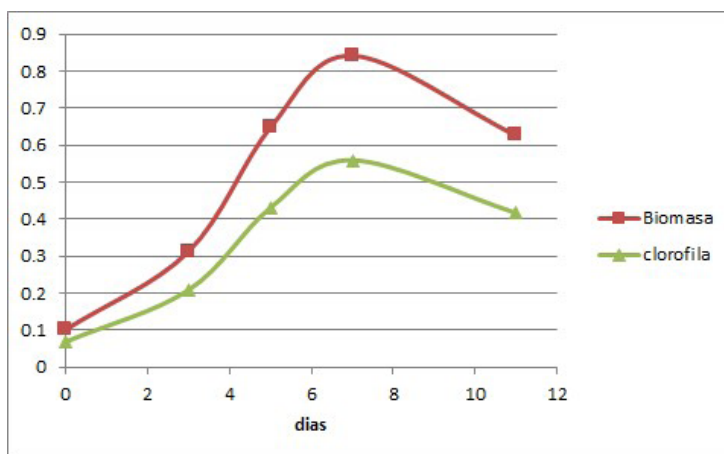


Figura 1. Comparación de dos estimadores de crecimiento en los cultivos de microalgas de *C. vulgaris* alimentados con agua del Lago Lugano. Los cultivos se mantuvieron en Erlenmeyers a 24°C y agitación constante (1900 rpm) en luz no PAR. Biomasa, estimación por peso seco (mg/L); clorofila, estimación de la concentración de clorofila (µg/mL).

Teniendo en cuenta que la literatura reporta mejores resultados inmovilizando los cultivos de microalgas, se estudió el crecimiento de las células de *C. vulgaris* inmovilizadas en perlas de alginato (Fig. 2). Los soportes que se han utilizado para la inmovilización de biomasa microalgal son diversos; cabe citar el alginato, agar-agar, celulosa y sílica-gel, entre los más utilizados (Bashan y col., 2002; Bashan y Bashan, 2008 y 2010; Perrulini y col., 2014; Durrieu y col., 2016). El alginato es una matriz de polisacáridos especialmente útil para la elaboración de cápsulas esféricas, comúnmente denominadas “perlas”. La inmovilización en alginato protege a las microalgas de los efectos tóxicos de los contaminantes presentes en el agua, manteniendo el pH y evitando temperaturas extremas, permitiendo una mayor eficiencia en la producción de biomasa y sobrevida (El-Sheekh y col., 2017).

Además, las células entrampadas en la matriz ocupan un volumen pequeño y definido -las perlas tienen un tamaño de 1 a 1,5 cm de diámetro- y son fáciles de manipular confiriendo una estabilidad operacional al sistema (Fig. 2A).

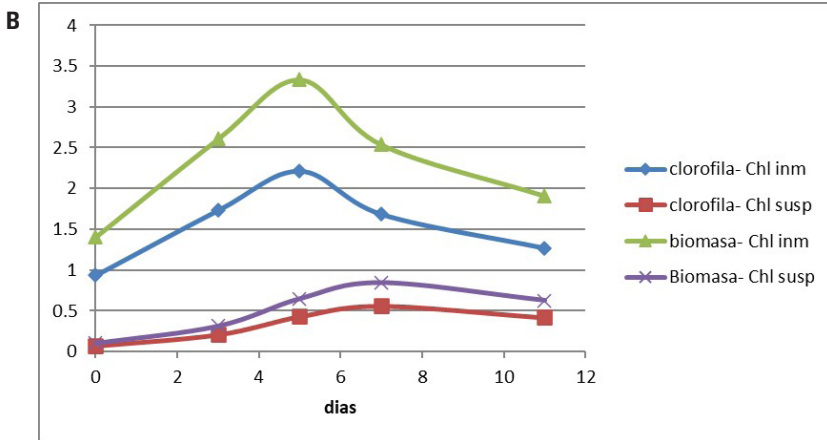


Figura 2. Cultivos de microalgas de *C. vulgaris* alimentados con agua del Lago Lugano. A, perlas de alginato conteniendo células al 2% (P:V); B, comparación del crecimiento obtenido por cultivos en suspensión (Chl susp) o inmovilizados (Chl inm) en perlas de alginato. Biomasa, estimación por peso seco (mg/L); clorofila, estimación de la concentración de clorofila ($\mu\text{g/mL}$).

Otra ventaja, es mantener una comunicación célula-célula generalmente obtenida por moléculas señal disueltas en la matriz que las contiene. En nuestro caso, la principal ventaja de la inmovilización de las microalgas en alginato fue obtener mayor biomasa y facilitarnos su recuperación (Fig. 4). Las perlas no sólo contribuyen a la resolución de aspectos estrictamente técnicos de ingeniería del proceso (scaling-up), sino que evita la liberación de células al medio y, por ende, los potenciales peligros de eutroficación del sistema.

El continuo aporte de materia orgánica y microorganismos a los que están sujetos estos cursos de agua periurbanos va reduciendo drásticamente los niveles de oxígeno disuelto y alterando el equilibrio ecológico natural. Así, pasan de predominar los procesos oxigénicos a predominar los procesos anoxigénicos. Estos cambios suelen traer aparejados aumentos de la microflora y pH, se elevan las concentraciones de nitritos, nitrógeno amoniacal y fósforo total por encima de las concentraciones admisibles de acuerdo al consenso internacional (Australia and New Zealand Guidelines Vol. 1/2000; Resolución 42/2006. Autoridad de agua, Guía Conama 2004. Chile, INA 02/1207/11, Resolución Acumar 03/2009, Anexo I, APHA 2005).

Entre los contaminantes que más impactan en el medio ambiente se describe el exceso de las especies químicas nitrogenadas y fosforadas responsables de causar la eutroficación de las aguas trayendo aparejado un desbalance en el ecosistema. Utilizando el mismo sistema de cultivo con algas inmovilizadas en perlas de alginato, el consumo de amonio y fósforo aumenta, disminuyendo su concentración en forma significativa en el medio acuoso (Figura 3). Además, observamos que los resultados obtenidos con las algas inmovilizadas son mejores respecto a los cultivos de las algas en suspensión (Trentini y col., 2017)(Fig. 3).

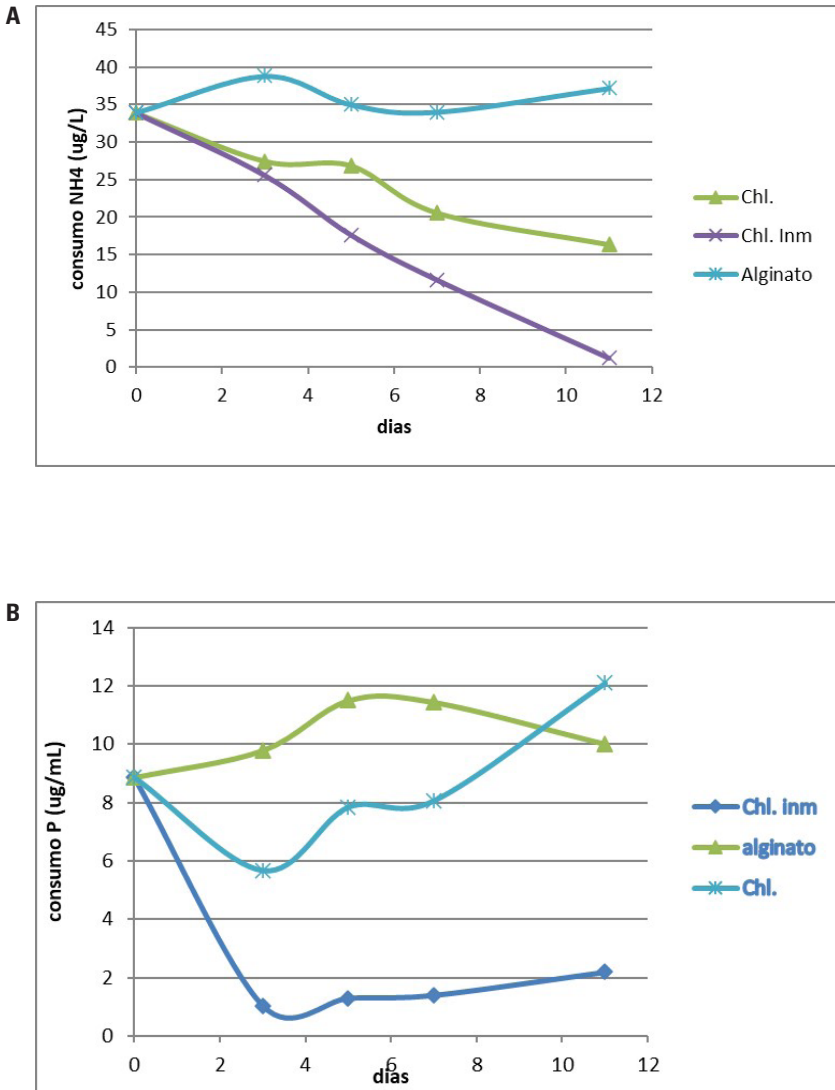


Figura 3. Consumo de nitrógeno amoniacal (A) y fósforo total (B) en agua del Lago Lugano luego de cultivar *C. vulgaris* en suspensión (Chl.) o inmobilizadas en perlas de alginato (Chl. Inm) respecto al control de perlas de alginato sin células (Alginato).

CULTIVO DE ALGAS EN ASOCIACIÓN CON OTRA ESPECIE

Existen varios trabajos en los que se menciona la influencia favorable de la inmovilización conjunta de la microalga con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) dentro de las cuales se pueden mencionar cepas de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus* sp. y *Azotobacter* sp. Estas bacterias no sólo estimulan el crecimiento de la microalga sino que aumentan la remoción de fósforo y nitrógeno del agua (de-Bashan y Bashan, 2004; Amavizca y col., 2017). Dentro de las PGPB, *Azospirillum* es utilizada ampliamente para mejorar el rendimiento de diversos cultivos como trigo, maíz, arroz a través de diversos mecanismos (Bashan y de-Bashan, 2010; Vogel y col., 2013; García y col., 2017). Además, se ha visto que la inoculación de plantas con esta PGPB las ayuda a hacer frente a diversos tipos de estrés abiótico. En este sentido, se realizaron una serie de ensayos para evaluar el crecimiento de *C. vulgaris* aislada o asociada a *A. brasilense* en cultivos inmovilizados en perlas de alginato esperando observar un mejor crecimiento del alga por el efecto de promoción del crecimiento y de protección frente al estrés.

Los resultados obtenidos mostraron que ambos microorganismos alcanzaron la mayor concentración de biomasa bajo el sistema de coinmovilización, lo que demuestra un efecto estimulador mutuo, no sólo de la bacteria sobre el alga (Fig. 4). Sin embargo, la asociación entre ambos microorganismos libres o inmovilizados en las perlas de alginato es menos efectiva para la remoción del amonio que el cultivo unialgal inmovilizado (misma figura). El mayor porcentaje de remediación de amonio se logra con las algas inmovilizadas en alginato al cabo de 10 días de cultivo (Trentini y col., 2017). Por el contrario, para la remoción de fósforo no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos aplicados.

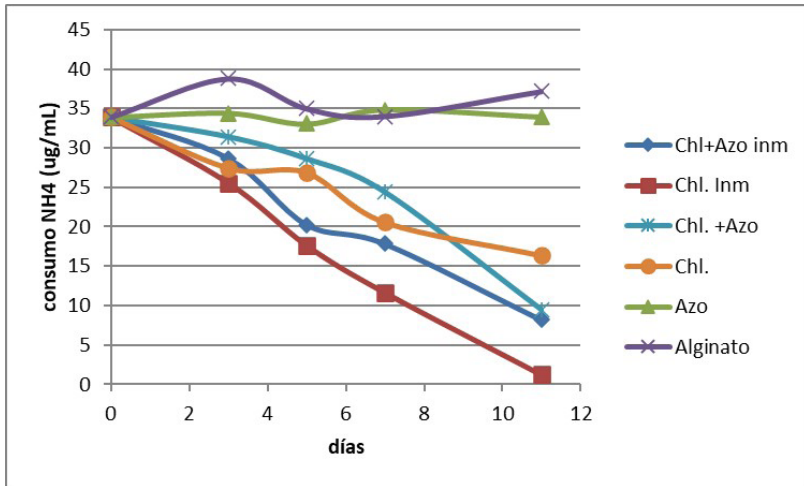


Figura 4. Consumo de amonio ($\mu\text{g NH}_4/\text{mL}$) en cultivos de *C. vulgaris* (Chl), *A. brasilense* (Azo) y en cultivos de estas especies en suspensión o inmovilizadas en perlas de alginato (Inm) alimentados con agua del Lago Lugano. Se utilizaron perlas de alginato sin organismos vivos como control (alginato).

CULTIVO DE ALGAS EN BIORREACTORES

A partir de estos resultados se decidió escalar el sistema a cultivos en biorreactores de 2 L utilizando solamente la microalga como sistema de biorremediación. El escalado del sistema permite estudiar cómo van variando los principales parámetros como biomasa, velocidad de crecimiento, remoción de contaminantes, entre otros que permitan establecer si el tratamiento de biorremediación es efectivo y, además, determinar si es plausible de llegar a un desarrollo a escala de campo.

Los ensayos fueron realizados en fermentadores tipo tanque agitado (Minifors, Infors HT®, Switzerland) con un volumen de trabajo de 1,5 L y agitación por propeler Rushton o marino (100 rpm). Estos equipos cuentan con sistema de control de pH y aireación por burbujeo (sparger) con una bomba a 0.5 vvm. El biorreactor fue alimentado con agua del Ao. Cildáñez e iluminado con un juego de luces LED alcanzando una irradiancia de 14,000 k ($400 \mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{s}$) con un fotoperíodo de 16 h.

Se sabe que las algas son sensibles a concentraciones mayores a 100 mg/L de amonio (Capítulo 2.5). El amonio a pH mayores a 9 trae como consecuencia la formación de amoníaco y el desacople de la cadena de electrones en el

fotosistema II (Collos y Harrison, 2014). Esta competencia por el O_2 en la reacción de oxidación conduce su liberación (Muñoz y col., 2005). Sin embargo, rara vez se llegan a esas concentraciones de contaminantes en las aguas del Ao. Cildáñez. El oxígeno proveniente de la fotosíntesis es el que enriquece el medio acuoso estimulando el crecimiento de la microflora. Estos microorganismos se asocian a las microalgas por medio del proceso de nitrificación y por la fotosíntesis que libera O_2 . Los microorganismos autótrofos aeróbicos obligados conocidos como bacterias oxidantes de amonio (AOB) generalmente de los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosopira* presentes en estas aguas residuales incorporan amonio y liberan nitratos (Su y col., 2012; Liu y col., 2018; Sepehri y col., 2020).

También hay que tener especial cuidado con la relación N/P. La falta de cualquiera de estas especies químicas actuará de limitante del crecimiento para el sistema microalgal (Ledda y col., 2015; Sepúlveda y col., 2015).

En los ensayos realizados en los biorreactores alimentados con agua del Ao. Cildáñez, se observó una remoción significativa en la concentración de nitrógeno amoniacal (90 %) y fósforo total (73 %) del agua (Figura 5). Por el contrario, el contenido de nitritos no varió en forma significativa y se mantuvo por debajo de las concentraciones de referencia no representando un parámetro de riesgo ambiental (APHA 2005).

Los metales suelen encontrarse en valores cercanos a los límites permitidos (APHA, 2005). No representan peligros de toxicidad extrema, pero es conveniente removerlos para evitar su acumulación en el ambiente (EPA, 2017). Para ello, la adsorción de metales a determinadas superficies suele ser el método de elección por ser económico y efectivo. Los materiales biosorbentes tales como el salvado de trigo, polvo de algas y algas vivas como *Clamydomonas* sp., *Spirogyra* sp. y *Chlorella* sp., suelen ser utilizados por su fácil obtención y aplicación como un proceso adecuado para la eliminación de metales de las soluciones acuosas (Anastopoulus y Kyzas, 2015; Wang y Wu, 2016; Son y col., 2018; Ngah y col., 2018, Moghazy, 2018). Algunas microalgas tienen la capacidad de acumular en su interior metales pesados y de degradar algunos compuestos orgánicos. Está descrito que la microalga *C. vulgaris* tiene la capacidad de adsorber metales en su pared celular gracias a que se carga con una densidad negativa. Los grupos químicos funcionales como amino, hidroxilo, ácidos, entre otros, de la pared celular atraen por diferencia de cargas a los metales inmovilizándolos en la superficie celular (Monteiro y col., 2012; Kaplan, 2013; Ferraro y col., 2018; Sayadi y col., 2019).

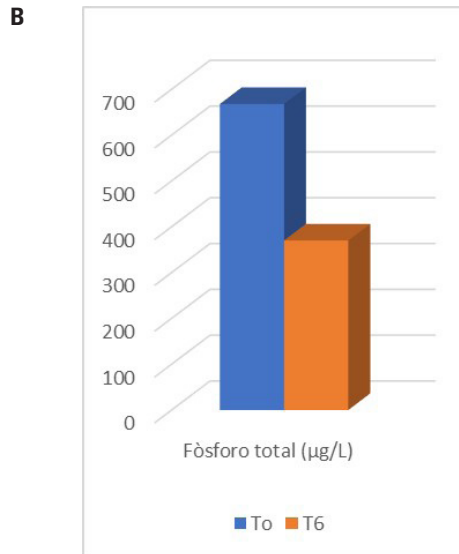
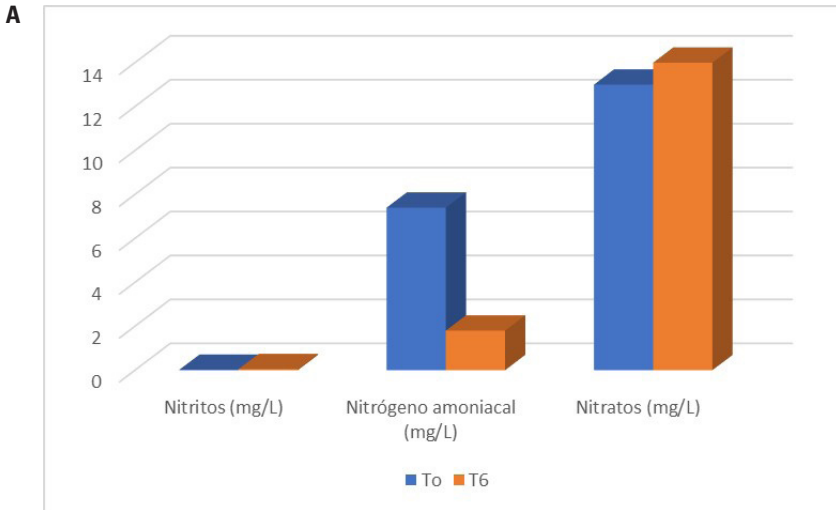


Figura 5. Concentración de nitritos, nitrógeno amoniacal y nitratos (A) y fósforo total (B) en agua del Ao. Cildañez (T0) y luego de 6 días (T6) de cultivar *C. vulgaris* inmobilizadas en perlas de alginato en un cultivo en batch en biorreactor.

Estrategias de remediación para las cuencas de dos ríos urbanos de llanura

Los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo con agua del Lago Lugano y del Ao. Cildáñez son coincidentes. Esta cepa de *C. vulgaris* tiene la propiedad de secuestrar plomo en porcentajes superiores al 90 %, cobre (36%) y arsénico (42 %) (Fig. 6). No obstante, otros metales como cadmio están en los límites de detección de los equipos utilizados y por ello no se detectan porcentajes de remoción significativos (misma figura).

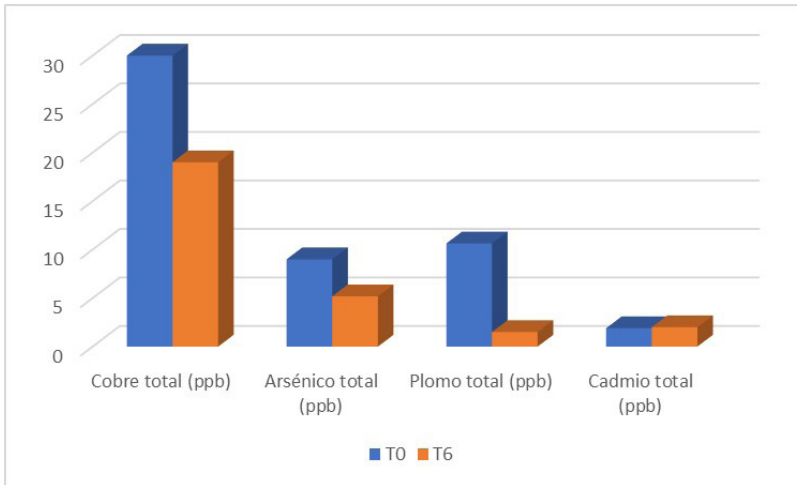


Figura 6. Concentración de cobre, arsénico, plomo y cadmio (ppb) en agua del Ao. Cildáñez (T0) y luego de 6 días (T6) de tratamiento con *C. vulgaris* inmovilizada en perlas de alginato en un cultivo en batch en biorreactor.

También se ha observado que las microalgas son efectivas en la remoción de bacterias coliformes y ayudan a reducir la demanda química y biológica de oxígeno (Abdel-Raouf y col., 2012). El exceso de microbiota patógena (coliformes, estreptococos, enterococos, entre otras) proveniente de los desechos cloacales hacen que estos cuerpos de agua sean altamente peligrosos para el humano (Sayadi y col., 2015; EPA, 2017). Durante el proceso de biorremediación de aguas contaminadas con efluentes cloacales se debe controlar la concentración de microorganismos tendiendo a aumentar la oxigenación y disminuyendo la concentración de nitrógeno y fósforo del medio y las fuerzas de corte generadas por los flujos del fluido (Mujtaba y col., 2017).

ENSAYOS DE CITO Y GENOTOXICIDAD

Para probar si el agua tratada por esta metodología es biorremediada se realizaron test citotóxicos y genotóxicos utilizando semillas de *Allium cepa* (cebolla). Estos test son clásicos y económicos. Las plantas vasculares son ampliamente reconocidas como excelentes modelos genéticos para evaluar y detectar compuestos con potencial citotóxico y genotóxico (Silveira y col., 2018). Así, se puede estimar el potencial citotóxico y el poder genotóxico del agua contaminada siguiendo el índice mitótico y el índice germinativo, respectivamente. Los efectos citoestáticos son valorados a partir de la inestabilidad del DNA e inhibición de la división celular provocados por xenobióticos. Las semillas de *A. cepa* son usadas para evaluar estos daños del ADN, como alteraciones cromosómicas y mitóticas y daños en las células meristemáticas. Estas semillas tienen la ventaja de ser poblaciones homogéneas en términos genéticos y fisiológicos, y disponibles durante todo el año (Leme y Marin, 2009). La primera estructura expuesta a los contaminantes del medio externo son los tips de las raíces que sufren rápidamente las consecuencias del ambiente (Leme y Marin-Morales, 2009). Además, los tips de raíz emergidos presentan células con un reducido número de grandes cromosomas ($2n=16$) que facilitan su observación al microscopio óptico.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en los índices de germinación (IG) y mitótico (IM) a partir de semillas de cebolla regadas con agua del Ao. Cildáñez sin tratar y agua del Ao. Cildáñez previamente tratada con las microalgas inmovilizadas en perlas de alginato. Además, se utilizó un lote de semillas regadas con agua destilada como control del proceso de germinación. Tanto a las 48 h como a los 7 d de haber iniciado el experimento se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) para el IG entre los tratamientos. El IG obtenido con las semillas embebidas con el agua del “Cildáñez” fue significativamente menor respecto de los otros 2 tratamientos. Lo mismo se observó para el IM, también fue significativamente menor en los tips de raíces regados con agua del Ao. Cildáñez sin tratar ($p<0,05$). Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre el tratamiento “Cildáñez tratada” y tratamiento control para todos los parámetros medidos. Estos resultados corroboraron que el tratamiento del agua del Ao. Cildáñez mediante un bioproceso de remediación utilizando *C. vulgaris* inmovilizada en perlas de alginato revierte el efecto tóxico del agua sin tratar.

Tabla 1. Efecto de biorremediación en la citotoxicidad del agua del Ao. Cildáñez. Índice de germinación (IG) y mitótico (IM) en semillas de *A. cepa* utilizando agua proveniente del Ao. Cildáñez sin tratar (Cildáñez), agua tratada (Cildáñez tratada) y agua destilada (control agua). Se utilizó un diseño experimental aleatorio de 10 unidades experimentales con 10 semillas cada una por tratamiento (Groppa y col., 2019; Orozco, 2020). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tratamiento	IG (%) 48 horas	IG (%) 7 días	IM (%) 48 horas
Cildáñez	55 B	70 B	6,09 B
Cildáñez tratada	74 A	93 A	11,01 A
Control agua	86 A	96 A	9,88 A

CONCLUSIONES

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. En nuestros trabajos, hemos estudiado la posibilidad de utilizar una cepa autóctona de *C. vulgaris* para biorremediar aguas contaminadas. Nuestro modelo de contaminación ambiental fue el agua proveniente del lago Lugano y arroyo Cildáñez de CABA. El conjunto de trabajos publicados permitió demostrar que esta cepa de microalga inmovilizada en perlas de alginato permite biorremediar estas aguas en el término de 5 días en sistemas confinados como son los Erlenmeyers y los biorreactores. Lo interesante es que se produce biomasa algal la cual puede ser utilizada en otros procesos a expensas de metabolizar altas concentraciones de CO₂, N y P, nutrientes que remueve del ambiente (Trentini y col., 2017; Groppa y col., 2019). Otras ventajas observadas fueron el secuestro de metales pesados y la disminución de microorganismos patógenos. Así, esta tecnología se presenta como una alternativa potencialmente aplicable a espacios abiertos para su posterior remoción, evitando la eutrofización del sistema. Futuros ensayos tenderán a demostrar la eficiencia de este bioproceso a campo (Capítulo 11).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275.
- Amavizca, E., Bashan, Y., Ryu, C. M., Farag, M. A., Bebout, B. M., & de-Bashan, L. E. (2017). Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokinia*-

na remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

- Anastopoulos, I., & Kyzas, G. Z. (2015). Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *Journal of Molecular Liquids*, 209, 77-86.
- Acién, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2016. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>.
- APHA, American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Ed., Washington DC: American Public Health Association. Accessed 2005.
- APRA 2017, Agencia de Protección Ambiental, Gob. Cdad. Autónoma de Buenos Aires, LEY N° 303 DE ACCESO A LA INFORMACIÓN AMBIENTAL. Eds. Patricia Himschoot y Jesica Paletta.
- 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
- El-Sheekh, M. M., Metwally, M. A., Allam, N. G., & Hemdan, H. E. (2017). Effect of algal cell immobilization technique on sequencing batch reactors for sewage wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research*, 11(5-6), 603-611.
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water research*, 38(19), 4222-4246.
- Durrieu, C., Ferro, Y., Perullini, M., Gosset, A., Jobbágy, M., & Bilmes, S. A. (2016). Feasibility of using a translucent inorganic hydrogel to build a biosensor using immobilized algal cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(1), 9-13.

- EPA WEB Archive 2017, United States Environmental Protection Agency, Ground Water and Drinking Water, Basic Information about Lead in Drinking Water, retrieved from <https://www.epa.gov/>. Accessed on 12/07/2018.
- Ferraro G, Toranzo RM, Castiglioni DM, Lima Jr E, Mansilla MV, Fellenz NA, Bagnato, C (2018) Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low cost magnetic particles. *Algal Research* 33:266-276.
- García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, 202, 21-29.
- Groppa MD, Trentini A, Zawoznik M, Bigi R, Nadra C, Marconi PL (2019) Optimization of a bioremediation strategy for an urban stream of Matanza-Riachuelo basin. *Int J Environ Ecol Eng* 13:418-424.
- Kaplan, D (2013) Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In: Richmond A, Hu Q (Ed) *Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology* John Wiley & Sons, New York.
- Ledda C, Romero Villegas GI, Adani F, Acién FG, Molina E (2015) Utilization of centrate from wastewater treatment for the outdoor production of *Nanochloropsis gaditana* biomass at pilot-scale. *Algal Res* 12:17–25
- Lema, J. M., & Martinez, S. S. (Eds.). (2017). *Innovative wastewater treatment & resource recovery technologies: impacts on energy, economy and environment*. IWA publishing.
- Leme DM, Marin-Morales AM (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682:71–81.
- Long, S. L., Gahan, C. G., & Joyce, S. A. (2017). Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 56, 54-65.
- Moghazy, R. M. (2019). Activated biomass of the green microalga *Chlamydomonas variabilis* as an efficient biosorbent to remove methylene blue dye from aqueous solutions. *Water Sa*, 45(1), 20-28.
- Monteiro CM, Castro PM, Malcata FX (2012) Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol Progress* 28:299-311.
- Mujtaba, G., & Lee, K. (2017). Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water research*, 120, 174-184.

- Ngah, W. W., & Hanafiah, M. M. (2008). Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review. *Bioresource technology*, 99(10), 3935-3948
- Orozco Daniel, Tesis de grado “Ingeniería metabólica en *Chlorella vulgaris* como posible estrategia para aumentar la eficiencia en la remediación de aguas residuales”, Carrera de Biología, U. Maimonides, 2020.
- Perullini, M., Ferro, Y., Durrieu, C., Jobbagy, M., & Bilmes, S. A. (2014). Sol-gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors. *Journal of Biotechnology*, 179, 65-70.
- Sayadi MH, Rashki O, Shahri E (2019) Application of modified *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* powder on the adsorption of heavy metals from aqueous solutions. *J Environ Chem Eng* 7:103169.
- Sepehri, A., Sarrafzadeh, M. H., & Avateffazeli, M. (2020). Interaction between *Chlorella vulgaris* and nitrifying-enriched activated sludge in the treatment of wastewater with low C/N ratio. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119164.
- Sepúlveda C, Acién FG, Gómez C, Jiménez-Ruiz N, Riquelme C, Molina-Grima E (2015) Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Res* 9:107–116
- Shao, J., Jiang, Y., Wang, Z., Peng, L., Luo, S., Gu, J., & Li, R. (2014). Interactions between algicidal bacteria and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: lytic characteristics and physiological responses in the cyanobacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(2), 469-476.
- Silveira, M. A. D., Ribeiro, D. L., Vieira, G. M., Demarco, N. R., & d’Arce, L. P. G. (2018). Direct and indirect anthropogenic contamination in water sources: evaluation of chromosomal stability and cytotoxicity using the *Allium cepa* test. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100(2), 216-220.
- Son, E. B., Poo, K. M., Mohamed, H. O., Choi, Y. J., Cho, W. C., & Chae, K. J. (2018). A novel approach to developing a reusable marine macro-algae adsorbent with chitosan and ferric oxide for simultaneous efficient heavy metal removal and easy magnetic separation. *Bioresource technology*, 259, 381-387.
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2012 Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresour. Technol.* 105, 67–73
- Trentini A, Groppa MD, Zawoznik M, Bigi R, Perelman PE, Marconi PM (2017) Biorremediación del lago Lugano de la Ciudad Autónoma de Bue-

nos Aires por algas unicelulares – estudios preliminares para su posterior utilización. Terra Mundus 4 <http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/handle/123456789/4302>.

- Tuantet, K., Temmink, H., Zeeman, G., Janssen, M., Wijffels, R. H., & Buisman, C. J. (2014). Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water research*, 55, 162-174.
- Vogel, G. F., Martinkoski, L., Bittencourt, H. V. H., & Grillo, J. F. (2013). Agronomic performance of *Azospirillum brasilense* on wheat crops. *Applied Research & Agrotechnology*, 6(3), 111-119
- Wang J, Wu L (2016) Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnol Proc* 34: 1103-112. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.07.001.
- Wang, L., Addy, M., Lu, Q., Cobb, K., Chen, P., Chen, X., ... & Ruan, R. (2019). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in sludge extracts: Nutrient removal and algal utilization. *Bioresource technology*, 280, 505-510.
- Yao, S., Lyu, S., An, Y., Lu, J., Gjermansen, C., & Schramm, A. (2019). Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of applied microbiology*, 126(2), 359-368.
- Zhou, J., Lyu, Y., Richlen, M. L., Anderson, D. M., & Cai, Z. (2016). Quorum sensing is a language of chemical signals and plays an ecological role in algal-bacterial interactions. *Critical reviews in plant sciences*, 35(2), 81-105.