

Trabajo Final
Ingeniería Ambiental



Tratamiento de lactosuero acoplado a la producción de biomasa:

Estudio de factibilidad a escala laboratorio
para el cultivo de cianobacterias con fines
biotecnológicos.

Tutor Académico:
Dr. Pérez, Leonardo M.

Co-Tutor Académico:
Lic. Carralero Bon, Iván

Asesora Técnica:
Lic. Bergara, Daniela

Autoras:
Lione, Danisa
Chenevier, DelfinTua
Fideleff, Sofía

2021

Índice

1. Introducción	2
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Marco Teórico	4
3.1. Cianobacterias	4
3.2. Lactosuero	11
3.3. Estado del Arte	21
3.4. Análisis FODA	23
4. Materiales y Métodos	25
4.1. Adquisición de cianobacterias y lactosuero	25
4.2. Caracterización del lactosuero	26
4.3. Preparación de los cultivos	31
4.4. Determinación de parámetros físico-químicos y fisiológicos	31
4.5 Determinación de peso seco	35
4.6. Análisis estadístico	35
5. Resultados	36
6. Conclusiones	46
7. Anexo – Matriz Legal	51
8. Bibliografía	52

1. Introducción

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la factibilidad de acoplar el tratamiento de lactosuero ácido al cultivo de cianobacterias, buscando así no sólo revalorizar los nutrientes aún presentes en el llamado “suero de quesería”, sino también generar experiencias sencillas y económicamente accesibles para promover su tratamiento “in-situ”, desalentando su posible eliminación al ambiente sin el pretratamiento adecuado y/o evitando el traslado de grandes volúmenes a centros de tratamiento específicos.

Llegamos a este tema a través de un interés genuino por realizar un trabajo original y distinto, que contenga experiencias prácticas y “tangibles” que sumen a nuestra formación académica y profesional, y que no sólo implique la elaboración teórica de la problemática a indagar. La posibilidad de trabajar en el laboratorio fue una gran motivación y excelente oportunidad para seguir ampliando nuestro horizonte de conocimientos. Nos encontramos así con nuestro tutor, quién nos ayudó a elaborar y profundizar la idea del trabajo, acrecentando nuestro interés por la potencialidad de su aplicación, hecho que no sólo se traduciría en un impacto positivo para el ambiente sino también para el sector socio-productivo local y nacional.

Consideramos que fue una decisión muy acertada, y esperamos que más estudiantes tengan la oportunidad de realizar este tipo de “trabajo final”, ya que nos permitió poner en práctica conceptos teóricos adquiridos en la cursada -aunque de una manera más abstracta- relacionados con el tratamiento de efluentes, reutilización y circularidad, bioeconomía, prevención de la contaminación, cuidado del ambiente desde una perspectiva social y, por supuesto, toda la ingeniería y la logística que necesariamente existe detrás de la implementación de un sistema de tratamiento en pequeña y/o mediana escala.

El presente documento que da cuenta de las actividades realizadas se desarrollará de la siguiente manera: comenzaremos planteando los objetivos del trabajo y seguiremos con un amplio marco conceptual que define los elementos de trabajo y argumenta la viabilidad teórica del mismo. Presentaremos, también, un breve resumen del marco socio-político nacional y regional referido al “sector lácteo”.

Por último, se profundizará en el detalle técnico de la metodología utilizada para la ejecución del trabajo experimental, que incluye una sección de materiales y técnicas analíticas empleadas, finalizando con la discusión de los resultados obtenidos.

Esperamos que este “viaje” a lo largo del presente documento les produzca la misma emoción y satisfacción que hemos sentido al momento de concretarlo...

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Indagar e informar acerca de la problemática de los efluentes de la industria láctea en la provincia de Santa Fe con el propósito de proponer una alternativa redituable a la disposición de lactosuero en PyMEs lácteas a través de su incorporación como sustrato para la producción de biomasa con alto valor nutritivo y/o tecnológico.

2.2. Objetivos Específicos

- Relevar y analizar información acerca de la problemática de la disposición y tratamiento de efluentes de la industria láctea en la provincia de Santa Fe.
- Evaluar y comparar cuantitativamente el crecimiento de cianobacterias utilizando diferentes proporciones de lactosuero industrial como medio de cultivo, en comparación al medio mínimo salino tradicional (Zarrouk) utilizando para el desarrollo de estos microorganismos.
- Cuantificar diferentes parámetros fisiológicos (concentración de clorofilas, carotenoides, proteína total, carbohidratos solubles) e indicadores de crecimiento (actividad deshidrogenasa, peso seco) con el fin de determinar la calidad/cantidad de la biomasa obtenida y su respuesta metabólica en las condiciones de cultivo analizadas.
- Adquirir experiencia práctica en el trabajo de laboratorio, y los criterios necesarios para una adecuada obtención de datos experimentales, y su posterior análisis.

3. Marco Teórico

3.1. Cianobacterias

3.1.1. Generalidades

Las cianobacterias o microalgas son bacterias procariotas, pero poseen el aparato fotosintético de las algas eucariotas. Presentan una alta tolerancia a condiciones ambientales y/o de crecimiento extremas, y una gran flexibilidad adaptativa. Se las encuentra en ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como salobre, y pueden ser unicelulares o pluricelulares. Otra particularidad es que son los únicos organismos fotoautotróficos capaces de fijar nitrógeno atmosférico, por lo cual se ha indagado en su empleo como “biofertilizantes”.

Por otro lado, estos organismos poseen características morfológicas muy heterogéneas. Existen con formas unicelulares, coloniales y filamentosas, con o sin ramificaciones. En función de la presencia de células diferenciadas se distinguen filamentos homocistineos (sin células diferenciadas) y heterocistineos (con células diferenciadas). No se observan formas móviles dado que carecen de cilios o flagelos.

Cuando se encuentran en su forma libre en cuerpos de agua naturales pueden originar *blooms* o *floraciones algales* que son proliferaciones masivas de cianobacterias. Estas traen como consecuencia una disminución del oxígeno disuelto y, potencialmente, la liberación de compuestos tóxicos o “cianotoxinas”, así como de compuestos volátiles que alteran las características organolépticas del agua. Estos metabolitos secundarios pueden representar un riesgo para las personas y para la biota asociada a los cuerpos de agua afectados.

Tradicionalmente, se clasifican en 4 órdenes: *Chlorococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* y *Stigonematales*. Particularmente, en el presente trabajo, se utilizaron cultivos de cianobacterias pertenecientes al orden *Oscillatoriales* (Fig. 1) cedidos por el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Ambiental, Química y Biotecnología Aplicada (INGEBIO-UCA) con sede en la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA-campus Rosario), lugar en el cual se desarrolló el presente estudio.



Figura 1. Fotografía representativa de una cianobacteria perteneciente al orden *Oscillatoriales* (*Oscillatoria* sp., longitud 2-3 μm , ancho 10 μm). Fuente: Prokaryote: Cyanobacteria: Oscillatoria, 2021

Algunas especies de cianobacterias pertenecientes a los géneros *Arthrospira* sp. (popularmente conocida como “Espirulina”) y *Nostoc* sp. han sido cultivadas y consumidas históricamente por pobladores del valle de Méjico y del lago Chad en Perú, así como en distintas locaciones de China y Siberia. Sin embargo, no todas las especies son comestibles, algunas pueden contener o generar sustancias tóxicas. En los últimos años, se ha incrementado el interés por el estudio de estos microorganismos fotoautótrofos debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas, particularmente como fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran valor económico; tales como clorofilas, carotenoides, proteínas, y otros metabolitos biológicamente activos. Además, muchos de los compuestos obtenidos a partir de estos microorganismos poseen propiedades antibióticas y antivirales¹.

Además de las utilidades antes mencionadas, se suman otras como la producción de energía “limpia” (biogás, biocombustibles, etc.) y la depuración de aguas residuales. En este sentido, el cultivo de cianobacterias ha cobrado relevancia mundial por su capacidad para dar respuesta a distintas problemáticas (Fig. 2).

¹ Giannuzzi et al (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud de la Nación.



Figura 2. Potencial contribución de las microalgas en respuesta a tres de las grandes crisis que actualmente afectan a la humanidad. Fuente: Adaptado de AST Ingeniería, S.L. (2014). Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas en el litoral cantábrico. FSE.

Sin embargo, el cultivo industrial de cianobacterias presenta diferentes desafíos, como, por ejemplo, una alta tasa de crecimiento y tolerancia a las variaciones estacionales sumado a la obtención de una biomasa con propiedades adecuadas para fines comerciales. Aunque el uso de las cianobacterias para el tratamiento de efluentes con alta carga contaminante podría limitar sus usos para alimentación humana y animal, podría ser una alternativa válida para acoplar su crecimiento a escala con el fin de producir biocombustibles, generar biogás, o para su aplicación como biofertilizante².

3.1.2. Composición nutricional

El consumo de cianobacterias como “alimento funcional” es milenario, habiéndose utilizado ampliamente en la antigüedad para combatir numerosas patologías; sin embargo, su incorporación a la dieta occidental fue impulsada desde hace sólo algunas décadas debido a su alta densidad proteica y a elevado contenido en aminoácidos de alto valor biológico³. Además, estos organismos aportan una importante cantidad de nutrientes (Tabla 1) habiendo demostrado también una muy buena aceptación organoléptica, lo cual ha facilitado su aceptación para el consumo como suplemento nutricional.

² Labbé et al. (2017). Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier.

³ Gutiérrez-Salmeán, et al (2015). Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). *Nutrición Hospitalaria*.

Tabla 1. Composición y nutrientes presentes en el alga comercial “Espirulina”. Fuente: Adaptado del sitio web: <https://www.ecospirulina.es/mini-guia-elegir-espirlulina/composicion-nutrientes/>

Composición nutricional de la microalga “Espirulina”	
Vitaminas	Composición (cada 10 g)
Pro-A (Betacaroteno)	14 mg
B1 (Tiamina)	0,35 mg
B2 (Riboflavina)	0,4 mg
B3 (Niacina)	1,4 mg
B5 (ácido pantoténico)	0,01 mg
B6 (piridoxina)	0,06 mg
B8 (Biotina)	0,005 mg
B9 (ácido fólico)	0,01 mg
B12 (Cianocobalamina)	3,2 µg
E (α-tocoferol)	1 mg
K (Fitomenadiona)	244 µg
Inositol	6,4 mg
Minerales	Composición (cada 10 g)
Calcio	100 mg
Hierro	18 mg
Magnesio	40 mg
Fósforo	80 mg
Potasio	140 mg
Zinc	0,3 mg
Cobre	0,12 mg
Manganeso	0,5 mg
Sodio	0,09 mg
Aminoácidos esenciales	Composición (cada 10 g)
Fenilalanina	280 mg
Histidina	100 mg
Isoleucina	350 mg
Leucina	540 mg
Lisina	290 mg
Metionina	140 mg
Treonina	320 mg
Triptófano	90 mg
Valina	400 mg
Pigmentos y enzimas	Composición (cada 10 g)
Clorofila a	79 mg
Carotenoides	37 mg
Betacaroteno	7-20 mg
Ficocianina	1500-2000 mg

Ácidos grasos	Composición (cada 10 g)
Ácido linolénico	120 mg
Ácido linoléico	80 mg
Ácido oléico	11 mg

3.1.3. Usos de las cianobacterias

3.1.3.1. Tratamiento de aguas residuales

La utilización de cianobacterias para el tratamiento de aguas residuales ha demostrado ser eficiente y efectiva, especialmente en su capacidad para remover nutrientes, xenobióticos y compuestos tóxicos (por ej., metales pesados, fármacos, pesticidas, etc.). Entre sus ventajas, se pueden mencionar la implementación de sistemas de tratamiento con menores costos operación y requerimiento de aditivos químicos, y la consecuente recuperación de la biomasa cultivada para su revalorización y/o reemplazo⁴.

3.1.3.2. Alimentación animal

Si bien el consumo de biomasa microbiana presenta numerosas ventajas nutricionales, la misma puede presentar algunos riesgos para animales monogástricos debido a su elevado contenido en ácidos nucleicos y celulosa. La ingesta elevada de estas sustancias puede causar un aumento en el nivel de ácido úrico, degeneración hepática, y problemas de indigestión y alergias⁵. Por ejemplo, en las aves de corral, su consumo masivo puede cambiar el color de la piel y la pigmentación de la cáscara de los huevos⁶.

Por su parte, los rumiantes no sufren estas complicaciones y son capaces de utilizar de manera más eficiente la proteína algal⁵. En este sentido, la incorporación de cianobacterias y microalgas como suplemento en piensos para ganado ha demostrado ser muy beneficiosa, habiéndose reportado una estimulación del sistema inmunológico y una disminución en la necesidad de terapias antibióticas en animales de granja, posiblemente relacionadas con modificaciones en la microbiota intestinal, nasal y fecal.

Adicionalmente, en la acuicultura moderna, el género *Isochrysis* se utiliza tradicionalmente como alimento de larvarios debido a sus altos niveles de ácidos grasos⁷.

⁴ Daneshvar et al (2019) Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition.

⁵ Juliano, Muset, Castells et al (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

⁶ Santos et al (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Anales de mecánica y electricidad.

⁷ AST Ingeniería, S.L. (2014). Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas.

3.1.3.3. Aplicaciones en la industria cosmética y alimenticia

El consumo humano de microalgas está restringido a unas pocas especies debido a la existencia de regulaciones en materia de seguridad alimentaria, comercialización y demanda del mercado. Las especies que mayormente se cultivan para consumo humano son:

- *Chlorella*
- *Spirulina*
- *Dunaliella*

Principalmente, estos organismos se comercializan como suplementos dietarios en diferentes formatos, ya sea en cápsulas o como algas secas en polvo (Fig. 3).



Figura 3. Formatos tradicionales para la comercialización de productos a base de microalgas y/o cianobacterias. Fuente: Google Imágenes.

Algunas especies se utilizan para producir extractos que se agregan a diferentes productos cosméticos tales como jabones, protectores solares y cremas (antiarrugas, regeneradoras, etc.), ente otros (Fig. 4). En particular, muchos de estos productos se encuentran con frecuencia en el mercado internacional de la cosmética “ecológica” de países como Estados Unidos, Canadá y Europa Central. Algunas marcas que han logrado posicionarse a nivel global con productos a base de microalgas son Weleda y La Biosthetique.



Figura 4. Ejemplos de productos cosméticos comerciales a base de microalgas. Fuente: Google Imágenes.

También se utilizan con diferentes propósitos en la producción de alimentos, tales como la “tostada sirena” y los “smoothies” verdes, tanto por sus propiedades nutricionales como para otorgarles un color “verde-azulado” a estos productos (Fig. 5).



Figura 5. Algunos ejemplos de productos alimenticios que incluyen microalgas como parte de sus ingredientes. Fuente: Google Imágenes.

Así mismo, es importante destacar que en reconocimiento a sus importantes propiedades nutricionales, en el año 2003, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) impulsó la creación del Instituto Intergubernamental Pro-utilización del alga *Spirulina* con el fin de cooperar en la investigación científica orientada a promover el empleo de esta microalga con fines alimenticios, sobre todo en situaciones de emergencia sanitaria y en casos de malnutrición crónica en poblaciones vulnerables⁸.

3.1.3.4. Generación de energía

El uso de cianobacterias para la producción de biocombustible tiene la doble ventaja de ser una fuente de energía alternativa que no profundiza la crisis climática y que, además, en comparación con otros cultivos empleados para la generación de bioenergías, su producción a escala no implica el uso de grandes extensiones de tierra ni compite en forma directa con la alimentación. Además, debido a su desarrollo autótrofo, durante el crecimiento de la biomasa algal se favorece la captación de CO₂, uno de los gases estrechamente asociado al calentamiento global⁹.

La tecnología para elaborar combustibles a partir de cianobacterias ha demostrado tener potencial tanto en estudios teóricos, como a nivel de laboratorio y a escala piloto. Sin embargo, para su viabilidad económica y sostenibilidad ambiental, se requiere una reducción de costos de producción y garantizar balances de carbono y energía positivos¹⁰.

⁸ Proyecto de Resolución, Segunda comisión, tema 52, Desarrollo Sostenible (31 de octubre de 2005). Asamblea General Naciones Unidas.

⁹ Daneshvar et al (2019) Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition.

¹⁰ Santos et al (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Anales de mecánica y electricidad.

El biocombustible proveniente de cianobacterias más estudiado es el biodiésel por su mayor facilidad para la producción. Si bien pueden obtenerse otros combustibles a partir de estos microorganismos, las técnicas de producción son más complejas y costosas¹¹.

3.1.4. Modos de cultivo según la fuente de energía

Los cultivos de cianobacterias pueden clasificarse en:

- *Fotoautotróficos*: el medio de cultivo no aporta carbono orgánico, por lo que las microalgas crecen estrictamente mediante la fotosíntesis.
- *Heterotróficos*: el medio aporta carbono orgánico y las microalgas no fotosintetizan. Para que un cultivo sea exclusivamente heterotrófico no debe haber exposición de este a la luz.
- *Mixotróficos*: el medio aporta carbono orgánico y las microalgas pueden fotosintetizar. Esta forma de crecimiento es más frecuente que el cultivo estrictamente heterotrófico.

3.1.6. Recuperación de la biomasa

Durante la producción de microalgas, la etapa más costosa del proceso es su separación del medio de cultivo. Esto se debe a la dificultad técnica que representa. El método por utilizar depende de varios factores, tales como la especie de microalga, la densidad del cultivo, el uso posterior de la biomasa y de los costos de operación ¹². Las técnicas más empleadas son: sedimentación, floculación, centrifugación, filtración y flotación. Una vez separada la biomasa del medio de cultivo, la misma se seca para evitar su descomposición.

3.2. Lactosuero

3.2.1. Características

El lactosuero o suero de quesería es el subproducto líquido que se obtiene como resultado de la elaboración de quesos, luego de la separación del coágulo de leche y la precipitación de las caseínas. Se caracteriza por ser un fluido de color amarillento, con turbidez elevada y olor similar al yogur. Dependiendo del tipo de coagulación que se haya utilizado para la elaboración del queso, se pueden obtener dos tipos distintos de lactosuero: el “suero dulce”, por coagulación enzimática; y el “suero ácido”, por coagulación mixta o láctica. En cualquiera de estos casos, este residuo representa cerca del 90% del volumen de la leche procesada para la obtención del

¹¹ Giannuzzi et al (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud de la Nación.

¹² AST Ingeniería, S.L. (2014). Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas en el litoral cantábrico. FSE.

queso y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes¹³; es decir, por cada 10 litros de leche procesados, se obtiene 1 litro de queso, y 9 litros de lactosuero.

El lactosuero puede ser considerado tanto un efluente como un subproducto. Como subproducto, suele utilizarse en la elaboración de bebidas fermentadas y no fermentadas, entre otros productos. En este caso, el suero es filtrado y pasteurizado a 72°C durante 15 segundos, antes de ser almacenado en condiciones de inocuidad a temperaturas inferiores a 6°C (Fig. 6). Dependiendo del uso final al que se destine, podrá realizarse o no su desnatado¹⁴.



Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de lactosuero. Adaptado de Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

¹³ Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable de la Nación. (2018). Recuperación y valorización de lactosuero en PYMES de la cuenca láctea argentina, a través de la asociación público-privada.

¹⁴ Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

3.2.2. Calidad nutricional

En la Tabla 2, se muestra la gran cantidad de nutrientes y componentes que contiene el suero de quesería y su potencial para la obtención de productos de alto valor agregado.

Tabla 2. Composición y nutrientes del lactosuero. Fuente: Adaptado de Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

Composición y nutrientes del lactosuero	
Mayoritarios (g/L)	
Agua	935
Sólidos Totales	65
Carbohidratos (g/L)	
Lactosa	47
Materia grasa (g/L)	
Triglicéridos	0,25
Diglicéridos	0,05
Ácidos Grasos	0,05
Fosfolípidos	1,5
Minerales (g/L)	
Calcio	0,3
Magnesio	0,1
Fósforo	0,7
Potasio	1,5
Cloruro	1,1
Sodio	0,5
Proteínas (g/L)	
β -Lactoglobulinas	0,3
α -Lactoalbumina	1,2
Seroalbumina	0,4
Inmunoglobulinas	0,7
Proteasas/peptonas	0,6
Nitrógeno no proteico (mg/L)	
Urea	80
Aminoácidos	25
Colina	15
Ac. Orótico	12
Vitaminas (mg/L)	
B5	4
B2	1,5
C	1,5
B6	0,5
Elementos traza (mg/L)	
Zinc	1,5
Hierro	0,6
Iodo	0,5
Cobre	0,2

- *Carbohidratos:* representan una gran proporción de los componentes del lactosuero. Específicamente la lactosa representa alrededor del 70% de los sólidos totales¹⁵.

¹⁵ Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

- *Proteínas*: representan aproximadamente el 12% de los sólidos totales en el suero, contienen altos niveles de aminoácidos que le imparten un alto valor nutricional. Sus proteínas son altamente valoradas por su composición y digestibilidad, y se las considera nutricionalmente superiores a las proteínas de origen vegetal. Por ello están tomando gran relevancia en la industria de alimentos y farmacéutica¹⁴.
- *Minerales y vitaminas*: El lactosuero es rico en potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio, vitaminas del grupo B y ácido ascórbico¹⁴.

3.2.3. Usos del lactosuero

Algunos productos alimenticios elaborados a partir del lactosuero o que lo utilizan como uno de sus ingredientes son:

- Quesos: ricota, urda, requeijão y requesón
- Bebidas lácteas
- Bebidas con frutas
- Bebidas fermentadas: kéfir de leche, yogurt
- Bebidas alcohólicas: cervezas artesanales
- Bebidas para deportistas
- Productos de panadería y confitería: ya sea en remplazo total o parcial de algunos ingredientes como huevo, leche en polvo, mantequilla y sacarosa. Además, la incorporación de lactosuero en este tipo de productos incrementa su valor nutricional.
- Helados, dulces y postres de leche¹⁶

3.2.4. Impactos ambientales asociados a la disposición del lactosuero crudo al ambiente

El vuelco del lactosuero sin tratamiento previo provoca un impacto muy negativo en el ambiente que no sólo es evitable, sino que resulta en el desperdicio de un subproducto con alto valor nutricional que podría ser aprovechado para la generación de valor agregado.

La eliminación inadecuada de lactosuero se debe principalmente a la alta cantidad de agua en su composición (93-95%), lo que hace muy costoso su transporte, concentración, secado y fraccionamiento, especialmente para las PyMEs lácteas. Como se puede observar en la Figura 7, de los 10 millones de litros de lactosuero que aproximadamente se producen por día en Argentina, sólo el 45% se reprocessa. Sobre el 55% restante no hay datos exactos; sin embargo, se estima que una parte se utiliza para alimentación animal y otra es vertida al ambiente (en general, sin tratamiento adecuado).

¹⁶ Mazorra-Manzano et al (2019) Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal.

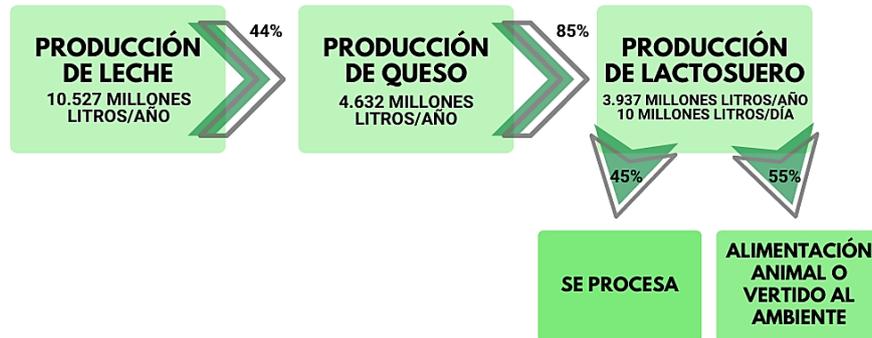


Figura 7. Relación entre la producción de leche, lactosuero y su destino. Adaptado de Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

La incorrecta eliminación del lactosuero al ambiente como efluente crudo trae aparejado la contaminación del agua por diversos factores, tales como:

- Aumento de la Demanda Química y Biológica de Oxígeno (DQO y DBO), y disminución de la concentración de Oxígeno Disuelto (OD).
- Aumento del contenido de grasas y aceites.
- Aumento de la concentración de fosfatos, nitratos y otras especies del nitrógeno.
- Incorporación de microorganismos.
- Alteración del pH del medio.

Estas variaciones en los parámetros indicadores de calidad del agua se traducen en los siguientes efectos: eutrofización, pérdida de biodiversidad autóctona, generación de olores desagradables, aumento de los costos de potabilización, aumento del potencial de transmisión de enfermedades, modificación de los hábitos de recreación y/o de otras actividades, como la pesca de subsistencia.

3.2.5. Industria Láctea en Argentina

Como puede apreciarse en la Figura 8, la mayor concentración de industrias lácteas en el país se ubica en la región de La Pampa húmeda. El relevamiento realizado por el INTI entre los años 2016 y 2018 arrojó que el 88% de estas industrias destinan la mayor parte de la leche que producen a la elaboración de quesos. A su vez, considerando como PyME a las empresas que procesan volúmenes de leche menores a 50.000 L/día¹⁷, este informe reveló que el 90% son PyMEs (Tabla 3).

¹⁷ Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación (2018). Recuperación y valorización de lactosuero en PYMES de la cuenca láctea argentina, a través de la asociación público-privada.

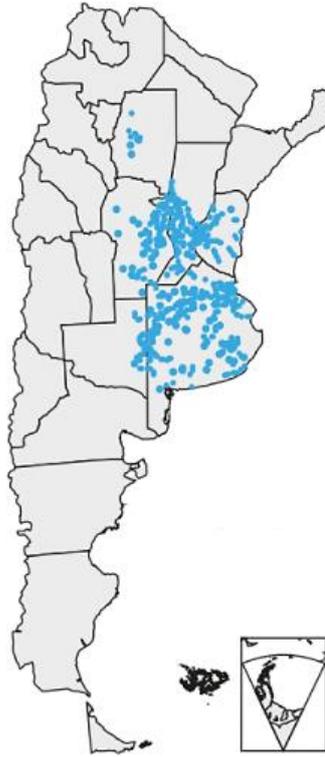


Figura 8. Mapa de la localización de las principales industrias lácteas en Argentina. Fuente: Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

Tabla 3. Caracterización de empresas lácteas argentinas que destinan queso a leche. Adaptado de Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

Tipo de industria según cantidad de producción de leche		Cantidad de industrias	Volumen de suero generado (L/d)
PyMEs	Hasta 1.000 L/d	72	32.361
	Entre 1.000 y 10.000 L/d	301	975.012
	Entre 10.000 y 50.000 L/d	163	2.941.719
Grandes	Desde 50.000 L/d	54	9.698.794
Total		590	13.647.887

Dado que el transporte de lactosuero es muy costoso debido a los grandes volúmenes que se generan, se han desarrollado algunos “clústeres” (agrupaciones) en el país con el fin de mejorar la eficiencia colectiva de las PyMEs en cuanto a la disposición final de este residuo. La conformación de estos “clústeres” ha facilitado la generación de agregado de valor a partir del lactosuero, así como el tratamiento de los efluentes generados, disminuyendo de esta manera los costos de traslado. En la llamada “cuenca láctea” argentina se han localizado cinco “clústeres” (Fig. 9); sin embargo, ninguno de ellos se ha conformado en la provincia de Santa Fe, lo cual representa una desventaja para nuestra región, especialmente en cuanto a la capacidad de las PyMEs lácteas santafesinas para revalorizar este subproducto y/o tratar sus efluentes.

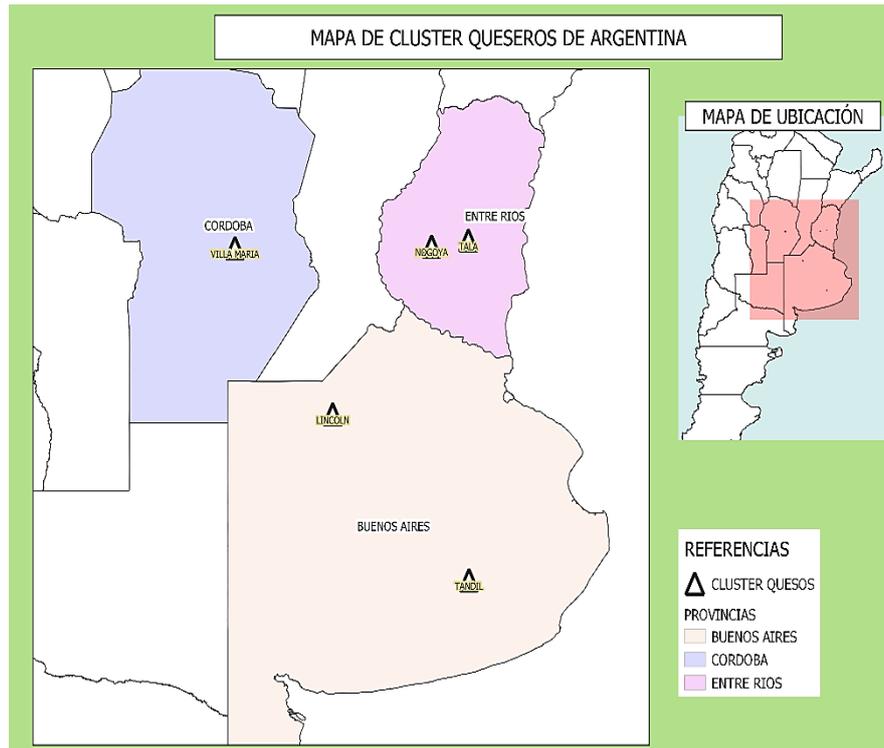


Figura 9. Mapa de clústeres queseros de Argentina. Elaborado a partir de datos tomados de Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI.

3.2.5.1. Tratamiento de Lactosuero

Las empresas argentinas que tratan el lactosuero como efluente suelen aplicar sistemas de tratamiento tradicionales, tales como lagunas aeróbicas y anaeróbicas, acopladas a procesos de desgrasado, floculación y/o cloración. En la literatura consultada, no se hallaron reportes de empresas que utilicen este residuo para la generación de combustibles alternativos.¹⁸

3.2.6. Industria láctea en Santa Fe

Específicamente, nuestra provincia se posiciona como la segunda cuenca lechera más importante de Argentina con un total de 3.800 tambos relevados en el último censo (Fig. 10), siendo responsable del 25% de la leche producida en el país¹⁹. Dentro de la provincia, la actividad láctea es especialmente intensiva en los territorios del Centro-Oeste que poseen una larga tradición en el rubro y constituyen la principal cuenca lechera provincial. Los departamentos de mayor producción son: Castellanos, Las Colonias, San Cristóbal y San Martín, que juntos suman el 25% del total de las cabezas de ganado en tambo registradas en Argentina. Desde hace aproximadamente 15 años, la producción asciende a unos 10.000 millones de litros anuales. Al realizar un análisis por producto de las exportaciones del sector lácteo santafesino,

¹⁸ Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable de la Nación. (2018). Recuperación y valorización de lactosuero en PYMES de la cuenca láctea argentina, a través de la asociación público-privada.

¹⁹ Lechería y Política Láctea. Provincia de Santa Fe: Sitio web.

se destacan dos líneas principales que conforman el 97% del total, siendo estas las leches y los quesos. La exportación de lactosuero santafesino representa tan sólo el 1% del total (Fig. 11)²⁰.

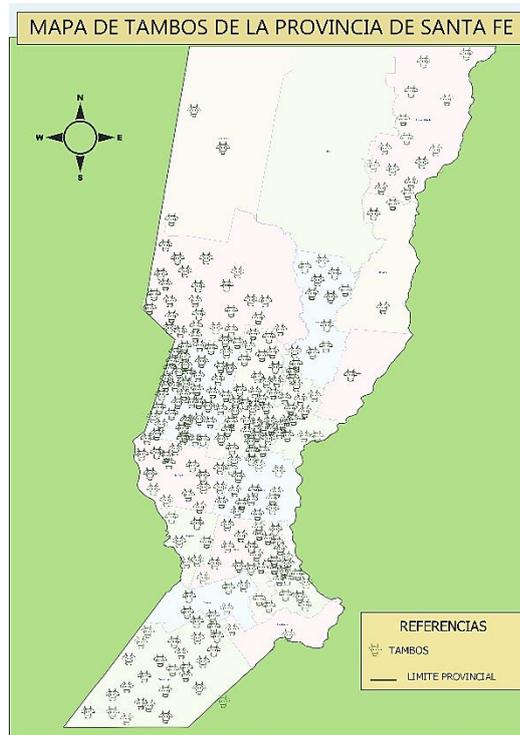


Figura 10. Mapa de tambos de la Provincia de Santa Fe. Elaborado a partir de datos del Registro de Tambos de la Provincia de Santa Fe.

Es importante destacar que, dado el alto costo asociado al tratamiento del lactosuero, sólo el 5% de las empresas que producen importantes volúmenes de suero lácteo (Tabla 4) poseen la capacidad operativa para su procesamiento, dedicándose principalmente a la elaboración de distintos tipos de ingredientes (como los mencionados en el apartado **3.2.3**), así como al fraccionamiento y comercialización de insumos de alto valor agregado (principalmente, lactosa y proteínas) empleados en la generación de productos farmacéuticos y/o alimenticios, abasteciendo tanto al mercado interno como externo.

²⁰ Bergero, Sigauco (2020). Sector lácteo santafesino: producción primaria, industrial y proyección exportadora. BCR.

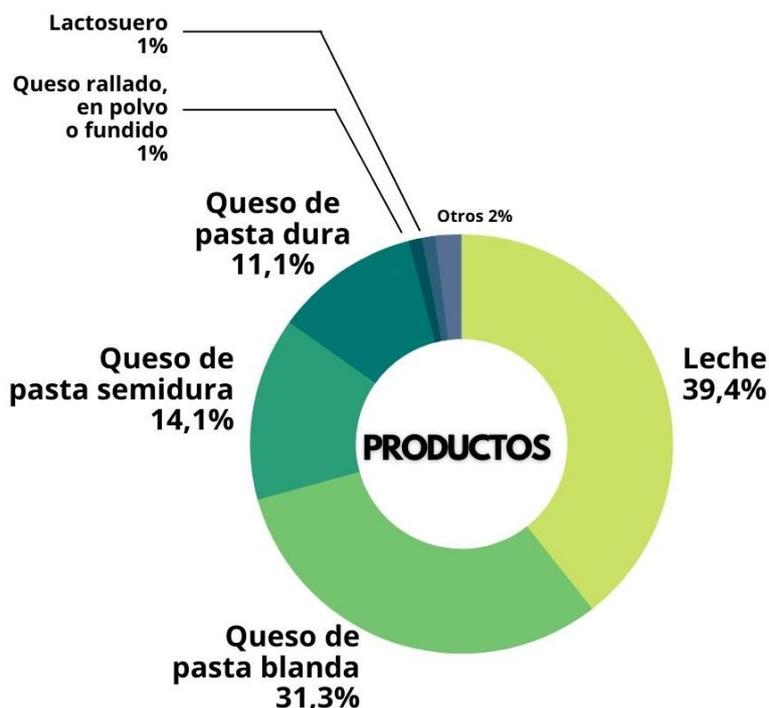


Figura 11. Detalle de las exportaciones santafesinas de lácteos según producto. Adaptado de Bergero, Sigauco (2020). Sector lácteo santafesino: producción primaria, industrial y proyección exportadora. BCR.

Tabla 4. Empresas lácteas de Santa Fe. Adaptado de Bergero, Sigauco (2020). Sector lácteo santafesino: producción primaria, industrial y proyección exportadora. BCR.

Tipo de industria según cantidad de producción de leche	Cantidad de industrias (%)
Pequeñas – Hasta 5.000 L/d	45
Medianas – Entre 5.000 a 250.000 L/d	50
Grandes – Desde 250.000 L/d	5
Total	100

En el caso de las PyMEs queseras, el suero generado tiene principalmente dos destinos: la alimentación animal o la eliminación como efluente líquido no tratado; esta segunda, provocando un incremento de los niveles de contaminación ambiental en las zonas cercanas a las fábricas y, además, desaprovechando una importante fuente de proteínas y de macro y micronutrientes que pueden emplearse para la alimentación (humana y/o animal)²¹.

3.2.6.1. Vertido de efluentes en Santa Fe: Resolución N°1089/82

En la Tabla 5 se informan valores promedio de pH, contenido de grasas, sólidos totales, DQO y DBO para el caso de lactosueros típicos, y se los compara con los valores límites de descarga admitidos en la legislación provincial vigente (Resol. Nro. 1089/82) para efluentes industriales.

²¹ Bergero, Sigauco (2020). Sector lácteo santafesino: producción primaria, industrial y proyección exportadora. BCR.

Se observa que todos los parámetros considerados se encuentran fuera del rango de valores permitidos, a excepción del pH del lactosuero “dulce” que suele ser cercano al de la leche (pH~6,4). Estos valores explican el hecho de que el vertimiento del lactosuero como efluente sin tratar sea ilegal, y resalta la importancia de efectuar un tratamiento adecuado previo a su disposición final.

Tabla 5. Elaboración propia adaptado de la Resolución Provincial N°1089/82.

Parámetro	Rango admitido*	Valores promedios hallados en lactosueros**
pH	5,5-10	2,5-6,4
Sustancias Grasas	100-200 mg/L	300-500 mg/L
Sólidos Totales	30-500 mg/L	65.000 mg/L
DBO	50-300 mg/L	35.000 mg/L
DQO	75-375 mg/L	68.000 mg/L

*Varía según el punto de descarga. **Fuente: Valorización del Lactosuero, INTI, 2017

Los cuerpos de agua han sido históricamente considerados receptores de diferentes tipos de desechos, siendo frecuente que las industrias trasladen la externalidad de sus acciones al conjunto de la sociedad afectando bienes comunes como el agua, el suelo, el aire y la biota. Si bien, el estado provincial ha dado muestras de políticas activas para revertir esta situación es evidente que el proceso de reconversión de prácticas históricamente empleadas durante décadas demandará tiempo, persistencia y coherencia. En este contexto, en los últimos años ha habido un fuerte incremento en políticas públicas orientadas a promover el desarrollo sostenible del sector lácteo mediante la incorporación de nuevas prácticas y mejores tecnologías que permitan un uso más racional de los recursos y de la energía, con el fin de garantizar la protección del ambiente. Entre algunas de estas iniciativas, podemos mencionar el proyecto “Ecosuero con valor agregado” cuyo objetivo ha sido el de mejorar la sustentabilidad económica y ambiental de las PyMEs lácteas a través de diferentes desarrollos tecnológicos que permitan el aprovechamiento y la valorización integral del suero lácteo y sus derivados, buscando transferir conocimiento a las empresas para que puedan optimizar la calidad de sus productos y minimizar el impacto ambiental.²²

Por lo tanto, vemos necesario el estudio de nuevas tecnologías basadas en la evidencia científica, la investigación y la innovación, a través de la concreción de proyectos escalables que puedan ser transferidos de manera permanente al sector productivo, con el fin de generar valor

²² Avanza la iniciativa de aprovechamiento de lactosueros en Santa Fe, Agencia Nacional de promoción de la investigación, el desarrollo tecnológico y la innovación. Sitio web.

a partir del aprovechamiento del lactosuero, desarrollando capacidades críticas que promuevan al crecimiento, competitividad y sustentabilidad de las PyMEs lácteas²³.

3.3. Estado del Arte

Considerando los objetivos planteados en el presente trabajo, es válido mencionar que el estudio de la producción de microalgas utilizando como medio de cultivo efluentes de la industria láctea tiene al menos una década. Este interés se debe, principalmente, a la alta concentración de nutrientes que existe en este tipo de efluente y al gran potencial que poseen las microalgas para adaptarse y crecer en un amplio rango de sustratos debido a su elevada capacidad para captar nutrientes.

En este sentido, Mahavir *et al.* (2014) evaluaron el cultivo a escala de laboratorio de la microalga *Spirulina* sp. en medio salino Zarrouk suplementado con lactosuero. Los ensayos fueron realizados durante 15 días empleando distintas diluciones de lactosuero en medio Zarrouk (10^{-1} a 10^{-6}). Al final del ensayo, se estimó la biomasa total (peso seco), el contenido de clorofilas y de proteínas de cada cultivo. Durante su estudio, los autores concluyeron que la *Spirulina* sp. posee un alto potencial de crecimiento y desarrollo en varios tipos de efluentes, entre ellos el lactosuero²⁴.

Por otro lado, es interesante destacar que existen pocos reportes en la literatura científica de estudios realizados a escalas mayores que las de laboratorio. Entre ellos, Lu *et al.* (2015) evaluaron el cultivo de *Chlorella* sp. en efluentes lácteos utilizando un sistema piloto montado al aire libre con el fin de cuantificar la tasa de remoción de nutrientes. Estos autores informaron valores máximos de remoción cercanos al 85% para nitrógeno total y 88% para el fósforo, luego de 8 días de cultivo²⁵.

En un estudio más reciente, Labbé *et al.* (2017) analizaron la viabilidad del cultivo de las cianobacterias *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en diferentes efluentes lácteos durante 14 días, como forma de producción de biomasa y remediación de efluentes. Además, evaluaron la variación del pH y la conductividad eléctrica del medio de cultivo con el fin de correlacionar estos valores con la eficiencia del tratamiento, buscando herramientas que faciliten el control del proceso a gran escala. A partir de sus resultados, los autores concluyeron que si bien fue

²³ Fondo Argentino Sectorial (FONARSEC). Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación. Sitio web.

²⁴ Mahavir *et al.* (2014). To evaluate Lab Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to Evaluate its Chlorophyll and Protein content. International Research Journal of Biological Sciences.

²⁵ Lu *et al.* (2015). Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. Bioresource Technology, Elsevier.

factible el desarrollo de las cianobacterias en los efluentes analizados su viabilidad fue intermedia²⁶.

En un estudio similar, Kabariya *et al.* (2018) analizaron la remoción de nutrientes asociado a la extracción de compuestos de alto valor comercial a partir del cultivo conjunto de *Oscillatoria* sp. y *Phormidium* sp. en efluentes lácteos. Tras 18 días de cultivo, se observó una reducción muy significativa en el contenido de nutrientes de los efluentes tratados, alcanzando tasas de remoción de 81% y 94% para nitrógeno y fósforo, respectivamente. Además, se obtuvieron elevadas concentraciones de productos de alto valor comercial como C-ficocianina (0,133 mg/L) y ácidos grasos (175 mg/L)²⁷.

Por su parte, Choi *et al.* (2018) enfocaron sus estudios hacia la producción rentable de biomasa microalgal en efluentes lácteos. Para ello, a partir de una cepa de *Chlorella* sp. aislada de un efluente lácteo, se realizaron subcultivos en medio BG-11 en condiciones de aireación e iluminación (2500 lux, fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h) estandarizadas durante 7 días. Luego, se inoculó el alga en un efluente lácteo puro, previamente esterilizado (121°C, 30 min.), en distintas proporciones, y los cultivos se incubaron en agitación (200 rpm) bajo luz blanca (2500 lux, fotoperíodo luz/oscuridad de 12h) por 16 días obteniendo resultados altamente satisfactorios²⁸.

Más recientemente, Daneshvar *et al.* (2019) evaluaron el crecimiento de microalgas en efluentes lácteos como alternativa para su tratamiento, empleando un esquema de cultivo secuencial compuesto por dos etapas de cultivo mixotrófico en presencia de luz y una tercera etapa de cultivo en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz. Cada etapa duró 12 días. El estudio fue realizado con algas de agua marina y de agua dulce, analizándose su crecimiento a los días 1, 2 y 8 de cada ciclo. Estos autores llegaron a la conclusión que el cultivo mixotrófico resultó ser más eficiente que el heterotrófico²⁹.

Finalmente, Pereira *et al.* (2019)³⁰ estudiaron la producción de biomasa, la composición bioquímica y capacidad antioxidante de un cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis* en lactosuero. Estos autores concluyeron que el cultivo mixotrófico utilizando suero de leche es una alternativa viable para reducir los costos de producción de biomasa, acortar el tiempo de

²⁶ Labbé *et al.* (2017). Microalgae growth in polluted effluents from de dairy industry for biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier.

²⁷ Kabariya *et al.* (2018). Dairy wastewater Treatment by Cyanobacteria from Removal of Nutrients with Extraction of High Value Compound from Biomass. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Excellent Publishers.

²⁸ Choi *et al.* (2018). Microalgal Biomass and Lipid Production on Dairy Effluent Using a Novel Microalgae, *Chlorella* sp. Isolated from Dairy Wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.

²⁹ Daneshvar *et al.* (2019). Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition. *Bioresource Technology*, Elsevier.

³⁰ Pereira *et al.* (2019). Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. *PLoS ONE* 14(10): e0224294.

cultivo y obtener carbohidratos de manera eficiente y económica, sin la necesidad de suministrar nutrientes químicos al medio de crecimiento.

Por lo tanto, los estudios arriba mencionados sustentan los objetivos planteados en el presente trabajo final.

3.4. Análisis FODA

El siguiente análisis FODA se llevó a cabo considerando las fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas que presentaría un proyecto como el aquí planteado para un tambo en expansión que desee implementar el cultivo de cianobacterias acoplado al tratamiento de sus efluentes, y con el objetivo adicional de obtener un subproducto comercializable.

Fortalezas	Debilidades
<ul style="list-style-type: none"> • Mínimo traslado de efluentes. • Proyecto sustentable a largo plazo. • Permite la reutilización de los efluentes generados en planta. • Generación de empleo local. • Reduce el volumen de efluentes a disponer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta inversión inicial (capital intelectual, adquisición de tecnología y adecuación de espacios físicos). • Grandes volúmenes de efluente a tratar. • Productos poco conocidos. • Técnica en estudio con bajo nivel de desarrollo industrial.
Oportunidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> • Potencial de integración entre los sectores públicos y privados: MinCyT, Estados y PyMEs. • Legislación que promueve los procesos con prácticas sustentables. • Gran disponibilidad de materia prima. • Mercado con potencial de expansión. • Tendencia de los consumidores a elegir productos más naturales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dependiente de las políticas de Estado reguladas por los gobiernos de turno. • Inestabilidad económica del país. • Disminución del consumo de productos no esenciales a causa de la crisis económica. • Ausencia de clúster lácteo en la provincia. • Cambio climático.

Como conclusión del análisis FODA se puede decir que el proyecto presenta un mayor número de fortalezas y oportunidades, que de amenazas y debilidades.

Entre las oportunidades, se destaca la posibilidad de estimular el desarrollo de nuevas industrias relacionadas con la obtención de microalgas a partir de subproductos lácteos, lo cual no solo fomentaría la industria local sino también consolidaría el polo lácteo de la región. Además, resalta la importancia del vínculo empresarial con el sector científico-académico, ya que al tratarse de una nueva forma de producción que surge a partir de la investigación aplicada,

resulta fundamental crear lazos con instituciones científicas y universidades para poder garantizar el acceso a información de calidad.

Es necesario mencionar también que en el análisis FODA es necesario mantener una visión económica, política, institucional, tecnológica y ambiental sobre proyecto.

4. Materiales y Métodos

4.1. Adquisición de cianobacterias y lactosuero

4.1.1. Obtención, caracterización y mantenimiento de la biomasa a estudiar

Los cultivos parentales de cianobacterias fueron donados por productores locales vinculados con la Estación Experimental Agropecuaria INTA-Oliveros. A partir de estas muestras, se realizaron subcultivos en condiciones controladas de laboratorio ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con un régimen luz-oscuridad de 12 h que fueron utilizados para los diferentes ensayos (Fig. 12).

Para el crecimiento y mantenimiento de dichos cultivos se empleó medio Zarrouk (Zarrouk, 1966) ligeramente modificado, siendo su composición: NaHCO_3 (16,80 g/L), K_2HPO_4 (0,50 g/L), NaNO_3 (2,50 g/L), K_2SO_4 (1,00 g/L), NaCl (1,00 g/L), MgSO_4 (0,20 g/L), CaCl_2 (0,04 g/L) y 1,00 mL de solución A5 compuesta por H_3BO_3 (2,80 g/L), MnCl_2 (1,80 g/L), CuSO_4 (0,20 g/L) y MoO_3 (0,015 g/L), el cual fue considerado como medio de cultivo “control” de crecimiento autotrófico para los estudios comparativos propuestos.

Previo al inicio de los ensayos, se enviaron muestras de los cultivos de cianobacterias al Instituto del Alimento (Secretaría de Salud Pública, Municipalidad de Rosario) para su caracterización e identificación, observándose mayormente (>90%) células con tricomas sin vainas ni ramificaciones, coincidentes con cianobacterias pertenecientes al género *Oscillatoria* sp.



Figura 12. Fotografía representativa de un cultivo de cianobacterias en las condiciones de laboratorio descriptas. Fuente: Elaboración propia.

4.1.2. Obtención del lactosuero

Inicialmente, se realizó un relevamiento de queserías cercanas a nuestra región con la intención de obtener su colaboración para la donación de lactosuero industrial. Finalmente, a través de un convenio preexistente entre la Fac. de Química e Ingeniería del Rosario (UCA) y la empresa Milkaut S.A. se logró la derivación de una muestra de lactosuero ácido de queso azul (Fig. 13). Esta muestra se utilizó a lo largo de todo el estudio. Para su correcta conservación, se mantuvo refrigerada en heladera (3-8°C) en un bidón plástico de 5 L, cerrado y al resguardo de la luz.



Figura 13. Muestra de lactosuero ácido de queso azul cedido por la empresa Milkaut S.A utilizado a lo largo del presente estudio. Fuente: Elaboración propia.

4.2. Caracterización del lactosuero

4.2.1. Medición de DQO

La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica susceptible de ser oxidada en una muestra. Para su estimación se empleó el método normalizado SM 5220D³¹. Brevemente, se colocó en un vial de vidrio 1,50 mL de $K_2Cr_2O_7$ y 3,50 mL de Ag_2SO_4 (catalizador). La reacción de oxidación necesita de un medio ácido, por tanto, al ser el lactosuero naturalmente ácido (pH 2,5-3,0) no hubo necesidad de acidificar el medio. Luego, la mezcla se llevó a 150°C durante 2 h en un digestor. Durante este periodo, el ion $Cr_2O_7^{2-}$ (solución de color naranja) oxida la materia orgánica presente en la muestra y se reduce a $Cr(III)$ (solución de color verde) (Fig. 14). Posteriormente, se midió la absorbancia de la solución obtenida a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos) y se calculó la DQO de la muestra utilizando una curva de calibración generada a partir del procesamiento de soluciones estándares en iguales condiciones a las

³¹ NEMI: National Environment Methods Index. Standard Methods: 5220D: Chemical Oxygen Demand. Sitio web.

empleadas para el procesamiento de la muestra de lactosuero. Los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$) y los resultados fueron expresados como ppm \pm desvío estándar.

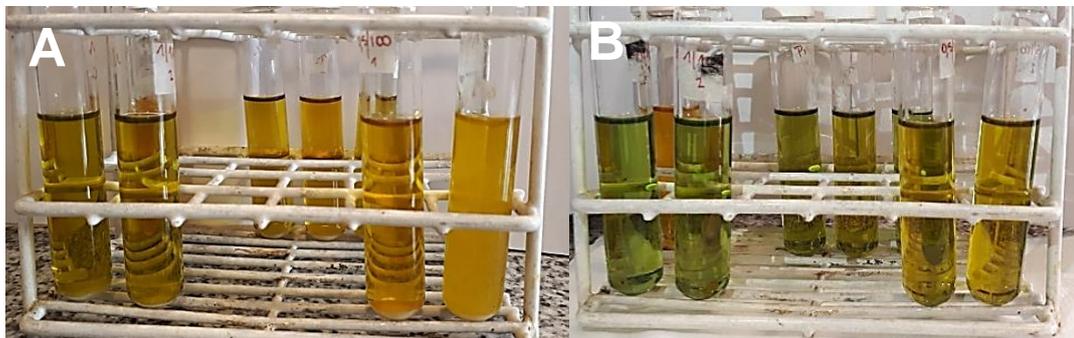


Figura 14. A) Fotografía representativa del color de las muestras previo a la reacción de oxidación. **B)** Fotografía representativa de las muestras procesadas, luego de la oxidación de la materia orgánica presente. Se aprecia la coloración verde adoptada por las soluciones, característica de la reducción de Cr(IV) a Cr(III). Fuente: Elaboración propia.

4.2.2. Medición de DBO₅

La demanda biológica de oxígeno (DBO) es un parámetro frecuentemente utilizado para la caracterización de cuerpos de agua o efluentes que acompaña al valor de DQO, y mide la cantidad de oxígeno que los microorganismos, especialmente las bacterias, consumen durante la degradación de las sustancias orgánicas contenidas en una muestra. A mayor cantidad de materia orgánica, más oxígeno necesitarán los microorganismos para oxidarla (degradarla) y, por tanto, mayor será el valor de DBO obtenido. Por lo tanto, este parámetro no sólo depende de la carga orgánica inicial, sino también de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra y del oxígeno disponible. La medida estandarizada de este parámetro se realiza a los 5 días (DBO₅) donde se estima que se degrada entre el 70% al 80% de la materia orgánica total presente en una determinada muestra.

La determinación de DBO₅ de las muestras de lactosuero y de los cultivos analizados se realizó empleando el método estandarizado SM5210³². Brevemente, se llenaron botellas de vidrio opaco con el agua de dilución conteniendo buffer fosfato, MgSO₄, CaCl₂ y FeCl₃, y se las inoculó con diferentes proporciones de las muestras a analizar. Luego, se dejaron incubar a 20°C durante 5 días en agitación lenta y constante (Stirring Station, VELP Scientifica). El sistema utilizado para la estimación de la DBO₅ incluye unos sensores o “cabezales” (BOD sensors, VELP) que permiten registrar los datos en tiempo real y una tapa de goma donde se coloca el K(OH)_(S) necesario para la reacción (Fig. 15). Diariamente, se registraron los valores indicados en el sensor el cual arroja el valor de la concentración residual de oxígeno disuelto en el sistema en ppm (mg/L). Los datos registrados para las diferentes muestras fueron contrastados

³² Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 5210 Biochemical Oxygen Demand (BOD). Sitio web.

contra un control negativo de agua de dilución sin inocular, el cual arroja siempre valores entre 0,60 a 1,00 ppm. Todos los ensayos se realizan por triplicado ($n=3$) y los resultados fueron expresados como ppm \pm desvío estándar.



Figura 15. Fotografía del sistema comercial utilizado para la estimación de la DBO₅.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.3. Determinación de sólidos solubles en éter etílico

El ensayo de sólidos solubles en éter etílico permite estimar la concentración de compuestos no polares y ligeramente polares (*i.e.*, grasas y aceites) en una muestra. Para su determinación, se tomó una alícuota de 50,00 mL de lactosuero y se la colocó en una ampolla de decantación de 500 mL. Posteriormente, se añadieron 5 gotas de heliantina y se procedió con el agregado de HCl 1N hasta viraje del indicador. Luego, se añadieron 50,00 mL de éter etílico, se agitó vigorosamente, y se dejó reposar hasta observar una franca separación de fases (Fig. 16).



Figura 16. Fotografía ilustrativa de la separación de fases observada durante la determinación del contenido de grasas y aceites en una muestra de lactosuero. Fuente: elaboración propia.

A continuación, se descartó la fase coloreada y se colectó la fase orgánica en un cristizador, procediendo a su evaporación en una plancha calefaccionada a 70°C. Finalmente, el cristizador se colocó en una estufa a 105°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en mg de grasas/mL de lactosuero \pm desvío estándar.

4.2.4. Determinación de sólidos totales y sólidos volátiles

Para determinar el contenido de sólidos totales, se colocan 50,00 mL de lactosuero en un crisol de porcelana previamente secado en mufla a 550°C y tarado en balanza analítica (ML 201/01, Mettler Toledo, Estados Unidos) para obtener su peso seco inicial. A continuación, se procedió a evaporar el contenido líquido del lactosuero en mechero, evitando su ebullición. Luego, el crisol se llevó a una estufa a 105°C hasta peso constante con el fin de establecer el contenido de sólidos totales (g/L) por diferencia de pesada (Fig. 17). A continuación, se los colocó en la mufla a 550°C con el fin de determinar el contenido sólidos volátiles (g/L). Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desvío estándar de al menos tres determinaciones ($n=3$).



Figura 17. Fotografía representativa del contenido de sólidos totales en la muestra de lactosuero en estudio, antes de ser llevada a mufla. Fuente: elaboración propia.

4.2.5. Análisis Microbiológico

Con el objetivo de estimar el contenido de microorganismos presentes en la muestra de lactosuero de queso azul provisto, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}) en solución fisiológica estéril y se sembraron diferentes alícuotas de 10 μ L y 100 μ L en placas de Petri conteniendo medio “Hongos y Levaduras” (Britania S.A., Argentina) (Fig. 18) o agar nutritivo PCA (Britania S.A., Argentina), este último para el recuento de heterótrofos totales (Fig. 19). Los resultados se informaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (mL) de muestra.

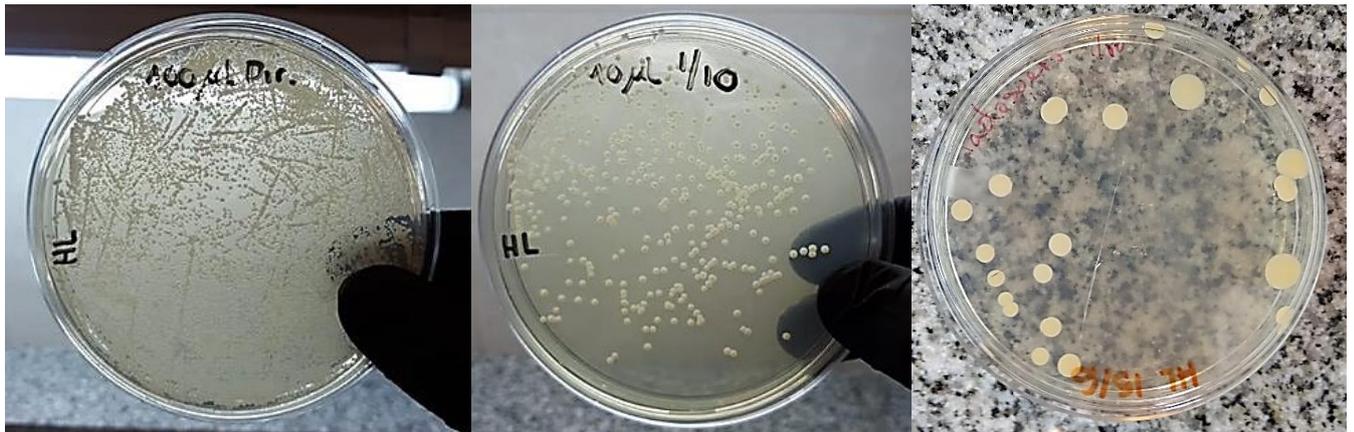


Figura 18. Fotografías representativas del tipo y número de colonias observadas al sembrar distintas diluciones de lactosuero en medio “Hongos y Levaduras” (de izquierda a derecha, 100 μ L de lactosuero sin diluir; 10 μ L de una dilución 1/10 y 10 μ L de una dilución 1/100 de lactosuero en solución fisiológica estéril). Fuente: Elaboración propia.

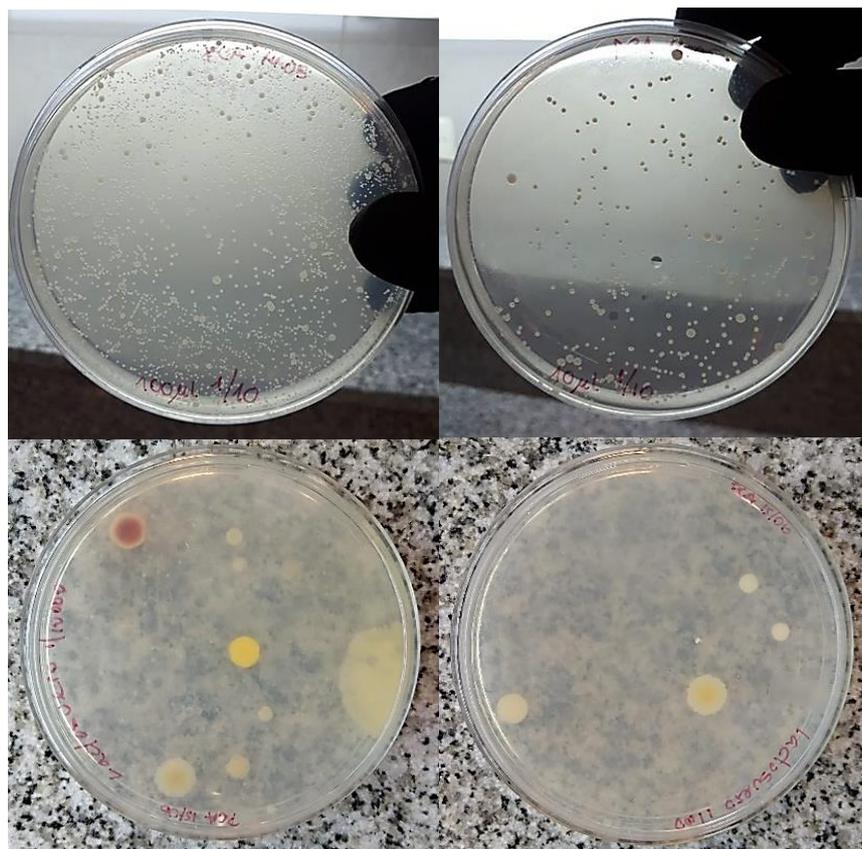


Figura 19. Fotografías representativas del tipo y número de colonias bacterianas observadas al sembrar distintas diluciones de lactosuero en medio agar PCA. Fuente: Elaboración propia.

4.2.6. Inactivación biológica del lactosuero a estudiar

Con el fin de inactivar la microbiota asociada al lactosuero, se procedió a irradiar una alícuota de 500 mL con luz ultravioleta durante 30 min en una cabina de flujo laminar (PCR Cabinet 1000, Bio Base). Mediante este procedimiento se evita la competencia por nutrientes entre las bacterias indígenas del suero lácteo y las cianobacterias durante el cultivo; sin alterar, a su vez, las propiedades físico-químicas del lactosuero. Adicionalmente, se repitió el procedimiento para otra alícuota de 200 mL de lactosuero, la cual fue sometida a las mismas condiciones de cultivo (pero sin la adición de cianobacterias) con el fin de controlar el proceso de inactivación biológica a lo largo del estudio. Para ello, periódicamente se determinó la viabilidad celular de esta muestra control siguiendo el protocolo descrito en el apartado **6.5.5**.

4.3. Preparación de los cultivos

La cantidad de biomasa inicial del cultivo parental de cianobacterias utilizado en el presente estudio se estableció utilizando un método gravimétrico. Brevemente, se filtraron 50,00 mL de cultivo utilizando papeles de filtro Whatman (Grado 589/3) previamente secados en estufa (80°C, 24 h) y tarados en balanza analítica ML 201/01 (Mettler Toledo, Estados Unidos) para obtener su peso seco inicial. Luego del proceso de filtrado, los filtros con células se secaron nuevamente en estufa por 24 h a 80 °C estableciendo el peso seco de la biomasa por diferencia de pesada. Este procedimiento se realizó por duplicado ($n = 2$) previo al inicio del ensayo. Para todos los estudios se utilizó una cantidad de biomasa promedio de 0,5 g/L.

Con el objetivo de comparar el crecimiento de *Oscillatoria* sp. en medio Zarrouk y en lactosuero, se prepararon dos cultivos con la misma cantidad de biomasa inicial. El cultivo denominado “Z” se generó al mezclar 500 mL de cultivo parental de cianobacterias con 500 mL de medio Zarrouk. Este cultivo se utilizó como control de crecimiento autotrófico. Por otro lado, se estableció un segundo cultivo denominado “LZ” compuesto por 500 mL de cultivo parental de cianobacterias y 500 mL de lactosuero inactivado (ver apartado 6.2.6.). Ambos medios se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un régimen de 12 h luz/oscuridad) y con agitación constante (100 rpm) durante 28 días. Periódicamente, se tomaron muestras de ambos cultivos para proceder con los diferentes análisis.

4.4. Determinación de parámetros físico-químicos y fisiológicos

Para evaluar el crecimiento de *Oscillatoria* sp. en ambos medios de cultivo, se midieron diferentes parámetros recolectando muestras cada 48-72 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$).

4.4.1. Determinación de pH y conductividad

El valor de la acidez del lactosuero y de los cultivos Z y LZ se registró utilizando un pH-metro digital AD1030 (Adwa, Rumania). Adicionalmente, se determinó la conductividad del cultivo parental de cianobacterias y del lactosuero utilizando un equipo EC215 (Hanna Instruments, Argentina).

4.4.2. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofila α y carotenoides totales se determinó espectrofotométricamente aplicando el método descrito por Henriques *et al.* (2007)³³. Para ello, se tomaron 2,00 mL de cada cultivo y se centrifugó a 10.000g durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante, se lavaron las células con 2,00 mL de agua desmineralizada para eliminar posibles restos de sales. Posteriormente, se repitió la centrifugación para descartar el agua de lavado y se agregaron 2,00 mL de metanol absoluto (Merck, Alemania) sobre el pellet celular, dejándose incubar a 4 °C durante 24 h en oscuridad para asegurar la extracción total de los pigmentos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 7.000g durante 10 min y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 665 nm y 470 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos).

La concentración de clorofila α y carotenoides totales se calculó según las siguientes ecuaciones propuestas por Mackinney (1941)³⁴ y Britton (1985)³⁵, respectivamente:

$$[\text{Clorofila } \alpha] (\mu\text{g/mL}) = (13,43 A_{665} \times v) / b V$$

$$[\text{Carotenoides totales}] (\mu\text{g/mL}) = (4.4 \times A_{470} \times 10) / b V$$

Donde: A_{665} es la absorbancia de la muestra a 665 nm, A_{470} es la absorbancia de la muestra a 470 nm, v es el volumen de metanol utilizado como agente extractante (mL), V es el volumen de muestra (mL) y b el camino óptico de la cubeta (1 cm).

4.4.3. Cuantificación de carbohidratos solubles

Para determinar el contenido de carbohidratos solubles se empleó el método propuesto por Dubois *et al.* (1956)³⁶. Se toman alícuotas de 2,00 mL de cada cultivo, las cuáles fueron centrifugadas a 7.000g durante 10 min. Luego, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 5,00 mL de H_2SO_4 (Cicarelli, Argentina) y 1,00 mL de fenol 5% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

³³ Henriques, Silva, Rocha (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.

³⁴ Mackinney (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*.

³⁵ Britton (1985). General carotenoids methods. *Methods in Enzymology*.

³⁶ Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*.

Posteriormente, las muestras se agitaron en vórtex durante 30 s y se dejaron reposar durante 20 min. a temperatura ambiente. Luego de centrifugar las muestras por 10 min. a 7000g, se midió la absorbancia del sobrenadante a 490 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Para el cálculo de la concentración de carbohidratos solubles se utilizó una solución patrón de Glucosa 50 mg/mL como testigo.

4.4.4. Cuantificación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales se determinó según el método propuesto por Lowry *et al.* (1951)³⁷ y modificado por Herbert *et al.* (1971)³⁸. Brevemente, se tomaron alícuotas de 2,00 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 7.000g durante 10 min. Luego de descartar el sobrenadante, las muestras fueron resuspendidas en agua destilada y sonicadas durante 15 min. en un baño ultrasónico (modelo TB-04 TA, TestLab, Argentina). Posteriormente, se tomaron 400 µL de cada muestra a los cuales se les adicionó 2,00 mL de reactivo de Lowry (Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 M, CuSO₄ × 5H₂O al 1% y tartrato sódico-potásico al 2%, en proporción: 50:0,5:0,5). A continuación, se agitaron en vórtex durante 30 s y se dejaron reposar durante 10 min. en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, a cada muestra se le añadió 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteau (diluído 1/3 en H₂O), y se las agitó vigorosamente en vórtex durante 30 s dejándose incubar durante 30 min. en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Como blanco de reactivos se procesó una muestra de agua destilada a la cual se le aplicó el mismo procedimiento experimental descrito anteriormente. Para determinar la concentración de proteínas totales (mg/L) se empleó la curva de calibración de la Ec. 1 (R²>0,98), obtenida al procesar diferentes estándares de seroalbúmina bovina (BSA)³⁹

$$Abs_{750nm} = 2,05 \text{ cc.} + 0,06 \quad (\text{Ec. 1})$$

4.4.5. Evaluación de la viabilidad celular

Con el fin de determinar la viabilidad de las cianobacterias en cada uno de los cultivos a lo largo del tiempo se empleó un método colorimétrico basado en la reducción enzimática del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (Capasso *et al.*, 2003)⁴⁰. El TTC es un indicador redox que es reducido enzimáticamente a 1,3,5-trifenilformazán (formazán) de color rojo en presencia de

³⁷ Lowry, Rosebrough, Farr, Randall (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.

³⁸ Herbert, Phipps, Strange (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*.

³⁹ Carralero Bon, Salvatierra, Lario, Morató, Pérez (2021). Prospects in Cadmium-contaminated water management using free-living cyanobacteria (*Oscillatoria* sp.). *Water*.

⁴⁰ Capasso, Cossío, Berl, Rivard, Jiménez (2003). A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures. *Biomolecular Engineering*.

microorganismos metabólicamente activos, debido a la acción de las deshidrogenasas celulares. La detección de formazán se realiza espectrofotométricamente a 485 nm.

Para llevar adelante estos ensayos, se tomaron alícuotas de 10,00 mL de cada cultivo a diferentes tiempos y se adicionó 0,50 mg/mL de TTC. Luego de 1 h de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se toman alícuotas de 2,00 mL y se centrifugaron a 7.000g durante 10 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregó 1,00 mL de acetona al 70% sobre el pellet con el objetivo de lisar las células y liberar el colorante. Adicionalmente, las muestras fueron colocadas en un baño ultrasónico TB-04 TA (TestLab, Argentina) durante 10 min. y posteriormente agitadas en vórtex a máxima velocidad durante 15 s para asegurar la liberación completa del formazán intracelular. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 7.000g durante 10 min. y se cuantificó la absorbancia del sobrenadante a 485 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 25, Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$). Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles/mL}$ de Trifenilformazán (TF) según la ecuación propuesta por Ghaly *et al.* (2006)⁴¹:

$$\text{TF } (\mu\text{moles/mL}) = 0,0603 \times \text{Abs}_{485}$$

4.4.6. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) son una forma habitual de medir los productos de peroxidación lipídica en las células y tejidos biológicos. Para su determinación, se tomaron alícuotas de 1,00 mL de cada cultivo de algas y se centrifugó a 15000 rpm por 10 min. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 0,50 mL de agua destilada. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 0,50 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico 0,5% p/v preparada en TCA 20% v/v y 0,10 mL de BHT 4% preparada etanol. Luego de homogenizar las muestras, se incubaron durante 45 min. a 100°C en una plancha calefactora. A continuación, se dejaron enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 nm y 600 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Como control positivo, se tomó una alícuota de 1,00 mL de cultivo de cianobacterias en medio Zarrouk al cuál se le adicionaron 30,00 μL de H_2O_2 10V para inducir estrés oxidativo. Como control negativo se procesó una muestra de agua destilada. La concentración de TBARs se expresó como concentración de malondialdehído (nmoles de

⁴¹A.E. Ghaly and N.S. Mahmoud. (2006). Optimum Conditions for Measuring Dehydrogenase Activity of *Aspergillus niger* using TTC. American Journal of Biochemistry and Biotechnology.

MDA/mL) utilizando la Ec. 2 y un coeficiente de extinción para el complejo MDA-ácido tiobarbitúrico de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 530 nm.

$$\text{nmoles MDA} = 2,2 \times (A_{530} - A_{530c}) \cdot (A_{600} - A_{600c}) / 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (\text{Ec. 2})$$

4.5 Determinación de peso seco

Con el fin de determinar la capacidad de producción de cianobacterias en ambas condiciones de cultivo se estimó el peso seco de la biomasa obtenida a tiempo final utilizando un método gravimétrico. Brevemente, se colocaron 10,00 mL de cultivo en cristalizadores previamente secados en estufa (105°C , 24h) y tarados en balanza analítica (ML 201/01, Mettler Toledo, Estados Unidos) para obtener su peso seco inicial. A continuación, se incubaron en una estufa de secado para permitir la evaporación del líquido hasta obtener un peso constante. El peso seco (g/L) de la biomasa se calculó por diferencia de pesada. Este procedimiento se realizó por triplicado ($n=3$) y los resultados se informaron como el promedio \pm desvío estándar.

4.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Estados Unidos). Los datos experimentales se analizaron aplicando el test de ANOVA (análisis de la variancia). Cuando el efecto del medio de cultivo sobre los parámetros estudiados fue significativo ($p < 0,05$) se aplicó la prueba *Honestly Significant Difference* (HSD) de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) para efectuar las comparaciones entre grupos.

5. Resultados

5.1. Caracterización inicial del lactosuero industrial y del cultivo parental de cianobacterias

Inicialmente, se procedió a realizar una caracterización del lactosuero ácido de origen industrial y del cultivo madre de cianobacterias con el fin de determinar y comparar algunas de sus propiedades. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Caracterización inicial del lactosuero.

Parámetros	Valores obtenidos	Valores referencia
Olor	Yogur ácido	Yogur ácido
pH	2,8-2,9	4,0-5,2
Densidad (g/mL)	1,0276	-
Conductividad (mS/cm)	6,55	-
DQO (ppm)	75.500±2.600	~68.000
DBO ₅ (ppm)	38.800±2.200	~35.000
Proteínas (g/L)	4,5±0,3	4,0-8,0
Carbohidratos totales (g/L)	320±5	45-50 (sólo lactosa)
Grasas totales (g/L)	1,50±0,05	0,3-5,0
Sólidos totales (g/L)	46,5±0,1	50,0-70,0
Sólidos volátiles (g/L)	4,60±0,05	3,0-7,0
Heterótrofas totales (UFC/mL)	4,0 x 10 ⁵	~1,0 x 10 ⁵ ⁴²

Fuente: Datos de elaboración propia. Los resultados obtenidos se comparan con los datos informados en la literatura de consulta (Juliano, Muset, Castells *et al.*, 2017).

Tabla 7. Caracterización inicial del cultivo madre de cianobacterias.

Parámetro	Cianobacterias
pH	10,0 ± 0,2
Conductividad (mS/cm)	16,54
Carotenoides totales (µg/mL)	10,9 ± 0,62
Clorofila α (µg/mL)	5,1 ± 0,30
Proteínas (mg/mL)	0,76 ± 0,04
Carbohidratos (mg/mL)	21,26 ± 3,80

Fuente: datos propios.

⁴² Fuente: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (2019). Recuperación y valorización de lactosuero en PyMEs de la cuenca láctea argentina a través de la asociación público-privada.

Como se puede observar en la Tabla 6, los valores hallados para el lactosuero ácido de queso azul utilizado en el presente estudio poseen gran similitud con los datos reportados en la literatura. En particular, es notable la elevada acidez de este residuo que contrasta fuertemente con el valor de pH francamente alcalino adoptado por un cultivo maduro de cianobacterias (Tabla 7). Por otro lado, es de remarcar los elevados valores de DQO y DBO₅ que presenta este efluente (Tabla 6). Ambos valores, sumado a la gran acidez del suero lácteo y a su elevada carga microbiológica, justifican la necesidad de realizar un procesamiento adecuado de este residuo industrial previo a su disposición final.

Por otro lado, no se hallaron valores importantes de conductividad en la muestra de lactosuero utilizada en nuestros estudios. Si bien, es frecuente el uso de altas concentraciones de NaCl en la industria quesera, el efluente recibido mostró valores de conductividad aún menores a los registrados en el cultivo parental de cianobacterias crecido en un medio salino estándar (*i.e.*, Zarrouk).

5.2. Evaluación preliminar de las condiciones de cultivo

Inicialmente, se procedió a realizar un ensayo cualitativo con el objetivo de orientar la elección acerca de la proporción biomasa celular:lactosuero más apropiada para el estudio de la capacidad de crecimiento mixotrófico de las cianobacterias en un medio conteniendo suero lácteo como fuente alternativa de nutrientes. Para ello, se prepararon diferentes suspensiones de lactosuero (20%, 50% y 100% v/v) en agua destilada estéril, las cuáles se combinaron con igual volumen (proporción 1:1) de un cultivo parental de cianobacterias (Fig. 20).

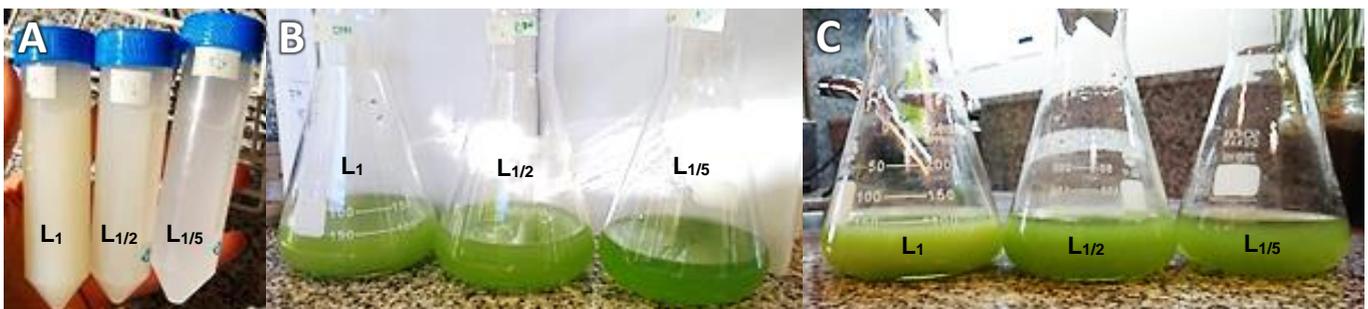


Figura 20. **A)** suspensiones de lactosuero en agua destilada estéril (100%, 50% y 20% v/v, respectivamente). **B y C)** Cultivos combinando 50 mL de cianobacterias en medio Zarrouk y 50 mL de las distintas suspensiones de lactosuero a tiempo inicial (B) y luego de 72 h de incubación (C) a 25 °C (100 rpm agitación, fotoperíodo de 12 h luz:oscuridad).

Como se aprecia en la Figura 20 C, luego de 72 h de incubación a temperatura ambiente, los tres cultivos analizados mantuvieron la pigmentación verde original característica de estos microorganismos, asociada al contenido intracelular de clorofila. Además, la acidez del medio alcanzó valores de pH entre 9,0-10,0 para todas las muestras, lo cual es indicativo de una buena respuesta adaptativa de las cianobacterias al medio de crecimiento conteniendo lactosuero

ácido. A partir de este ensayo preliminar, se determinó que una dilución inicial del lactosuero no sería necesaria ya que las cianobacterias mostraron una rápida adaptación a las condiciones ácida del medio provocada por la adición del suero lácteo, a las tres concentraciones de suero ensayadas. Este resultado es alentador, ya que al considerar el diseño de un sistema de tratamiento que involucre la reutilización del suero de quesería residual, es importante minimizar todo paso adicional (e.g., consumo de agua para dilución) que pudiera generar costos incrementales al proceso y/o aumentar el volumen de efluentes a tratar y disponer.

Sin embargo, a pesar de estos resultados, para los ensayos posteriores se procedió a trabajar con una muestra de lactosuero previamente irradiada con luz UV durante 30 min con el fin de eliminar la microbiota indígena del lactosuero a modo de adecuar el sistema experimental para garantizar que las determinaciones de actividad enzimática realizados sobre los cultivos sean exclusivamente representativas de la actividad metabólica de las cianobacterias.

5.3. Evolución de parámetros físico-químicos, composición nutricional y aspectos fisiológicos de los cultivos autotróficos y mixotróficos de cianobacterias

En función de los resultados preliminares, se establecieron dos sistemas para su estudio denominados “Z” y “LZ” para evaluar y contrastar el desarrollo de las cianobacterias en condiciones de cultivo autotrófico (“Z” = medio Zarrouk) y mixotrófico (“LZ” = lactosuero 50% v/v en medio Zarrouk). Ambas muestras se prepararon a partir de un mismo cultivo parental de cianobacterias preestablecido en medio Zarrouk. El cultivo “Z” se conformó a partir de la mezcla de 500 mL de cultivo parental y 500 mL de medio Zarrouk. Por su parte, el cultivo denominado “LZ” se constituyó a partir de la mezcla de 500 mL de cultivo madre de cianobacterias con 500 mL de lactosuero ácido de origen industrial sin diluir (pretratado con luz UV por 30 min).

En la Figura 21, se muestra la **evolución del pH** de ambos cultivos durante 28 días de incubación (25°C, 100 rpm, fotoperíodo 12 h). Como se puede apreciar, el cultivo “Z” registró siempre valores de pH alcalinos, aumentando menos de 1 unidad de pH durante todo el periodo de estudio. A partir del día 14, se registró una gran estabilidad de este parámetro registrándose valores comprendidos entre 10,0-10,2 unidades de pH hasta el tiempo final (28 días). Este comportamiento es el esperado para un cultivo de cianobacterias en las condiciones ensayadas y se correlaciona con datos previos reportados por el grupo de trabajo (Carralero Bon *et al.*, 2021). Además, sobre este aspecto, es interesante notar que la alcalinización del medio de cultivo es una estrategia que utilizan las cianobacterias para evitar la competencia por nutrientes con otros microorganismos no-alcalófilos, siendo este parámetro, a su vez, indicativo de un buen desarrollo del cultivo y de la ausencia de contaminación externa.

Por su parte, el sistema “LZ” mostró un abrupto descenso del pH del medio en las primeras 24 h a causa de la extrema acidez inicial del lactosuero (pH~2,8-2,9; Tabla 6). Sin embargo, muy notablemente, con los sucesivos días de incubación, el índice de acidez del medio comenzó a incrementarse gradualmente hasta alcanzar valores francamente alcalinos. A su vez, es interesante notar dos etapas bien definidas en la evolución del pH del medio para este cultivo. La primera, comprendida entre el día 1 y 9, donde se pudo apreciar una pendiente más pronunciada en la curva de registro de acidez del medio (*i.e.*, evolución más rápida) alcanzándose un valor de pH~8,0 en aproximadamente 10 días. La segunda etapa, comprendida entre el día 10 y 28, donde se pudo evidenciar un incremento más gradual del pH del medio hasta valores comprendidos entre 9,0-9,5 (Fig. 20). Si bien, el presente estudio se extendió sólo hasta el día 28, la tendencia en los valores de pH del medio para el cultivo “LZ” indicaría que podría continuar aumentando hasta alcanzar valores estables (pH~10,0-10,2) similares a los alcanzados por el cultivo “Z”.

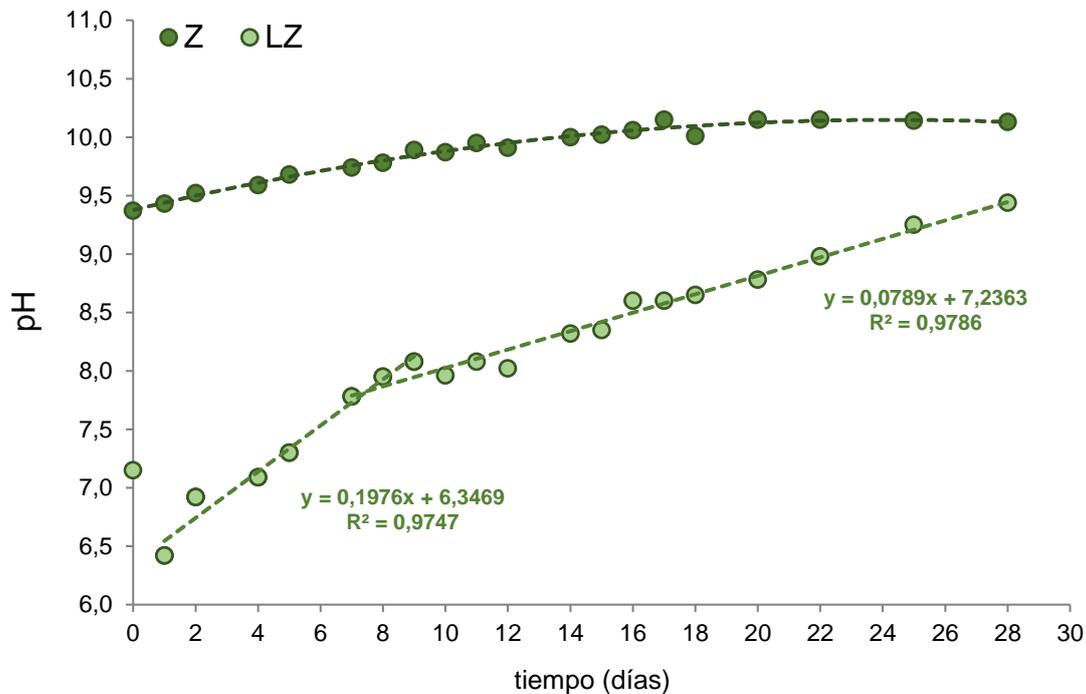


Figura 21. Evolución del pH de un cultivo de cianobacterias en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutriente.

Si bien, la evolución del pH del medio hasta valores alcalinos puede ser referenciado como un buen indicador de un adecuado desarrollo de las cianobacterias en presencia de lactosuero, el registro de la actividad metabólica de las células en cultivo es el parámetro más apropiado para indicar viabilidad. Como se aprecia en la Figura 22, se pudo evidenciar un paralelismo entre la evolución del pH del medio de cultivo y la **evolución de la actividad deshidrogenasa** celular para el sistema “LZ”. Las enzimas deshidrogenasas forman parte del catabolismo aeróbico de los hidratos de carbono, principalmente actuando en la glucólisis, en la descarboxilación

oxidativa del piruvato, y en el ciclo de Krebs. También están presentes en el metabolismo de lípidos y proteínas⁴³. Entonces, la mayor actividad deshidrogenasa desarrollada por las cianobacterias creciendo en un medio conteniendo lactosuero (LZ) es indicativo de una mayor actividad metabólica heterotrófica (Figs. 24-26). A su vez, esto explica la menor actividad enzimática desarrollada por las cianobacterias en condiciones de cultivo autótrofo (Z) ya que en estas condiciones las células no cuentan con una fuente de carbono orgánico biodisponible para consumir, y su desarrollo dependen exclusivamente de la capacidad de las cianobacterias para realizar fotosíntesis (Figs. 27-28).

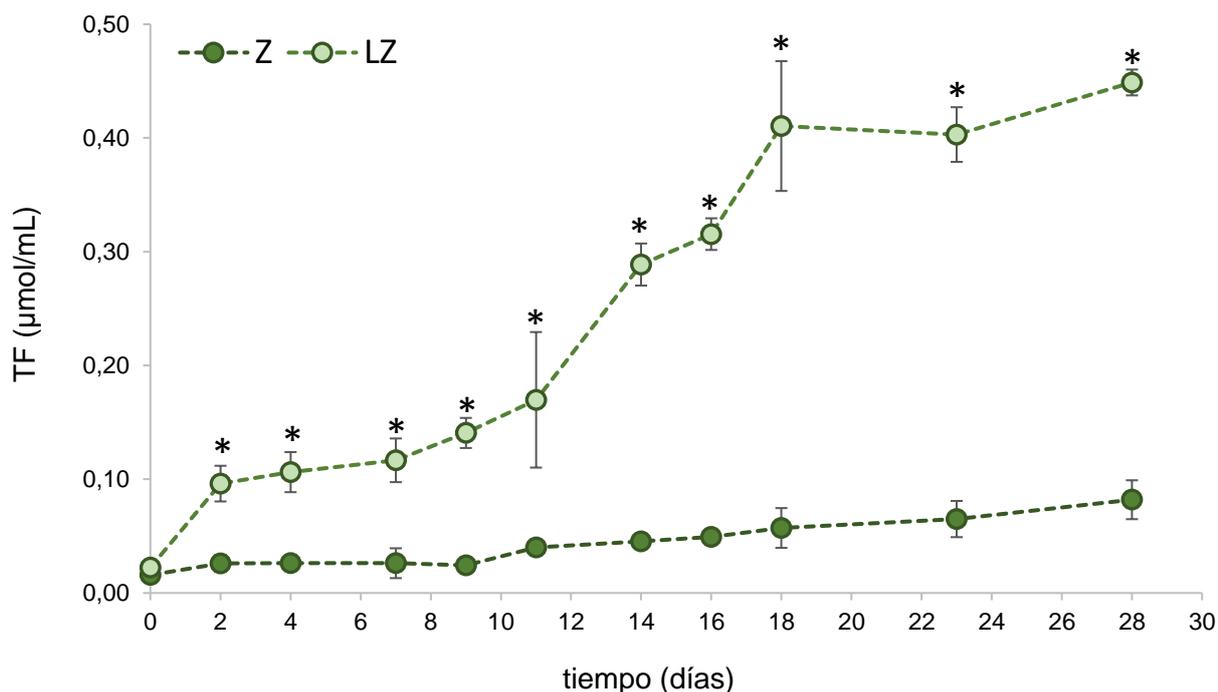


Figura 22. Evolución de la actividad deshidrogenasa celular para un cultivo de cianobacterias en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes. *, indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de trifenilformazán (TF) intracelular en cada condición de cultivo.

A su vez, también se pudo apreciar que durante los primeros 10-12 días de incubación, la acumulación de trifenilformazán (TF) en las células creciendo en un cultivo mixotrófico fue algo menor (Fig. 22), incrementándose a partir del día 14 hasta el final del ensayo (día 28). Estos resultados son compatibles con las dos etapas observadas en la evolución del pH de este cultivo (LZ), mencionadas anteriormente (Fig. 21). Por lo tanto, las condiciones de crecimiento subóptimas o de estrés dada por la acidez del medio durante los primeros días de cultivo

⁴³ Fuente: Blanco, Blanco. (2016). Química Biológica. Editorial El Ateneo.

podrían haber afectado a la reducción enzimática de TTC a TF⁴⁴ por parte de las cianobacterias, ya que la actividad enzimática es dependiente del metabolismo celular. Por lo tanto, si las condiciones del medio no son las más adecuadas, esta actividad podría verse disminuida. Sin embargo, a tiempo final, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), asociadas con síntomas de estrés oxidativo, para las células en crecimiento en ambos tipos de cultivos (*i.e.*, autótrofo y mixotrófico) (Fig. 23).

Adicionalmente, la cantidad de TF liberado al medio también depende de la capacidad de acumulación intracelular del colorante por parte de los microorganismos. Por lo tanto, el aumento de biomasa durante el cultivo es otro factor a considerar, ya que es dable suponer que a mayor cantidad de células mayor será la cantidad de TF cuantificado. En este sentido, es esperable también un incremento en la concentración de TF con el correr de los días de cultivo.

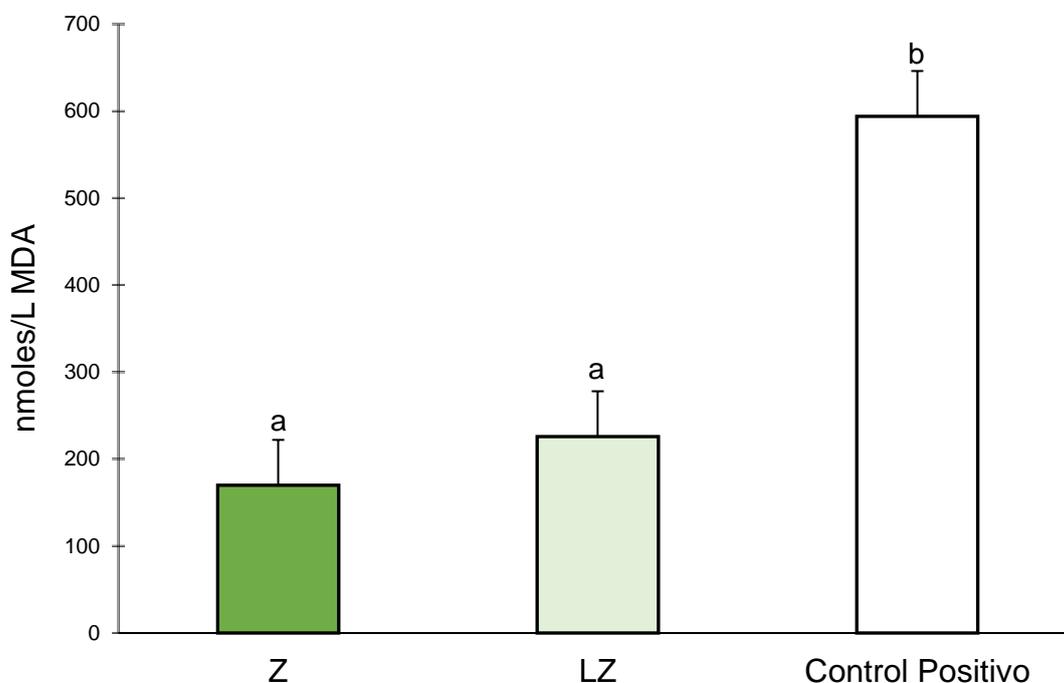


Figura 23. Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en cianobacterias luego de 28 días de crecimiento en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes. Control positivo, se refiere a los valores de TBARs hallados en células tratadas con un agente pro-oxidante (H_2O_2).

Por otro lado, el aumento en la actividad deshidrogenasa detectado para las células en crecimiento mixotrófico (LZ) se pudo correlacionar con una disminución en la concentración de nutrientes del medio aportados por el lactosuero (*i.e.*, carbohidratos y proteínas) (Figs. 24-26).

⁴⁴ Loureiro *et al.* (2020). Microbial characterization of a facultative residual sludge obtained from a biogas plant with ability to degrade commercial B10 diesel oil.

En efecto, la concentración de **carbohidratos solubles** del medio de cultivo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante los primeros 9 días para el sistema “LZ” (Fig. 24), mismo periodo en el cual se vio reflejado un mayor incremento en los valores de pH del medio (Fig. 21). A partir del día 9 en adelante, la concentración de carbohidratos solubles del medio llegó a un valor límite; sin embargo, la **concentración de proteínas** comenzó a disminuir paulatinamente (Fig. 25). Estos resultados indican que las cianobacterias obtienen principalmente su energía metabólica (ATP) a expensas de la oxidación de carbohidratos (glucólisis) y, frente al agotamiento de esta primera fuente de carbono biodisponible, activan el catabolismo proteico para regular su crecimiento a partir de la digestión de proteínas exógenas aportadas por el lactosuero.

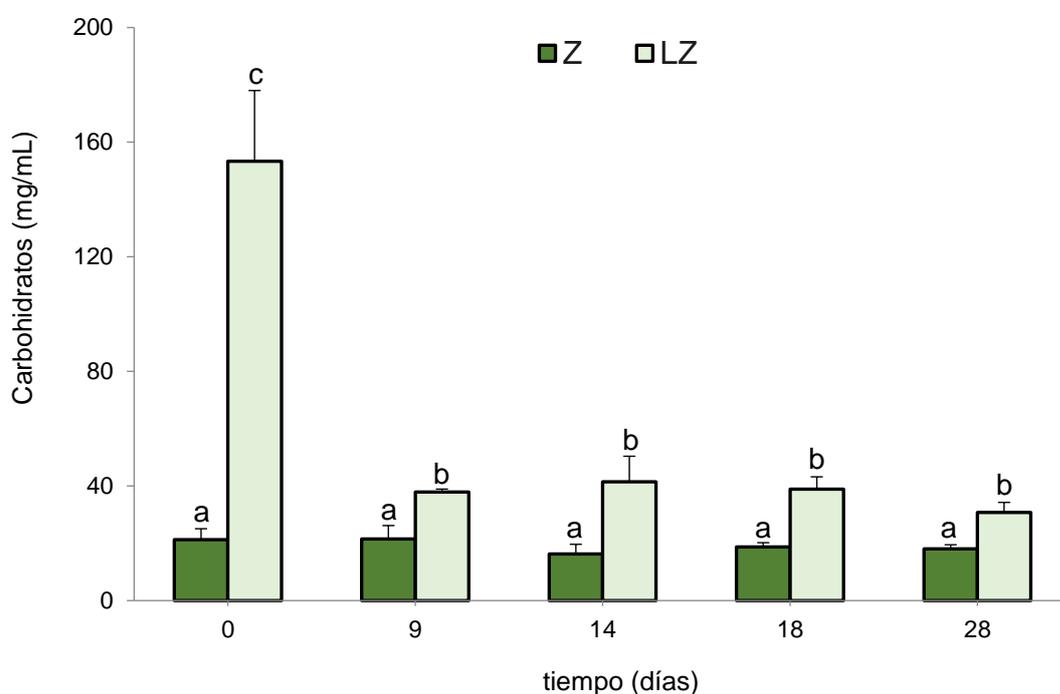


Figura 24. Contenido de carbohidratos solubles (mg/mL) del medio de cultivo durante el desarrollo de las cianobacterias en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

A su vez, esta disminución en la concentración de nutrientes del medio aportados por la incorporación de lactosuero al cultivo se pudo correlacionar con un marcado descenso (~75%) en la **demanda química de oxígeno (DQO)** para el sistema “LZ” a tiempo final, comparada con el valor hallado para el lactosuero sin tratar y considerando su dilución al medio producto de la mezcla (1:1) entre este efluente y el cultivo celular (Fig. 26). Además, se constató que las cianobacterias en cultivo autótrofo (Z) no aportan a la DQO del medio (DQO=0). Por lo tanto, esta diferencia entre la DQO del lactosuero sin tratar y la obtenida para el sobrenadante del

cultivo "LZ" se debe al consumo de materia orgánica (carbohidratos, proteínas y potencialmente grasas) por parte de estos microorganismos.

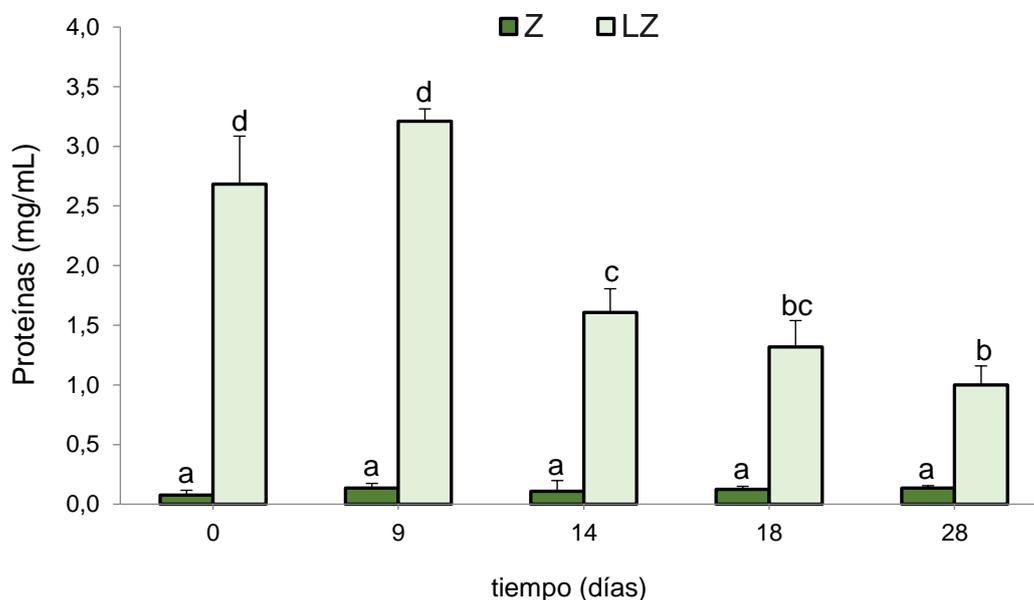


Figura 25. Contenido de proteínas (mg/mL) del medio de cultivo durante el desarrollo de las cianobacterias en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); por ej., "bc" no es estadísticamente diferente de "b" ó "c"; pero si lo es "b" de "c".

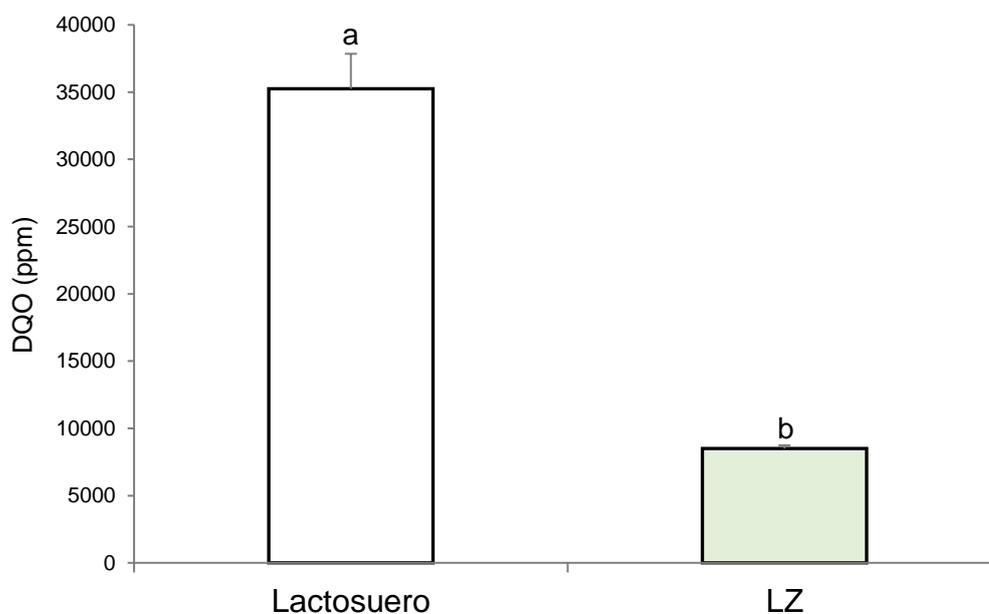


Figura 26. Comparación entre los valores de DQO de una muestra de lactosuero ácido de origen industrial diluido al medio y el sobrenadante del cultivo mixotrófico de cianobacterias, luego de 28 días de crecimiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, en la Figura 27 se presenta la **evolución en el contenido de pigmentos fotosintéticos** para las células en cultivo autótrofo (Z) o mixotrófico (LZ). Como se puede apreciar, en ausencia de fuentes de carbono exógenas (cultivo Z), el desarrollo de las cianobacterias depende exclusivamente de su capacidad fotosintética; por lo tanto, en estas condiciones las células inducen la biosíntesis de ftopigmentos para maximizar la captación de luz y la fijación de carbono inorgánico. Las clorofilas y los carotenoides forman parte del proceso fotosintético, específicamente, en la conversión de energía lumínica en química (clorofilas) y en la neutralización de especies reactivas del oxígeno (carotenoides)⁴⁵. Por lo tanto, una mayor presencia de estos pigmentos implica mayor actividad fotosintética.

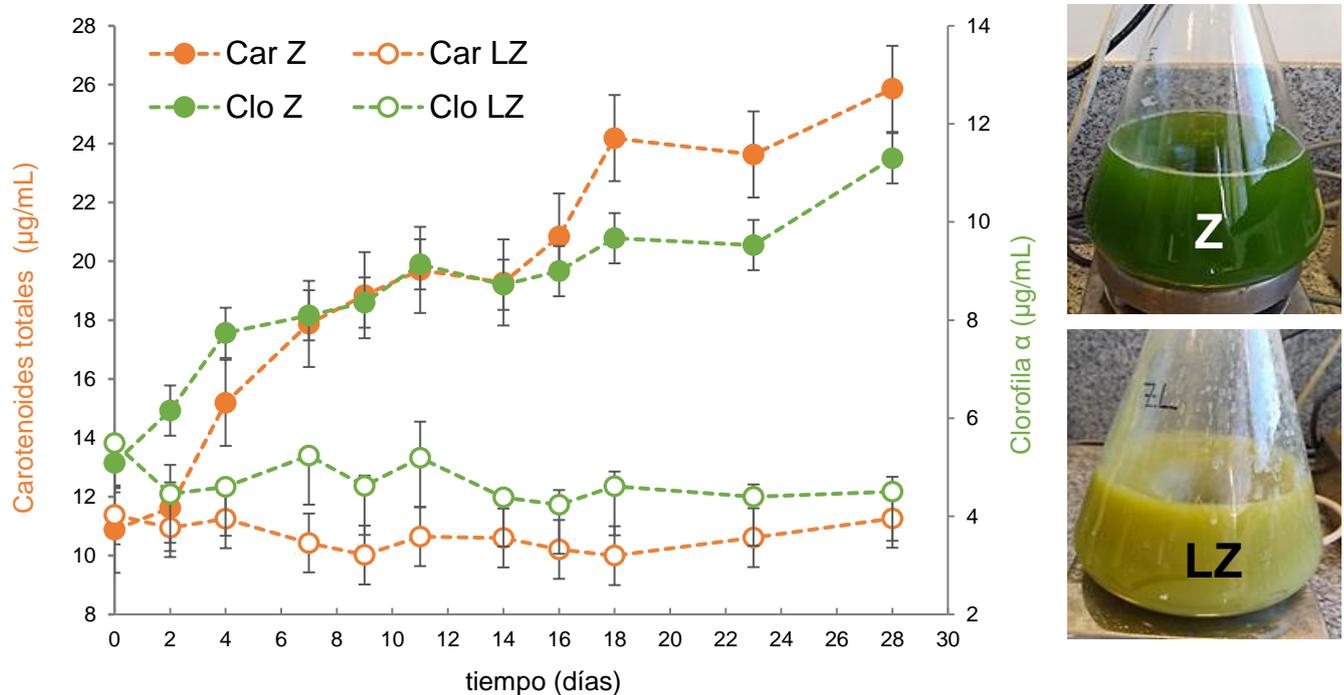


Figura 27. Evolución del contenido ($\mu\text{g/mL}$) de clorofila α y carotenoides totales en cultivos de cianobacterias en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes. A la derecha, se muestran fotografías representativas de la coloración de los cultivos a tiempo final (28 días) que dan cuenta del contenido de ftopigmentos LZ cuantificados para cada sistema.

Por su parte, en las células creciendo en un ambiente nutrido por la presencia de fuentes de carbono exógenas aportadas por el lactosuero (cultivo LZ) no se evidenciaron cambios significativos en la concentración de clorofila α y carotenoides totales, a pesar de constatar un importante aumento en la producción de biomasa (Fig. 28). Esto puede estar relacionado

⁴⁵Kahn Academy. Luz y pigmentos fotosintéticos. Propiedades de la luz. Cómo absorben la luz las clorofilas y otros pigmentos. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-and-photosynthetic-pigments>

con la alta biodisponibilidad de carbono orgánico en el medio; por lo cual, las cianobacterias en cultivo mixotrófico no requieren de la fotosíntesis como principal fuente de energía. A su vez, la turbidez aportada al medio por la incorporación del suero lácteo podría impedir parcialmente el pasaje de luz y su captación por parte de las células, afectando la inducción de la biosíntesis de fotopigmentos en las cianobacterias.

5.4. Determinación de la cantidad de biomasa generada en los cultivos

Con el fin de cuantificar la capacidad de producción de biomasa en condiciones de crecimiento autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ), se estimó el contenido celular a través de la determinación del peso seco de la biomasa generada en ambas condiciones de cultivo luego de 28 días. Como se observa en la Figura 28, la cantidad de cianobacterias obtenidas en las condiciones de cultivo autótrofo (Z) fue de $2,0 \pm 0,1$ g/L, mientras que empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes la cantidad de células ascendió a $4,7 \pm 0,3$ g/L. Por lo tanto, estos resultados muestran un rendimiento en la producción de biomasa en las condiciones de cultivo mixto de entre 2,0 a 2,5 veces superior a la obtenida para el cultivo autótrofo. Estos datos son muy alentadores y confirman nuestra hipótesis acerca de la factibilidad de acoplar el tratamiento de lactosuero al cultivo de cianobacterias para múltiples propósitos.

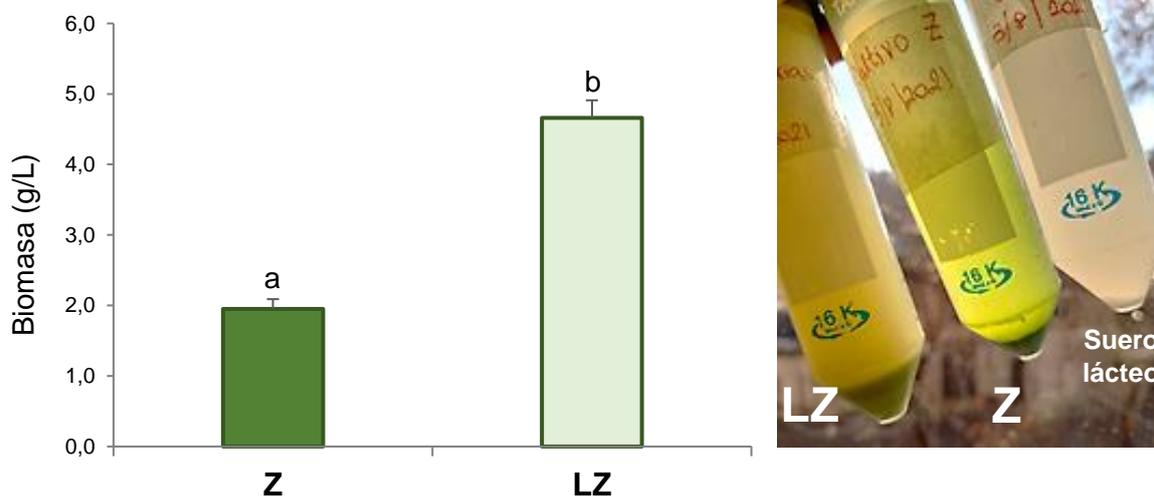


Figura 28. Cuantificación de la cantidad de biomasa (g/L) obtenida en condiciones de cultivo autótrofo (Z) y mixotrófico (LZ) empleando lactosuero ácido de origen industrial como fuente de nutrientes para el desarrollo de cianobacterias. A la derecha, se muestra una fotografía representativa de la cantidad de células sedimentadas a partir de 50 mL de cultivo a tiempo final (28 días) donde se aprecia una mayor cantidad de pellet para el cultivo mixto (LZ) respecto al obtenido en el cultivo autótrofo (Z), aun considerando la cantidad de sólidos sedimentables de una muestra de lactosuero sin tratar.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que el lactosuero es un sustrato muy prometedor para acoplar al cultivo y producción de cianobacterias con fines biotecnológicos, ya que se pudo demostrar que:

- Las cianobacterias en cultivo pudieron sobrevivir, adaptarse y crecer en un medio conteniendo hasta un 50% v/v de lactosuero ácido industrial (pretratado con luz UV). Esta capacidad para desarrollarse se evidenció mediante el aumento sostenido del pH del medio, el incremento en la actividad metabólica de enzimas degradativas relacionadas con la viabilidad celular (deshidrogenasas), el consumo de las fuentes de C y N suministradas al medio y la ausencia de estrés oxidativo (TBARs).
- Luego de 28 días de cultivo, la producción de biomasa en las condiciones de crecimiento mixotrófico fue de 2,0 a 2,5 veces superior a la obtenida en las condiciones de cultivo autótrofo (*i.e.*, medio Zarrouk).
- La disminución en la concentración de carbohidratos y proteínas del medio estuvo acompañada de una notable disminución de la DQO del cultivo, indicando que la materia orgánica aportada por el lactosuero no sólo puede ser utilizada como fuente de nutrientes para el desarrollo de las cianobacterias, sino que, además, esta estrategia puede ser utilizada para disminuir la carga contaminante del suero lácteo.

Recordando que el objetivo principal del trabajo es proponer una alternativa redituable a la disposición final del lactosuero en las PyMEs lácteas, podemos concluir que incorporar parte de este residuo industrial al cultivo de cianobacterias sería una opción viable para su tratamiento biológico.

Desde el punto de vista técnico, este tipo de tratamiento llevado a una escala industrial podría pensarse como un cultivo en suspensión en un reactor de mezcla completa con recirculación. Esta primera etapa, se acoplaría a un sedimentador donde se recuperaría la biomasa para fines posteriores (producción de piensos, extracción de compuestos con valor agregado -clorofila, carotenoides, enzimas-, biorremediación, etc.); mientras que el sobrenadante debería acoplarse con una segunda instancia de tratamiento para disminuir su DQO a valores que se adecuen con los parámetros de vuelco admitidos por la legislación vigente (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación entre los parámetros de vuelco permitidos para efluentes industriales según la Resolución Provincial 1089/82 y los valores obtenidos para el lactosuero crudo y para el sobrenadante del cultivo mixto a tiempo final (28 días).

Parámetro	Rango permitido*	Lactosuero sin tratar	Sobrenadante de cultivo mixotrófico
pH	5,5-10	2,8	9,4
DQO (mg/L)	75-375	75.500	8.500
DBO (mg/L)	50-300	38.800	-
Sólidos Totales (mg/L)	30-500	46.500	4.700

*Varía según el punto de descarga.

Examinando cada parámetro de la Tabla 8 de manera individual podemos agregar que:

Si bien el **pH registrado en el cultivo mixotrófico a tiempo final** mostró valores cercanos al límite superior del rango permitido por la legislación provincial vigente, analizando la Figura 21, se puede inferir que reduciendo el tiempo de retención hidráulica (τ) entre 10-12 días se obtendría un efluente con un pH final cercano a 8,5 (más alejado del valor límite normativo).

Por su parte, la **demanda química de oxígeno (DQO)** determinada en el sobrenadante del cultivo mixotrófico a tiempo final fue aún superior al valor de vuelco permitido. A pesar de ello, este parámetro sufrió una reducción del 75% respecto del valor inicial hallado para el lactosuero sin tratar, demostrando una disminución sustancial de la carga orgánica a degradar en un postratamiento. Por su parte, la **demanda biológica de oxígeno (DBO₅)** no fue medida a tiempo final; sin embargo, se puede inferir una reducción proporcional a la alcanzada por la DQO. Aun así, se estima que este parámetro seguiría encontrándose por encima del valor de vuelco permitido.

Ahora bien, al plantear una reducción del tiempo de retención hidráulico (τ) para obtener un valor de acidez del medio más alejado del valor límite de vuelco, inevitablemente la DQO (y DBO₅) final adoptarían valores mayores; cuánto más elevados, dependerá del tiempo en el que se reduzca el τ . Lamentablemente, en este trabajo no se realizó ninguna medición intermedia de DQO para poder estimar esta reducción. Por lo tanto, sería pertinente abordar estos estudios en trabajos futuros para poder determinar el τ ideal para cada sistema de tratamiento, considerando diferentes objetivos (e.g., descarga del efluente tratado vs. producción de biomasa).

La cantidad de **sólidos totales** observado a tiempo final se debe principalmente al desarrollo de biomasa. Aunque este parámetro se encuentra por encima del valor de vuelco admitido, a los fines de nuestro estudio, no representa una desventaja ya que el objetivo secundario del tratamiento propuesto es generar valor agregado (i.e., cianobacterias). De acuerdo con sus características, la biomasa generada podría ser luego utilizada para alimentación de ganado, producción de complementos nutricionales, productos cosméticos o biocombustibles de tercera

generación (e.g., biodiésel), entre otras aplicaciones con potencial de generar rentabilidad. Otra ventaja adicional es la reducción del costo asociado al traslado de un biosólido en comparación con el movimiento de grandes volúmenes de efluentes líquidos (lactosuero). Sin embargo, vale aclarar que, a pesar del incremento en la producción de cianobacterias, en las condiciones ensayadas no se observó un aumento significativo en la concentración de clorofilas y carotenoides por gramo de biomasa. Por lo tanto, la producción de estos microorganismos con fines alimenticios o farmacéuticos se estima más apropiada en condiciones autótrofas, es decir, facilitando aquellas condiciones de cultivo que maximicen la tasa de fotosíntesis con el consecuente aumento en la inducción de fotopigmentos.

En este contexto, es importante volver a mencionar que el pretratamiento con luz UV realizado al lactosuero se efectuó a fines de garantizar que la actividad enzimática determinada en el cultivo mixotrófico se debiera exclusivamente al metabolismo de las cianobacterias. Sin embargo, este pretratamiento podría no ser un requerimiento para el desarrollo de estos microorganismos ya que los ensayos cualitativos de crecimiento celular en cultivo mixotrófico con lactosuero sin pretratar mostraron resultados satisfactorios y prometedores. De todos modos, debido a que nuestros resultados no permiten inferir concluyentemente acerca del potencial de las cianobacterias para crecer y desarrollarse eficientemente en presencia de la microbiota indígena del lactosuero, se estima necesario y oportuno abordar estos estudios en trabajos posteriores.

Finalmente, en la Tabla 9 se comparan las ventajas y desventajas que ofrece un sistema de tratamiento de efluentes industriales acoplado a la producción de biomasa respecto a otros métodos más convencionales de tratamiento biológico de tipo aeróbico, tales como los sistemas de barros activados y las lagunas aeróbicas.

Tabla 9 Comparación de métodos de tratamiento de efluentes.

	Barros Activados	Lagunas Aerobias	Cianobacterias
Objetivos	Producción de una masa activada de microorganismos capaz de estabilizar un efluente de manera aeróbica.	Tratamiento de efluentes mediante procesos naturales de depuración.	Tratamiento de efluentes acoplado a la producción de biomasa.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Requiere poco espacio. -Bajo costo de construcción. -No genera olor. -Pequeña pérdida de carga. 	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo costo de construcción y operación. -Alta eficiencia de remoción de DBO₅ (95%). 	<ul style="list-style-type: none"> -Buena sedimentación de biomasa. -Biomasa comercializable (no requiere tratamiento posterior).
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Gran volumen de barros generados a tratar. -Alto consumo de energía eléctrica por agitación. -Elevado costo de operación y mantenimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Requiere grandes extensiones de terreno. -Generación de área anóxica en ausencia de aireación asistida. 	<ul style="list-style-type: none"> -No llega a disminuir lo suficiente la carga orgánica por sí solo.

Fuente: Henry, Henry. (1999). Ingeniería Ambiental. 2da Edición. Pearson Education.

Vale aclarar que todos estos métodos se presentan como alternativas adecuadas para ser aplicados al manejo de los caudales y las cargas orgánicas de los efluentes que se generan en una PyME láctea. Además, los factores de diseño y los parámetros de operación presentan algunas similitudes entre los distintos sistemas propuestos. Por ejemplo, un tratamiento por barros activados consta de un tanque de aireación, un sedimentador y un sistema de retorno de los barros del sedimentador al tanque. Por su parte, un sistema de tratamiento con lagunas aerobias consiste en uno o más estanques excavados de poca profundidad (hasta 50 cm) conectados entre sí, operando a cielo abierto. En este sentido, acoplar el tratamiento de lactosuero al crecimiento de cianobacterias en una laguna artificial ofrece la ventaja adicional de facilitar la captación de luz solar y la fijación de CO₂ por parte de estos microorganismos. Por lo tanto, la propuesta de reutilizar el suero de quesería para la producción de biomasa como alternativa sustentable a su disposición final parece ser una alternativa viable. Entonces, vemos la necesidad de impulsar más acciones orientadas a promover políticas comerciales y socio-ambientales basadas en una economía circular, facilitando el acceso de las empresas al

conocimiento científico. Así, cada establecimiento podrá evaluar en torno a sus capacidades técnico-financieras aquella tecnología que mejor se adapte para el abordaje integral de la problemática asociada al lactosuero, con el fin de mitigar los daños al ecosistema provocados por la liberación intencional de este complejo residuo industrial al ambiente.

7. Anexo – Matriz Legal

A continuación, se detalla una matriz legal que identifica y sintetiza la normativa ambiental vigente aplicable:

Marco Legal Nacional ⁴⁶		
Año	Forma y N°	Título
1994	Art. N° 41	Constitución Nacional
1994	Art. N° 121	Constitución Nacional
1994	Art. N° 124	Constitución Nacional
1969	Ley N° 18.284	Código Alimentario Argentino
1993	Ley N° 24295	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático
2001	Ley N° 25438	Protocolo de Kioto
2002	Ley de Presupuestos Mínimos N° 25612	Gestión Integral de Residuos Industriales y de Actividades de Servicio
2002	Ley de Presupuestos Mínimos N° 25675	Ley General del Ambiente
2003	Ley de Presupuestos Mínimos N° 25688	Régimen de Gestión Ambiental de Aguas
2004	Ley N° 25831	Régimen de Libre Acceso a la Información Pública Ambiental
2006	Ley N° 26093	Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles
2016	Ley N° 27270	Aprueba el Acuerdo de París
2019	Ley de Presupuestos Mínimos N° 27520	Presupuestos Mínimos de Adaptación y Mitigación al Cambio Climático Global
2020	Ley N° 27506	Economía del Conocimiento

Marco Legal Provincial ⁴⁷		
Año	Forma y N°	Título
1962	Art. N° 55	Constitución Provincial
1982	Resolución N° 1089	Reglamento para el control del vertimiento de Líquidos Residuales
1994	Ley N°10552	Conservación y Manejo de Suelos
1994	Ley N°11220	Prestación y regulación de los servicios sanitarios
1999	Ley N° 11717	Ley Marco de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable.
2004	Decreto N° 101	Impacto Ambiental
2009	Ley N°13055	Basura Cero
2010	Ley N°13132	Adhesión a los Principios Rectores de la Política Hídrica de la República Argentina
2021	Ley N°14019	Acción Climática

⁴⁶ INFOJUS: Información Legislativa y Documental de la Nación. Sitio web.

⁴⁷ Sistema de información de Normativa de la Provincia de Santa Fe. Sitio web.

8. Bibliografía

- AST Ingeniería, S.L. (2014). Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas en el litoral cantábrico. FSE. Recuperado de: <http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/06/oportunidades.pdf>
- Bergero, Sigauco (2020). Sector lácteo santafesino: producción primaria, industrial y proyección exportadora. Bolsa de Comercio de Rosario. Recuperado de: <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/80276>
- Blanco, Blanco. (2016). Química Biológica. Editorial El Ateneo.
- Britton (1985). General carotenoids methods. *Methods in Enzymology*.
- Capasso, Cossío, Berl, Rivard, Jiménez (2003). A colorimetric assay for determination of cell viability in algal cultures. *Biomolecular Engineering*.
- Carralero Bon, Salvatierra, Lario, Morató, Pérez (2021). Prospects in Cadmium-contaminated water management using free-living cyanobacteria (*Oscillatoria* sp.). *Water*.
- Daneshvar et al. (2019) Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition.
- Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*.
- Giannuzzi, Petcheneshsky (2017). Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud. Ministerio de Salud de la Nación.
- Ghaly, Mahmoud (2006). Optimum Conditions for Measuring Dehydrogenase Activity of *Aspergillus niger* using TTC. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*.
- Gutiérrez-Salmeán, et al (2015). Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (*Arthrospira*). *Nutrición hospitalaria*.
- Henriques, Silva, Rocha (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Henry, Henry. (1999). *Ingeniería Ambiental*. 2da Edición. Pearson Education.
- Herbert, Phipps, Strange (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*.

- INFOJUS: Información Legislativa y Documental de la Nación. Recuperado de: <http://www.infoleg.gob.ar/>
- Juliano, Muset, Castells *et al.* (2017). Valorización del lactosuero. INTI. Recuperado de: <https://www.inti.gob.ar/publicaciones/descargac/16>
- Kabariya *et al.* (2018). Dairy wastewater Treatment by Cyanobacteria from Removal of Nutrients with Extraction of High Value Compound from Biomass. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Excellent Publishers.
- Kahn Academy. Luz y pigmentos fotosintéticos. Propiedades de la luz. Cómo absorben la luz las clorofilas y otros pigmentos. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-light-dependent-reactions-of-photosynthesis/a/light-and-photosynthetic-pigments>
- Lechería y Política Láctea. Provincia de Santa Fe. Recuperado de: <https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/235296/>
- Loureiro, Olivera, Tondo, Herrero, Salvatierra, Pérez (2020). Microbial characterization of a facultative residual sludge obtained from a biogas plant with ability to degrade commercial B10 diesel oil. Ecological Engineering.
- Lowry, Rosebrough, Farr, Randall (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry.
- Mackinney (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. Journal of Biological Chemistry.
- Mahavir *et al.* (2013). To evaluate Lab Cultivation of Spirulina by using different substrates and to Evaluate its Chlorophyll and Protein content.
- Mazorra-Manzano *et al.* (2019) Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4419/441962430010/html/index.html>
- NEMI: National Environment Methods Index. Standard Methods: 5220D: Chemical Oxygen Demand. Recuperado de: https://www.nemi.gov/methods/method_summary/5716/
- Pereira *et al.* (2019). Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. PLoS ONE.

- Protist.i.hosei.ac.jp. 2021. Prokaryote: Cyanobacteria: Oscillatoria. Recuperado de: http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Prokaryotes/Oscillatoriaceae/Oscillatoria/sp_18.html
- Proyecto de Resolución, Segunda comisión, tema 52, Desarrollo Sostenible (31 de octubre de 2005). Asamblea General Naciones Unidas. Recuperado de: <https://hgl.la/download/Resolucion%20Naciones%20Unidas%20-%20Spirulina.pdf>
- Registro de Tambos de la Provincia de Santa Fe (2011).
- Resolución Provincial N° 1089/82: Reglamento para el control del vertimiento de líquidos residuales.
- Santos et al. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Anales de mecánica y electricidad.
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (2019). Recuperación y valorización de lactosuero en PyMEs de la cuenca láctea argentina a través de la asociación público-privada.
- Sistema de información de Normativa de la Provincia de Santa Fe. Recuperado de: <https://www.santafe.gov.ar/normativa/>
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 5210 BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND (BOD). Recuperado de: <https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.102>
- Zarrouk (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de Spirulina maxima Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris.