

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

**ESTUDIO DE LA BIOFLOCULACIÓN CON HONGOS
FILAMENTOSOS EN LA COSECHA DE MICROALGAS
PRODUCTORAS DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS CON
POTENCIAL USO EN SUPLEMENTACIÓN ANIMAL**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Camila Paglianno Nieto – 201757

Constanza Parentelli Salvetto – 222711

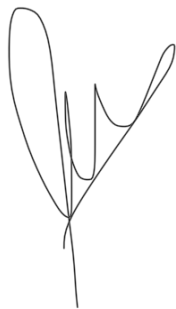
Tutora: Mariana Umpiérrez, PhD

2025

Declaración de autoría

Nosotras, Camila Paglianno y Constanza Parentelli, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera de Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue lo contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Camila Paglianno Nieto



Constanza Parentelli Salvetto

7 de mayo 2025

Agradecimientos

En primer lugar, queremos agradecer a nuestra tutora Mariana Umpiérrez por habernos guiado en la realización de la tesis, brindándonos herramientas, conocimientos y consejos a lo largo de todo el proyecto.

A nuestros compañeros y a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, en especial a Nico y Seba por toda la ayuda, buena onda y predisposición sobre todo cuando las cosas no salían.

Por otra parte, queremos agradecer a Ana Laura Reyes Ábalos PhD. (Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, UdelaR) por la adquisición de las micrografías de MEB las cuales enriquecieron nuestro trabajo final de carrera.

A nuestras familias y amigos, en especial a nuestros padres y hermanos por habernos apoyado y acompañado desde el inicio de la carrera, siendo nuestro sostén diario y dándonos aliento en los buenos momentos y los no tan buenos.

Por último, pero no menos importante, agradecemos a nosotras mismas por el apoyo y sostén mutuo a lo largo de estos años de carrera. No solo compartimos desafíos académicos, sino también momentos de compañía y amistad, que hicieron que este proceso fuera mucho más ameno y llevadero.

Resumen

El crecimiento poblacional previsto para 2050, con una estimación de 9.700 millones de personas representa un reto para la seguridad alimentaria debido al incremento en la demanda de alimentos y la disminución de recursos naturales, agravada por el cambio climático y crisis socioeconómicas. La producción animal, al depender de insumos limitados, requiere alternativas más sostenibles. En este contexto, las microalgas se destacan por su alto valor nutricional y su aplicación en la alimentación animal; no obstante, los costos de producción, especialmente en la recuperación de biomasa, siguen siendo un obstáculo. La biofloculación se presenta como una solución prometedora para optimizar la cosecha de microalgas, reduciendo costos y promoviendo la sostenibilidad del sistema.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad biofloculante de distintas cepas fúngicas y analizar la eficiencia de la biofloculación en co-cultivos de microalgas y hongos filamentosos como un posible método de cosecha, considerando su impacto en la calidad de las raciones animales. Además, se analizó la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, un carotenoide de alto valor por sus propiedades antioxidantes.

Los resultados permitieron identificar dos especies fúngicas comerciales con capacidad biofloculante, *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*. Estas fueron utilizadas en el ensayo de biofloculación junto con *Chlorella sorokiniana* y *Haematococcus pluvialis*, obteniendo tasas de recuperación de entre 62% y 100% en un período de 22-28 horas, dependiendo del co-cultivo.

El contenido lipídico de la biomasa obtenida fue tres veces menor a lo reportado en bibliografía, posiblemente debido a bajos rendimientos de extracción. Sin embargo, el contenido proteico de los flóculos fue del orden reportado en bibliografía, conteniendo entre un 20 y 30 %. Además, se logró evaluar la capacidad antioxidante de los flóculos, obteniendo valores de entre 312 – 822 mg/100 g de biomasa seca. El valor máximo registrado se encuentra dentro del rango esperado según lo reportado en bibliografía.

Asimismo, se logró inducir la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* mediante la reducción de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Por otro lado, a partir de un estándar

comercial se logró identificar mediante HPLC tanto la astaxantina en su forma libre como en sus formas esterificadas.

Los resultados del estudio demuestran que la biofloculación es una estrategia viable y sustentable. Además de su potencial aplicación en la suplementación animal, esta tecnología podría emplearse en la remediación y revalorización de nutrientes de efluentes, promoviendo así un modelo de economía circular.

Palabras claves

Microalgas, hongos filamentosos, co-cultivo, biofloculación, *Chlorella sorokiniana*, *Haematococcus pluvialis*, biomasa, proteínas, lípidos, astaxantina, capacidad antioxidante, suplementación animal.

Abreviaciones

Abs- Absorbancia

ADN- Ácido desoxirribonucleico

BBM- Medio de cultivo BBM (del inglés: *bold's basal medium*)

BG11- Medio de cultivo BG11 (del inglés: *blue green 11 medium*)

BHT- Butilhidroxitolueno

BLAST- (del inglés: *basic local alignment search tool*)

BSA- Albúmina de suero bovino

cm- Centímetro

DCMU- Diurón (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea)

DNTPs- Desoxinucleótidos trifosfatos (del inglés: *deoxynucleotide triphosphates*)

EDTA- Ácido etilendiamino tetraacético (del inglés: *ethylenediamine tetraacetic acid*)

g- Gramo

H₂O- Agua

H₂O mQ- Agua ultrapura miliQ

HPLC- Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés: *high performance liquid chromatography*)

ITS- Espaciador transcrito interno (del inglés: *internal transcribed spacer*)

L- Litro

M- Molar

min- Minuto

mM- Milimolar

mg- Miligramo

mL- Mililitro

NCBI- Centro nacional para la información biotecnológica (del inglés: *national center for biotechnology information*)

OD- Densidad óptica

pb- Pares de bases

PCR- Reacción de cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*)

PDA- Medio papa dextrosa agar (del inglés: *potato dextrose agar*)

pH- Logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones de una solución

PPDF- Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (del inglés: *photosynthetic photon flux density*)

RM- Medio de cultivo Rudic (del inglés: *rudic medium*)

rbcL- Gen de la subunidad grande de la ribulosa bifosfato carboxilasa (del inglés: *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*)

rpm- Revoluciones por minuto

SDS- Dodecil sulfato de sodio (del inglés: *sodium dodecyl sulfate*)

s- Segundo

SEM- Microscopio electrónico de barrido (del inglés: *scanning electron microscope*)

YES- Medio de extracto de levadura suplementado (del inglés: *yeast extract supplemented*)

µg- Microgramo

μL - Microlitro

μm - Micrómetros

(v/v)- Volumen/volumen

$^{\circ}\text{C}$ - Grado Celsius

18S- Ácido ribonucleico ribosomal 18s

xg- Fuerza gravitatoria

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Microalgas	15
1.1. Composición bioquímica y valor nutricional	16
1.2. Aplicaciones de biomasa y producción de biomoléculas de alto valor agregado	19
1.3. Desafíos en la producción de biomasa	19
2. Co-cultivos microbianos.....	20
3. Alternativas de cosecha: Biofloculación	21
3.1. Biofloculación con hongos filamentosos.....	22
4. Biorremediación y revalorización de efluentes	24
5. Uso de biomasa algal y fúngica en suplementación animal	25
Objetivos	27
1. Objetivo general	27
2. Objetivos específicos.....	27
Metodología	28
1. Cepas y medios de cultivos	28
1.1. Cepas de algas	28
1.2. Especies de hongos.....	28
1.3. Medios de cultivos.....	29
1.4. Banco maestro y de trabajo	30
1.5. Identificación morfológica	30
2. Evaluación de crecimiento.....	31
2.1. Condiciones de crecimiento.....	31
2.2. Mediciones de OD ₇₅₀ y OD ₄₇₀	31
2.3. Determinación de la biomasa (peso seco)	32
3. Caracterización de hongos con capacidad biofloculante.....	32
3.1. Preparación y evaluación primaria del co-cultivo	32
3.2. Identificación molecular	33
3.2.1. Aislamiento y extracción de ADN hongos	33
3.2.2. PCR en tiempo final	34
3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	35

3.2.4. Secuenciación y análisis bioinformático	35
4. Ensayo de biofloculación.....	35
4.1. Peletización de hongos	36
4.2. Crecimiento de microalgas	36
4.3. Ensayo de biofloculación post cultivo de hongos-microalgas.....	36
4.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	37
5. Análisis del contenido nutricional	38
5.1. Análisis del contenido proteico	38
5.2. Análisis del contenido lipídico	39
5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	40
6. Evaluación del crecimiento de <i>Haematococcus pluvialis</i> y producción de astaxantina.....	41
6.1. Evaluación del crecimiento	41
6.2. Producción y evaluación de astaxantina.....	41
6.3. Eficiencia fotosintética	42
6.4. Determinación de astaxantina mediante Espectrofotometría UV-Vis.....	43
6.5. Determinación de astaxantina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)....	43
7. Procesamiento de datos	44
Resultados y discusión	45
1. Determinación de la biomasa producida (peso seco) para <i>Chlorella sorokiniana</i>	45
2. Evaluación de la capacidad biofloculante de hongos	46
2.1. Identificación molecular	50
2.1.1. Secuenciación y análisis bioinformático	52
3. Ensayo de biofloculación en co-cultivo y post cultivo.....	54
4. Análisis del contenido nutricional	63
4.1. Análisis del contenido proteico	63
4.2. Análisis del contenido lipídico	66
4.3. Análisis de la capacidad antioxidante.....	68
5. Evaluación del crecimiento de <i>Haematococcus pluvialis</i> y producción de astaxantina.....	70
5.1. Evaluación del crecimiento	70
5.2. Producción y evaluación de astaxantina.....	73
5.3. Eficiencia fotosintética	75
5.4. Determinación de astaxantina mediante Espectrofotometría UV-Vis.....	77

5.5. Determinación de astaxantina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)....	78
Conclusiones	81
Perspectivas a futuro	82
Referencias bibliográficas	83
Anexo	94

Introducción

El crecimiento sostenido de la población mundial, proyectado para alcanzar los 9.700 millones de personas en 2050, representa un desafío en términos de seguridad alimentaria. Este aumento implica una mayor demanda de alimentos, estimada entre un 60% y 100% en un contexto de recursos de tierra y agua cada vez más limitados debido al cambio climático, enfermedades emergentes y crisis socioeconómicas (1).

A esta problemática se suma la expansión de la producción animal, que plantea una amenaza significativa al depender de recursos finitos y prácticas insostenibles. Este escenario exige soluciones innovadoras que permitan garantizar tanto la seguridad nutricional humana como el bienestar animal, minimizando el impacto ambiental y los costos asociados (2).

En este contexto, las microalgas han emergido como una solución innovadora y sostenible para la suplementación en animales destinados a la producción de alimentos. Su uso no solo contribuye a reducir la dependencia de ingredientes tradicionales, sino que también mejora la calidad nutricional de los productos derivados, promoviendo beneficios adicionales para la salud humana. Esto se debe a la composición nutricional rica en varias biomoléculas como proteínas, vitaminas, lípidos, minerales y pigmentos (3, 4). Sin embargo, el alto costo de producción, particularmente en la etapa de recuperación de biomasa, sigue siendo un obstáculo importante (5). Este proceso representa entre el 20% y el 30% de los costos totales, debido al pequeño tamaño celular de las microalgas, que varía entre 3 μ m a 60 μ m de diámetro (3). En la Figura 1 se ilustra un proceso general de producción de microalgas y sus etapas principales.

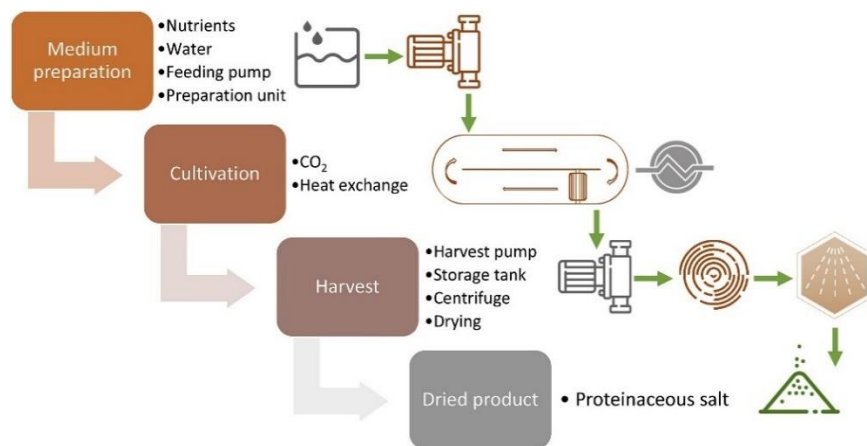


Figura 1. Método general del proceso de producción de microalgas extraído de Sui et al. (2020) (6)

Para superar estas limitaciones, se ha impulsado la búsqueda de tecnologías innovadoras en el ámbito agroindustrial para la producción y valorización de biomasa. Entre las estrategias emergentes, la biofloculación se ha destacado como una estrategia prometedora para maximizar el aprovechamiento de recursos naturales, facilitando la aglomeración de microorganismos a través de procesos biológicos, optimizando la cosecha de biomasa y reduciendo los costos asociados (7).

Este enfoque resulta relevante en el estudio de microalgas y hongos filamentosos, organismos que no solo poseen un alto valor nutricional y funcional, sino que también presentan un enorme potencial en la mejora de la calidad de las raciones animales (8). El uso de microalgas ya sea aisladas o en co-cultivos con hongos filamentosos, no solo contribuye a la sostenibilidad al ofrecer una fuente alternativa de biomasa, sino que también potencia el reciclaje de nutrientes y la reducción de desechos agroindustriales (9).

El presente trabajo tiene como objetivo principal investigar la biofloculación de algas aisladas con hongos filamentosos, evaluando su efectividad como método de revalorización de biomasa y su impacto en la calidad de raciones animales. Este enfoque integra principios biotecnológicos y medioambientales, buscando aportar nuevas perspectivas para el desarrollo de sistemas de producción más eficientes y sostenibles con el sector agroalimentario.

1. Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos, que incluyen tanto eucariotas como procariotas, y presentan tamaños que oscilan entre 0.2 μm hasta 200 μm . Estos microorganismos desempeñan un papel crucial en los ecosistemas globales, ya que producen cerca del 50% del oxígeno presente en la tierra mediante la fotosíntesis (10–12).

Con un aparato fotosintético altamente eficiente, estos microorganismos son capaces de convertir la luz solar y el dióxido de carbono (CO_2) en oxígeno y materia orgánica. Aunque la principal fuente de carbono para la mayoría de las especies es el CO_2 , algunas microalgas tienen la capacidad de utilizar compuestos orgánicos bajo condiciones de cultivo heterotróficas o mixotróficas (13). En la figura 2 se muestra la estructura general de una microalga.

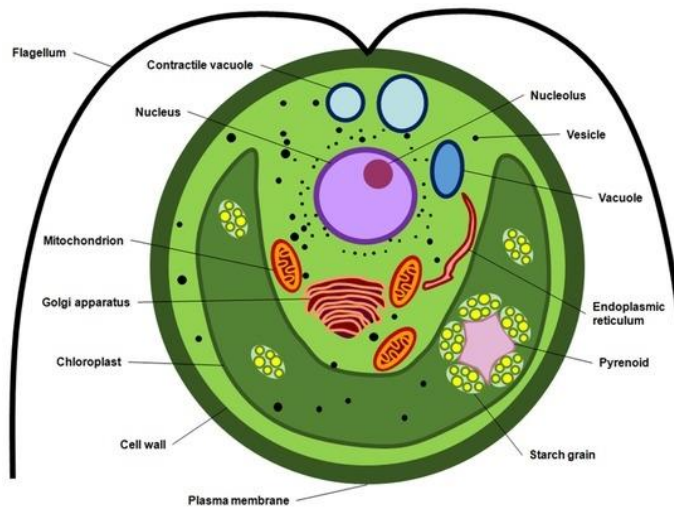


Figura 2. Estructura general de una microalga (14).

Este grupo de microorganismos abarca una enorme diversidad taxonómica, que incluye miles de especies de diferentes tamaños, formas y pigmentos. Se ha estimado que el número de especies disponibles es $2\text{-}5 \times 10^5$ pero solo $4\text{-}5 \times 10^4$ están descritas en la literatura y clasificadas en cuatro grupos principales: *Cyanophyceae* (algas verdeazuladas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillophyceae* (diatomeas) y *Chrysophyceae* (algas doradas) (11, 15).

Se destacan por ser organismos versátiles, capaces de sobrevivir en una amplia variedad de entornos, desde océanos y lagos hasta ambientes extremos como aguas termales y desiertos. Esta

adaptabilidad las convierte en organismos de interés para diversas aplicaciones biotecnológicas y ecológicas (16).

Entre sus propiedades más destacadas se encuentra su rápido crecimiento, esta característica les permite acumular grandes cantidades de proteínas, lípidos y carbohidratos, lo que hace que la biomasa sea rica en nutrientes que promueven el crecimiento (17–19). Esta rápida producción de biomasa resulta especialmente beneficiosa para diversas aplicaciones como la generación de biocombustibles, la industria alimentaria, de piensos, la biorremediación de efluentes y la obtención de compuestos bioactivos de alto valor agregado (20).

1.1. Composición bioquímica y valor nutricional

El contenido de los principales componentes bioquímicos en las microalgas varía según la especie, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento y el estado fisiológico (21). Las microalgas tienen la capacidad de producir lípidos, proteínas y carbohidratos de manera sostenible y a gran escala, posicionándose como una alternativa innovadora y ecológica a los productos de consumo convencionales (22).

Los lípidos han despertado gran interés en la ciencia y la industria debido a su potencial para generar biocombustibles, así como por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la familia de omega-3, específicamente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), que son esenciales en la suplementación de alimentos (23).

Desde el punto de vista nutricional, los ácidos grasos omega-3 desempeñan un papel fundamental tanto en la salud humana como en la nutrición animal. El EPA y el DHA son cruciales para el desarrollo y el funcionamiento del cerebro, el sistema nervioso y la retina (24). En animales, estos ácidos grasos no solo promueven la salud cardiovascular y metabólica, sino que también mejoran el rendimiento productivo y la calidad de los productos animales, como la carne, la leche y los huevos (25). Además de ser una excelente fuente de omega-3, los lípidos contienen otros nutrientes

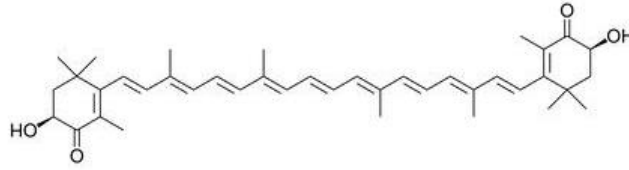
valiosos, como vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y antioxidantes, que contribuyen al bienestar general y la protección celular tanto en humanos como en animales (26).

Esta diversidad de lípidos resalta la variabilidad de las microalgas, destacándose como recursos claves tanto para innovaciones industriales como para el desarrollo del conocimiento científico. Además de su uso en biocombustibles y nutrición, tienen diversas aplicaciones significativas en sectores como la cosmética, la farmacéutica y la producción de alimentos funcionales (23).

Por otra parte, las microalgas también son una fuente valiosa de proteínas. Varios géneros como *Chlorella vulgaris* y *Arthrospira sp.*, son utilizadas en la industria debido a su alto contenido proteico, que puede variar entre el 40-60% de la materia seca (27). Estas proteínas compiten favorablemente en cantidad y calidad con productos tradicionales como el huevo, la soja o el pescado. Además, tienen la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos esenciales (28). Esto las posiciona como una alternativa ideal tanto para suplementos alimenticios como para la alimentación animal, especialmente en productos destinados a la producción de carne, leche y huevos (29).

Los pigmentos presentes en las microalgas, como la clorofila, carotenoides (incluyendo β - caroteno y astaxantina) y ficobiliproteínas, no solo son responsables de la captación de luz para la fotosíntesis, sino que también ofrecen beneficios adicionales (28). Estos compuestos actúan como antioxidantes y agentes inmunoestimulantes, protegiendo a los animales y humanos contra el estrés oxidativo y promoviendo la salud general (30). En la industria de alimentos para animales, los pigmentos contribuyen a mejorar el color de productos como la carne, la yema de huevo y la piel del salmón, aumentando su atractivo comercial.

Dentro de los pigmentos, la astaxantina se destaca como uno de los compuestos más valiosos y comercializados (figura 3) (31, 32). Este carotenoide es reconocido por sus propiedades antioxidantes superiores, siendo hasta 6000 veces más potente que la vitamina C. En particular, *Haematococcus pluvialis* es conocida como la microalga con mayor contenido de astaxantina en la naturaleza, lo que la convierte en una fuente clave para la producción comercial de este pigmento. Además de la astaxantina, acumula otros metabolitos comercialmente valiosos como lípidos, carbohidratos y proteínas, ampliando su versatilidad industrial (33).



Astaxanthin

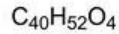


Figura 3. Estructura molecular de la astaxantina (34).

Esta microalga es capaz de acumular astaxantina en concentraciones que oscilan entre el 3.8% y el 5.0% de su peso seco, dependiendo de la cepa utilizada, las condiciones de cultivo y el diseño del fotobiorreactor (35, 36).

El ciclo de vida de *H. pluvialis* se divide en dos etapas, una etapa verde móvil y una etapa roja no móvil. En la primera etapa, la microalga crece como una célula vegetativa flagelada, durante la cual se produce un incremento significativo en la biomasa. El desarrollo de las células en esta fase está influenciado por varios factores ambientales, como la humedad, la nutrición, la temperatura y la luz. Por otro lado, en la etapa roja no móvil, las células pierden su movilidad y comienzan a acumular astaxantina como mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés ambiental, como la limitación de nitrógeno y fósforo o la exposición a la alta intensidad lumínica (37, 38).

Gracias a su amplio espectro de aplicaciones, esta microalga se ha posicionado como un recurso estratégico en sectores como la suplementación animal, la industria alimentaria y la cosmética, respondiendo a la creciente demanda de ingredientes naturales y sostenibles.

1.2. Aplicaciones de biomasa y producción de biomoléculas de alto valor agregado

La producción industrial de microalgas cuenta con una trayectoria de aproximadamente 75 años, comenzando con aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales. Estas microalgas han demostrado ser altamente efectivas en la remoción de nutrientes como el nitrógeno y fósforo, así como en la eliminación de metales pesados y contaminantes orgánicos, siendo una herramienta clave para la biorremediación. Además de los usos en fitorremediación también se utilizan cada vez más en la industria alimenticia, de piensos, cosmética y farmacéutica (39, 40).

Entre las especies más estudiadas y utilizadas en la industria se encuentran *Chlorella vulgaris*, conocida por su alto contenido en proteínas y antioxidantes; *Spirulina platensis*, ampliamente utilizada en la industria alimentaria como suplementos nutricionales y *Dunaliella salina*, destacada por su producción de betacarotenos con aplicaciones en cosmética y salud. En los últimos tiempos, *Chlorella sorokiniana* ha ganado relevancia para eliminar contaminantes en aguas residuales, además posee un gran potencial para la producción de biomasa rica en proteínas y lípidos. Por otro lado, *Haematococcus pluvialis* es utilizada en biorremediación y en la producción de astaxantina (30, 41, 42).

1.3. Desafíos en la producción de biomasa

La producción de biomasa presenta diversos desafíos que limitan su utilización a gran escala. Entre ellos, se destaca los elevados costos asociados a la cosecha y procesamiento, que representan la mayor parte del costo total de producción (18). Asimismo, las limitaciones tecnológicas en la purificación y el procesamiento eficiente de la biomasa dificultan la obtención de productos de alta calidad necesarios para aplicaciones alimenticias. Por otro lado, los sistemas de cultivo, particularmente los fotobiorreactores cerrados, presentan altos costos iniciales, aunque permite un

mayor control ambiental y disminuye considerablemente los problemas ocasionados por contaminación (43).

La escalabilidad sigue siendo un desafío clave, ya que las tecnologías actuales no siempre son económicamente viables al pasar de pruebas piloto a escala industrial. Además de otros factores como el consumo energético, el manejo de contaminantes y especies competidoras, y la necesidad de cepas más robustas y productivas, contribuyen a las dificultades mencionadas. Estos retos tienen un impacto directo en la viabilidad económica y en la competitividad de las microalgas como una fuente sostenible y accesible de suplementos alimenticios, lo que exige avances tecnológicos y nuevas estrategias de optimización para su integración a gran escala (44).

Para abordar los desafíos mencionados, surgen diversas estrategias innovadoras, entre las que se destacan los co-cultivos y la biofloculación. Estas técnicas no solo buscan mitigar los altos costos asociados a la producción de biomasa, sino que también mejoran la eficiencia en el manejo de contaminantes, la productividad de cepas y la viabilidad económica del sistema.

2. Co-cultivos microbianos

Los co-cultivos o consorcios microbianos son una agrupación conformada por diferentes especies de microorganismos que interactúan de diversas formas entre sí, formando comunidades funcionales de manera simbiótica, cooperativa o competitiva. Dichas comunidades microbianas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se pueden encontrar en diversos hábitats como el suelo, ecosistemas acuáticos, alimentos, raíces de plantas e intestinos de animales. Se caracterizan por su alta biodiversidad y por establecer redes de comunicación mediante metabolitos primarios y secundarios, así como por interacciones físicas a través de proteínas y polisacáridos de superficie. Estas señales moleculares facilitan tanto relaciones intraespecíficas como interespecíficas, tales como la simbiosis. Además, promueven interacciones cooperativas que incluyen protección mutua, división de tareas y otros tipos de mutualismos, incrementando la eficiencia de la comunidad. Sin embargo, estas comunidades son dinámicas, pudiendo incorporar nuevos miembros o evolucionar de acuerdo a las necesidades del entorno (45).

En los últimos años, se ha incrementado el interés en el uso de comunidades microbianas naturales con el fin de mejorar la eficiencia de diversos procesos, marcando una transición del modelo tradicional basado en monocultivos puros hacia la implementación de co-cultivos. Estos consorcios, formados por al menos dos especies de microorganismos, han demostrado beneficios como el incremento de la productividad de biomasa y lípidos, así como la generación de metabolitos específicos (46, 47). Además, presentan una menor susceptibilidad a la contaminación debido a sus mecanismos de autorregulación.

Un área de particular relevancia son los co-cultivos que incluyen microalgas, ya sea entre especies algales o en combinación con otros microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y levaduras. En estos sistemas, las microalgas colaboran con microbios heterótrofos, intercambiando nutrientes y metabolitos, lo que no solo favorece su crecimiento, sino que también facilita la recuperación de biomasa y la valorización de residuos. Esta estrategia constituye un enfoque prometedor para el desarrollo de biorrefinerías basadas en algas, permitiendo la producción de bioproductos de alto valor agregado, también son fundamentales en diversos procesos biológicos como la degradación de materia orgánica, la biofloculación, la biorremediación, la producción de metabolitos secundarios y otros procesos industriales o ambientales (48).

3. Alternativas de cosecha: Biofloculación

A pesar del potencial de la biomasa de microalgas para la comercialización de productos y aplicaciones derivadas, uno de los principales desafíos técnicos radica en el alto costo asociado a la cosecha y remoción de la biomasa algal. Este proceso, condicionado por las propiedades físicas y químicas propias de las microalgas, representa una etapa crítica que puede contribuir con un 20-30% o más de los costos totales de producción (49, 50). A pesar de que se han empleado varios métodos para la recolección de microalgas como centrifugación, floculación, filtración o sedimentación, estas técnicas presentan un desafío técnico y económico cuando se aplican a grandes volúmenes de operación, debido al tamaño celular (diámetro 2-20 μm), baja densidad (0.5-5.0 g/L de peso seco) y alta estabilidad coloidal en la solución nutritiva que poseen las microalgas (51, 52).

A partir de esta problemática, se desarrollaron estrategias viables para cosechar microalgas en cultivos a gran escala, una de ellas es el uso de tecnologías de biofloculación. Esta técnica se basa en el proceso de agregación y sedimentación de células de microalgas mediante mecanismos biológicos, utilizando microorganismos como bacterias, hongos filamentosos o levaduras, en lugar de sales inorgánicas o polímeros sintéticos. Este enfoque aprovecha las capacidades de coagulación de los microorganismos vivos, sus metabolitos secretados o biopolímeros derivados de células. La biofloculación ofrece varias ventajas sobre los floculantes químicos, incluida la sostenibilidad, la biocompatibilidad, la selectividad y la rentabilidad (50).

3.1. Biofloculación con hongos filamentosos

Diversos estudios han evidenciado que la incorporación de hongos en las raciones y forrajes contribuye a la mejora de la salud animal cuando se emplean como aditivos alimentarios. Dentro de este grupo se destacan hongos ascomicetos como *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus spp.* y *Cordyceps militaris*. Estos organismos son ricos en compuestos bioactivos, tales como glucanos, polisacáridos, polifenoles, triterpenos y ergosterol. Dichos componentes funcionales presentan propiedades claves como antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores, lo que favorece un incremento en los rendimientos productivos (53).

La biofloculación basada en hongos filamentosos se considera un método económico y ecológico con amplias perspectivas debido a muchas razones. Por un lado, no se necesitan agentes químicos adicionales, lo que la hace una técnica sostenible y segura para aplicaciones posteriores. Por otro lado, el tamaño de los gránulos o flóculos formados es considerablemente grande (desde varios milímetros hasta 1-2 cm), lo que facilita su separación y cosecha, reduciendo los costos operativos asociados (54).

A nivel microscópico, el proceso se basa en la interacción entre las microalgas y las hifas fúngicas a través de varios mecanismos. Los hongos, al poseer una carga positiva, neutralizan la carga superficial negativa de las microalgas (derivada de grupos como carboxilos y fosfatos), funcionando como floculantes catiónicos, como se representa en la figura 4. Además, los hongos

secretan exopolisacáridos pegajosos que facilitan la adhesión, mientras que compuestos como N-acetilglucosamina y galactosaminogalactano desempeñan un papel clave en la interacción. Asimismo, iones divalentes como calcio y magnesio contribuyen significativamente al proceso al alterar el potencial zeta de las microalgas y al promover interacciones hidrofóbicas y puentes de calcio, haciendo que el proceso sea más eficiente (55).

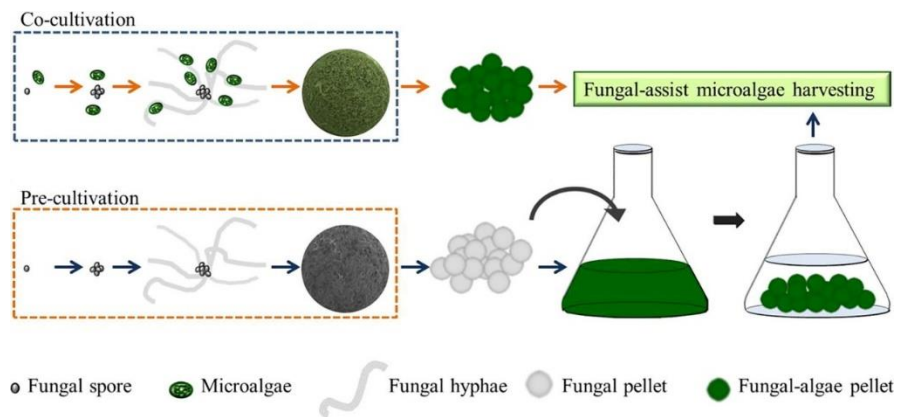


Figura 4. Representación esquemática del proceso de biofloculación extraída de Pei *et al.* (2021) (56)

Además de los mecanismos fundamentales que rigen este proceso, factores como la especie de hongo filamentoso utilizado, la densidad inicial de microalgas y hongos, y las condiciones fisicoquímicas del medio (pH, temperatura y concentración de nutrientes) tienen un impacto directo en la eficiencia de la biofloculación (57). Especies de hongos como *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* han demostrado tener un alto potencial para la formación de flóculos, mientras que valores óptimos de pH y temperatura garantizan la producción de metabolitos secundarios necesarios para la agregación (58).

La implementación de la biofloculación con hongos filamentosos en escalas industriales también ofrece ventajas adicionales. Este método puede integrarse en sistemas de producción sostenibles, como el tratamiento de aguas residuales con microalgas. Los flóculos resultantes pueden reutilizarse como insumos valiosos para la alimentación animal o la producción de biofertilizantes, fortaleciendo la economía circular (59).

Sin embargo, presenta ciertos desafíos asociados con la aplicación de esta tecnología. Entre ellos, garantizar la reproducibilidad del proceso en distintas condiciones de cultivo, evitar la contaminación por otros microorganismos y optimizar la composición de los flóculos para maximizar su valor comercial.

4. Biorremediación y revalorización de efluentes

El consorcio hongos-microalgas posee un potencial masivo en el tratamiento de aguas residuales. Además de las microalgas, la aplicación de hongos en el tratamiento de aguas residuales no es un concepto nuevo y se presenta como una solución biotecnológica eficiente y sostenible (60, 61).

Las microalgas destacan por su capacidad para eliminar nutrientes como nitrógeno y fósforo, asimilándolos durante su crecimiento y reduciendo la eutrofización en cuerpos de agua. Además, producen oxígeno, favoreciendo la actividad de bacterias aerobias que degradan materia orgánica (62). Las propiedades superficiales únicas de los hongos y los abundantes recursos de enzimas degradantes que contienen contribuyen significativamente a la eliminación de contaminantes en las aguas residuales, como la bioadsorción de metales pesados, la biodegradación de compuestos farmacéuticos o microcontaminantes orgánicos. Estos microorganismos forman flóculos al generar una matriz micelial que atrapa sólidos suspendidos, mejorando la clarificación y sedimentación del agua. Su alta adaptabilidad a condiciones extremas, como variaciones de pH y la presencia de contaminantes tóxicos, los hace ideales para tratar aguas residuales municipales, industriales y agrícolas (63). Este enfoque integrado no solo mejora la calidad del efluente tratado, sino que también promueve la sostenibilidad al generar biomasa reutilizable en biocombustibles, fertilizantes y bioproductos. Por otra parte, reduce la generación de lodos residuales, posicionándose como una alternativa innovadora y responsable para abordar los retos relacionados con la gestión del agua. En la figura 5 se representa un esquema general del co-cultivo de hongos y microalgas utilizado para el tratamiento de efluentes.

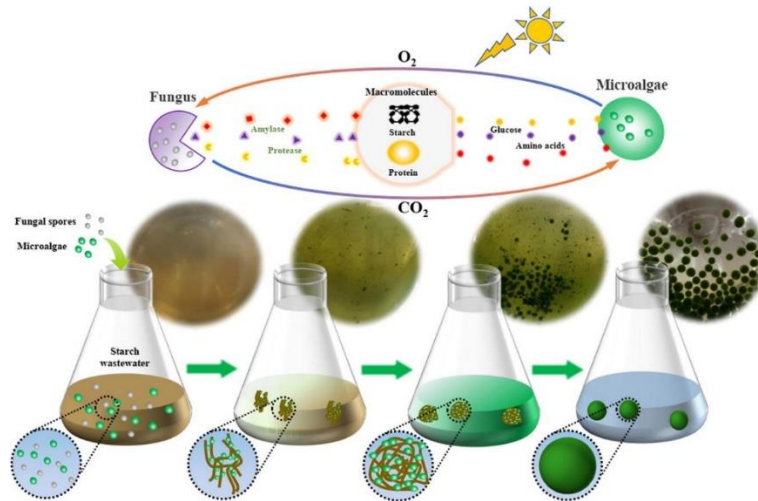


Figura 5. Esquema de co-cultivo de microalga-hongo filamentoso utilizado en efluentes extraída de Wang *et al.* (2022) (50)

5. Uso de biomasa algal y fúngica en suplementación animal

La utilización de la biomasa generada como aditivo para la suplementación animal ofrece beneficios únicos y complementarios, lo que los convierte en una combinación ideal para aplicaciones en salud, nutrición y sostenibilidad (64). Los hongos producen diversas sustancias bioactivas, como antibióticos, enzimas y metabolitos secundarios, que inhiben el crecimiento de bacterias, virus y otros hongos patógenos (65). Entre estas sustancias destacan los polisacáridos, el ergosterol, la adenosina y los triterpenos, que poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antifatiga y antipalúdicas. Además, contribuyen a la protección de órganos como los pulmones y el hígado, fortalecen el sistema inmunológico y aumentan la capacidad antioxidante. Los hongos también actúan como probióticos o prebióticos cuando se integran en la dieta, mejorando la eficiencia alimenticia, la salud metabólica y la resistencia a enfermedades. Por otro lado, las microalgas son una fuente sostenible y rica en nutrientes esenciales, como lípidos, proteínas y carbohidratos. Contienen ácidos grasos, vitaminas liposolubles y antioxidantes que promueven la salud cardiovascular y metabólica, mientras mejoran la calidad de productos animales como carne, leche y huevos (53).

La combinación de hongos y microalgas potencia sus beneficios individuales, generando una biomasa altamente nutritiva y funcional, mejorando no solo la salud y el rendimiento de los animales, sino también contribuyendo a la sostenibilidad, utilizando recursos renovables y reduciendo el impacto ambiental. Estas estrategias representan una solución innovadora para atender las demandas de nutrición y salud, alineándose con la búsqueda global de alternativas más ecológicas y eficientes (66, 67).

En este trabajo final de carrera se propone una alternativa innovadora para abordar estas problemáticas mediante el uso de la biofloculación como estrategia eficiente para la cosecha de microalgas. Este enfoque no solo permite optimizar los procesos de recolección, sino que también abre la posibilidad de utilizar el producto obtenido como suplemento en la alimentación animal. De esta manera, se busca contribuir al desarrollo de una economía circular, donde los recursos sean utilizados de forma más sostenible, promoviendo la revalorización de los subproductos y reduciendo el impacto ambiental de las actividades productivas.

Objetivos

1. Objetivo general

Estudio de la biofloculación de microalgas con hongos filamentosos como método de cosecha y revalorización de biomasa con uso potencial en mejoramiento de raciones animales.

2. Objetivos específicos

- i. Estudio y caracterización de la capacidad biofloculante de hongos filamentosos.

- ii. Estudio de la biofloculación de algas en co-cultivo y post cultivo con hongos filamentosos.

- iii. Evaluación de las características nutricionales del bioactivo generado para posibles formulaciones alimenticias.

- iv. Evaluación del crecimiento de cultivos de *Haematococcus pluvialis* y la producción de astaxantina.

Metodología

1. Cepas y medios de cultivos

En esta sección se describen las cepas de algas y hongos utilizadas en los ensayos, así como los medios de cultivo empleados para su crecimiento y mantenimiento.

1.1. Cepas de algas

Se emplearon dos cepas de microalgas en el trabajo: *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella sorokiniana*. La cepa de *Chlorella sorokiniana* fue obtenida a partir de un aislamiento nativo realizado a partir de una muestra de efluente de un establecimiento lechero, proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. En cuanto a la cepa de *Haematococcus pluvialis* fue adquirida de *Carolina Biological Supply Company* (Carolina – Carolina del Norte, Estados Unidos, Ítem #152282).

1.2. Especies de hongos

Se utilizaron cinco especies de hongos: *Pleurotus ostreatus* y *Acidomyces acidophilus* (cepario del Laboratorio de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay), *Ganoderma lucidum* (proporcionada por la empresa Mushlove), *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus oryzae* (obtenida de *ARS Culture Collection – Northern Regional Research Laboratory*, Ítem #6270). Todas brindadas por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay.

1.3. Medios de cultivos

Para el cultivo de *Chlorella sorokiniana* se utilizó el medio BG11 preparado según Rippka *et al.* (1979) (68), con la siguiente composición: NaNO_3 1.5 g. L⁻¹, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g. L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g. L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g. L⁻¹, ácido cítrico 0.006 g. L⁻¹, citrato de amonio férrico 0.006 g. L⁻¹, EDTA 0.001 g. L⁻¹, Na_2CO_3 0.02 g. L⁻¹, H_3BO_3 2.86 g. L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g. L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 g. L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.390 g. L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079 g. L⁻¹, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0494 g. L⁻¹, tanto para la propagación como para la generación de inóculos. El cultivo sólido se logró adicionando agar 15 g. L⁻¹ para mantener los cultivos en placas de Petri y en tubos inclinados.

En cuanto a *Haematococcus pluvialis*, se utilizó el medio Bold's Basal Medium (BBM) (69), para la propagación y la generación de inóculos. La composición se presenta a continuación: NaNO_3 0.25 g. L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g. L⁻¹, K_2HPO_4 0.075 g. L⁻¹, KH_2HPO_4 0.175 g. L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g. L⁻¹, NaCl 0.025 g. L⁻¹, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0×10^{-3} g. L⁻¹, H_3BO_3 2.8×10^{-3} g. L⁻¹, MnCl_2 1.8×10^{-3} g. L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2×10^{-3} g. L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4×10^{-3} g. L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08×10^{-3} g. L⁻¹, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05×10^{-3} g. L⁻¹. También se realizó cultivo sólido a partir del agregado de agar 15 g. L⁻¹ para la conservación de las cepas en placas de Petri y tubos inclinados. Posteriormente, a la hora de evaluar la producción de astaxantina se utilizó el medio Rudic (RM) con limitación de nitrógeno descrito por Imamoglu *et al.* (70). La composición del medio RM es la siguiente: KH_2PO_4 0.02 g. L⁻¹, K_2HPO_4 0.08 g. L⁻¹, NaCl 0.02 g. L⁻¹, CaCl_2 0.047 g. L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g. L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-4} g. L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0015 g. L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8×10^{-5} g. L⁻¹, H_3BO_3 0.0003 g. L⁻¹, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0003 g. L⁻¹, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.017 g. L⁻¹, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002 g. L⁻¹, EDTA 0.0075 g. L⁻¹.

Las especies de hongos se crecieron en placas de medio sólido Agar Papa y Dextrosa (PDA), con la siguiente composición: Extracto de patata 4.0 g. L⁻¹, Dextrosa 20 g. L⁻¹.

Para generar la peletización de los hongos en el ensayo de biofloculación se utilizaron dos medios de cultivo diferentes: extracto de malta 200 g. L⁻¹ y medio de peletización. La composición del medio de peletización es la siguiente: glucosa 10 g. L⁻¹, NH_4Cl 1.0 g. L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g. L⁻¹, KCl 0.5 g. L⁻¹, K_2HPO_4 1.0 g. L⁻¹, y FeSO_4 0.01 g. L⁻¹.

1.4. Banco maestro y de trabajo

Todas las cepas utilizadas fueron preservadas en bancos maestros por triplicado. En el caso de *C. sorokiniana*, se prepararon tubos inclinados con medio BG11 sólido, donde se estriaron dichos tubos. Posteriormente, se cultivaron a 25 °C en un fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad, hasta obtener crecimiento y luego se almacenaron a 4 °C.

Se realizó el mismo procedimiento para *H. pluvialis* con la diferencia de que se utilizó medio BBM sólido para generar dichos tubos.

En el caso de los bancos maestros de hongos, se generaron tubos inclinados a partir de medio sólido PDA, con un ansa se tomó una porción de cada hongo en dicho medio y se incubaron en estufa a 25 °C hasta visualizar crecimiento para su posterior almacenado a 4 °C.

Todos los bancos maestros se almacenaron a 4 °C, se realizaron tubos inclinados cada 3 meses con el fin de mantener la viabilidad de las cepas.

Para la generación del banco maestro de trabajo, tanto para *C. sorokiniana* como *H. pluvialis*, se realizaron cuatro placas de Petri por cepa con su correspondiente medio de cultivo sólido según la microalga, a través del estriado de las mismas. Estas se cultivaron a 25 °C, en un fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad. Todas las placas fueron repicadas cada mes con el fin de mantener placas con medio de cultivo fresco y evitar deshidrataciones en el medio.

1.5. Identificación morfológica

Cada cepa fue estudiada e identificada morfológicamente a lo largo del trabajo, esto se realizó a partir de un preparado fresco de cultivo de cada cepa, las cuales se visualizaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E100) a 40X y 100X, a modo de visualizar la estructura de las microalgas para identificar en qué fase se encontraban. Esto se logró visualizando la forma, el tamaño, la presencia-ausencia de flagelo y el color verde-rojo.

Por otro lado, se realizó periódicamente tinciones de Gram para verificar presencia-ausencia de contaminantes en los cultivos.

2. Evaluación de crecimiento

2.1. Condiciones de crecimiento

Las microalgas utilizadas en el presente trabajo fueron crecidas a escala de matraces, a partir de una placa sólida del banco de trabajo, cada cepa fue crecida en su correspondiente medio de cultivo bajo condiciones controladas, a una temperatura de 25 °C, agitación orbital continua de 145 rpm, fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad respectivamente, y una intensidad de luz PPFD de $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se realizaron duplicados de ambos cultivos para tener respaldo en caso de detectar contaminaciones durante el escalado. La detección de contaminantes se evaluó mediante tinciones Gram periódicamente, tanto en el stock como durante los pasajes.

2.2. Mediciones de OD₇₅₀ y OD₄₇₀

El seguimiento de ambos cultivos se realizó a través de la determinación de la densidad óptica (OD), realizando mediciones diarias de absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro (Peak Instruments C-7100), con sus correspondientes blancos. Esta longitud de onda se eligió para evitar interferencias del espectro de absorción de la clorofila, que podría afectar el valor de absorbancia obtenido. Para el cultivo de *H. pluvialis*, se tomaron medidas de absorbancia a 470 nm con el fin de evaluar la producción de astaxantina. Este valor corresponde a su máximo de absorción en el

espectro visible, determinado por su sistema de dobles enlaces conjugados, el cual influye en su interacción con la luz y en su coloración característica (71).

Se estableció que el criterio para aumentar la escala es que los cultivos se encuentren en fase de crecimiento exponencial, con una absorbancia igual o superior a 0.4.

2.3. Determinación de la biomasa (peso seco)

Para la obtención de datos sobre la biomasa algal, se realizaron curvas de correlación de biomasa seca y valores de OD.

Para las dos cepas de microalgas, a partir de un cultivo concentrado con una OD superior a 1, se realizaron diluciones seriadas ($\frac{1}{2}$; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{8}$ y $\frac{1}{16}$), en un volumen final de 50 mL. A cada dilución se le midió OD, posteriormente se las centrifugó a 5000 g por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se transfirió el pellet a Eppendorfs, los cuales habían sido pesados previamente en balanza analítica, esto permitió determinar graviméricamente la biomasa obtenida. Los tubos volvieron a ser centrifugados a 1350 g durante 10 minutos y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Los pellets fueron secados en estufa a 60 °C hasta peso seco constante.

Una vez obtenido los valores de biomasa seca, se graficaron los mismos junto con los valores de OD, obteniéndose distintas ecuaciones de rectas que los correlacionan.

3. Caracterización de hongos con capacidad biofloculante

3.1. Preparación y evaluación primaria del co-cultivo

A partir de las cinco especies de hongos obtenidas, se extrajo una pequeña porción homogénea de

5 mm para cada cultivo de hongo previamente crecido en estufa, utilizando un ansa estéril. Luego, se transfirió esta porción a un tubo Eppendorf que contenía 2 mL de suero fisiológico con Tween 80 al 0.1%. Se mezcló vigorosamente la suspensión utilizando vórtex para garantizar una dispersión homogénea de las estructuras fúngicas.

Seguidamente, se dividió el cultivo inicial de *C. sorokiniana* (1 L), en cinco matraces estériles de 100 mL cada uno. El siguiente paso consistió en tomar 500 µL de la suspensión fúngica preparada y transferirla a cada uno de los cinco matraces con cultivo de *Chlorella*. Los cultivos fueron monitoreados mediante observación macroscópica.

3.2. Identificación molecular

Una vez identificadas las especies de hongos con capacidad biofloculante, se llevó a cabo su identificación molecular mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal mediante PCR en tiempo final, a partir de ADN genómico previamente extraído. Se utilizaron los *primers* ITS1 e ITS4 para esta región. Las secuencias amplificadas fueron enviadas a secuenciar a MacroGen Inc. y los resultados fueron analizados con herramientas bioinformáticas.

3.2.1. Aislamiento y extracción de ADN hongos

Las especies de hongos previamente seleccionadas se crecieron en placas de Petri con medio sólido PDA, se llevaron a estufa a 25 °C, posteriormente se cultivó una porción de dichos hongos en medio YES (Extracto de levadura 5 g. L-1, glucosa 30 g. L-1) a 25 °C, hasta obtener 200 mg de biomasa fúngica.

Una vez obtenida dicha biomasa, se utilizó un kit de extracción de Zymo Research (#D6007) para extraer el ADN de las muestras de *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus oryzae*. Las muestras obtenidas de ADN se preservaron a -20 °C en freezer.

3.2.2. PCR en tiempo final

La amplificación se realizó utilizando *primers* específicos para ITS1 y ITS4. Dichos *primers* fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay (ver Tabla 1–Anexo).

A partir de las dos muestras de ADN genómico extraído, se llevó a cabo una reacción de PCR con cada uno de los *primers* obtenidos. Se realizaron dos mix de PCR para cada muestra, de acuerdo con el siguiente orden (Tabla 1). Para la muestra de *Aspergillus oryzae* se realizó una dilución ½, 1/5 y 1/10. Como control negativo se utilizó la mix de PCR sin el agregado de ADN molde.

Tabla 1. Reactivos de PCR.

Componentes	Volumen para 1 reacción (µl)
<i>Taq buffer</i> (10x)	2.5
MgCl ₂	1.25
DNTPs mix (10 mM)	1
Primer <i>Forward</i> (10 µM)	1
Primer <i>Reverse</i> (10 µM)	1
ADN molde	1
Taq polimerasa (U.µL ⁻¹)	0.125
H ₂ O mQ	Hasta 25

Tabla 2. Ciclado para la PCR a tiempo final.

Etapa	Tiempo (minutos: segundos)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	03:00	95
Desnaturalización (x 35)	00:30	94
<i>Annealing</i> (x 35)	00:30	55
Extensión (x 35)	00:30	72
Extensión final	05:00	72
Hold	∞	4

3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

El producto de PCR obtenido se evaluó mediante un gel de agarosa al 1% con el fin de verificar el producto de amplificación. Se utilizó 5 µL de marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (#SM0331) de Thermo Fisher Scientific. Para el revelado se utilizó *GoodView* como agente intercalante, luego se visualizó el gel de agarosa utilizando un transiluminador *Life Technologies E-gel® Imager*.

3.2.4. Secuenciación y análisis bioinformático

Las regiones amplificadas fueron enviadas a secuenciar a la empresa MacroGen Inc, la cual utiliza una metodología de secuenciación Sanger. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas por medio de alineamientos locales utilizando el software MEGA, con el fin de obtener las secuencias consenso para cada primer. Luego, las secuencias tratadas fueron comparadas con la base de datos del NCBI (ver Secuencias 1 y 2 – Anexo).

4. Ensayo de biofloculación

Para el ensayo de biofloculación se emplearon dos cepas de microalgas, *Chlorella sorokiniana* y *Haematococcus pluvialis*, así como dos especies de hongos con capacidad biofloculante previamente identificada, *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*. Los ensayos se realizaron por duplicado, evaluando todas las combinaciones posibles entre las especies de microalgas y hongos.

4.1. Peletización de hongos

Se partió de placas de Petri sólidas con medio PDA, en las cuales se cultivaron las especies de hongos a 25 °C durante 7 días. Posteriormente, una porción del hongo desarrollado fue transferida e inoculada en los respectivos medios de cultivo líquidos en un volumen de 125 mL cada uno.

Para *Aspergillus oryzae* se utilizó el medio de peletización obtenido de Pei *et al.* (2020) (56), para *Pleurotus ostreatus* se utilizó extracto de malta.

Los hongos fueron crecidos en shaker orbital a 190 rpm y 25 °C durante 5 días o hasta que se observara peletización.

4.2. Crecimiento de microalgas

Ambas cepas de microalgas fueron cultivadas en sus respectivos medios de cultivo hasta alcanzar un volumen de 1 L. Manteniendo las condiciones óptimas de crecimiento, siendo: 25 °C, 145 rpm, fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad respectivamente, y una intensidad de luz PPFD de 60 μ mol.m⁻².s⁻¹.

Una vez obtenido este volumen, se midió la absorbancia a 750 nm para determinar la fase de crecimiento de las microalgas. Para este ensayo, es fundamental que las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial. Una vez confirmada esta condición, el cultivo se distribuyó en matraces de 100 mL para su posterior inoculación con los pellets de hongos.

4.3. Ensayo de biofloculación post cultivo de hongos-microalgas

Una vez obtenidos los pellets de hongos y alcanzada la fase exponencial del cultivo de microalgas, los hongos fueron filtrados utilizando un colador previamente esterilizado. Posteriormente, se

inocularon en cada matraz que contenía 100 mL del cultivo de microalgas y se añadieron 5 mL de glucosa como fuente de carbono.

Los matraces se mantuvieron a 25 °C, 145 rpm, fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad respectivamente, y una intensidad de luz PPFD de 60 μ mol.m⁻².s⁻¹.

Se midió la absorbancia a 750 nm al momento de inocular los matraces con los hongos (día 0) y a las 24-72 horas del ensayo o cuando se visualizó cambio en el color tanto del medio como de los flóculos. A partir de los valores de absorbancia registrados, se realizó una curva de OD₇₅₀ en función del tiempo para visualizar el comportamiento de este ensayo.

Posteriormente, los flóculos fueron filtrados y almacenados a -20 °C hasta su utilización en el análisis del contenido nutricional y la posterior observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron llevadas a la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias para su análisis por SEM.

La eficiencia de recuperación se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de recuperación (\%)} = \frac{(OD_i - OD_f)}{OD_i} \times 100$$

4.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se evaluaron los flóculos mediante un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900LV). Para la preparación de las muestras, se utilizó una solución buffer fosfato, preparada a partir de dos soluciones base: la solución A, compuesta por Na₂HPO₄ 0.2M y la solución B, compuesta por NaH₂PO₄ 0.2M. Se mezcló 81 mL de la solución A con 19 mL de la solución B y 100 mL de agua destilada para obtener 200 mL de la solución de trabajo. El pH de esta solución debe estar entre 7.2 y 7.4 con una concentración final de 0.1M. Además, se preparó una solución de glutaraldehído al 2.5% que consistió en 1 parte de glutaraldehído 25% con 9 partes de buffer fosfato previamente preparado.

Las muestras se fijaron en un volumen suficiente de solución de glutaraldehído al 2.5% para garantizar su completa cobertura. Luego, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se realizaron tres lavados consecutivos con buffer fosfato, uno cada 10 minutos, para eliminar el exceso de fijador. Seguidamente, se llevó a cabo la deshidratación de las muestras mediante inmersiones sucesivas en etanol a concentraciones del 50%, 70%, 90% y 100%, con un tiempo de exposición de 10 minutos en cada concentración. La inmersión en etanol al 100% se repitió dos veces, y las muestras se conservaron en esta misma solución a 4 °C hasta su procesamiento final. El procesamiento final consistió en cuatros recambios realizados con CO₂ supercrítico (Denton Vacuum), para posterior montaje y metalizado con oro (Denton Vacuum Desk II).

5. Análisis del contenido nutricional

Para evaluar la calidad nutricional de la biomasa obtenida tras el proceso de biofloculación, se analizaron sus principales componentes nutricionales, incluyendo proteínas, lípidos y capacidad antioxidante. Estos análisis permiten determinar el valor nutricional de los flóculos.

5.1. Análisis del contenido proteico

Los flóculos generados en el ensayo de biofloculación fueron previamente secados en estufa a 37°C. A partir de este material, se tomaron 100 mg de biomasa seca de cada muestra y se resuspendieron en buffer PBS, manteniendo una relación 1:8 en cuanto a biomasa seca: volumen. Seguidamente, se realizó un paso de sonicado (Sonics Vibracell VCX 130) durante 20 minutos, utilizando 100% amplitud correspondiente a 130 W, con pulsos de 1 segundo encendido, 1 segundo apagado. Se procuró mantener el pellet en hielo durante todo el proceso de sonicado.

Por último, se adicionó un paso de centrifugación durante 10 minutos a 10000 g y a 4 °C para clarificar el sobrenadante y asegurarnos de quedarnos con las proteínas solubles.

Para determinar la concentración de proteína en las muestras, se utilizó el método Bradford, el cual se basa en la interacción del colorante Azul de Coomassie en su forma aniónica con las proteínas presentes. Esta interacción induce un cambio en la absorción máxima del colorante, que pasa de 465 nm a 595 nm (72).

Para este método se realizó una curva de calibración con Albúmina de suero bovino (BSA). La curva y las diluciones de las muestras se realizaron en un rango de concentraciones de 0,1 a 1,4 µg/mL y se sembraron en placa de 96 pocillos por triplicado. Los blancos fueron realizados con buffer PBS incubado con el reactivo. Posteriormente, se sembraron 5 µL de cada muestra junto con 250 µL del reactivo, se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó 15 minutos a 25 °C. Se reveló utilizando un lector de placa (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 595 nm. A partir de la lectura, se graficó concentración de proteína BSA en función de la absorbancia restada la absorbancia de los blancos, obteniendo una ecuación.

Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras fueron promediados y restados por el blanco siendo interpolados en la ecuación, hallando de esta manera la concentración de proteínas, teniendo en cuenta el factor de dilución. Finalmente, se obtuvieron los porcentajes del contenido proteico en las muestras.

Además de la cuantificación de proteínas mediante el ensayo de Bradford, las muestras fueron enviadas al Laboratorio Cristar Zerbi para la determinación del contenido total de nitrógeno mediante el método Kjeldahl (NTK). Este análisis permitió estimar el contenido proteico de los flóculos y comparar resultados obtenidos con el ensayo realizado.

5.2. Análisis del contenido lipídico

La determinación del contenido total de lípidos se realizó siguiendo el procedimiento de Folch *et al.* (1951) (73), con algunas modificaciones. El primer paso de la extracción consistió en utilizar 250 mg de biomasa seca proveniente de los flóculos obtenidos de cada co-cultivo del ensayo de biofloculación, previamente cosechada y secada. A la biomasa obtenida se le adicionó una mezcla

de cloroformo/metanol (2:1 v/v), con el agregado de BHT 50 mg. mL⁻¹ homogeneizando con la ayuda de un vórtex.

Posteriormente, se realizó un paso de sonicado en baño sonicador durante 20 minutos a 150 W, con pulsos de 1 segundo encendido, 1 segundo apagado. Además, se le adicionó una solución de NaCl 0.75 % seguido de una centrifugación a 3000 g durante 3 minutos para la correcta separación de las fases acuosa y la fase orgánica la cual contiene los lípidos. Se realizó un lavado final utilizando agua, lo que permitió una nueva separación de fases. Posteriormente, se procedió a la evaporación del cloroformo restante a 60 °C en un baño termociclador, utilizando un tubo Eppendorf previamente pesado, para poder determinar los lípidos obtenidos mediante gravimetría.

5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

Para medir y evaluar la actividad antioxidante total de las muestras, se utilizó el método de ABTS (ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) siguiendo el protocolo realizado por Miller *et al.* (1993)(74), con adaptaciones. Como estándar se utilizó ácido ascórbico, en un rango de concentraciones de 25 a 225 µg/mL.

La forma de radical libre del ABTS se preparó 14 horas antes de la medición. Para ello, se preparó una solución 7mM de ABTS con 2,45 mM de amonio persulfato en agua. Pasado el tiempo de incubación, se realizó una dilución en etanol hasta obtener una absorbancia a 734 nm de $0.7 \pm 0,025$. El ensayo se llevó a cabo utilizando una placa de 96 pocillos, donde se añadieron 3 µL de muestra y 300 µL de ABTS en forma de radical libre. Luego, las muestras se incubaron en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se registró la absorbancia a 734 nm del producto coloreado obtenido utilizando un lector de placas *TECAN Infinite M200 PRO*.

El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos fueron procesados donde se ajustaron los valores de absorbancia obtenidos para cada punto de las curvas a una recta, y se interpolaron los valores de cada muestra en la curva correspondiente para cada caso, expresando los resultados en miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de muestra.

6. Evaluación del crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y producción de astaxantina

6.1. Evaluación del crecimiento

La evaluación del crecimiento se realizó utilizando cultivos líquidos de *H. pluvialis* en medio BBM con y sin elementos trazas. Las condiciones experimentales establecidas fueron una temperatura de 25 °C, agitación orbital continua de 145 rpm, un fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad, y una intensidad lumínica de PPFD de 60 μ mol.m⁻².s⁻¹.

Para monitorear el crecimiento, se realizaron medidas diarias de OD 750 nm durante todo el período de cultivo. Posteriormente, se graficó absorbancia en función del tiempo.

6.2. Producción y evaluación de astaxantina

Para evaluar la producción de astaxantina, se partió de un cultivo líquido en fase exponencial de *H. pluvialis* en medio BBM. Posteriormente, se sometieron a un proceso de centrifugación en Falcons estériles de 50 mL a 1000 g durante 2 minutos. Finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante con el objetivo de concentrar las células en el fondo del tubo. Las células recolectadas fueron transferidas asépticamente a un matraz que contenía 100 mL de medio de cultivo Rudic (RM).

La incubación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura a 25 °C, agitación orbital continua de 145 rpm, fotoperíodo de 16:8 horas de luz y oscuridad respectivamente, y una intensidad de luz PPFD de 60 μ mol.m⁻².s⁻¹ en un período de 15 días.

Se realizaron mediciones diarias de absorbancia a 470 nm y 750 nm utilizando un espectrofotómetro. Además, se realizaron observaciones microscópicas diarias para evaluar posibles cambios en la morfología celular, entre otros aspectos.

Los valores obtenidos de absorbancia fueron registrados y utilizados para la construcción de una curva de producción de astaxantina en función del tiempo.

6.3. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética es un indicador clave de la eficiencia fotoquímica de algas, en particular del fotosistema II (PSII), se utiliza para evaluar la salud y el estado fisiológico de las algas.

Para medir la eficiencia fotosintética, se siguió el procedimiento descrito por Spilling *et al.* (2017) (75). En primer lugar, se utilizaron tres cultivos en diferentes estados de crecimiento: uno con 5 días de inoculado, otro con 13 días de inoculado y un tercero que había recibido un cambio de medio 12 días antes del ensayo. Para la evaluación, se realizaron 5 diluciones seriadas al medio del cultivo correspondiente a cada condición experimental y se analizaron en placa de 96 pocillos, de forma de obtener 150 μL por pocillo. Como blanco se utilizó una muestra filtrada de la misma matriz, con ausencia de microalgas. El ensayo se realizó por triplicado. La placa se dejó en oscuridad durante 20 minutos y posteriormente, se midió la fluorescencia excitando a 440 nm y registrando la emisión a 685 nm. La fluorescencia oscura se denomina F_0 , que representa la fluorescencia mínima con todos los centros de reacción del PSII están abiertos (tras la aclimatación a la oscuridad). Para medir la fluorescencia máxima (F_m), se saturó el sistema fotosintético PSII añadiendo 15 μL de DCMU 2mM. Seguidamente, la muestra se expuso a la luz durante 4 minutos y se volvió a registrar la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 440 nm y registrando la emisión a 685 nm. Esta medición se denomina fluorescencia saturante o máxima, F_m . La diferencia entre F_m y F_0 se expresó como fluorescencia variable F_v . El índice de eficiencia fotosintético se calculó como $F_v/(F_m-\text{Blanco})$.

Todas las medidas de fluorescencia realizadas en este trabajo se realizaron dentro del rango lineal determinado en esta etapa y utilizando siempre ganancia 100.

6.4. Determinación de astaxantina mediante Espectrofotometría UV-Vis

Se extrajo el contenido de una cápsula de astaxantina de 4 mg y se disolvió utilizando 50 mL de metanol como solvente, con el fin de obtener una solución madre con una concentración de 80 µg/mL. La mezcla se homogeneizó mediante vortex, asegurando la disolución total del compuesto.

Seguidamente, se procedió a la preparación de las diluciones estándar necesarias para la construcción de la curva de calibración. Se seleccionaron concentraciones adecuadas para garantizar mediciones dentro del rango óptimo de absorbancia del espectrofotómetro. Se prepararon soluciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL.

Posteriormente, se determinó la longitud de onda máxima de absorbancia (λ máx) de la astaxantina mediante un barrido espectral utilizando la solución madre, siendo de 470 nm. Una vez identificado este valor, se procedió a medir la absorbancia de cada una de las diluciones estándar a dicha longitud de onda, empleando celdas de vidrio. El ensayo se realizó por duplicado, utilizando metanol como blanco.

Finalmente, se construyó la curva de calibración graficando absorbancia en función de las concentraciones de las muestras en µg/mL.

6.5. Determinación de astaxantina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se disolvió una cápsula de astaxantina de 4 mg en 20 mL de metanol, con el fin de evaluar su eficiencia de extracción del compuesto. La solución obtenida se agitó en vortex durante 20 segundos para favorecer la disolución y homogeneización del contenido. Luego, se sometió a un proceso de sonicación utilizando un baño sonicador durante 5 minutos con el fin de mejorar la extracción del compuesto.

Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 1200 rpm durante 15 minutos para separar el sobrenadante, donde se encontraba disuelta la astaxantina. Luego, la solución se filtró mediante un filtro de 0.22 μm para eliminar cualquier partícula en suspensión que pudiera interferir en el análisis cromatográfico. La muestra se diluyó para garantizar que la concentración de astaxantina estuviera dentro del rango óptimo de 0.120 a 0.200 mg/mL, conforme a referencias previamente establecidas (76).

Por otro lado, se centrifugó 50 mL de cultivo líquido de astaxantina a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se guardó en freezer a -80 °C durante 1 hora. Posteriormente, la muestra se liofilizó durante 24 horas. La biomasa seca se trató con 500 μL de HCl 1M y se incubó a 70 °C durante 5 minutos, luego se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionó 1 mL de hexano-isopropanol en una relación 6:4 (v/v), se vortexeó por 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizó un paso de centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos para separar la fase líquida, el sobrenadante se transfirió a un Eppendorf nuevo. Luego, se evaporó el solvente en termobloque a 60 °C y se disolvió el extracto en 200 μL de metanol. Finalmente, la muestra se filtró utilizando un filtro de 0.22 μm .

El análisis cromatográfico se llevó a cabo para el estándar mediante HPLC (Shimadzu, Nexera x2), utilizando una columna de fase reversa C18 (Restek, LC columns - Serial #14060317T) de 25 cm de longitud y 0.46 cm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil utilizada estuvo compuesta por una mezcla de agua, metanol, diclorometano y acetonitrilo en una proporción de 4.5:28:22:45.5 (v/v/v/v), manteniendo un flujo constante isocrático de 1 mL/ min. Se inyectó un volumen de 20 μL de muestra y la detección se realizó mediante un detector UV-Vis a una longitud de onda de 476 nm.

7. Procesamiento de datos

El procesamiento de datos y todos los gráficos obtenidos en este proyecto se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism* 8.0.2.

Resultados y discusión

1. Determinación de la biomasa producida (peso seco) para *Chlorella sorokiniana*

Para llevar a cabo el ensayo para la correlación entre OD₇₅₀ y peso seco, primero se determinó la curva de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* a partir del registro diario de la absorbancia a 750 nm. Luego, se realizó el ensayo de peso seco, en el que se correlacionaron los valores de OD₇₅₀ con la biomasa seca obtenida, permitiendo establecer una relación entre la densidad óptica y la acumulación de biomasa a lo largo del tiempo.

A la hora de realizar la curva de crecimiento de *C. sorokiniana* se tuvieron en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, se seleccionó una longitud de onda de 750 nm para la medición de densidad óptica, con el fin de evitar la interferencia de la absorción de clorofila en la lectura. En segundo lugar, se partió de cultivos frescos, ya sea repicando de placas o de cultivos líquidos para no afectar el crecimiento de la microalga.

A partir de esto, se determinó el comportamiento de esta cepa a escala de matraces (1L) para poder distinguir las diferentes fases de crecimiento que presenta. La Figura 6a muestra el seguimiento del cultivo. De este primer ensayo se pudo determinar que la cepa *C. sorokiniana* presenta una fase exponencial temprana y duradera que comienza a los 3 días y se extiende hasta el día 18, con posterior estancamiento del cultivo. Esta tendencia de crecimiento se asemeja a las obtenidas en bibliografía bajo condiciones similares (77).

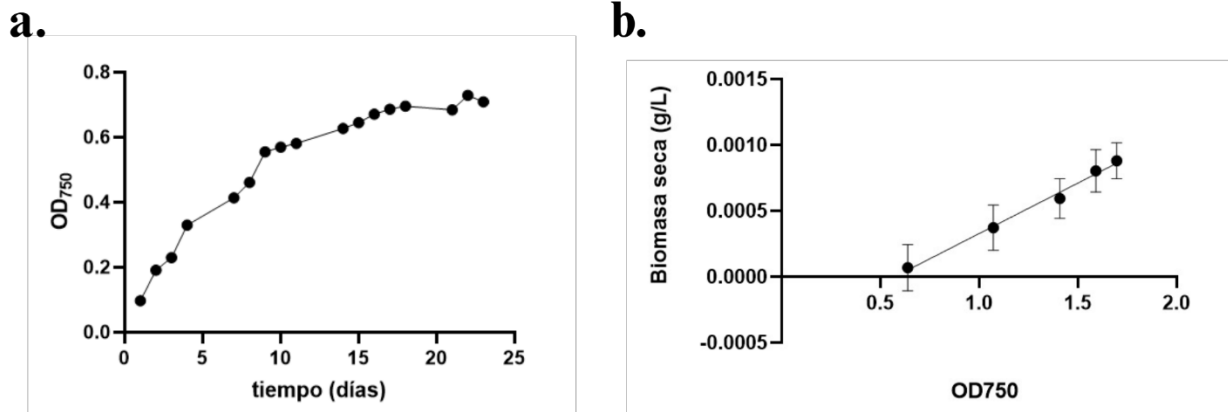


Figura 6. Representación gráfica de la curva de crecimiento y la curva de relacionamiento de OD₇₅₀ con peso seco. a) Curvas de crecimiento de la cepa *C. sorokiniana* describiendo su crecimiento en OD₇₅₀ nm en función de los días de cultivo. b) Curva de relacionamiento de OD₇₅₀ con peso seco en g/L. Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación $y=0,0008 * x + 0,0004$, con una pendiente de 0,0008 y un R² de 0,992 para relacionar las medidas de OD₇₅₀ y el peso seco en gramos de cultivo de *C. sorokiniana*.

Una vez obtenido el primer acercamiento al comportamiento de la cepa, se realizaron curvas de correlación entre valores de OD₇₅₀ y biomasa seca algal (Figura 6b). Este ensayo nos permitió determinar concentraciones de biomasa seca a partir de valores de OD₇₅₀.

2. Evaluación de la capacidad biofloculante de hongos

Para este ensayo se utilizaron las especies *Aspergillus oryzae*, *Pleurotus ostreatus*, *Acidomyces acidophilus*, *Ganoderma lucidum* y *Rhizopus oryzae*, las cuales en su mayoría presentan un crecimiento filamentoso o poseen propiedades que pueden favorecer la biofloculación. La capacidad de biofloculación en estos hongos puede atribuirse a varios factores, incluyendo la producción de exopolisacáridos, la presencia de cargas superficiales en la pared celular y la capacidad de formar redes de micelio que facilitan la agregación de partículas en suspensión. Según fuentes bibliográficas *Ganoderma lucidum* y *Aspergillus oryzae*, han sido reportados como agentes floculantes eficientes debido a su capacidad para formar enlaces electroestáticos y puentes de hidrógeno con otras partículas del medio (78, 79). Por otra parte, también se ha reportado que

las hifas de hongos filamentosos presentes en *Pleurotus ostreatus* y *Rhizopus oryzae*, pueden actuar como estructuras físicas que atrapan células de microalgas y otros sólidos en suspensión, mejorando la eficiencia del proceso de biofloculación (80).

La selección de estos hongos no solo se basó en sus propiedades estructurales y funcionales, sino que también en su idoneidad para el consumo animal, garantizando que los bioproductos generados puedan ser utilizados en estrategias de suplementación sin comprometer la seguridad alimentaria, respaldado por búsqueda bibliográfica.

En primer lugar, realizamos un ensayo preliminar para la determinación de la capacidad biofloculante basándonos en un protocolo reportado en bibliografía (50). Esta metodología consistió en utilizar una suspensión fúngica, ya que es un método más sencillo y rápido para la determinación, considerando que disponíamos de cinco especies de hongos diferentes. Aunque el protocolo incluía conteo de esporas mediante cámara de Neubauer, dicho procedimiento no fue realizado en nuestro ensayo. Sin embargo, se partió de una porción homogénea de 5 mm, lo cual nos permitió normalizar el inóculo.

Por otra parte, se llevó a cabo en simultáneo el crecimiento y escalado de un cultivo de *Chlorella sorokiniana* hasta obtener el volumen necesario que permitiera su distribución en cinco matraces de 100 mL. Es importante destacar que el cultivo debía encontrarse en fase de crecimiento exponencial, con una OD₇₅₀ de 0.4 aproximadamente, con el fin de garantizar una óptima relación tamaño-densidad celular lo cual asegura una mejor eficiencia en la formación de pellets estables y funcionales.

Una vez distribuido el cultivo en los matraces, se adicionaron 500 µL de cada solución fúngica en su matraz correspondiente y se mantuvieron los mismos en agitación orbital a 155 rpm y 24 °C. Luego de una semana de incubación, se logró visualizar cambios en el matraz que contenía *C. sorokiniana* junto a *A. oryzae*, donde se evidenció la presencia de flóculos de tamaño reducido. A partir de lo observado, se decidió adicionar una fuente de carbono (glucosa 20 g. L⁻¹) a cada matraz con el objetivo de favorecer el desarrollo y metabolismo de los microorganismos, dado que los hongos, al ser heterótrofos, requieren de una fuente de carbono para su crecimiento (81). Además, la glucosa favorece la expansión del micelio, lo que podría facilitar el proceso de floculación. Sin embargo, la incorporación de esta fuente de carbono implica un mayor riesgo de contaminación,

ya que su disponibilidad puede promover el crecimiento de microorganismos no deseados, como bacterias. Adicionalmente, se realizó un ajuste de pH mediante la adición de HCl 0.5 M hasta alcanzar un valor de pH 6, con el fin de optimizar las condiciones de crecimiento.

A partir de estas modificaciones realizadas, se logró observar presencia de biofloculación en los matraces que contenían *C. sorokiniana* + *P. ostreatus* y *C. sorokiniana* + *A. oryzae* al cabo de 5 días. Aunque los flóculos permanecieron en un tamaño reducido (Figura 7c), se decidió prolongar la incubación 6 días más. Durante este período, se observó un cambio de coloración en el cultivo, indicando que había entrado en fase de muerte (Figura 7b). Esto podría atribuirse a que la duración total del ensayo (25 días) junto con la adhesión tardía de la fuente de carbono superó el tiempo óptimo de crecimiento. Además, los hongos tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos por lo que, frente a la falta de nutrientes en el medio, los mismos pueden degradar las microalgas reduciendo significativamente la viabilidad celular. Para el resto de los co-cultivos, a pesar de las modificaciones realizadas, no se observaron generaciones de biofloculación. Adicionalmente, se realizaron tinciones de Gram a los matraces donde se visualizó cambio de color en el medio, detectándose contaminación bacteriana, por lo que este factor pudo haber influido directamente en los resultados obtenidos.

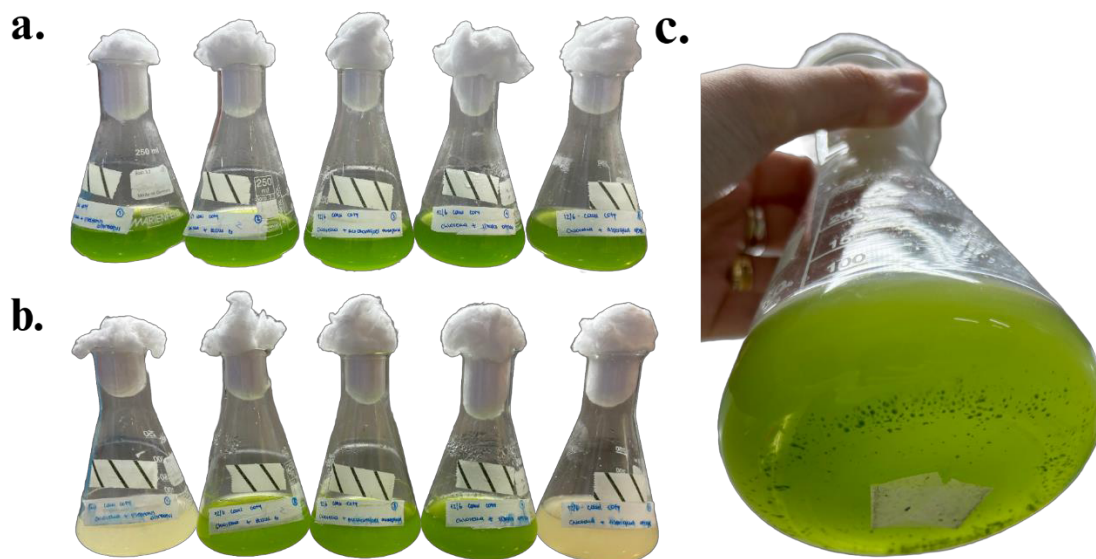


Figura 7. Ensayo de determinación de hongos con capacidad biofloculante para los co-cultivos. De izquierda a derecha: *C. sorokiniana* + *P. ostreatus*, *C. sorokiniana* + *G. lucidum*, *C. sorokiniana* + *A. acidophilus*, *C. sorokiniana* + *R. oryzae* y *C. sorokiniana* + *A. oryzae*. a) Matracas inoculados con la suspensión fúngica en el día 1. b) Matracas post-inoculación a los 18 días. c) Imagen aumentada del co-cultivo *C. sorokiniana* + *A. oryzae* donde se visualizan los flóculos obtenidos previo a la prolongación del ensayo.

En el trabajo de Wang *et al.* (2022)(50), se ha reportado que el tiempo estimado para observar presencia de flóculos varía entre 72 horas aproximadamente dependiendo de la especie, un período significativamente menor en comparación con el tiempo empleado en este ensayo preliminar.

Entre los posibles factores que pudieron haber afectado el éxito del ensayo, es importante destacar que, si bien se normalizó el inóculo en base a micelio fresco crecido en placa, por motivos prácticos no se realizó conteo de esporas mediante cámara de Neubauer, pudiendo ser un paso fundamental ya que probablemente la cantidad añadida haya sido insuficiente, motivo por el cual no permitió una adecuada formación de flóculos. También un aspecto a optimizar es la relación alga:hongo, como también la optimización de la fase de crecimiento del alga al momento del agregado del hongo, así como el pH. Asimismo, la fuente de carbono fue glucosa, pudiéndose reemplazar por otros azúcares o almidones, ya que este agregado favorece la proliferación bacteriana.

A pesar de las dificultades observadas en el ensayo, se logró identificar dos hongos con capacidad biofloculante, siendo *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*. A partir de este estudio se procedió con la verificación de la identidad de estos hongos a nivel género y especie.

2.1. Identificación molecular

Dado que todas las especies de hongos utilizadas en este trabajo eran conservadas y provistas por el laboratorio, se consideró necesario confirmar la identidad de las dos especies con capacidad biofloculante: *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*. Para esto se empleó la identificación molecular mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal, utilizando los primers ITS1 e ITS4. Esta región corresponde a un segmento no codificante del ADN ribosomal, ubicado entre los genes que codifican las subunidades del ARN ribosomal. Su variabilidad entre especies, junto con la presencia de secuencias altamente conservadas en sus extremos, la convierte en un marcador molecular ampliamente utilizado para la identificación y caracterización de hongos. La longitud del fragmento amplificado de la región ITS varía según la especie, con tamaños que oscilan entre 400 y 700 pb (82).

La PCR se llevó a cabo empleando primers ITS1 e ITS4, que permiten amplificar la región ITS en su totalidad. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el agente intercalante GoodView para la visualización de las bandas (Figura 8). Este procedimiento permitió determinar el tamaño de los fragmentos amplificados y así poder corroborar la identidad de las especies evaluadas. En el caso de *Aspergillus oryzae*, el tamaño esperado del fragmento amplificado se encuentra en un rango de 500-600 pb, mientras que para *Pleurotus ostreatus* oscila entre 600 y 650 pb (83, 84).

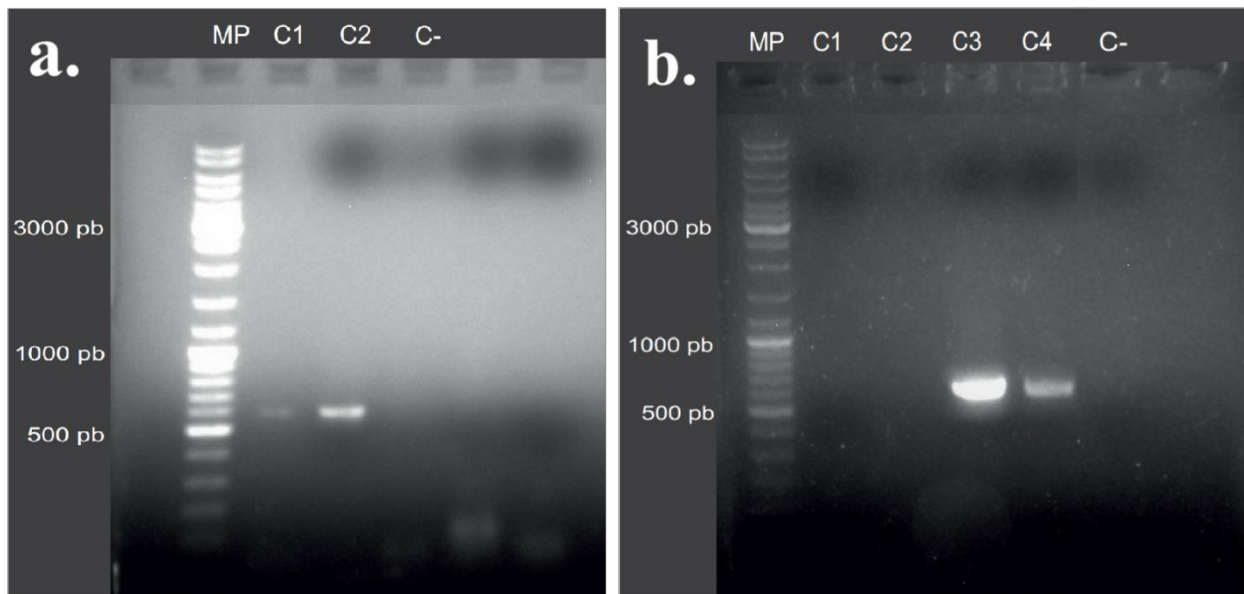


Figura 8. Geles de agarosa al 1%. a) Carriles: Marcador de peso molecular (MP), C1: *A. oryzae*, C2: *P. ostreatus*, C-: Control negativo. b) Carriles: Marcador de peso molecular (MP), C1: *A. oryzae* sin diluir, C2: dilución $\frac{1}{2}$ *A. oryzae*, C3: dilución $\frac{1}{5}$ *A. oryzae*, C4: dilución $\frac{1}{10}$ *A. oryzae*, C-: Control negativo.

En el gel de agarosa al 1%, la imagen A corresponde a la corrida de *A. oryzae* y *P. ostreatus*. En el caso de *P. ostreatus* se observa una banda definida en el carril C2, correspondiente a 600 pb. Este tamaño concuerda con lo esperado según bibliografía, lo que confirma la correcta amplificación del ADN (83).

Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron dificultades en la detección de una banda definida en el carril C1 correspondiente a *A. oryzae*, esto pudo deberse a la posible presencia de inhibidores que afectaron el rendimiento de la PCR y la migración del ADN en el gel. La presencia de inhibidores está dada por la naturaleza pigmentada de algunas cepas de *A. oryzae*, que pueden producir metabolitos secundarios y compuestos fenólicos que actúan como inhibidores de la PCR (85). Estos compuestos pueden unirse al ADN o interferir con la actividad de la Taq polimerasa, reduciendo la eficiencia de la amplificación. La falta de visualización de una banda clara en el carril requirió la repetición del ensayo, implementando algunas estrategias para reducir la presencia de estos posibles inhibidores, como diluciones ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{10}$) del ADN extraído previamente. El control negativo no mostró amplificación, lo que indica ausencia de contaminación.

Luego de repetir el ensayo, se puede observar en la imagen B las muestras. Como resultado se observa una clara amplificación en el carril C3 y C4 correspondientes a las diluciones $\frac{1}{5}$ y $\frac{1}{10}$

respectivamente. Además, se visualiza un tamaño de banda de 500 pb aproximadamente, resultado que concuerda con lo esperado (84). En este caso, el control negativo no mostró amplificación, evidenciando que no hubo contaminación durante el procedimiento.

Tanto para *Aspergillus oryzae* como para *Pleurotus ostreatus*, los resultados del ensayo de PCR indicaron que el tamaño de banda coincide con el esperado para cada especie según lo reportado en bibliografía. Además, la ausencia de amplificación en el control negativo confirma la especificidad en la reacción. Sin embargo, a pesar de la concordancia en el tamaño de las bandas observadas, se decidió enviar los productos de PCR a secuenciación para una identificación definitiva.

2.1.1. Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación de ADN es una herramienta muy utilizada para la identificación molecular de hongos, permitiendo confirmar taxonómicamente las especies mediante la comparación de sus secuencias con bases de datos de referencia. Además, requieren de un análisis bioinformático, que incluye la evaluación de la calidad de los datos, la alineación de secuencias y la comparación con secuencias previamente caracterizadas.

En este estudio, se amplificaron fragmentos de ADN de *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus* mediante PCR en tiempo final utilizando primers ITS1 e ITS4. Estos productos fueron enviados a secuenciación y sometidos a un análisis bioinformático para su correcta identificación.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se llevó a cabo una evaluación de los cromatogramas generados con el objetivo de verificar la calidad de la secuenciación. Durante este proceso, se identificaron y eliminaron regiones con señales de baja calidad que podrían afectar la precisión del análisis. Posteriormente, las secuencias depuradas fueron alineadas utilizando el software MEGA, lo que permitió la obtención de secuencias consenso para cada uno de los primers utilizados.

Luego de obtener las secuencias consenso, se realizó un alineamiento local utilizando la herramienta BLASTn del NCBI. Esta comparación permitió determinar el grado de similitud de las secuencias analizadas con aquellas disponibles en la base de datos del NCBI. A partir de los resultados obtenidos, se evaluaron los porcentajes de cobertura e identidad, y se identificaron los géneros y especies correspondientes a las secuencias analizadas. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del BLASTn para las cepas *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*

Nombre científico	Total Score	Query Cover	E value	Porcentaje de identidad	Nº acceso
<i>Aspergillus oryzae</i>	556	74%	7e-154	99.67%	JX868678.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	673	70%	0.0	100%	EU424310.2

A partir de los datos obtenidos, podemos visualizar que se logró determinar el género en ambos casos, sin embargo, no es posible confirmar la especie con certeza para *A. oryzae*. El análisis de BLAST arrojó un porcentaje de identidad de 99.67% con *Aspergillus oryzae*. Si bien estamos frente a un alto porcentaje de identidad, la cobertura es relativamente baja, lo que indica que solo una porción de la secuencia se alineó con la referencia, por lo que no podemos confirmar la especie con certeza, esto es debido a que *Aspergillus oryzae* está estrechamente relacionada con otras especies del género, por lo que es difícil su identificación molecular.

Por otro lado, la muestra inicialmente atribuida a *Pleurotus ostreatus* fue identificada por BLAST como *Pleurotus ostreatus*, con un 70% de cobertura y un 100% de identidad. En este caso, el porcentaje de identidad nos indica una alineación total, pero en el caso de la cobertura presentó un porcentaje del 70%, indicando que solo se alineó una porción de la secuencia con la referencia. A partir de este resultado obtenido, tampoco pudimos confirmar con certeza la especie para *P. ostreatus*.

A pesar de que la región ITS es el marcador más utilizado para la identificación de hongos, presenta una limitada capacidad para diferenciar especies dentro de ciertos géneros, especialmente en aquellos que presentan alta diversidad y especies filogenéticamente cercanas. Por este motivo, la utilización de *barcoding* propone el uso de múltiples marcadores genéticos que complementan la

información proporcionada por ITS. En el caso de *Aspergillus*, genes como *benA*, calmodulina y RPB1 o RPB2 pueden proporcionar una mejor diferenciación entre especies cercanas. Para *Pleurotus*, el gen β -tubulina y TEF1- α han demostrado ser marcadores confiables para distinguir especies con mayor precisión (86, 87).

3. Ensayo de biofloculación en co-cultivo y post cultivo

A partir del screening preliminar que permitió evaluar la capacidad biofloculante de los hongos, se pudo identificar varias limitaciones en el protocolo que requirieron ajustes. En primer lugar, la biofloculación observada fue mínima, esto pudo deberse a la no optimización del inóculo inicial y el ratio alga:hongo utilizado, pudiendo afectar la reproducibilidad del experimento. Además, se presentaron problemas de contaminación, esto pudo deberse al agregado tardío de fuente de carbono a un cultivo que ya no se encontraba en fase exponencial.

En el ensayo inicial para la evaluación de la floculación de algas en co-cultivo con hongos, se utilizó una suspensión fúngica a partir de micelio fresco, no obteniéndose buenos resultados de floculación. En base a los resultados de esta etapa se decidió dejar de lado la estrategia de cosecha en co-cultivo.

Se ha reportado en estudios al método de peletización fúngica post cultivo, como una alternativa más eficiente de cosecha, ya que permite obtener flóculos en un menor tiempo y con buenos rendimientos (56). A partir de esto, se procedió a evaluar y optimizar la formación de pellets de hongos para optimizar el proceso.

La primera estrategia consistió en evaluar el comportamiento de cada hongo por separado en medio de extracto de malta. Para ello, se inoculó una porción normalizada de cada hongo en matraces con 100 mL de medio y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento, 195 rpm, 25 °C durante 5 días. El objetivo inicial fue poder determinar el tiempo requerido para la formación de los pellets, evaluar el tamaño alcanzado y analizar la efectividad del medio de cultivo para ambos hongos. Pasado el tiempo de incubación establecido, no se logró visualizar peletización para *A. oryzae* aunque en el caso de *P. ostreatus* se identificaron pellets de pequeño tamaño a los 7 días de inoculados. A partir de este primer resultado, se pudo determinar que *P. ostreatus* presentó un mejor

crecimiento en extracto de malta, ya que es un medio rico en azúcares que puede metabolizar eficientemente. Por otro lado, *A. oryzae* no presentó crecimiento, debido a que se caracteriza por degradar polisacáridos más complejos como almidón y glucosa, además de que prefiere un pH más ácido, mientras que el extracto de malta presenta un pH más neutro (88).

A partir de esta información inicial obtenida, se consultó la bibliografía para adaptar un medio de cultivo adecuado para *A. oryzae*, tomando como referencia el estudio de Pei *et al.* (2021) (56) en el cual se utilizó un medio de peletización que contiene principalmente glucosa como fuente de carbono, amonio, minerales esenciales y un pH favorable para su crecimiento gracias al HCl proporcionado en el medio. Basado en este estudio, se optó por repetir el ensayo empleando el medio específico para cada hongo, obteniendo un resultado favorable. A los 5 días de inoculación, *A. oryzae* formó pellets de 0.1 a 0.3 cm aproximadamente, mientras que *P. ostreatus* desarrolló pellets de más de 0.5 cm a los 7 días. En ambos casos se mantuvieron las mismas condiciones de inoculación.

En paralelo se creció el cultivo de *Chlorella sorokiniana*, una vez alcanzada la fase exponencial se dividió el cultivo en matraces de 250 mL, se midió absorbancia 750 nm y se agregaron los flóculos de los hongos colados previamente. Se adicionaron 5 mL de glucosa al momento de la inoculación con los hongos a diferencia del ensayo de screening preliminar que fue añadido días después. Este ensayo se realizó por duplicado. El cultivo *A. oryzae*- *C. sorokiniana*, luego de 24 horas de agitación, evidenció un cambio de coloración en el medio de cultivo, el cual se volvió completamente transparente, mientras que los flóculos adquirieron un tono verde uniforme. En cuanto al cultivo *P. ostreatus* – *C. sorokiniana*, tras 96 horas de agitación, se observó un cambio de color en algunos flóculos, acompañado de una disminución en la intensidad del tono verde en el medio de cultivo. Para ambas cosechas se registraron medidas OD₇₅₀ en el sobrenadante luego del ensayo.

Posteriormente, se repitió el ensayo bajo las mismas condiciones de cultivo con el objetivo de comparar los resultados con los obtenidos en primera instancia (Figura 9). Esto permitió verificar la reproducibilidad del procedimiento. Este segundo ensayo se realizó por triplicado.

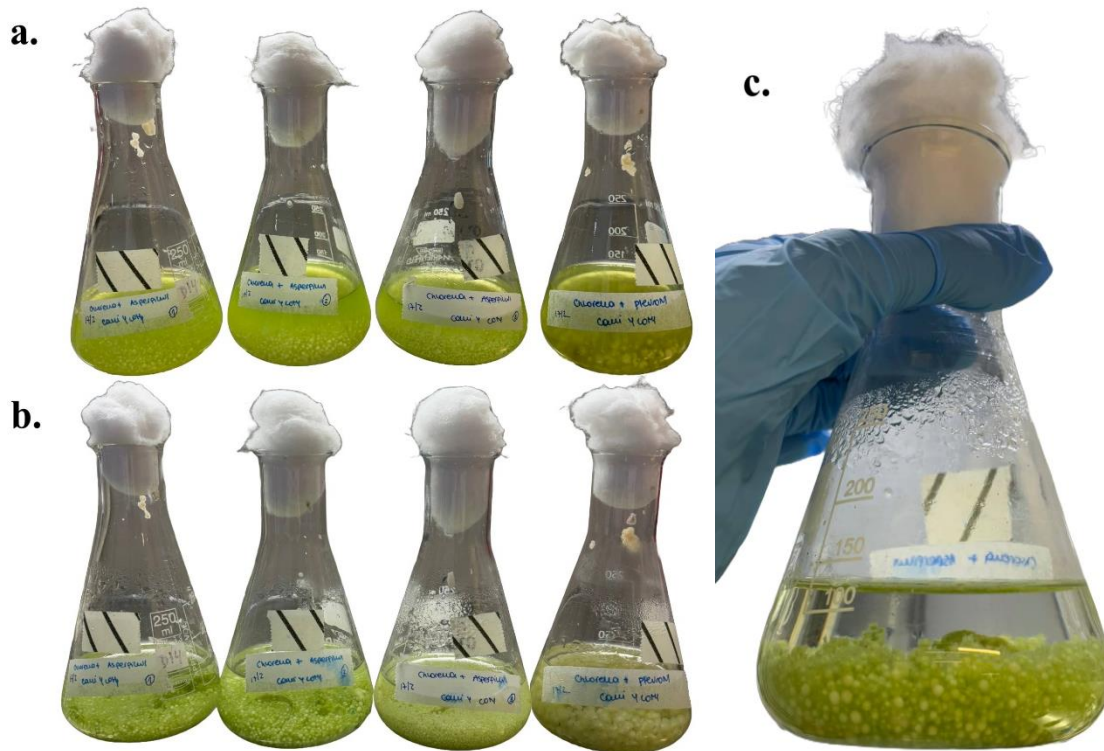


Figura 9. Ensayo de biofloculación para el cultivo *Chlorella sorokiniana* - *Aspergillus oryzae* y *Chlorella sorokiniana* - *Pleurotus ostreatus*. a) Matracas inoculados día 1 para ambos cultivos. b) Matracas luego de 22 horas de inoculados para ambos cultivos. c) Imagen aumentada de cultivo *C. sorokiniana* - *A. oryzae*.

La primera diferencia observada en este segundo ensayo fue el tiempo requerido para su desarrollo, siendo para ambos cultivos de algas con pellets en 22 horas, un tiempo menor del reportado anteriormente. Asimismo, en los cuatro matraces se evidenció un cambio en la coloración del medio, siendo transparentes en todos los casos. Esto se puede visualizar en la figura 9, donde se compara el estado del medio al momento de la inoculación (día 1) y después de las 22 horas. Estos resultados confirman nuevamente la formación del proceso de biofloculación entre hongos y microalgas, evidenciado el entrelazamiento característico de ambos organismos. El tiempo registrado en este segundo ensayo concuerda con lo reportado en bibliografía, donde se estima un rango de tiempo de 2.5 a 72 horas dependiendo de la especie (60).

Para ambos ensayos, los valores de OD₇₅₀ obtenidos luego de la adición de los flóculos fueron notoriamente menores en comparación con los valores de absorbancia iniciales (sin inocular), lo que confirma el correcto atrapamiento de las microalgas por parte de los flóculos fúngicos (ver

tabla 2 -Anexo). Para evaluar la eficiencia de recuperación, se aplicó la ecuación correspondiente. Los resultados obtenidos se presentan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de ambos ensayos para los co-cultivos *Chlorella sorokiniana*-*Pleurotus ostreatus* y *Chlorella sorokiniana* – *Aspergillus oryzae*.

Ensayo 1	<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>
Porcentaje de recuperación	62.4%	77.1%	99.7%	ND

ND: no determinado debido a contaminación

Ensayo 2	<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> – <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> – <i>A. oryzae</i>
Porcentaje de recuperación	96.1%	ND	ND	100%	100%	100%

ND: no determinado debido a contaminación

Los resultados confirman que el ensayo de biofloculación en el co-cultivo de *Chlorella sorokiniana* con pellets de *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus* fue exitoso, logrando una alta eficiencia en la recuperación celular. En particular, el co-cultivo de *A. oryzae* y *C. sorokiniana* presentó valores de recuperación de 100 %. Si bien los flóculos formados por *A. oryzae* fueron de menor tamaño al inicio del ensayo, lo que dificultó ligeramente su recuperación en comparación con los de *P. ostreatus*, esto no afectó la efectividad del proceso. Además, tras la biofloculación, se observó un incremento en el tamaño de los flóculos, lo que facilitó su recuperación en las etapas finales del ensayo. Cabe mencionar que la adición de la fuente de carbono al inicio del cultivo con los pellets favoreció el proceso de biofloculación, contribuyendo a la formación de flóculos.

En los matraces no determinados, no se visualizó biofloculación debido a la presencia de contaminación bacteriana, confirmada mediante tinción de Gram.

Luego, se realizó el mismo ensayo de biofloculación para la microalga *Haematococcus pluvialis*, siguiendo los mismos pasos tanto para la generación de los pellets de hongos como el procedimiento para obtener el co-cultivo. El ensayo se realizó por triplicado, sin embargo, al momento de la generación de los pellets de hongos de *P. ostreatus*, uno de los matraces presentó diferencias en la coloración, por lo que fue descartado.

Previo a la inoculación con los pellets de hongos, se observaron diferencias en la coloración del medio de cultivo líquido de *H. pluvialis* en algunos de los matraces, así como la presencia de pequeñas agregaciones de la microalga. No obstante, se dividieron los cultivos en los matraces correspondientes y se les adicionó el hongo respectivo. Seguidamente, se adicionó la fuente de carbono y se realizaron las correspondientes mediciones de OD₇₅₀. Se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura y agitación.

Estas diferencias anteriormente mencionadas podrían atribuirse a pequeñas variaciones en la disponibilidad de nutrientes o a una posible contaminación bacteriana, lo que terminó afectando la fisiología de las microalgas. Esto se vio reflejado tras la inoculación con los hongos correspondientes (28 horas después), ya que, con el paso del tiempo, no se logró visualizar biofloculación en la mayoría de los matraces, a excepción de dos. Sin embargo, incluso en estos dos matraces en los que sí se observó cierta biofloculación, el color del medio presentaba una apariencia inusual. Estos factores podrían deberse a una posible contaminación bacteriana, la cual habría afectado la fisiología de *H. pluvialis* y su interacción con los hongos, interfiriendo en el proceso esperado (Figura 10).



Figura 10. Ensayo de biofloculación para el co-cultivo alga-pellet de *Haematococcus pluvialis*- *Aspergillus oryzae* y *Haematococcus pluvialis*- *Pleurotus ostreatus* luego de 28 horas de inoculados.

Luego del tiempo de incubación, se observó que únicamente funcionó el ensayo para dos matraces, correspondientes a los co-cultivos *H. pluvialis* – *P. ostreatus* y *H. pluvialis* – *A. oryzae*. Este

resultado fue confirmado mediante la medición de OD₇₅₀ posterior a las 28 horas de inoculado, corroborando las observaciones visuales (ver tabla 3- Anexo).

Tabla 5. Porcentaje de recuperación para los co-cultivos *Haematococcus pluvialis*- *Aspergillus oryzae* y *Haematococcus pluvialis*- *Pleurotus ostreatus*.

Ensayo 1	<i>H. pluvialis</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>H. pluvialis</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>	<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>	<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>
Porcentaje de recuperación	52.2%	ND	87.6%	ND	ND

ND- no determinado debido a contaminación.

A pesar de que para el co-cultivo *H. pluvialis* – *A. oryzae* se obtuvo un buen porcentaje de recuperación, el valor obtenido para el co-cultivo *H. pluvialis*- *P. ostreatus* es relativamente bajo (Tabla 5). Sin embargo, si comparamos los resultados obtenidos en este co-cultivo con los obtenidos en el co-cultivo correspondiente a *C. sorokiniana*, podemos observar que los valores para *P. ostreatus* también fueron inferiores en comparación a los obtenidos para *A. oryzae* en el primer ensayo. Por lo que podemos decir que *P. ostreatus* presenta una menor capacidad para bioflocular.

A partir de las dificultades presentadas en esta primera prueba utilizando *H. pluvialis*, se decidió repetir el ensayo para el co-cultivo *H. pluvialis* – *A. oryzae*. No se pudo repetir el ensayo para *P. ostreatus* debido a la falta de disponibilidad del medio utilizado para su crecimiento. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación para el co-cultivo *Haematococcus pluvialis* – *Aspergillus oryzae*.

Ensayo 2	<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>
Porcentaje de recuperación	80, 96%
	85, 42%

En este segundo ensayo, se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación pese a que la cosecha se realizó 18 horas post inoculación con *A. oryzae*. Se podría evaluar prolongar el tiempo de incubación para observar si se obtienen porcentajes similares a los obtenidos con *C. sorokiniana* donde se lograron porcentajes del 100%.

Por otro lado, se evaluó un cultivo de *H. pluvialis* el cual se encontraba en su fase roja junto con *A. oryzae* (Figura 11). Sin embargo, pasadas 18 horas de incubación, no se logró visualizar adhesión

de la microalga a los flóculos de los hongos. Esto ocurre ya que al producirse astaxantina, se genera un cambio morfológico en la membrana de la microalga, lo que provoca un engrosamiento de la pared celular, impidiendo la adhesión del hongo. A su vez, ocurren alteraciones en la carga superficial, modificando la carga eléctrica y reduciendo la atracción (89).

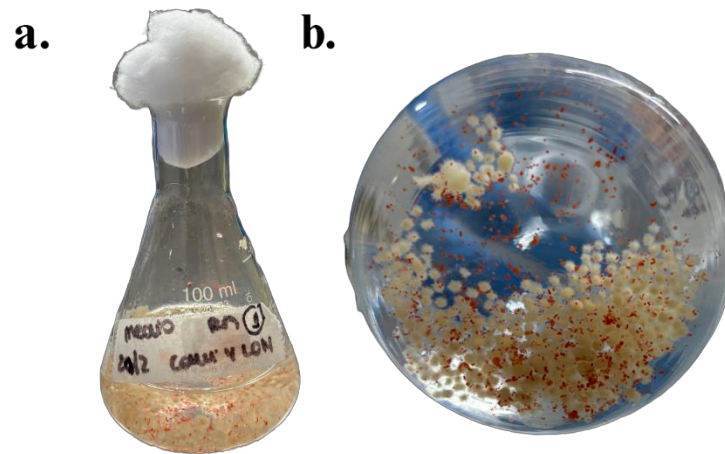


Figura 11. Ensayo de biofloculación para el co-cultivo *Haematococcus pluvialis* (en fase roja) – *Aspergillus oryzae*. a) Visualización del matraz con los flóculos de *A. oryzae*. b) Imagen tomada desde otro ángulo.

En términos generales, el ensayo de biofloculación mostró resultados satisfactorios, alcanzando eficiencias de hasta 100%, valores que concuerdan con los reportados en la bibliografía para esta técnica (55, 58). Además, la adición de glucosa en los co-cultivos con *H. pluvialis* y *C. sorokiniana* favoreció el crecimiento y mantenimiento de los flóculos. Aunque no podemos confirmarlo en este estudio, se ha reportado que la adición de glucosa incrementa tanto el tamaño como el número total de pellets formados en el co-cultivo (90). No obstante, consideramos que su incorporación en el momento adecuado promovió una mejor peletización, reflejándose en una mayor eficiencia de cosecha. Por otra parte, se considera necesario lograr optimizar el tiempo de cosecha, así como el estadio en el cual se encuentra la microalga.

Posteriormente, los flóculos obtenidos para ambas cepas de microalgas fueron analizados mediante SEM, esta técnica nos permitió comprender el mecanismo de los procesos de peletización entre hongos-microalgas, mostrando los posibles cambios en la estructura causada por la interacción entre ambas especies.

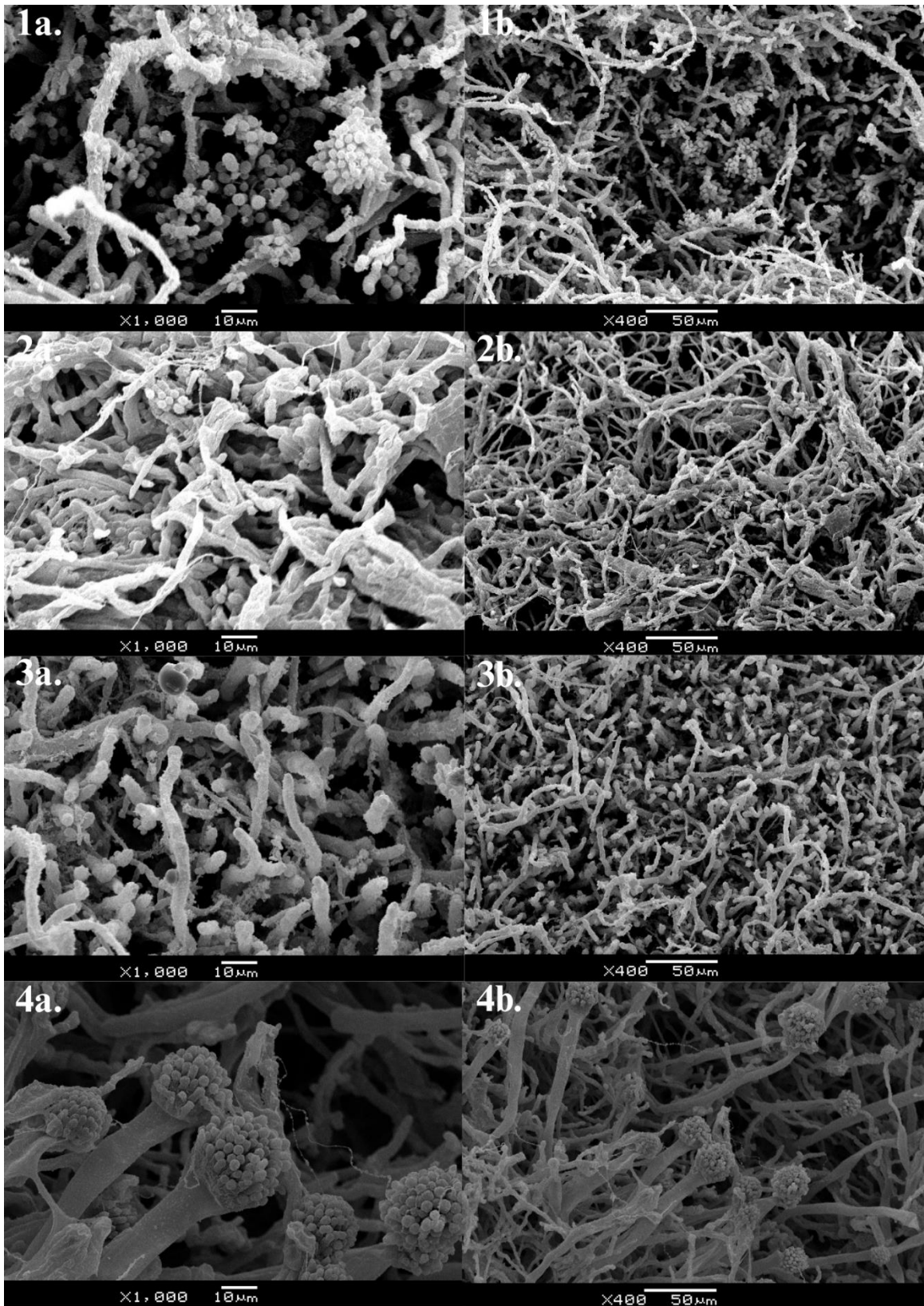


Figura 12. Imágenes de SEM para cada co-cultivo en aumento 1000X y 400X. 1a y b) *H. pluvialis*- *A. oryzae*. 2a y b) *C. sorokiniana*- *A. oryzae*. 3a y b) *H. pluvialis*- *P. ostreatus*. 4a y b) *C. sorokiniana*- *P. ostreatus*.

La imagen 1 y 2 perteneciente a la Figura 12, muestran cómo las células de microalgas (visualizadas como esferas) se adhieren y agrupan alrededor de las hifas fúngicas, evidenciando un proceso exitoso de bioadsorción durante la biofloculación. Según estudios previos, este entrelazamiento con el hongo podría estar relacionado con interacciones en la superficie celular entre ambos organismos, lo que contribuiría a explicar los mecanismos de floculación observados (91). Además, estas imágenes representan los co-cultivos *H. pluvialis*- *A. oryzae* y *C. sorokiniana*- *A. oryzae*, los cuales presentaron un porcentaje de recuperación del 88-100%. Este resultado es coherente con las observaciones microscópicas, ya que se evidencia una gran presencia de microalgas asociadas a las hifas fúngicas.

Por otro lado, en los co-cultivos *H. pluvialis*- *P. ostreatus* y *C. sorokiniana*- *P. ostreatus* (imagen 3 y 4) no se logró observar la presencia de microalgas en la superficie de los flóculos, lo que podría estar relacionado con el menor porcentaje de recuperación obtenido en comparación con *A. oryzae*. Sin embargo, aunque la recuperación fue inferior, no fue lo suficientemente baja como para descartar la biofloculación, por lo que es posible que las microalgas estuvieran atrapadas dentro de la estructura fúngica y no fueran visibles en las imágenes obtenidas. Este suceso se puede visualizar en el co-cultivo *H. pluvialis*- *P. ostreatus*, donde la estructura fúngica es notablemente homogénea y compacta (ver figura 1- Anexo), por lo que las microalgas podrían haber quedado atrapadas dentro de la matriz del hongo. Cabe mencionar que, en el ensayo de biofloculación realizado en matraces, se observó un cambio en la coloración del cultivo de microalgas, lo cual indicaba una posible alteración en el sistema. Al analizar las imágenes obtenidas, se pudo constatar la presencia de contaminación bacteriana (ver figura 2- Anexo), lo cual explica no solo el cambio de color observado, sino que también el bajo porcentaje de recuperación registrado.

Asimismo, en el co-cultivo perteneciente a *C. sorokiniana*- *P. ostreatus* (imagen 4) no se logró detectar visualmente presencia de microalgas. Se observaron únicamente hifas fúngicas con un crecimiento altamente desarrollado, sin embargo, el porcentaje de recuperación en el ensayo de biofloculación no fue excesivamente bajo, por lo que posiblemente la estructura del hongo influye en la visualización de estas. Además de que influyen otros factores como, el flóculo seleccionado y el tipo de corte realizado para la observación. Es posible que en estos casos haya sido necesario realizar cortes estratégicos para evaluar la presencia de microalgas en el interior de la estructura fúngica.

4. Análisis del contenido nutricional

El análisis de las propiedades nutricionales de los flóculos obtenidos es fundamental para evaluar su potencial como suplemento en la alimentación animal. Se determinó el contenido proteico mediante el método de Bradford, el contenido lipídico utilizando el protocolo de Folch y la capacidad antioxidante total a través del ensayo de ABTS. Estos ensayos proporcionan información clave sobre el valor nutricional y funcional de los flóculos, permitiendo estimar su aporte y su posible impacto en la salud animal.

4.1. Análisis del contenido proteico

Se determinó el análisis cuantitativo de proteínas solubles presentes en los flóculos de los co-cultivos *C. sorokiniana* – *P. ostreatus*/*A. oryzae* y *H. pluvialis*- *P. ostreatus*/*A. oryzae*. Para eso, se utilizó el método de Bradford, una metodología ampliamente referenciada. Este ensayo fue realizado con el objetivo de analizar los resultados obtenidos y discutir diferencias encontradas frente a otros trabajos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Contenido proteico soluble en porcentaje en base a biomasa seca para los co-cultivos cosechados en el ensayo de biofloculación. Resultados obtenidos mediante método de Bradford.

Co-cultivos	Porcentaje proteico (%)
<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	11,2 ± 3,8
<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	8,24 ± 2,6
<i>H. pluvialis</i> – <i>P. ostreatus</i>	11,0 ± 3,5
<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>	8,86 ± 2,2

Los valores obtenidos muestran que los co-cultivos con *Pleurotus ostreatus* presentaron en promedio un mayor contenido de proteínas solubles en comparación con los co-cultivos realizados con *Aspergillus oryzae*. En el caso de *C. sorokiniana*- *P. ostreatus*, el porcentaje de proteína alcanzó en promedio un 11,2%, mientras que *A. oryzae* fue de 8,24%. Para *H. pluvialis* se obtuvo un 11% de proteína cuando se cultivó con *P. ostreatus*, mientras que con *A. oryzae* el valor fue de 8,86%, un valor ligeramente superior al observado con *C. sorokiniana*.

El mayor contenido proteico en los co-cultivos con *P. ostreatus* puede deberse a la capacidad que presenta este hongo en degradar compuestos orgánicos y liberar metabolitos que pueden ser utilizados por las microalgas para la biosíntesis de proteínas. Además, *P. ostreatus* es conocido por su capacidad de producir enzimas extracelulares que facilitan la conversión de materiales orgánicos en fuente de nitrógeno asimilables, promoviendo el crecimiento algal y la síntesis proteica (92). Por otro lado, la menor proporción de proteínas obtenidas en los co-cultivos con *A. oryzae* podría estar relacionada con su capacidad para degradar compuestos orgánicos y su tendencia a acumular carbohidratos en lugar de proteínas cuando se enfrenta a una cantidad limitada de nitrógeno o cuando hay exceso de carbono disponible (93).

En comparación con bibliografía, el contenido proteico en los co-cultivos es inferior al reportado para cultivos puros de *Chlorella* y *Haematococcus*, donde los valores pueden oscilar entre el 40% y el 60% del peso seco en condiciones óptimas (94). Aun así, estudios reportan que la competencia por nutrientes y las interacciones metabólicas entre los microorganismos puede alterar la composición bioquímica de la biomasa resultante, provocando una disminución de hasta un 13% en el contenido proteico (95).

Los bajos porcentajes obtenidos podrían adjudicarse principalmente a la metodología de extracción proteica empleada o a las condiciones de cultivo. El uso del buffer PBS para la disrupción de los flóculos pudo haber limitado la eficiencia de extracción, ya que, si bien estabiliza las proteínas, no fue lo suficientemente efectivo para lograr una ruptura completa. Como consecuencia, esto podría haber afectado la liberación de proteínas y su posterior recuperación en el sobrenadante. Por otro lado, se probó la misma metodología, pero utilizando buffer de lisis para la disrupción, sin embargo, este buffer fue descartado ya que presentaba interferencias debido a su composición la cual contenía detergentes y quelantes. Además, factores como el tiempo de sonicación y la estrategia de biofloculación también pudieron influir en la eficiencia del proceso y por ende en la composición final de la biomasa. Por otro lado, es importante señalar que el análisis se realizó sobre la fracción de proteína soluble, lo que podría haber influido en la cuantificación final. Finalmente, para obtener datos del contenido de proteína total y comparar los resultados con lo reportado en bibliografía se utilizó una técnica de cuantificación proteica estándar ya utilizada para microalgas y hongos como es la cuantificación de nitrógeno total Kjeldahl, utilizando los flóculos previamente obtenidos en el ensayo de biofloculación.

Para convertir los valores de nitrógeno total a proteína, es necesario utilizar factores de conversión que son variables. Si bien no hay reportados valores específicos para los flóculos generados, se decidió realizar una estimación a partir de valores reportados para especies de microalgas como *Chlorella pyrenoidosa* y para hongos filamentosos. Siendo estos de 5.95 para la microalga y 6.25 para hongos (96, 97). Utilizando estos valores se obtuvieron los resultados de proteína total analizada (Tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de proteína medida mediante cuantificación de nitrógeno total Kjeldahl con factores de conversión específicos para los co-cultivos.

Co-cultivo	Nitrógeno total (g/100 g N)	Factor de conversión (g proteína /g N)	Cantidad de proteína (%)
<i>C. sorokiniana- A. oryzae</i>	0.33	6.1	26,52
<i>C. sorokiniana- P. ostreatus</i>	0.33	6.1	28,63
<i>H. pluvialis- P. ostreatus</i>	0.31	6.1	23,53
<i>H. pluvialis- A. oryzae</i>	0.30	6.1	22,78

Al comparar los resultados obtenidos con el método de Bradford (Figura 13), se observa un aumento en el porcentaje de proteína determinado por el análisis de nitrógeno total. Esto se debe a que la técnica detecta proteínas totales (solubles e insolubles) a diferencia del método de Bradford que detecta proteínas solubles por el método de extracción utilizado.

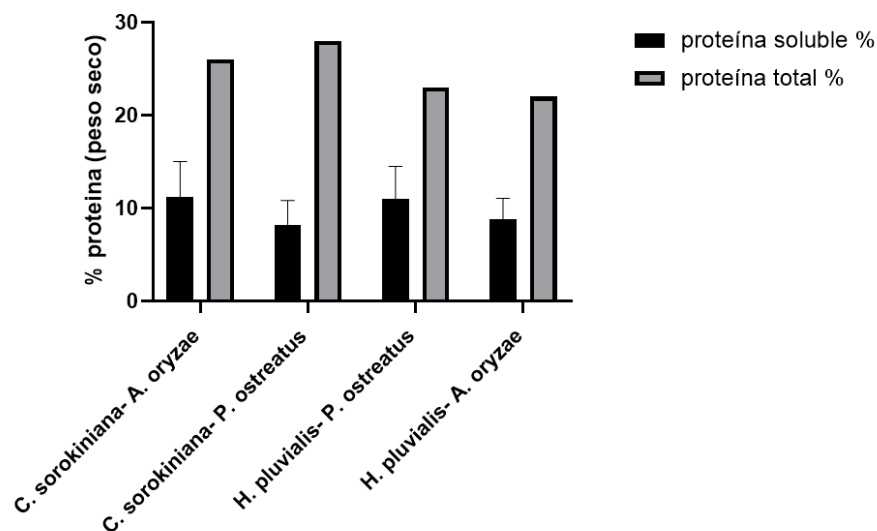


Figura 13. Gráfico de barras comparativo para el porcentaje obtenido del método de Bradford (proteínas solubles – representado en color negro) y el método de nitrógeno total Kjeldahl (proteínas totales – representado en color gris).

No se han encontrado estudios de referencia que reporten el contenido de nitrógeno total en flóculos de microalgas y hongos. Esto se debe a la variabilidad en la proporción y tipo de organismos utilizados, así como a las diferencias en las condiciones de cultivo y procesamiento utilizadas. Sin embargo, estudios donde se utilizó *C. pyrenoidosa* la cual se caracteriza por su alto contenido proteico, mostró para los pellets de algas y hongos un contenido proteico de 54.3% en condiciones óptimas (50). Esto es el doble de la concentración obtenida en este estudio. La densidad del pellet, así como las cepas y condiciones de cultivo utilizadas pueden haber afectado el resultado.

4.2. Análisis del contenido lipídico

Habiendo evaluado el contenido proteico, se plantea el análisis cuantitativo de lípidos presentes en los flóculos del co-cultivo *C. sorokiniana* – *P. ostreatus*/ *A. oryzae* y *H. pluvialis*- *A. oryzae* utilizando el método gravimétrico de Folch. Este ensayo fue realizado con el fin de analizar los resultados obtenidos y discutir diferencias encontradas frente a otros trabajos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Contenido lipídico en porcentaje para los co-cultivos cosechados en el ensayo de biofloculación

Co-cultivos	Concentración lipídica (g/L)
<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	0,21 ± 0,07
<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	0,12 ± 0,08
<i>H. pluvialis</i> - <i>A. oryzae</i>	0,11 ± 0,07

Los valores obtenidos en este ensayo muestran que el co-cultivo de *C. sorokiniana*- *P. ostreatus* presentó un mayor contenido lipídico en comparación con el co-cultivo de *A. oryzae*. Esto sugiere que la interacción con *P. ostreatus* favoreció una mayor acumulación de lípidos en la biomasa floculada. Esto puede deberse a la capacidad que presenta *P. ostreatus* para degradar compuestos orgánicos complejos y liberar metabolitos que podrían ser utilizados por *C. sorokiniana* para la biosíntesis de lípidos (98). Por otro lado, la menor acumulación de lípidos en el co-cultivo con *A. oryzae* podría deberse a diferencias en la competencia por nutrientes o a la regulación metabólica específica del hongo. Como se mencionó anteriormente, *A. oryzae* es conocido por su capacidad para producir enzimas hidrolíticas que degradan polisacáridos y proteínas (93), esto podría haber favorecido un metabolismo orientado hacia la síntesis proteica en lugar de la acumulación de lípidos en la biomasa generada.

Por otro lado, el contenido lipídico obtenido para *H. pluvialis* con *A. oryzae* presentó una concentración relativamente baja, obteniéndose valores de $0,11 \pm 0,065$. De acuerdo con bibliografía, la mayor acumulación de lípidos ocurre en fase estacionaria, en cambio, en este ensayo, el co-cultivo se encontraba en fase exponencial, esto podría explicar el resultado obtenido (99).

Para confirmar si el co-cultivo con *P. ostreatus* favorece una mayor producción de lípidos, se debería evaluar el co-cultivo con *H. pluvialis*- *P. ostreatus*, dado que el co-cultivo estudiado con *C. sorokiniana* – *P. ostreatus* el valor obtenido fue mayor.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó una comparación con la bibliografía disponible, donde se ha reportado que, en condiciones óptimas, los cultivos de microalgas pueden alcanzar hasta un 30% de su peso seco en lípidos, mientras que en *Chlorella sp.* se han registrado valores de hasta un 53% (99). Por otro lado, se ha reportado que para *C. pyrenoidosa* en co-cultivo con *A. oryzae*, los valores reportados fueron de 0.99 g/L (50). En el caso de *H. pluvialis* en co-cultivo, no

se disponen de datos sobre su contenido lipídico, excepto para el cultivo de *Haematococcus sp.* donde se reportaron valores de entre 23,29% – 31,63%, dependiendo del tipo de ácido grasos analizado (100).

La baja acumulación lipídica en comparación con otros estudios plantea la búsqueda de otras estrategias para optimizar la producción de lípidos, como la modificación de las condiciones de cultivo o el uso de estrés nutricional para inducir la lipogénesis en las microalgas, así como la metodología de extracción. Por otra parte, los bajos valores de lípidos obtenidos en estos co-cultivos sugieren que la biofloculación favorece la acumulación de biomasa sin inducir una acumulación significativa de lípidos, esto puede ser una ventaja en aplicaciones donde el objetivo es la generación de biomasa para la alimentación animal (99).

4.3. Análisis de la capacidad antioxidante

Se utilizó el método de ABTS para medir la actividad antioxidante de los flóculos obtenidos del ensayo de biofloculación en fase verde. Esta propiedad resulta de gran interés, ya que la suplementación con biomasa seca podría aportar capacidad antioxidante, lo que contribuiría a la reducción del estrés oxidativo, favoreciendo la salud intestinal y modulando la microbiota ruminal del animal, lo que mejoraría la digestión y absorción de nutrientes (101).

Además, los antioxidantes presentes en la biomasa pueden reducir la peroxidación lipídica de tejidos, mejorando la calidad de la carne y leche, al tiempo que favorecen el sistema inmunológico del animal. Esto es beneficioso en sistemas de producción intensiva, donde los animales están expuestos a factores de estrés ambiental y nutricional que pueden comprometer su rendimiento y bienestar (18).

Para este ensayo, se realizó una curva de calibración con ácido ascórbico, los valores obtenidos de los flóculos fueron interpolados en la ecuación obtenida (ver figura 4 – Anexo). Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Capacidad antioxidante obtenida para los co-cultivo

Co-cultivo	Capacidad antioxidante equivalentes de ác. Ascórbico (mg/100g) de biomasa seca
<i>H. pluvialis</i> - <i>P. ostreatus</i>	312 ± 74
<i>H. pluvialis</i> - <i>A. oryzae</i>	326,47 ± 57
<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	760,57 ± 56,5
<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	822,38 ± 73

Se observaron diferencias entre los distintos co-cultivos, siendo los cultivos de *C. sorokiniana* los que presentaron valores considerablemente más altos en comparación con los de *H. pluvialis*. Esto puede deberse a que *H. pluvialis* se encontraba en fase verde, lo que indica la ausencia de factores de estrés que estimulen la síntesis de astaxantina.

Se espera que *H. pluvialis* en fase roja presente una mayor capacidad antioxidante, ya que esta microalga produce astaxantina, un potente antioxidante con una actividad superior a la de la vitamina C.

Según bibliografía, se reportaron valores de entre 671 mg/100 g de biomasa seca hasta 3100 mg/100 g de biomasa seca, dependiendo de la especie de microalga analizada. Esta variación depende de la exposición a factores ambientales externos, como también depende de factores intrínsecos como la especie y el tiempo de cultivo (102).

Cabe destacar, que este ensayo se realizó a partir de un sobrenadante, el cual contenía compuestos solubles. Por ende, esto también pudo haber interferido en el valor final obtenido.

5. Evaluación del crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y producción de astaxantina

5.1. Evaluación del crecimiento

Para llevar a cabo la evaluación del crecimiento de *H. pluvialis* en fase verde, se partió de cultivos líquidos con medio BBM con y sin trazas metálicas. A pesar de que no se encontraron referencias bibliográficas que comparen directamente estas condiciones, es sabido que la adición de estos micronutrientes al medio de cultivo favorece el crecimiento y la productividad de la microalga (101). La disponibilidad de trazas metálicas es crucial en la etapa vegetativa, sin embargo, en ausencia de estos micronutrientes, pueden generarse deficiencias que afecten el crecimiento y, en algunos casos, desencadenen respuestas de estrés que conduzcan a acumulación de astaxantina.

A partir de las medidas de absorbancia a 470 nm registradas diariamente, se realizó el gráfico de absorbancia en función del tiempo para ambos cultivos (Figura 14). Este gráfico permitió visualizar diferencias entre ambas condiciones, evidenciando un cambio pronunciado en la fase exponencial del cultivo que contenía medio BBM con elementos traza. Esto significa que, a mayores valores de absorbancia, mayor es el crecimiento de la microalga. En función de este resultado, se decidió continuar el resto de los ensayos utilizando medio BBM con trazas.

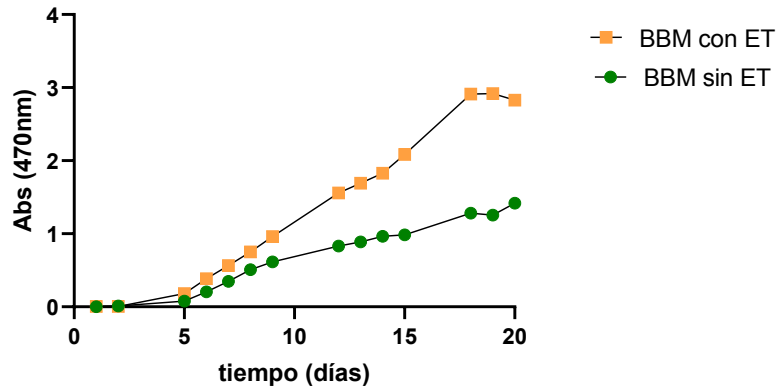


Figura 14. Curvas de comportamiento de *H. pluvialis* en medio BBM con elementos trazas (amarillo) y sin elementos trazas (verde), describiendo su crecimiento en Absorbancia 470 nm en función de los días de cultivo.

El siguiente paso fue la realización de la curva de crecimiento, mediante el registro diario de absorbancia a 750 nm, la misma fue correlacionada mediante un ensayo de peso seco, que consistió en realizar curvas de biomasa seca en función de valores de OD₇₅₀. A continuación, se presentan ambos gráficos (Figura 15).

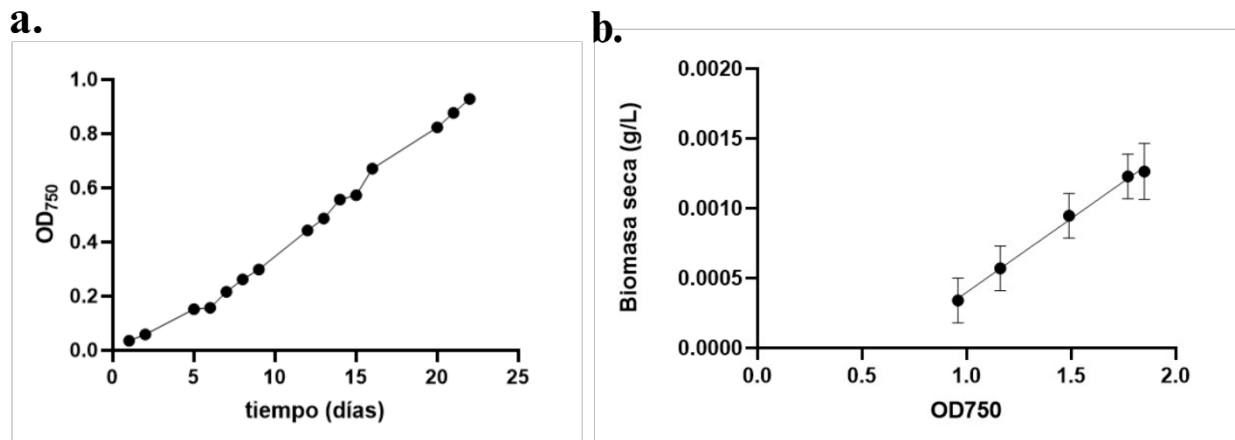


Figura 15. Representación gráfica de la curva de crecimiento y la curva de relacionamiento de OD₇₅₀ con peso seco. a) Curvas de crecimiento de la cepa *H. pluvialis* describiendo su crecimiento en OD 750 nm en función de los días de cultivo. b) Curva de relacionamiento de OD₇₅₀ con peso seco en g/L. Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación $y = 0.0011 * x + 0.0007$, con una pendiente de 0.0011 y un R² de 0.9962 para relacionar las medidas de OD₇₅₀ y el peso seco en gramos de cultivo de *H. pluvialis*.

A partir de la curva de crecimiento (Figura 15a), se visualizó como esta microalga presenta una fase exponencial temprana y duradera, la cual se prolonga a lo largo de los días. Sin embargo, para la obtención de una curva completa de comportamiento se requieren más medidas de OD₇₅₀, para poder determinar las correspondientes fases de crecimiento que presenta la microalga.

A pesar de que se partió de una cepa comercial, es fundamental garantizar que se está trabajando con la especie correcta, por lo tanto, se recomienda realizar una identificación molecular con posterior secuenciación (ver Protocolo 1 - Anexo).

5.2. Producción y evaluación de astaxantina

La producción de astaxantina ocurre en dos etapas diferentes: primero se desarrolla la fase verde, donde se da la acumulación de biomasa, y luego tiene lugar la fase roja, en la que se produce este carotenoide. Luego de analizar el crecimiento de *H. pluvialis* en fase verde bajo condiciones óptimas, se procedió a evaluar la producción de astaxantina. Para ello, se realizó la correspondiente búsqueda bibliográfica sobre las condiciones óptimas requeridas para la producción de este carotenoide. Diversos estudios han demostrado que la producción de astaxantina está directamente relacionada con la inducción de estrés en la microalga, lo cual puede lograrse mediante distintos factores ambientales. Entre los principales se encuentran la alta intensidad lumínica, el aumento de la salinidad en el medio, variaciones en el pH y la temperatura, así como también la falta de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo (101–104). En nuestro caso, optamos por la inducción de estrés en el medio de cultivo de *H. pluvialis* a través de la limitación de nitrógeno. El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales que al limitarlo desencadena una respuesta metabólica en la que la microalga redirige su metabolismo hacia la síntesis de carotenoides, como una forma de protección frente al estrés oxidativo. Esta reducción afecta directamente el crecimiento celular y la actividad enzimática (101, 105).

La estrategia consistió en realizar un cambio de medio en el cultivo líquido verde en fase exponencial. Para ello, se llevó a cabo una centrifugación a bajas velocidades, con el fin de evitar la ruptura celular o la mortalidad de las microalgas. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió en el medio de cultivo RM, cuya eficiencia para la producción de astaxantina ha sido probada (105), manteniendo las condiciones previamente establecidas de luz y temperatura. En primera instancia, se realizaron mediciones diarias de absorbancia a 470 nm para monitorear la acumulación de astaxantina. A los 4 días de la inoculación en el medio de cultivo RM, se comenzó a observar un cambio en la coloración del medio, tornándose en un color verdoso claro. Este primer resultado concuerda con lo reportado en bibliografía, donde se indica que, luego del cambio de medio, se comienza a visualizar cambio de color a los 3 días (103). Este cambio visual se comparó con los valores de absorbancias registrados (Figura 16), los cuales evidenciaron fluctuaciones en las medidas a lo largo de los días. Esto se debe ya que cuando *H. pluvialis* comienza a acumular astaxantina tiende a agregarse y sedimentar, por lo que realizar una toma de muestra homogénea

es complejo. A partir de las dificultades presentadas en este primer ensayo, se decidió repetir el mismo registrando valores de OD₇₅₀ y absorbancia 470 nm en función del tiempo. Sin embargo, no se logró obtener una curva de comportamiento de *H. pluvialis* en fase verde y roja para visualizar la producción de astaxantina ya que el matraz presentó contaminaciones bacterianas.

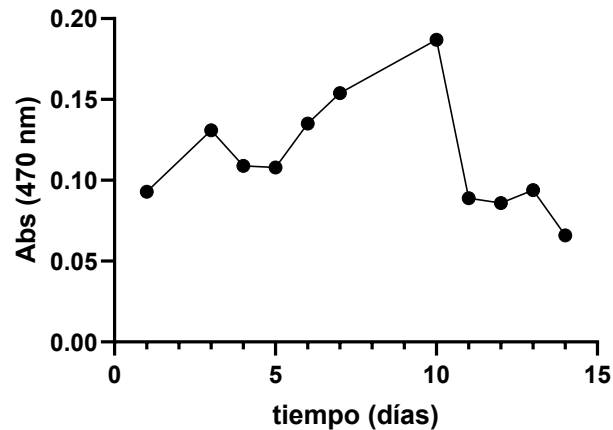


Figura 16. Curva de comportamiento de *H. pluvialis* post cambio de medio de cultivo RM para la evaluación de la producción de astaxantina, describiendo su comportamiento en absorbancia 470 nm en función de los días de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, la producción de astaxantina ocurre en dos etapas, este cambio no solo se manifiesta visualmente en el medio de cultivo, sino que implica una transformación morfológica en las microalgas.

Para visualizar esta transformación, se realizó una primera visualización mediante microscopía óptica a partir de un matraz que contenía 50 mL de cultivo RM, lo cual permitió observar los cambios morfológicos característicos en las tres fases del desarrollo de *H. pluvialis* (Figura 17).

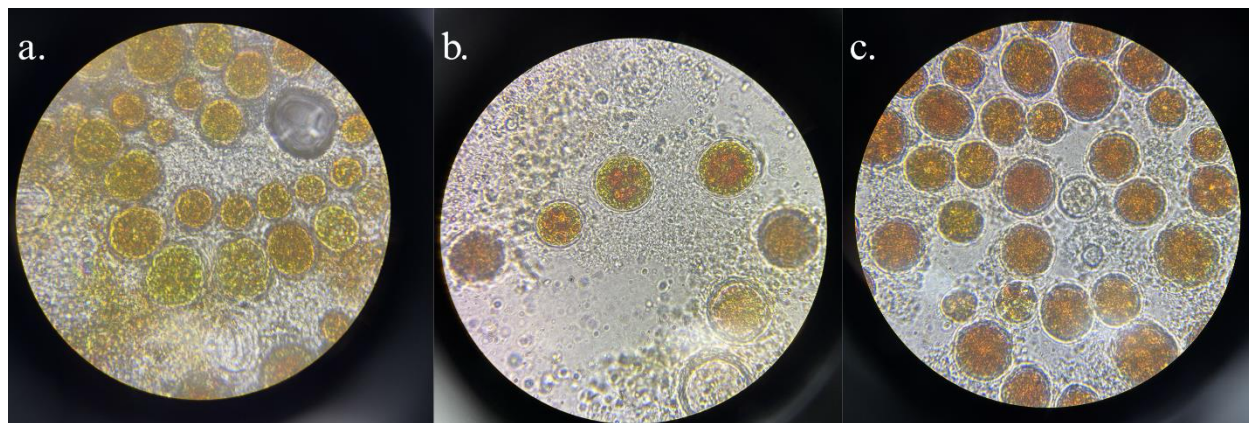


Figura 17. Visualización por microscopía óptica de “*Haematococcus pluvialis*” para observar la acumulación de astaxantina. a) Etapa vegetativa al comienzo del período del cultivo, b) Etapa intermedia, en la que las células se tornan de color naranja-verdoso, c) Etapa de quiste al final del período de cultivo.

Al principio, *H. pluvialis* comienza su ciclo de vida como una microalga biflagelada de color verde, caracterizada por su capacidad de movimiento (Fig. 17a). Posteriormente, pierde sus flagelos y adopta una morfología esférica, dando lugar a la fase de palmela no móvil (Fig. 17b), y finalmente pasa a la aplanospora de paredes gruesas (Fig. 17c).

Como se puede visualizar en la Figura 17, la astaxantina comienza a acumularse en la etapa intermedia, comenzando con el proceso de enquistamiento, donde *H. pluvialis* se convierte en células de color naranja-verdoso, este color fue observado a los 10 días del cultivo post cambio de medio. Las condiciones de estrés provocaron la pérdida de ambos flagelos además de que se visualizó un aumento del tamaño celular. Luego, la astaxantina continuó acumulándose y las células pasaron a formar quistes en la etapa de aplanospora, esto se observó a partir del día 11.

5.3. Eficiencia fotosintética

Con el fin de observar cambios en la transición de fase verde a roja, se evaluó la eficiencia fotosintética de *Haematococcus pluvialis* mediante fluorometría, comparando ambos estados para analizar su comportamiento fisiológico.

La medición de la eficiencia fotosintética en algas es fundamental para evaluar su crecimiento y salud, ya que la fluorescencia de clorofila *a* permite estimar la eficiencia fotoquímica y el estado del transporte de electrones en el fotosistema II. El uso de fluorimetría es una herramienta clave para detectar el estrés en algas en sus primeras etapas y evaluar la capacidad de conversión de energía lumínica en biomasa (75).

En *Haematococcus pluvialis*, la transición de la fase verde a la roja implica un cambio fisiológico significativo, donde las células acumulan astaxantina en respuesta a factores ambientales como la alta intensidad de luz o el estrés oxidativo. Durante este proceso, la eficiencia fotosintética disminuye, lo que se observa en una reducción del índice Fv/Fm, indicando una menor actividad del fotosistema II y un incremento en mecanismos de disipación de energía, como la disipación o quenching no fotoquímica (NPQ). Estos cambios reflejan la adaptación de *H. pluvialis* para minimizar el daño por fotooxidación y maximizar la producción de astaxantina en condiciones de estrés (108).

A partir de este ensayo, se observaron variaciones en la eficiencia fotosintética en función del tiempo de cultivo y del medio de cultivo utilizado (Figura 18). Se utilizaron 3 cultivos, dos en medio BBM correspondientes a los días 5 y 13, y un tercer cultivo en medio RM de 12 días, en este cultivo la microalga se encontraba en fase roja, produciendo astaxantina. En el cultivo de 5 días la eficiencia fotosintética fue de $0,4939 \pm 0,0079$, mientras que en el cultivo de 13 días aumentó a $0,5566 \pm 0,022$, esto sugiere una optimización del aparato fotosintético y una mayor eficiencia en la transferencia de electrones en el fotosistema II. Sin embargo, en el cultivo de 12 días en medio RM (fase roja) la eficiencia fotosintética disminuyó a $0,514 \pm 0,0068$. Esta tendencia a la reducción podría indicar que la acumulación de astaxantina actúa como un mecanismo de protección contra el estrés lumínico, disipando parte de la energía en forma de calor y reduciendo la eficiencia fotosintética (109, 110).

A su vez, la posterior adición de DCMU permitió evaluar el estado del fotosistema II en cada condición. En los cultivos en medio BBM, la inhibición del transporte de electrones provocó un incremento considerable en la fluorescencia (ver Tabla 4- Anexo), lo que refleja una mayor acumulación de electrones y una intensa actividad fotosintética, especialmente en el cultivo de 13 días. Por otro lado, en el cultivo de 12 días en medio RM, el aumento tras la adición de DCMU fue

18,1 veces menor en comparación con el cultivo de 13 días en medio BBM. Lo que sugiere una menor eficiencia en la transferencia de electrones, debido a la acumulación de astaxantina y la reducción de la actividad fotosintética (109).

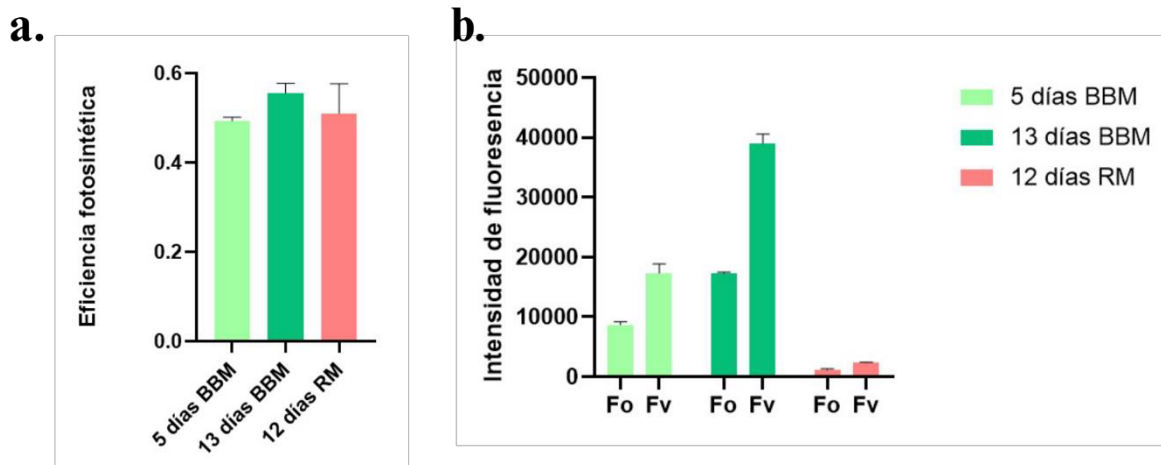


Figura 18. Gráficos de barras realizados para el ensayo de eficiencia fotosintética. a) Gráfico de barras representando la eficiencia fotosintética en función de los días para cada cultivo empleado en el ensayo. b) Gráfico de intensidad de fluorescencia antes (F0) y después del agregado del DCMU (Fv) para los distintos cultivos.

El cultivo en BBM de 13 días mostró la mayor eficiencia fotosintética, mientras que el cultivo RM presentó una marcada reducción debido al cambio metabólico hacia la producción de astaxantina. Estos resultados demuestran la relación entre el estado fisiológico de *Haematococcus pluvialis* y su eficiencia fotosintética, dependiendo del tiempo de cultivo y del medio en el que se encuentre.

5.4. Determinación de astaxantina mediante Espectrofotometría UV-Vis

Para este estudio se utilizaron cápsulas de astaxantina de venta comercial que, según lo descrito en el etiquetado, contienen 4 mg de astaxantina los cuales incluían otros excipientes como aceite de oliva, glicerina, almidón de maíz, extracto de hojas de romero, agua, entre otros. Cabe mencionar que la astaxantina es un carotenoide altamente lipofílico, de fácil oxidación y degradación, por lo que a la hora de realizar los ensayos se tuvo que minimizar la exposición a la luz. Estas cápsulas fueron utilizadas como estándar.

El primer ensayo realizado fue el barrido espectral a partir de una cápsula de astaxantina con el fin de medir la absorbancia de la cápsula en un rango de longitudes de onda que nos permita determinar cómo interactúa la astaxantina con la luz, ya que estamos frente a un carotenoide. Como resultado, se observa que este pigmento tiene un máximo de absorción alrededor de los 470 nm en el espectro visible. Según bibliografía este resultado puede variar dependiendo del solvente utilizado para realizar la dilución, pero se estima un rango de entre 470 – 495 nm (111). Sin embargo, se visualizó un único pico ancho en la región del espectro visible, esto puede deberse a la estructura química de la astaxantina y la presencia de enlaces conjugados (112), así como también a los excipientes presentes en la formulación de la cápsula. Entre ellos, el aceite de oliva el cual es el componente lipídico principal, cuya función es facilitar la solubilización de la astaxantina al ser un compuesto altamente lipofílico, aunque también puede generar dispersión de la luz, provocando un ensanchamiento del pico. Por otra parte, también está la presencia de glicerina y almidón de maíz cuya función principal es estabilizar este pigmento, ya que es de fácil degradación.

Mediante el barrido espectral se pudo identificar el pico (ver figura 5 - Anexo) confirmando la presencia de astaxantina en la cápsula, como también la presencia de los excipientes descritos en la etiqueta del producto, los cuales destacan por la importancia que presentan a la hora de evitar la oxidación de la astaxantina, que se considera un factor crítico, ya que la exposición prolongada al oxígeno y la luz puede reducir su concentración y generar productos de degradación.

A partir de la identificación del pico a 470 nm, se realizó una curva de calibración de absorbancia en función de concentración de astaxantina, partiendo de una solución madre obtenida a partir de las capsulas utilizadas como estándar (ver figura 6- Anexo).

5.5. Determinación de astaxantina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Se llevó a cabo la determinación de astaxantina mediante HPLC para identificar y caracterizar este carotenoide. Para este análisis, se utilizó un estándar de astaxantina de referencia comercial. Como se mencionó anteriormente, este estándar no solo está compuesto por astaxantina, sino que presenta

otros componentes necesarios para la estabilización de este carotenoide, como ésteres y antioxidantes, que contribuyen a la protección de la astaxantina frente a la degradación por factores externos como la luz y el oxígeno. Sin embargo, estos componentes pueden influir en el comportamiento cromatográfico del estándar.

Con el fin de eliminar estas impurezas, se sometió a un paso de centrifugación. Este procedimiento permitió descartar las fracciones insolubles, como los lípidos y otros compuestos presentes en la cápsula, quedándonos con la astaxantina. Este paso es importante para minimizar posibles interferencias de la muestra durante la separación cromatográfica.

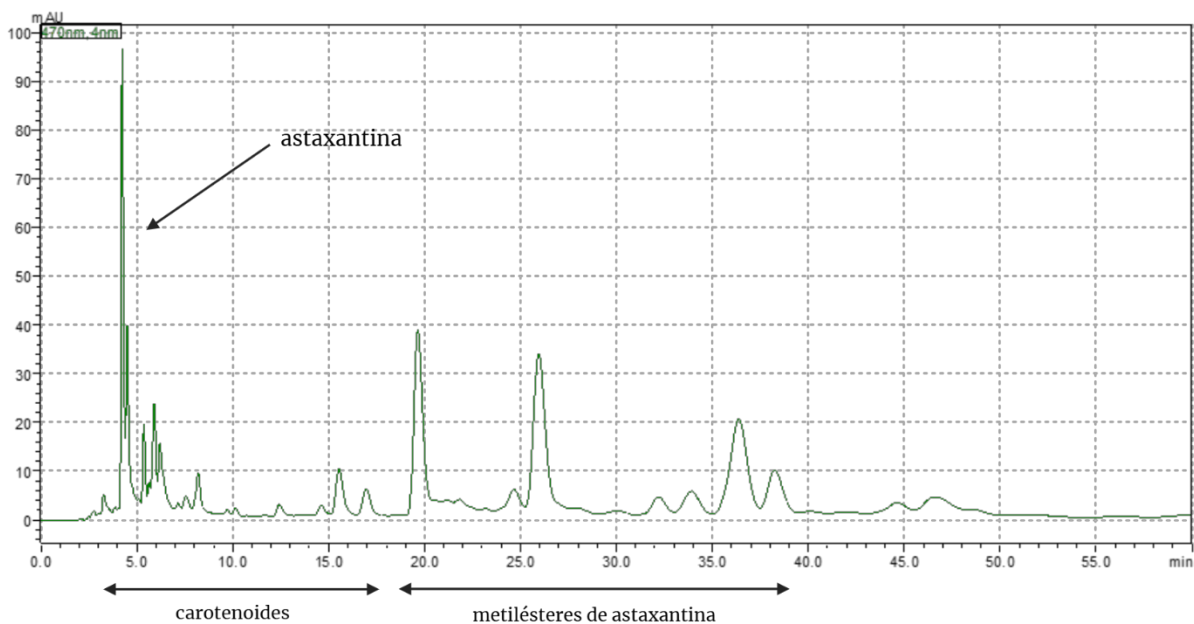


Figura 19. Cromatograma de HPLC para el estándar de astaxantina. Con una flecha se marca el pico correspondiente a la astaxantina así como los picos de carotenoides y los metilésteres de astaxantina.

El cromatograma obtenido para el estándar de astaxantina presentó diferentes tiempos de retención, lo que permitió distinguir entre sus formas libres y esterificadas como se representan en la figura 19. Se observaron eluciones a diferentes tiempos de retención, siendo los carotenoides los que primero eluyeron, seguido de los metilésteres de astaxantina. En comparación con bibliografía reportada, se determinó que el pico eluido a los 5 minutos corresponde a astaxantina (112).

Sin embargo, estos picos observados se deberían corroborar mediante estándares de monoésteres y diésteres para optimizar el método, así como también realizar un HPLC MS para caracterizar dichos picos.

Asimismo, se realizó la extracción de astaxantina y posterior análisis a partir de la biomasa cultivada. Sin embargo, no fue posible asignar picos a formas específicas de astaxantina o sus ésteres, ya que no se logró obtener un rendimiento adecuado con el volumen de cultivo generado para la extracción de *H. pluvialis* en fase roja y por ende para poder realizar la comparación de ambos cromatogramas.

Se propone realizar la extracción de astaxantina a partir de un volumen mayor de cultivo para mejorar el rendimiento de extracción para poder realizar el ensayo.

Conclusiones

En el presente estudio se evaluó la biofloculación en co-cultivos con dos cepas de microalgas y dos especies fúngicas con potencial aplicación en suplementación animal.

Se logró identificar dos especies fúngicas, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus oryzae* con capacidad biofloculante, cuya identidad fue confirmada mediante secuenciación. Asimismo, a través de co-cultivos con *Chlorella sorokiniana* y *Haematococcus pluvialis*, se analizó su capacidad de biofloculación conjunta, obteniendo resultados prometedores. En particular, se alcanzaron porcentajes elevados de recuperación de biomasa algal, lo que evidencia el potencial de esta estrategia como una solución eficiente para optimizar la cosecha de microalgas.

Se corroboró que la biomasa algal obtenida a partir de los flóculos contiene compuestos de alto valor, como proteínas, lípidos y moléculas bioactivas con potencial antioxidante. Aunque los análisis de composición lipídica no arrojaron resultados favorables, en la composición proteica se obtuvieron valores concordantes con bibliografía. Sin embargo, se ha documentado que la interacción simbiótica entre hongos y microalgas mejora el perfil nutricional de la biomasa. Esto la convierte en una alternativa viable para la suplementación animal, dado que sus componentes poseen propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y anticancerígenas, con impactos positivos en la salud de los animales y en la producción de carne y leche.

Adicionalmente, se estableció una metodología para evaluar el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y su capacidad de producción de astaxantina. Se logró su cultivo en condiciones adecuadas de luz, temperatura y agitación. Por otro lado, fue posible la síntesis de este carotenoide a partir de la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo, también se logró una primera aproximación a la metodología de extracción.

Perspectivas a futuro

La biofloculación se presenta como una estrategia prometedora dentro de los modelos de economía circular, con aplicaciones tanto en la aplicación de biomasa como en la reducción del impacto ambiental. A futuro, se plantea la optimización del proceso mediante el estudio de nuevos consorcios microbianos junto con diferentes condiciones de cultivo, para su aplicación en el tratamiento de efluentes industriales y la remoción de contaminantes específicos.

Además, es fundamental evaluar la viabilidad económica del escalado del proceso y su comparación con métodos convencionales de cosecha y tratamientos de agua.

Finalmente, la integración de la biofloculación con sistemas de producción sostenible podría favorecer el aprovechamiento de la biomasa obtenida en la generación de bioproductos, como fertilizantes o compuestos bioactivos- así como su uso en la suplementación animal. Debido a su composición nutricional, puede mejorar la salud y el rendimiento de los animales.

Por otra parte, el mercado de la astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* sigue en expansión, impulsado por su creciente demanda en las industrias nutracéuticas, cosméticas y acuícolas, donde se valora como una alternativa más segura y efectiva frente a los compuestos sintéticos.

Se espera que los avances en la optimización de condiciones de cultivo y las metodologías de extracción permitan desarrollar procesos más eficientes y sostenibles, reduciendo el impacto ambiental y mejorando la viabilidad económica de su producción.

Referencias bibliográficas

- (1) Nagarajan D, Varjani S, Lee DJ, Chang JS. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae – Nutritive value and techno-functional components. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021;150.
- (2) Lum KK, Kim J, Lei XG. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. 2013; 4:53.
- (3) Saadaoui I, Rasheed R, Aguilar A, Cherif M, Al Jabri H, Sayadi S, Manning SR. Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2021;12(1).
- (4) Sarma S, Sharma S, Rudakiya D, Upadhyay J, Rathod V, Patel A, Narra M. Valorization of microalgae biomass into bioproducts promoting circular bioeconomy: a holistic approach of bioremediation and biorefinery. *3 Biotech*. 2021;11(8).
- (5) Barros AI, Gonçalves AL, Simões M, Pires JCM. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015;41:1489–1500.
- (6) Sui Y, Jiang Y, Moretti M, Vlaeminck SE. Harvesting time and biomass composition affect the economics of microalgae production. *Journal of Cleaner Production*. 2020;259.
- (7) Ray A, Banerjee S, Das D. Microalgal bio-flocculation: present scenario and prospects for commercialization. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(21):26294–26312.
- (8) Toh PY, Azenan NF, Wong L, Ng YS, Chng LM, Lim JK, Chan DJC. The Role of Cationic Coagulant-to-Cell Interaction in Dictating the Flocculation-Aided Sedimentation of Freshwater Microalgae. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2018;43(5):2217–2225.
- (9) Olguín EJ. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*. 2012;30(5):1031–1046.
- (10) Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer JP. Microalgae cultivation systems. In: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier; 2019. p. 11–29.
- (11) Singh J, Saxena RC. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. Diversity and Significance. In: *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2015. p. 11–24.
- (12) Caroppo C, Pagliara P. Microalgae: A Promising Future. *Microorganisms*. 2022;10(8).

- (13) Abalde Alonso JE, Cid Blanco A, Fidalgo Paredes JP, Torres Vaamonde JE, Herrero López C. *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. Universidade da Coruña. Servizo de Publicacións; 1995. <http://hdl.handle.net/2183/25013>.
- (14) Poojary MM, Barba FJ, Aliakbarian B, Donsì F, Pataro G, Dias DA, Juliano P. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*. 2016;14(11).
- (15) Suparmaniam U, Lam MK, Uemura Y, Lim JW, Lee KT, Shuit SH. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019;115.
- (16) Varshney P, Mikulic P, Vonshak A, Beardall J, Wangikar PP. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresource Technology*. 2015;184:363–372.
- (17) Zhu C, Chi Z, Bi C, Zhao Y, Cai H. Hydrodynamic performance of floating photobioreactors driven by wave energy. *Biotechnology for Biofuels*. 2019;12(1).
- (18) Hernández-Pérez A, Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2014;49(2):157–173.
- (19) Dineshbabu G, Goswami G, Kumar R, Sinha A, Das D. Microalgae–nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods*. 2019;62.
- (20) Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Prosekov A, Ivanova S, Katserov D, Patyukov N, Sukhikh S. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*. 2020;10(8):1–24.
- (21) Richmond Amos. *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science; 2004. [citado 2025 Mar 24] Disponible desde: <https://alगतex.org/ebook/Handbook%20of%20microalgal.pdf>
- (22) Pignolet O, Jubeau S, Vaca-Garcia C, Michaud P. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2013;40(8):781–796.
- (23) Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: Occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;91(4):905–915.
- (24) Valenzuela AB, Sanhueza JC, Valenzuela RB, la correspondencia D, Alfonso Valenzuela Bonomo P. Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal. *Revista chilena de nutrición*. 2015; 42(3).
- (25) Givens I. Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health. *Nutrients*. 2009;1(1):71–82.

- (26) Del Mondo A, Smerilli A, Sané E, Sansone C, Brunet C. Challenging microalgal vitamins for human health. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1).
- (27) Wang Y, Tibbetts SM, McGinn PJ. Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. *Foods*. 2021;10(12).
- (28) Galarza VO. Carbohydrates and proteins in microalgae: Potential functional foods. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2019;22.
- (29) Amorim ML, Soares J, Coimbra JS dos R, Leite M de O, Albino LFT, Martins MA. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(12):1976–2002.
- (30) Begum H, Yusoff FMD, Banerjee S, Khatoon H, Shariff M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(13):2209–2222.
- (31) Oslan SNH, Oslan SN, Mohamad R, Tan JS, Yusoff AH, Matanjun P, Mokhtar RAM, Shapawi R, Huda N. Bioprocess Strategy of *Haematococcus lacustris* for Biomass and Astaxanthin Production Keys to Commercialization: Perspective and Future Direction. *Fermentation*. 2022;8(4).
- (32) Ambati RR, Moi PS, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs*. 2014;12(1):128–152.
- (33) Oslan SNH, Tan JS, Oslan SN, Matanjun P, Mokhtar RAM, Shapawi R, Huda N. *Haematococcus pluvialis* as a potential source of astaxanthin with diverse applications in industrial sectors: Current research and future directions. *Molecules*. 2021;26(21).
- (34) Hermes P. Astaxanthin, red coloring pigment, chemical formula and structure. [citado 2025 Mar 24] Disponible desde: <https://www.alamy.com/>
- (35) Abalde J, Orosa M, Torres E, Cid A. LA MICROALGA *Haematococcus* COMO FUENTE DE ASTAXANTINA. 1999. [citado 2025 Mar 24] Disponible desde: <http://hdl.handle.net/2183/10777>
- (36) Villaró S, Ciardi M, Morillas-españa A, Sánchez-zurano A, Acién-fernández G, Lafarga T. Microalgae derived astaxanthin: Research and consumer trends and industrial use as food. *Foods*. 2021;10(10).
- (37) Capelli B, Bagchi D, Cysewski GR. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*. 2013;12(4):145–152.

- (38) Li X, Wang X, Duan C, Yi S, Gao Z, Xiao C, Agathos SN, Wang G, Li J. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*. 2020;43.
- (39) La Bella E, Baglieri A, Fragalà F, Puglisi I. Multipurpose Agricultural Reuse of Microalgae Biomasses Employed for the Treatment of Urban Wastewater. *Agronomy*. 2022;12(2).
- (40) Leong YK, Chang JS. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology*. 2020;303.
- (41) Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2012;19(3):257–275.
- (42) Fernández FGA, Reis A, Wijffels RH, Barbosa M, Verdelho V, Llamas B. The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*. 2021;61:99–107.
- (43) Ruiz J, Olivieri G, De Vree J, Bosma R, Willems P, Reith JH, Eppink MHM, Kleinegris DMM, Wijffels RH, Barbosa MJ. Towards industrial products from microalgae. *Energy and Environmental Science*. 2016;9(10):3036–3043.
- (44) Qin S, Wang K, Gao F, Ge B, Cui H, Li W. Biotechnologies for bulk production of microalgal biomass: from mass cultivation to dried biomass acquisition. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2023;16(1).
- (45) Zhang S, Merino N, Okamoto A, Gedalanga P. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*. 2018;11(5):833–847.
- (46) Kapoore RV, Padmaperuma G, Maneein S, Vaidyanathan S. Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2022;42(1):46–72.
- (47) Qian X, Chen L, Sui Y, Chen C, Zhang W, Zhou J, Dong W, Jiang M, Xin F, Ochsenreither K. Biotechnological potential and applications of microbial consortia. *Biotechnology Advances*. 2020;40.
- (48) Ray A, Nayak M, Ghosh A. A review on co-culturing of microalgae: A greener strategy towards sustainable biofuels production. *Science of the Total Environment*. 2022;802.
- (49) López Chuken, J. “ESTUDIO DEL ACONDICIONAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE MICROALGAS NATIVAS PARA LA INDUCCIÓN DE FLOCULACIÓN, PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PULIMENTO DE EFLUENTES MUNICIPALES.” Universidad Autónoma de León [Internet]. 2017. [citado 24 Mar 2025]. Disponible desde: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/17658>

- (50) Wang SK, Yang KX, Zhu YR, Zhu XY, Nie DF, Jiao N, Angelidaki I. One-step co-cultivation and flocculation of microalgae with filamentous fungi to valorize starch wastewater into high-value biomass. *Bioresource Technology*. 2022;361.
- (51) Matho C, Schwarzenberger K, Eckert K, Keshavarzi B, Walther T, Steingroewer J, Krujatz F. Bio-compatible flotation of *Chlorella vulgaris*: Study of zeta potential and flotation efficiency. *Algal Research*. 2019;44.
- (52) Roselet F, Vandamme D, Muylaert K, Abreu PC. Harvesting of microalgae for biomass production. In: *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*. Springer Singapore; 2019. p. 211–243.
- (53) Chuang WY, Hsieh YC, Lee TT. The effects of fungal feed additives in animals: A review. *Animals*. 2020;10(5).
- (54) Toscano-Palomar L. Biofloculación de la microalga de agua dulce *Chlorella sorokiniana* asistida por hongos filamentosos. In: *CIERMMI Mujeres en la ciencia T.4. ECORFAN*; 2019. p. 16–38.
- (55) Zhu J, Wakisaka M, Omura T, Yang Z, Yin Y, Fang W. Advances in industrial harvesting techniques for edible microalgae: Recent insights into sustainable, efficient methods and future directions. *Journal of Cleaner Production*. 2024;436.
- (56) Pei XY, Ren HY, Liu BF. Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on harvesting of microalgal biomass. *Bioresource Technology*. 2021;321.
- (57) Matter IA, Hoang Bui VK, Jung M, Seo JY, Kim YE, Lee YC, Oh YK. Flocculation harvesting techniques for microalgae: A review. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2019;9(15).
- (58) Suresh Kumar K. *BIOFLOCCULATION: A POTENTIAL MEANS OF HARVESTING MICROALGAE*. 2020.
- (59) Mishra VK. Microbial Flocculants and Its Application in Wastewater Treatments: A Review *Journal of Water Pollution & Purification Research Microbial Flocculants and Its Application in Wastewater Treatments: A Review*. 2016. www.stmjournals.com
- (60) Leng L, Li W, Chen J, Leng S, Chen J, Wei L, Peng H, Li J, Zhou W, Huang H. Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*. 2021;330.
- (61) Implantación de un proceso de depuración de aguas residuales en dos fases mediante hongos filamentosos. *Revista Técnica de Medio Ambiente*. [Internet]. 2024. [citado 20 Ene 2025]. Disponible desde: <https://www.retema.es/articulos-reportajes/implantacion-de-un-proceso-de-depuracion-de-aguas-residuales-en-dos-fases>

- (62) Toscano L, Brown JK, Steichen SA. COSECHA DE MICROALGA CHLORELLA SOROKINIANA VIA CO-CULTIVO ASISTIDO POR HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES. 2019. <https://www.researchgate.net/publication/343111359>.
- (63) Sar T, Marchlewicz A, Harirchi S, Mantzouridou FT, Hosoglu MI, Akbas MY, Hellwig C, Taherzadeh MJ. Resource recovery and treatment of wastewaters using filamentous fungi. *Science of the Total Environment*. 2024;951.
- (64) De Gregorio, M. Energía de las algas. BIOPLAT. 2010 [citado 2025 Ene 20] Disponible desde: <https://bioplat.org/portfolio-items/energia-de-las-algas-presente-y-futuro-2010/>
- (65) Walker GM, White NA. Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi*. Wiley; 2017. p. 1–35.
- (66) Lloret Caulonga L. Proyecto MICROALGA-FEED: reducción de antibióticos en ganadería a través de hongos y microalgas. Plataforma Tierra. 2023.
- (67) Gafaro D. Microalgas: una fuente prometedora en la sostenibilidad. Corporación Tecnológica de Bogotá. 2023.
- (68) Rippka E, Deruelles J, Waterbury NB. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. 1979.
- (69) Algae Bank®. Basal De Bold M. [Internet]. México. [citado 2025 Ene 20] Disponible desde: <https://bioplat.org/portfolio-items/energia-de-las-algas-presente-y-futuro-2010/>
- (70) Imamoglu E, Dalay MC. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. 2007; 1(3).
- (71) Herrera-Andrade MH, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Núñez-Gastélum JA, Moreno-Ramos OH. Extracción de la astaxantina y su estabilidad. 2011.
- (72) Creative Proteomics. Protocol for Bradford Protein Assay. [Internet]. 2025. [citado 2025 Ene 20]. Disponible desde: <https://www.creative-proteomics.com/resource/protocol-for-bradford-protein-assay.htm>
- (73) Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1957;226(1):497–509.
- (74) Miller' NJ, Rice-Evans C, Davies2 M 1, Gopinathan' V, Milner' A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. 1993.
- (75) Spilling K, Seppälä J. Measurement of Fluorescence for Monitoring Algal Growth and Health. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1980. Humana Press Inc.; 2020. p. 41–45.

- (76) López Cervantes J, Sánchez Machado DI. HPLC METHOD AND MIXTURE FOR QUANTIFYING ASTAXANTHIN IN FERMENTED SHRIMP WASTE. 2012 May 3:1–21.
- (77) Xie Z, Pei H, Zhang L, Yang Z, Nie C, Hou Q, Yu Z. Accelerating lipid production in freshwater alga *Chlorella sorokiniana* SDEC-18 by seawater and ultrasound during the stationary phase. *Renewable Energy*. 2020;161:448–456.
- (78) López Legarda X, Arboleda Echavarría C, Segura Sanchez F. Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2015;17(2):44–54.
- (79) De A, Cortés-Sánchez J, Guadarrama LM, Díaz-Ramírez M, México DMF. BIOMASS PRODUCTION FROM *Aspergillus oryzae* IN SUBMERGED CULTURE. *Universidad de Sonora. Biotecnia*. 2014; 16(3): 11-16.
- (80) Walker GM, White NA. Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi*. Wiley; 2017. p. 1–35.
- (81) Abu-Elteen KH, Hamad M. Antifungal Agents for Use in Human Therapy. In: *Fungi*. Wiley; 2017. p. 299–332.
- (82) Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(16):6241–6246.
- (83) *Pleurotus ostreatus* TENN 53662 ITS region; from TYPE material. NCBI Reference Sequence. [Internet] [citado 2025 Ene 20]. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_163515.1
- (84) *Aspergillus oryzae* NRRL 447 ITS region; from TYPE material. NCBI Reference Sequence. [Internet] [citado 2025 Ene 20]. Disponible desde: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_135395.1
- (85) Jia X, Song J, Wu Y, Feng S, Sun Z, Hu Y, Yu M, Han R, Zeng B. Strategies for the Enhancement of Secondary Metabolite Production via Biosynthesis Gene Cluster Regulation in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fungi*. 2024;10(5).
- (86) Böcking J, Vitola C. Identificación y caracterización de basidiomicetos y su aplicación en procesos circulares. Universidad ORT Uruguay. Montevideo; 2022.
- (87) Nargesi S, Abastabar M, Valadan R, Mayahi S, Youn JH, Hedayati MT, Seyedmousavi S. Differentiation of *aspergillus flavus* from *aspergillus oryzae* targeting the *cyp51a* gene. *Pathogens*. 2021;10(10).

- (88) García, B. -Conde K. *Aspergillus oryzae*: An opportunity for agriculture. *Mexican Journal of Phytopathology*. 2023;42(1):1.
- (89) Jearim K, Ayala H. *REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS*. 2003.
- (90) Gultom SO, Zamalloa C, Hu B. Microalgae harvest through fungal pelletization - Co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Aspergillus niger*. *Energies*. 2014;7(7):4417–4429.
- (91) Chu R, Li S, Yin Z, Hu D, Zhang L, Xiang M, Zhu L. A fungal immobilization technique for efficient harvesting of oleaginous microalgae: Key parameter optimization, mechanism exploration and spent medium recycling. *Science of the Total Environment*. 2021;790.
- (92) Sekan AS, Myronycheva OS, Karlsson O, Gryganskyi AP, Blume Y. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. *PeerJ*. 2019;7.
- (93) Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto KI, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 2005;438(7071):1157–1161.
- (94) Anjos L, Estêvão J, Infante C, Mantecón L, Power DM. Extracting protein from microalgae (*Tetraselmis chuii*) for proteome analysis. *MethodsX*. 2022;9.
- (95) Civzele A, Mezule L. Fungal – assisted microalgae flocculation and simultaneous lignocellulolytic enzyme production in wastewater treatment systems. *Biotechnology Reports*. 2025;45.
- (96) Karimi S, Soofiani NM, Lundh T, Mahboubi A, Kiessling A, Taherzadeh MJ. Evaluation of filamentous fungal biomass cultivated on vinasse as an alternative nutrient source of fish feed: Protein, lipid, and mineral composition. *Fermentation*. 2019;5(4).
- (97) Waghmare AG, Salve MK, LeBlanc JG, Arya SS. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2016;3(1).
- (98) Sekan AS, Myronycheva OS, Karlsson O, Gryganskyi AP, Blume Y. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. *PeerJ*. 2019;7.
- (99) Sajjadi B, Chen WY, Raman AAA, Ibrahim S. Microalgae Lipid and Biomass for Biofuel Production: A Comprehensive Review on Lipid Enhancement Strategies and Their Effects on Fatty Acid Composition. 2018.
- (100) Escuredo R. Evaluación de la biomasa producida por la microalga *Haematococcus* sp. y la inducción a la carotenogénesis bajo diferentes condiciones de cultivo. Mexico; 2014.
- (101) Regina M, Segovia C. *UTILIZACIÓN DE MICROALGAS EN EL MANEJO SUSTENTABLE DE EFLUENTES DE TAMBO*. Universidad ORT Uruguay. Montevideo, Uruguay; 2024.

- (102) Ismail MM, El Zokm GM, Miranda Lopez JM. Nutritional, bioactive compounds content, and antioxidant activity of brown seaweeds from the Red Sea. *Frontiers in Nutrition*. 2023;10.
- (103) Oslan SNH, Shoparwe NF, Yusoff AH, Rahim AA, Chang CS, Tan JS, Oslan SN, Arumugam K, Ariff A Bin, Sulaiman AZ, et al. A review on haematococcus pluvialis bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*. 2021;11(2):1–15.
- (104) Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*. 2010;106(1–2):155–177.
- (105) Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3–4):199–204.
- (106) Pereira S, Otero A. *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*. 2020;51.
- (107) Li F, Cai M, Wu Y, Lian Q, Qian Z, Luo J, Zhang Y, Zhang N, Li C, Huang X. Effects of Nitrogen and Light Intensity on the Astaxanthin Accumulation in Motile Cells of *Haematococcus pluvialis*. *Frontiers in Marine Science*. 2022;9.
- (108) Teng Z, Zheng L, Yang Z, Li L, Zhang Q, Li L, Chen W, Wang G, Song L. Biomass production and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* in large-scale outdoor culture based on year-round survey: Influencing factors and physiological response. *Algal Research*. 2023;71.
- (109) Gu W, Li H, Zhao P, Yu R, Pan G, Gao S, Xie X, Huang A, He L, Wang G. Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies. *Scientific Reports*. 2014;4.
- (110) Ma G, Li L. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* in source-separated urine for biomass production and astaxanthin accumulation. *Algal Research*. 2023.
- (111) Olsina J, Durchan M, Minofar B, Polivka T, Mancal T. Absorption Spectra of Astaxanthin Aggregates. 2012 Aug 24.
- (112) Castro N, Reyes N. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. 2015 Dec 10.
- (113) Nozak3 H, Ito M, Sano R, Uchida H, Watanabe MM, Takahashi H, Kuroiwa T. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF YAMAGISHLELLA AND PLATYDORINA (VOLVOCEAE, CHLOROPHYTA) BASED ON *rbcl* GENE SEQUENCES. 1997.

(114) Nozaki H, Itoh M, Sano R, Uchida H, Watanabe MM, Kuroiwa T. PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS WITHIN THE COLONIAL VOLVOCALES (CHLOROPHYTA) INFERRED FROM rbcL GENE SEQUENCE DATA. 1995.

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial.

En la elaboración de este Trabajo Final de Carrera, se emplearon herramientas de inteligencia artificial (IA) Chat GPT para la síntesis y resumen de información científica, con el objetivo de optimizar la revisión de literatura y mejorar la claridad en la presentación de conceptos complejos. En todos los casos, el contenido generado fue cuidadosamente revisado, corregido y validado por los autores, garantizando su precisión, coherencia y adecuación a los estándares académicos.

Anexo

Tabla 1. Secuencias de primers ITS1 e ITS4 obtenidos de Macrogen Inc.

Primer	Secuencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Secuencia 1. FASTA obtenido a partir de la secuenciación Sanger para primers ITS1 e ITS4 sin tratar para *Aspergillus oryzae*.

>H250311-014_E05_AA_1_5_ITS1.ab1 1483

```
GGGCGTCGAGAGTAGGGGATCTAGCGAGACAACCTCCCACCCGTGTTA
CTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCT
CTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATC
TAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAAT
GGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACT
AGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
ATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCCCTCTCCGGGGGGGACG
GGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGC
TTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAA
TCTTTTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCATAAAAACGGGAAGAAAAAATTACGAGGGTGGGTCCTACCAGC
CCCACCCCTCGTTTTTTCTTTAAAAAAGTCCTGCGGGGGCCCTGTGGGG
GGCGGGAAACCCCCCCCCGCCCAACCCCAAAAACCCACAATTCTTTTGA
ATTGAGGGGGGGGGGGGAGTTTGGAGTGACAACCAAAAATTAATAATTTTA
AAAGGGTTTTTTTTTGGTCCGGCTGAAAAAAAAAAAAAGGGGAGGAGATG
GGATATGGATTTGGTGGTGTACTTAAAAAATTTACAAGAAAGGAGCGC
ATTCTTGTACGGCACCTTGGCCCCGCCAATACGCCGCGGGGGGAAGGAT
GTAGGAGACACCTTTCTCCCCTTCCCGGAAAGGGAGTAGAGAAGAACGA
CCCCCCCCCCCCGGGGGCAGAGGGAGGGATGGGAATGATTAGATCTCG
GCCCGCGCCGCCCTCGACCACTATGTGGGAGTTATTTGCTTTACTTTGT
```

TTTGCTATAGACGTGAGGAGAAAGGTAGGAGATGGTTGAGAGAAAAAAA
ATAAAAATAATGTAAGAAAGAGGGCAATATAAGAAAAAATGGGAGAGGA
AGTGTGTGAGTGTTCGTTGAAGTGTTCGACGGTTAGAAGGCGAGAAGCT
GTGAAAAGCGGAGAATGATGAGAAAAGATAATTGTGTACTACGGGGAGGG
GTGGGGTGGGAGGCGCGCGGGGGGTGAGCTGGTCGCGGAGGGGGGAAA
GAGAGGGACGCGATCAGACGCTGTGCGGGGGGGATTGATTGGGAGCATAG
TGGGCGACGGAGGGCTGGGTTGAGGGAGGGAGGAGTGTGACCGATGAGCT
TGGATGAACATGAAGATGGGCGAGTGGGATTGGGAGCGTACGGATCGTGC
ACGCAGAGCCGAAGAGGTGTCACAGGGGTCGTG

>H250311-014_G05_AA_1_5_ITS4.ab1 1513

AGGCGCGAACCTATCCTTCCTGATCCGAGGTCCACCTGGAAAAGATTGAT
TTTTCGTTCCGGCAAGCGCCGCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCC
CCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTGGGGCCCGT
CCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGG
CAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGT
TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATT
GTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGAT
CAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGC
CCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAA
ACACGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCC
TTCCGCATCCCCCCTTTCCGAAAGACCATTACCGAGGGGTAGGGGTTC
GGGGGGGCGACCTCCACCCGTGTTTACGGTACCTAAGTGGCTTCGGCG
GGCCCCCTTTCAGGGCCCCCGGGGGCTCTAAGCCCGGCCCCCGAAAACC
CAAAACACCTTTTAATCTTTGTAATATTGTGGAAGTCGGAGTGAATGGT
ATGGGAATTCAATATATTTTTTCCGGGGGGATTTGGGGCTCCCCGCC
CCAATAAAAAAGAGCCGCAATGGGGGTTAACCCGGGGGGGGGGGGGGGG
AAAAATTTGGGGGAAACGAGCGGTTTTTATTAAGAGCCGGGGCCC
CCCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCTTCTCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGTTCCTTTTTCGCCCCCCCCCCCCC

CCGGGGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCCCCACCCCCGCCCCCCCCCGCC
CCTTATTCCCCGCGTGGTGGGGGGGGGTCTTCTCCCTCCCCCCCCCA
TCTCACCCACCCCTCCCCCCCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAATAATTTT
TTCCTCTTTTTAACCTATTATCTCGGAAAAGAGGAAAAAAAAATCACCCC
TCTTTTTTTTTTTTCTCTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAGGAGAGAGAGAAAGTGGATGAGGAGCAGAGGAAGGGATAGGGT
GCGGTCTAGATGGATCTGGAGACAGGCAAAGGGGGGGGTGGGGGGATAGA
CCTGTGGCTCATGAGGATGATCGGTCTGGACGCCGTGTGTGGGGAATGGA
GGGGTGAGTGTGGAAGTACTCGGTGTGGGGGGCGAGTTTAGGGAGGTGC
TGGTGCACCTCATGTGAAAATAGAGCGGGGTGTTTTGGCTGGGGGCGTAG
ATGTGGTGGTAGA

Secuencia 2. FASTA obtenido a partir de la secuenciación Sanger para primers ITS1 e ITS4 sin tratar para *Pleurotus ostreatus*.

>H250311-014_I05_P_CC_ITS1.ab1 1506

GGGATGAGGAATCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCA
CGCCTTCCACTAGTCCTTTCCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGT
GAAGTCGTCTTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCT
CGGTGTGACAACACAGTCTATTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTA
CGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACATAATACAACCTTTCA
ACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CCTTGCGCCCCTTGGTATCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA
ATTCTCAAACCTCACTTTGGTTTTTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTG
GGGGCTGCTGGCCTTGACAGGTGCGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGAC
TTCTCACTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCAC
GCATGAATAGAGTCCAGCTCTCCAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAAT
TTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCTTGGG
GGAGGAAAAAAAAAAAAACATTAAGGGAATTCAAAAGGGATTTGTTGCTG
GCCTCTGGGGGCATGTGCACCTTCTAATCCTTTTACCACCTGTGAACTT
TTGAAAGAATTTTTGAAAGTCCCCCTTAGTTCTCGAACTTGGTTTGGCT
GGGAATTTAAACTTCGGGTTGGAACCCAGTCAATTTACTTAAAACCCC

CAAATGTATGTCTCCAAAGGTCATTTAAGGGGGCCTGGGGCCTATAAACC
ATAAAAACACTTTTAAACAACGAAATTTGGGCTTTGAACCCTTAAAAAAA
GCCCCAATTGCCATTAATTAGGGTGAAATTGGAAAAATTTGGTGAAACC
CCCAACCTTTTAAACCCCTGGCCCCCTGGTTTTTCCGGGGGGCGGCCCGG
TTTGAGGGGGCAAAAAAATTTCCCAACCCCTTGTGTTTTTTTTTTCCCT
TTTGAAATTTTTTTGAGAAATGTGTGGGGCGGGCCCCCGCCCCCTC
GCCCCGCCCCCCCCCTCCCCTAAAAACACCAAACAAAAGAGACCCCTCCT
CCCCCTCGCCGGCAAGAAAAAATTATAATTTTTTATTTTATCCACATAA
AAAAAAAAGAAGGGCGTCTCTCTCTTTTCCCCCGGGCAAAAATTTTTA
GATATTTATTCCCCCATTAAGTGTGGGAAAAACCACTCTAAATTAAT
TTTATTCTCTTTTTCTTTTTATAATGAATATAGACAAAAAAGAAAAAA
AAATAAACCGACGACTGCAGCGACGGCGATTGCCTATACGGGTTGTT
GTGCGCAGCGGAGAAGAAGGAAAAGAAATAAAAGGAAAAAGTATATGTA
TATAAA

>H250311-014_K05_P_CC_ITS4.ab1 1086

GGATTGAACAGGCAGTCTACCTGATTTGAGGTCAATTGTCAAATATGTCC
TTGCGGACGATTGGAGAGCTGGACTCTATTCATGCGTGCTATTGATGAGT
GATAATTATCACATCATGCGCAGAGGCAATGAGAAGTCCTGCTAATGCAT
TTAAGAGGAGCCGACCTGTCAAGGCCAGCAGCCCCAACAATCCAAACAT
CACAATTGGAAAAAAACCAAAGTGAGTTTGAGAATTTAATGACTCAAA
CAGGCATGCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTC
GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAATTATCGCATTTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTAT
GGTTTATAGGCACAAGGCCATTAAATGACATTCGTAGACATACATTTGG
GGTGTGTTAAGTAAATAGACTGTGTTGTACACCGAGACGTTTAAATCCC
AGCAAACCAAGTCTGACGACTTGAAAGACGACTTCACAGATCTATCAAAA
GTTACAGGTGGTTGAAAGACTAGTGAAGCGTGACATGCCCTAGAGGC
CAGCAACAACCTCCATAGTGAATTCATTAATGATCCTTCCGCAGGTTACC
CTACAGAAAATAGGATCAATAAAGAATCAGAGTGATTCTTGCGGCCCAGG
GTGATACACTCAGAGGAACCCCCCGCTAAGGGGATGAATGAGAGGGCCGT

GGGCGGAAGGTAGGCGAACTGGCTCGTTTCGGCCAACCGGTTTGAAAACC
AAAGTTCTTCCAAGTAATCTGGGCTGGCTTACCCGAGATTGCCGAGGGGG
GAAGGTAAAGGCCAGCAGGGGGGGGGGAAATGGACCCATTGGCGGCCCGT
CTCGGGCGCTTAGGTAGCAAAAAAGGGTTTCTCGTTGGGGGGGGGGGGGG
GGGGTCCCAAACGAGGAGAACCCGAAAGGTGTAAAAAAGAGGGGCC
CCCGCGAAAAATCCCTGGGGGACGTAAAGGGTGGGGAAAAAAGGGTA
AGGTCGCGGGGGGGGGAAGCGGTCCAGGGGCCGGTG

Tabla 2. Valores de OD₇₅₀ de ambos ensayos para los co-cultivos *Chlorella sorokiniana*- *Pleurotus ostreatus* y *Chlorella sorokiniana* – *Aspergillus oryzae*.

Ensayo 1	<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>
Día 1 (0 horas)	0.694	0.749	0.623	ND
Día 2 (24 horas)		0.107	0.002	
Día 4 (96 horas)	0.07			

Ensayo 2	<i>C. sorokiniana</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>P. ostreatus</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>	<i>C. sorokiniana</i> - <i>A. oryzae</i>
Día 1 (0 horas)	0.383	ND	ND	0.383	0.388	0.437
Día 2 (22 horas)	0.015			0	0	0

Tabla 3. Valores de OD₇₅₀ de ambos ensayos para los co-cultivos *Haematococcus pluvialis*- *Pleurotus ostreatus* y *Haematococcus pluvialis* – *Aspergillus oryzae*.

Ensayo 1	<i>H. pluvialis</i> – <i>P. ostreatus</i>	<i>H. pluvialis</i> - <i>A. oryzae</i>
Día 1 (0 horas)	0.268	0.283
Día 2 (28 horas)	0.128	0.035
Ensayo 2	<i>H. pluvialis</i> – <i>A. oryzae</i>	<i>H. pluvialis</i> - <i>A. oryzae</i>
Día 1 (0 horas)	0.31	0.295
Día 2 (18 horas)	0.059	0.045

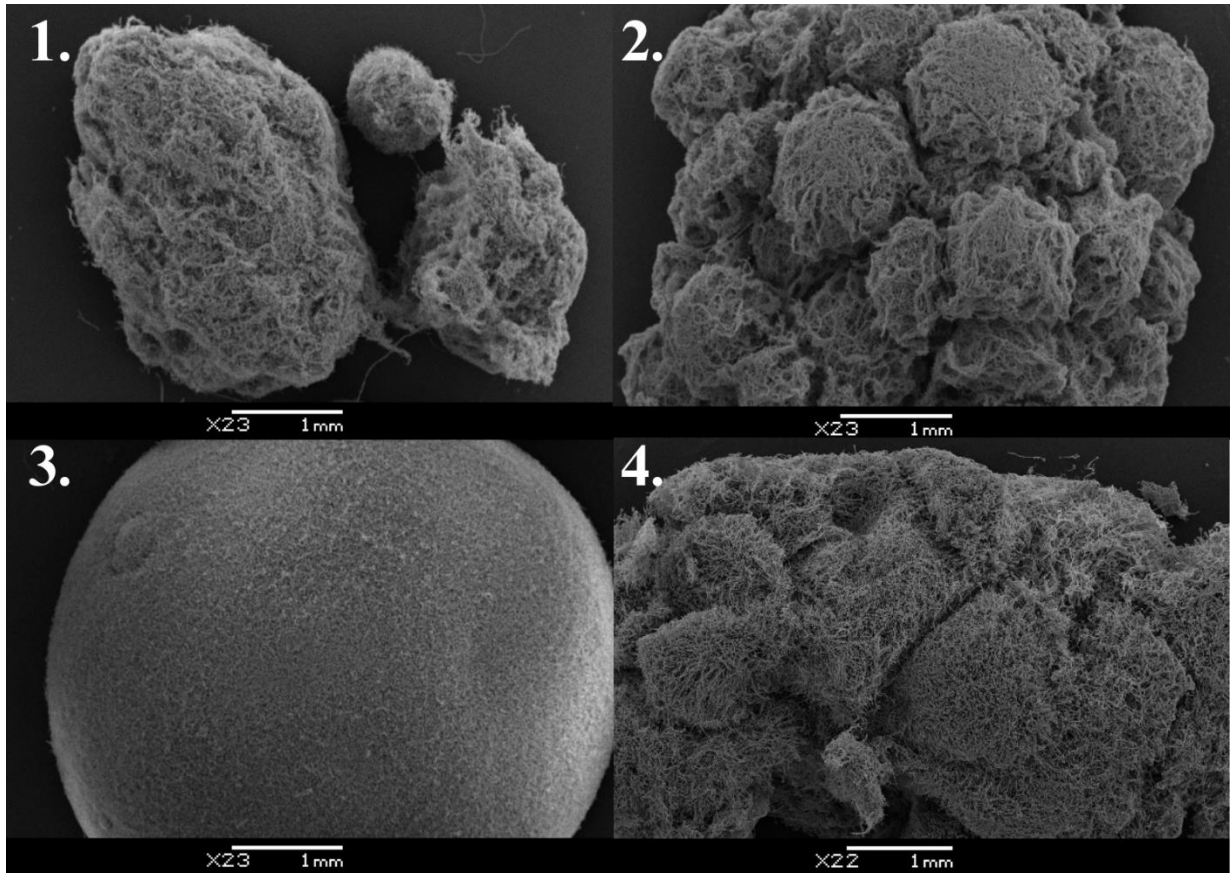


Figura 1. Imágenes de SEM para cada co-cultivo en aumento 23X. 1) *H. pluvialis*- *A. oryzae* 2) *C. sorokiniana*- *A. oryzae* 3) *H. pluvialis*- *P. ostreatus* 4) *C. sorokiniana*- *P. ostreatus*.

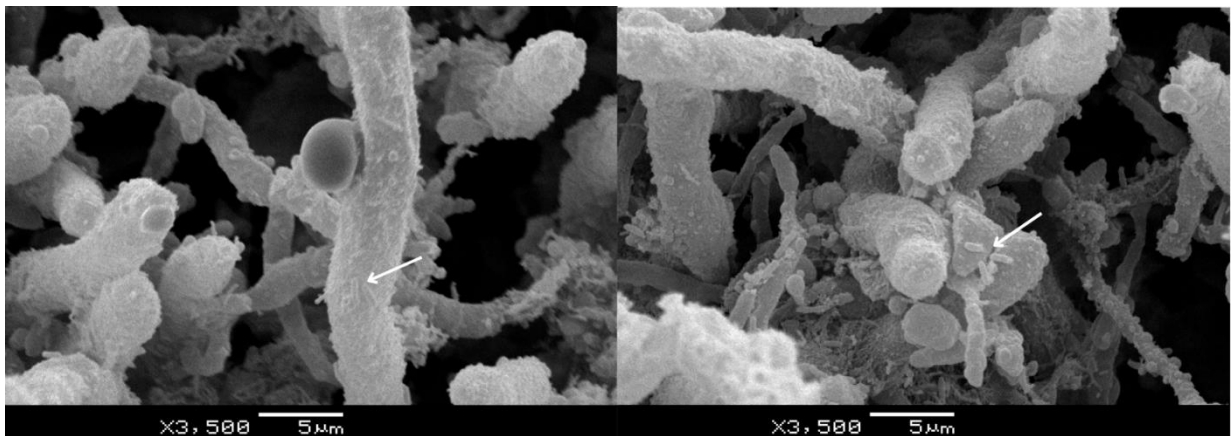


Figura 2. Imágenes de SEM para el co-cultivo *H. pluvialis*- *P. ostreatus* donde se visualizan contaminaciones bacterianas.

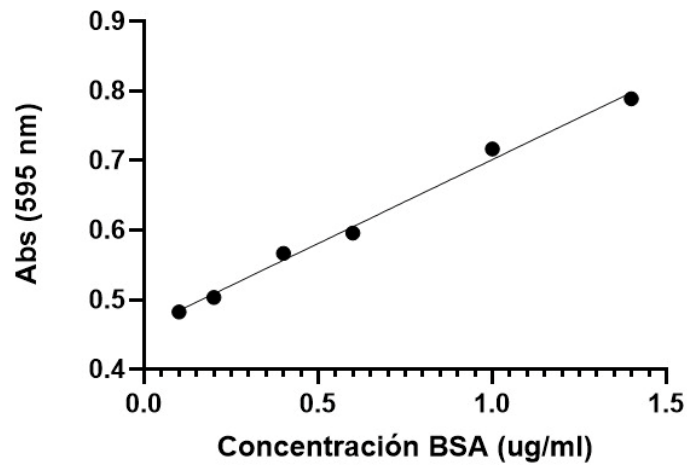


Figura 3. Curva de calibración correspondiente al ensayo de Bradford. Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación: $y=0,2409*x + 0,4602$, con una pendiente de 0,2409 y un R^2 de 0,9927.

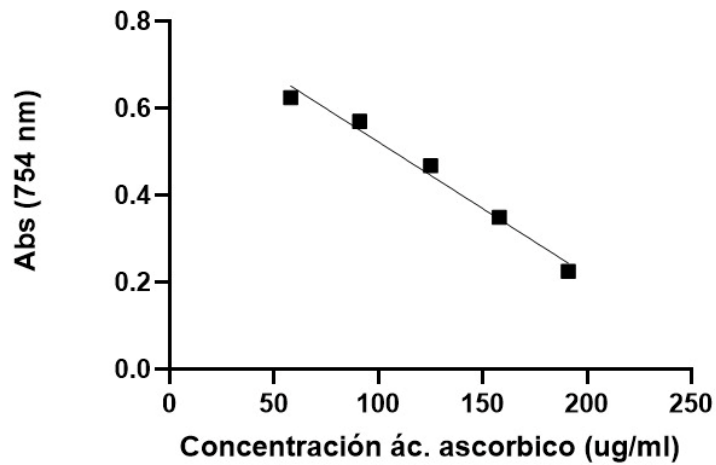


Figura 4. Curva de calibración correspondiente al ensayo de capacidad antioxidante. Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación: $y=-0,0031*x+0,8286$, con una pendiente de -0,0031 y un R^2 de 0,9816.

Tabla 4. Valores reportados para el ensayo de eficiencia fotosintética.

Cultivo	FO	FM	FV	EF
5 días BBM	8699	17160	8461	0,4939
13 días BBM	17324	39036	11708	0,5566
12 días RM	1157	2356	1199	0,5154

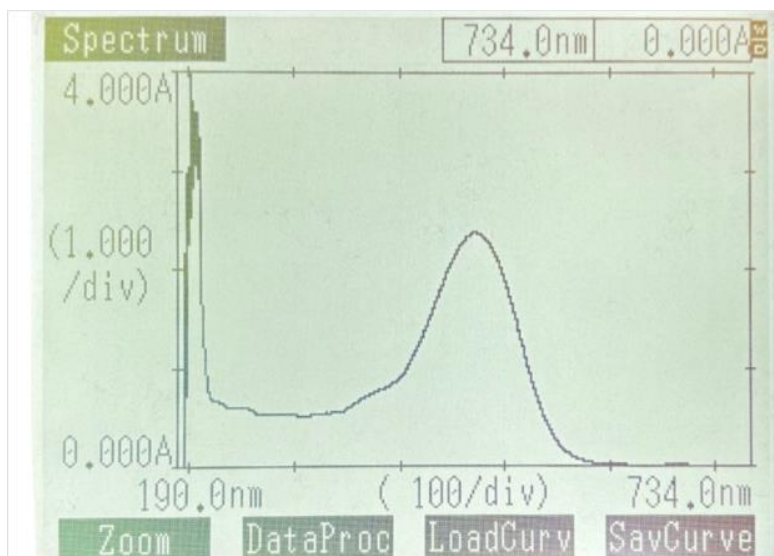


Figura 5. Espectro de barrido para el estándar de astaxantina a partir de una cápsula comercial.

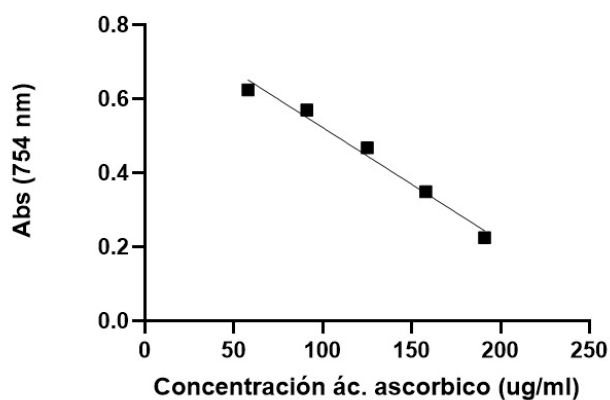


Figura 6. Representación gráfica de la Absorbancia a 470 nm en función de la concentración de astaxantina ($\mu\text{g/mL}$). Del gráfico se obtuvo la siguiente ecuación: $y=0,1568*x + 0,02705$, con una pendiente de 0,1568 y un R^2 de 0,9885.

Protocolo 1. Metodología tentativa para identificación molecular de *Haematococcus pluvialis*.

1. Identificación molecular

Para la realización de la identificación molecular de *H. pluvialis* se deberá utilizar *primers* específicos para el gen *rbcL*, el cual codifica la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), una enzima clave en la fijación de carbono en la fotosíntesis. La amplificación del fragmento esperado mediante PCR en tiempo final permite la confirmación de la presencia de *H. pluvialis*,

constituyendo un marcador molecular ampliamente utilizado para la identificación de especies de microalgas.

2. Aislamiento y extracción de ADN de *Haematococcus pluvialis*

El aislamiento y extracción de *Haematococcus pluvialis* se realiza a partir de un cultivo líquido con un volumen total de 250 mL. El cultivo se distribuye en tubos falcons de 50 mL y posteriormente se centrifuga a 5000 g durante 10 minutos, luego se descarta el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende en buffer de BashingBead™ para su posterior procesamiento.

La extracción de ADN se realiza utilizando el kit de extracción de Zymo Research (#D6007). La muestra obtenida de ADN se preserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en freezer.

3. Diseño de *primers* específicos

El diseño de *primers* específicos para *H. pluvialis* se realiza utilizando la base de datos NCBI GeneBank®. Para ello, se busca la secuencia correspondiente al gen *rbcL* de *H. pluvialis*, así como secuencias relacionadas, como *Chlamydomonas reinhardtii*. Una vez identificadas las secuencias de interés, estas se descargan en formato FASTA y se someten a un análisis BLAST en la plataforma NCBI BLAST, verificando que el porcentaje de identidad (*query cover*) sea del 100%.

Una vez confirmada la identidad de la secuencia, se procede a su análisis mediante el software Primer3Plus, el cual permite la identificación de los *primers* óptimos dentro de la secuencia seleccionada.

Finalmente, los *primers* diseñados son evaluados utilizando la herramienta Tm Calculator, con el objetivo de determinar su temperatura de fusión (*Tm*) y calcular la temperatura óptima de alineamiento, garantizando su uso para posterior amplificación por PCR.

4. PCR en tiempo final

Para la amplificación de la región de interés se recomienda los siguientes 3 juegos de *primers*. Uno de ellos recopilados por Nozaki et al. (1995, 1997) (113, 114) para la identificación de especies de microalgas y los dos juegos de *primers* restantes diseñados como se mencionó anteriormente.

Tabla 1. Secuencias correspondientes a los 3 juegos de *primers* utilizados para la identificación molecular.

Nombre <i>primer</i>	Rótulo	Secuencias nucleotídicas (5'-3')
P paper (F)	1	ATGGTTCCACAAACAGAAAC
P paper (R)		TGTGCTTTGTAAATAGCTTCAG
P <i>H. pluvialis</i> (F)	2	GCGGTGGTCTCGACTTTACA
P <i>H. pluvialis</i> (R)		ACACCTGGCATTGAACACCA
P <i>C. reinhardtii</i> (F)	3	TCCACAACCAGGTGTTCCAC
P <i>C. reinhardtii</i> (R)		GCCAACGCATGAATGGTTGT

Tabla 2. Reactivos de PCR.

Componentes	Volumen para 1 reacción (µL)
<i>Taq Buffer</i> (10X)	2.5
Mix dNTPs (2.5 mM)	2
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1
MgCl₂ (25 mM)	1
<i>Taq</i> polimerasa (U,µL-1)	0.125
ADN molde	0.5
H₂O mQ	Hasta 25

Tabla 3. Ciclado para la PCR en tiempo final.

Etapa	Tiempo (minutos: segundos)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	03:00	95
Desnaturalización (X 35)	00:30	94
<i>Annealing</i> (X 35) (Según juego de <i>primers</i>)	00:30	(1) 46
		(2) 50
		(3) 50
Extensión (X 35)	01:00	72
Extensión final	05:00	72
<i>Hold</i>	∞	4

5. Electroforesis en gel de agarosa

El producto de PCR se evalúa mediante un gel de agarosa al 1% con el fin de verificar el producto de amplificación. Se utiliza 5µL de marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM0331)* de Thermo Fisher Scientific. Para el revelado se utiliza *GoodView* como agente intercalante, luego se visualiza el gel de agarosa utilizando un transiluminador *Life Technologies E-gel® Imager*.

6. Secuenciación y análisis bioinformático

Las regiones amplificadas se envían a secuenciar, las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizan por medio de alineamientos locales utilizando el software MEGA, con el fin de obtener las secuencias consenso para cada primer. Luego, las secuencias tratadas se comparan con la base de datos del NCBI.