Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

CO-CULTIVOS DE MICROALGAS Y LEVADURAS PARA LA REVALORIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES HIDROPÓNICAS

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

Facundo Rocha – 230569

Tutores: Eliana Nervi & Mariana Umpiérrez

2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Facundo Rocha, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;

- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;

- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;

- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;

- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;

- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

X Facundo Rocha Calvette

Facundo Rocha

10 de agosto de 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras Eliana Nervi y Mariana Umpiérrez, por haberme guiado no solo durante la realización de esta tesis, sino también a lo largo de toda la carrera. Les agradezco por escucharme, aconsejarme y acompañarme, pero más que nada por confiar en mí para llevar a la práctica todas las ideas que se me fueron ocurriendo a lo largo del trabajo. Siempre las consideraré como docentes, tutoras, compañeras de trabajo, y sobre todo ejemplos a seguir.

Agradezco a la Universidad ORT Uruguay, sobre todo al Laboratorio de Biotecnología y todo su equipo, por brindarme el lugar, los recursos y herramientas para realizar el trabajo y desarrollarme personal y profesionalmente. Especialmente me gustaría agradecer a Mari, Feli, Flor, Ine, Sofi y Seba, por toda la ayuda y la buena onda cuando los necesitaba.

A Sebastián Figuerón e Igancio Ayres de Verdeagua por el apoyo en este proyecto y su apertura y disposición para hacerlo posible.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Mati y Clara, quienes comparten el mismo entusiasmo por las algas. También a Ro, por haberme acompañado y ayudado tanto a lo largo del proyecto, y a todos mis compañeros de generación con quienes compartí el estrés de hacer una tesis (hasta el punto de empezar a quedar pelado), pero también muchas risas en el laboratorio.

A mis familiares y amigos, que me motivaron a seguir a pesar de todo. En especial a mis padres, que sé están orgullosos del camino que seguí, y que me motivaron e hicieron posible que eligiera siempre lo que me apasiona. A Giu y Mathi por aceptar ser mis correctores personales gratis.

Por último, a mis alumnos, quienes me motivan en el día a día a hacer lo que me gusta.

RESUMEN

El empleo de la hidroponia como sistema productivo ha sido un factor clave en la producción de alimentos a nivel mundial. Este ha permitido aumentar los rendimientos de los cultivos, disminuir las pérdidas, y emplear los recursos de una manera más eficiente. Aun así, la principal problemática asociada a este sistema se da por la obtención y descarte de aguas residuales con contenidos elevados de macro y micronutrientes, entre los que destacan altas concentraciones de nitratos y fosfatos. La disposición inadecuada de este tipo de aguas enriquecidas ha generado un incremento en la preocupación medioambiental. Los co-cultivos entre microorganismos han sido de particular interés a la hora de biorremediar efluentes, aprovechando sus nutrientes y generando productos de valor agregado en el proceso. El presente trabajo tiene por objetivo el diseño y evaluación de co-cultivos entre microalgas y levaduras para la generación de productos de interés, utilizando como fuente de nutrientes aguas residuales hidropónicas y potencialmente otro tipo de desechos.

En primer lugar se llevó a cabo un *screening* de microalgas y levaduras oleaginosas capaces de crecer en el efluente. Se demostró que el efluente es un medio rico para el crecimiento de microalgas, logrando crecerse exitosamente seis aislamientos, siendo este el primer reporte de crecimiento en aguas residuales hidropónicas para tres de ellas: *Choricystis minor*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Spirulina platensis*. Se reporta la mayor cantidad de biomasa obtenida para *Chlorella spp*. en este tipo de efluente y en modalidad autotrófica, heterotrófica y mixotrófica hasta el momento. Estos valores fueron de 1.19, 1.76 y 1.66 $g.L^{-1}$ respectivamente. A su vez, se identificó una cepa de *Rhodotorula spp*. capaz de crecer en la solución en presencia de glucosa. A partir de estos dos organismos y una segunda microalga (*C. minor*), se diseñaron co-cultivos, identificándose sinergismos al crecer a cada microalga con la levadura en relación 1:1. Una vez escalados y crecidos en autotrofia, los posibles co-cultivos fueron evaluados en la producción de biomasa, lípidos y carotenoides, seleccionando al de mejores rendimientos para establecer sistemas heterotróficos y mixotróficos empleando glucosa como fuente de carbono.

El co-cultivo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. demostró aumentar la producción de biomasa respecto a los controles en todas las modalidades tróficas evaluadas, obteniéndose biomasas totales de 1.38, 2.67 y 2.08 $g.L^{-1}$ en autotrofia, heterotrofia y mixotrofia respectivamente. También se observó un aumento significativo en la producción lipídica al crecer ambas especies en modalidad autotrófica. Respecto a la producción de carotenoides, la misma se ve favorecida por el co-cultivo de C. *minor* y *Rhodotorula spp*.

Tanto los rendimientos de lípidos como de carotenoides fueron bajos comparados con valores de bibliografía para otros medios, probablemente por el exceso de nitrógeno y fósforo en el medio, concluyéndose que el mismo no es el ideal para la obtención de dichos metabolitos. Aun así, la biomasa obtenida podría tener potencial uso como biofertilizantes, así como suplementos y alimento animal. Como aspecto de la biorremediación en la cual se enfoca el proyecto, se logró una remoción del 84 % del fósforo total en el sistema autotrófico y un 98,20 % de los nitratos en el sistema heterotrófico.

Sería pertinente evaluar la producción de otros metabolitos, así como de realizar la puesta a punto de otros parámetros en el cultivo y escalado con el objetivo de optimizar aún más la generación de biomasa. El éxito de los sistemas heterotróficos y mixotróficos podría sentar las bases para ensayos empleando como fuente de carbono otros residuos asociados agroindustriales. Finalmente, se destaca este trabajo como el primero en emplear co-cultivos de microalgas y otros organismos para la revalorización y biorremediación de aguas residuales de producción hidropónica.

PALABRAS CLAVE

Aguas residuales, hidroponia, microalgas, co-cultivos, consorcios, *Rhodotorula*, *Chlorella*, *Choricystis minor*, revalorización, biomasa, lípidos, carotenoides, autotrofia, heterotrofia, mixotrofia.

ABREVIACIONES

ANOVA – Análisis de la varianza (del inglés: *Analysis of variance*)

As – Arsénico

B – Boro

Br – Bromo

C – Carbono

Ca – Calcio

CaCl2 - Cloruro de calcio

Cd – Cadmio

CE – Conductividad eléctrica

Cl – Cloro

CO_2 – Dióxido de carbono

CO_3^{-2} – Carbonato

Cr – Cromo

Cu – Cobre

DCMU - (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)

FBR – Fotobiorreactor

Fe – Hierro

g - gramo

GC – Cromatografía de gases (del inglés: *gas chromatography*)

H2O – Agua

Hg – Mercurio

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

K – Potasio

KH_2PO_4 – Fosfato diácido de potasio

L – Litro

Mg – Magnesio

mg – miligramo

$MgSO_4$ – Sulfato de magnesio

mL – mililitro

Mn – Manganeso

Mo – Molibdeno

mS – Milisiemens

N – Nitrógeno

NaCl – Cloruro de sodio

NO_3^- – Nitrato

O_2 – Oxígeno

OD – Densidad óptica

OH^- – Hidroxilo

Pb – Plomo

PDA – Papa-dextrosa-agar

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

PO_4^{-3} – Fosfato

PPFD – Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (del inglés: *photosynthetic photon flux density*)

ppm – partes por millón

rpm – revoluciones por minuto

S – Azufre

Sc – Escandio

SO_4^{--2} – Sulfato

TLC – Cromatografía en capa fina

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

Zn – Zinc

µg – Microgramo

µl – Microlitro

µm – Micromoles

$(NH_4)_2SO_4$ – Sulfato de amonio

(m/v) – masa/volumen

(v/v) – volumen/volumen

°C – Grado Celsius

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 11

1. Hidroponia como sistema productivo 11

2. Microalgas 13

2.1. Empleo en el tratamiento de efluentes 14

2.2. Producción de compuestos de interés 15

2.3. Modalidades de cultivo 16

3. Co-cultivos 20

3.1. Diseño y evaluación de consorcios 21

3.2. Asociaciones entre microalgas 22

3.3. Asociaciones con levaduras 23

OBJETIVOS 26

1. Objetivo general 26

2. Objetivos específicos 26

MATERIALES Y METODOLOGÍAS 27

1. Cepas y medios de cultivo 27

1.1. Cepas algales 27

1.2. Cepas de levaduras 27

1.3. Medios de cultivo 27

1.4. Agua residual hidropónica 28

2. Diseños experimentales 29

2.1. Selección de microalgas 29

2.2. Selección de levaduras 31

2.3. Crecimiento en co-cultivos 32

3. Métodos analíticos 36

3.1. Conteo celular 36

3.2. Medición de pH y CE 36
3.3. Determinación de biomasa producida (peso seco) 36
3.4. Extracción y cuantificación lipídica 37
3.5. Extracción y determinación de carotenoides totales 37
4. Análisis estadístico 38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39
1. Caracterización de agua residual hidropónica 39
2. Selección de microalgas 41
3. Selección de levaduras 46
4. Crecimiento en co-cultivos 49
4.1. Tipo de interacción y ratio óptimo 49
4.2. Cultivos autotróficos en fotobiorreactor 53
4.3. Sistemas mixotróficos y heterotróficos 59
4.4. Remoción de N y P 65
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO 68
1. Conclusiones 68
2. Perspectivas a futuro 69
REFERENCIAS 71
ANEXO 87

INTRODUCCIÓN

La revalorización y tratamiento de aguas residuales (tanto industriales como urbanas), mediante el empleo de microorganismos, ha sido un tema de especial importancia en los últimos años. La selección de especies capaces de adaptarse y crecer en dichos efluentes, así como de aprovechar sus nutrientes y generar productos de interés son un desafío para la biorremediación. A su vez, la baja rentabilidad de varios de estos bioprocesos termina por dejar a muchos en escala de laboratorio o fase piloto. Los co-cultivos han sido de particular interés a la hora de mejorar los rendimientos de diversos procesos, permitiendo sortear los obstáculos anteriormente planteados (1). El presente trabajo tiene por objetivo el diseño de co-cultivos microalga-microalga y microalga-levaduras para la generación de productos de interés, utilizando como fuente de nutrientes aguas residuales hidropónicas y potencialmente otro tipo de desechos.

1. Hidroponia como sistema productivo

Según la Organización de las Naciones Unidas, se espera que la población mundial supere los 9 billones de habitantes para el año 2050 (2). Este aumento poblacional deberá ser acompasado por un incremento del 70% en la producción de alimentos, lo que supondría un verdadero reto para las capacidades productivas de las distintas regiones del planeta. Sin embargo, no solo se espera un aumento en la población, sino también cambios en las preferencias por ciertos alimentos que mejoren la calidad de las dietas de las personas (3). Ambos factores mencionados requerirían que se duplique la superficie de tierras cultivables y pasturas, un escenario difícil considerando que actualmente casi el 50% de la superficie de la tierra ya es destinada a la agricultura. Por otro lado, la disponibilidad del suelo como recurso disminuye año a año debido principalmente a la urbanización, la erosión y desgaste causados por la agricultura intensiva, y a factores relacionados con el calentamiento global como lo es la desertificación. Además, muchas áreas con suelos pobres, o desprovistas de los mismos como las áreas urbanas, no son adecuadas para la agricultura convencional (4). Es en respuesta a dichas problemáticas que se propone a la hidroponia como sistema productivo.

La hidroponia, del griego *hydro* “agua” y *ponos* “trabajo”, es un conjunto de técnicas en las que se cultivan plantas en soluciones nutritivas sin la mediación del suelo orgánico-mineral. Esta solución nutritiva consta de un conjunto de sales capaces de aportar todos los nutrientes esenciales para el desarrollo óptimo de la planta. A su vez, dichos sistemas pueden utilizar variados medios que sirvan de soporte como grava, arena, perlita, musgo, espuma de polietileno y otros (5). Comparándolo con los sistemas convencionales de producción se lo considera altamente productivo, con un mayor rendimiento por unidad de área que el cultivo en tierra. Además, en este sistema se da un mejor aprovechamiento de los recursos como el agua y la energía, y se crecen las plantas en ambientes de cierta manera controlados, disminuyendo las pérdidas tanto por estrés biótico como abiótico (6–8).

Diversas especies vegetales se han adaptado al crecimiento en sistemas hidropónicos, teniendo que cumplir únicamente con ciertas características en lo que respecta al tamaño de las raíces y los frutos, ciclos de cosecha y hábitos de crecimiento. Se ha logrado producir exitosamente gramíneas, hortalizas, frutos, tubérculos, bulbos, legumbres, vegetales de inflorescencias y tallos, entre otros (9). Para cada cultivo se debe optimizar una solución nutritiva según los requerimientos nutricionales que presenten. En todos los casos se regula la concentración de cada nutriente esencial, siendo el balance entre estos y parámetros como la conductividad eléctrica, el pH de la solución, la oxigenación y el flujo de aplicación los que garantizan la calidad del producto (10,11).

Los sistemas hidropónicos son altamente versátiles y modificables, pudiendo adaptarse a las distintas necesidades del productor según los requerimientos productivos y las distintas variables ambientales. Es así que un mismo sistema puede no ser costo-efectivo en distintas circunstancias. Tradicionalmente se los clasifica, según el modo operativo, en abiertos y cerrados: en los primeros la solución nutritiva es directamente descartada luego de su paso por las raíces de las plantas, mientras que en los segundos la misma es recirculada hasta su eventual agotamiento (12). Una vez la solución es reemplazada, pasa a ser considerada como agua de descarte hidropónico.

El agua de descarte hidropónico, o aguas residuales hidropónicas, contienen altas concentraciones de macronutrientes (N, P, K, Ca, S, y Mg), y micronutrientes (B, Cl,

Mn, Fe, Zn, Cu y Mo), en forma de iones y sales, entre los que destacan altas concentraciones de nitratos (200–300 mg NO_3-N.L^{-1}), y fosfatos (30–100 mg PO_4-P.L^{-1}). A su vez, las mismas poseen bajas concentraciones de carbono orgánico (13–15). La disposición inadecuada de este tipo de aguas enriquecidas ha generado un incremento en la preocupación medioambiental, ya que las mismas propician la eutrofización de cursos de agua. En la actualidad la solución más común es la aplicación del agua residual directamente en campos y cultivares como fertilizante. Esto solo enmascara el problema, ya que los nutrientes terminan finalmente en cursos de agua debido al escurrimiento causado por las lluvias (16).

Se han empleado diversas tecnologías en el tratamiento de las aguas residuales hidropónicas, entre las que destacan ultra-filtración, ósmosis inversa, columnas de intercambio iónico, electrodiálisis y filtración por membrana, teniendo todas ellas altos costos operacionales y de mantenimiento. Como alternativa se ha planteado, exitosamente, el tratamiento por humedales mediante desnitrificación autótrofa y heterótrofa, así como mediante el empleo de plantas macrófitas y acuáticas flotantes (17). En todos los ejemplos mencionados los nutrientes removidos no son nuevamente aprovechados, sino que se pierden en los procesos de tratamiento. En el presente trabajo se emplean dichos nutrientes para la obtención de productos con valor agregado, revalorizando las aguas residuales hidropónicas.

2. Microalgas

Las microalgas son componentes primarios de muchos ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada, donde constituyen la base de las redes tróficas. Hasta el 2020 se registraban 72 mil especies de microalgas, divididas en 16 clases no relacionadas entre sí filogenéticamente, lo que hace que dichos grupos sean ya de por sí muy biodiversos, pudiendo estar compuestos de organismos tanto eucariotas como procariotas (18). A grandes rasgos, todas poseen en común la capacidad de realizar fotosíntesis y ser, en su mayoría, unicelulares o coloniales. Los principales grupos son las clorofitas o algas verdes (Chlorophyceae), las algas doradas (Chrysophyceae), diatomeas (Bacillariophyceae), y cianobacterias (Cyanophyceae). El incremento en el interés biotecnológico por las microalgas viene dado por su alta productividad, versatilidad de condiciones de crecimiento, composición celular y su capacidad de

biorremediar efluentes así como de producir compuestos bioactivos de alto valor agregado (19).

2.1. Empleo en el tratamiento de efluentes

Como fue mencionado anteriormente, el tratamiento de aguas residuales, y su apropiado descarte, ha resultado ser un verdadero desafío para las industrias y organismos gubernamentales. El tratamiento convencional de las mismas se compone de tres etapas que pueden variar según el tipo de residuo: tratamiento primario, secundario y terciario. En la primera etapa se realiza una remoción física de partículas de gran tamaño (por ejemplo por sedimentación), seguido por una segunda etapa de tratamiento biológico o químico para reducir la cantidad de nutrientes y materia orgánica en el efluente. Finalmente en el tratamiento terciario se mejora aún más la calidad del agua al remover trazas de elementos y materia orgánica (20).

El empleo de microalgas en el tratamiento de distintos efluentes ha sido de particular importancia en los últimos años, gracias a su capacidad de absorber nutrientes inorgánicos, compuestos de nitrógeno y fósforo, así como de degradar materia orgánica (21). Esto fue probado por primera vez en los Estados Unidos por Oswald & Gotaas en el año 1954, lográndose grandes avances desde entonces (22). Actualmente se han logrado tratar aguas residuales domiciliarias, residuos de la agricultura (en industrias lecheras y criaderos de animales como cerdos y pollos), y aguas de procesos industriales de frigoríficos, destilerías, plantas productoras de celulosa, curtiembres y textiles, entre otras (23–25).

El éxito del tratamiento de aguas residuales con microalgas también viene dado por la eliminación de organismos patogénicos en las mismas: coliformes y bacterias como *Salmonella* y *Shigella*, así como virus y protozoarios (26). Por último, es de particular interés la biorremediación de metales pesados, gracias a la capacidad de algunas microalgas de absorber y estabilizar Pb, Cd, Hg, Sc, As y Br (27).

Respecto a las aguas residuales hidropónicas, varios autores han reportado que el tratamiento de las mismas empleando microalgas ha sido exitoso, logrando remover hasta un 98% del fósforo así como un 99% del nitrógeno total. Las especies empleadas

han sido, principalmente, de los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Synechococcus*. Para ello se han realizado diversos ensayos de capacidad de crecimiento, así como el monitoreo de las concentraciones de nutrientes durante y después del proceso. El principal sistema empleado ha sido el cultivo en fotobiorreactores (FBR), o a escala de matraces (28–31).

2.2. Producción de compuestos de interés

Las microalgas juegan un rol fundamental no solo en la biorremediación de efluentes, sino también en la revalorización de los mismos. La biomasa algal obtenida luego del tratamiento de aguas residuales puede ser utilizada para la obtención de productos de alto valor agregado. Dichos productos se pueden clasificar en materias primas para biocombustibles, alimento para animales, biofertilizantes y compuestos bioactivos como proteínas, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos. La producción de los mismos se ve limitada por el costo de los procesos *downstream*, asociados a la cosecha de la biomasa y la extracción y purificación de los productos (32).

Algunas microalgas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de producir hidrógeno gaseoso (considerado un excelente combustible), o empleadas en la fermentación y digestión anaerobia de azúcares para la obtención de etanol y biogás respectivamente. Sin embargo, la producción de biocombustibles se da, principalmente, a partir de los lípidos contenidos en las células de las microalgas. Procesos como la transesterificación de ácidos grasos dan lugar a productos como el biodiesel, excelente alternativa a los combustibles fósiles. Los lípidos acumulados por las distintas especies de microalgas también son potenciales fuentes de nutrientes para ganado e incluso alimentación humana, así como posibles biofertilizantes (33). Microalgas como *Chlorella spp*., *Chlamydomonas spp.*, *Choricystis spp*. y *Schizochytrium spp*. pueden acumular hasta un 60-70 % de su peso en lípidos, siendo de gran importancia en la industria de los biocombustibles (34).

Si bien otros microorganismos, incluidos diversos géneros de bacterias, son capaces de acumular un alto porcentaje de su peso seco en forma de lípidos, los mismos son en su mayoría fosfolípidos. Los hongos también son acumuladores intracelulares de lípidos por naturaleza, sin embargo lo hacen generalmente en forma de ácidos grasos

específicos como el ácido linoleico. En el caso de las microalgas estos lípidos se encuentran, principalmente, en forma de triglicéridos. Estos son la principal materia prima en procesos de obtención de biodiesel, o importantes en cuanto a su contenido nutricional. Los ácidos grasos que conforman estos lípidos pueden clasificarse por sus dobles enlaces a lo largo de la cadena carbonada en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (35). En cada caso es necesario caracterizar los mismos por técnicas cromatográficas tales como la TLC, HPLC y GC (36).

Géneros como *Chlorella*, *Spirulina* y *Schizochytrium* destacan también por su potencial como fuente de alimento humano o para ganado, debido a su alto contenido en proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas. Además, muchas de ellas, y otras como *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis* son empleadas en la obtención de pigmentos como las clorofilas, los carotenos (en particular el β-caroteno), y las xantofilas (como la astraxantina) (37,38). Estos pigmentos pueden ser utilizados principalmente en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, tanto como colorantes, así como por sus propiedades como compuestos bioactivos. En el caso de las clorofilas las mismas sirven también como de conservantes naturales, mientras que los carotenoides y xantofilas pueden además actuar como antioxidantes, fotoprotectores, agentes antimicrobianos, prevenir enfermedades coronarias o tumorales y ser precursores de vitaminas (39).

2.3. Modalidades de cultivo

Si bien las microalgas son usualmente consideradas como microorganismos autótrofos, es posible cultivarlas bajo diversas modalidades de nutrición: autotrófica, mixotrófica, heterotrófica y fotoheterotrófica (Figura 1). Esta clasificación hace referencia a las fuentes de energía y carbono utilizadas por la microalga, pudiendo cambiar a lo largo de su crecimiento según la disponibilidad de luz o fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas (40).

Existen múltiples vías metabólicas asociadas a cada modalidad de nutrición, que pueden interrumpirse o activarse como estrategia de supervivencia a corto y largo plazo. Para ciertas microalgas es posible emplear más de una vía al mismo tiempo. Como resultado,

existe la posibilidad de obtener diferentes productos de interés bajo distintos regímenes nutricionales, así como optimizar parámetros para la biorremediación ambiental (41,42).

La producción de microalgas bajo modalidad autotrófica o fotoautotrófica se basa en su capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, mediante la cual emplean la energía lumínica para fijar CO_2 atmosférico y así producir compuestos orgánicos como los azúcares (43). En dichos sistemas solo es necesario aportar nutrientes inorgánicos en forma de sales, CO_2 por aireación, y una fuente de luz (artificial o natural), reduciendo los costos operacionales del proceso. Si bien la modalidad de producción autotrófica es la más común y más antigua a nivel industrial, también es la menos eficiente en cuanto a rendimientos obtenidos. Factores como la fotoinhibición, el sombreado de una célula a otra, y las posibles contaminaciones pueden llevar a la obtención de bajas cantidades de biomasa y células de pequeño tamaño (44).

Como modalidad de producción para el cultivo autotrófico se puede optar, principalmente, por dos sistemas: abiertos, como tanques y *open ponds*, y cerrados, como los FBR. Los sistemas abiertos constan de piscinas o tanques al aire libre que son llenados de una solución nutritiva (de fuentes naturales o artificiales), en los cuales la amplia superficie de intercambio gaseoso con el aire proporciona el CO_2 atmosférico necesario para el desarrollo del cultivo. Aun así, dichos sistemas son usualmente agitados para una distribución homogénea de los nutrientes y microorganismos, y una mejora en la aireación. Como ventaja, dichos sistemas son fáciles de manipular y presentan bajos costos operativos, mientras que son desventajosos al generar bajas cantidades de biomasa por la imposibilidad de controlar los parámetros ambientales a los que se expone el cultivo. A su vez, las contaminaciones con otras microalgas, bacterias o microorganismos patógenos son frecuentes. Por otro lado, en los sistemas cerrados es posible controlar parámetros como la temperatura, la intensidad lumínica y la aireación con mayor facilidad, repercutiendo en una mayor biomasa obtenida así como en un costo operativo más elevado que el de los sistemas abiertos (45–48).

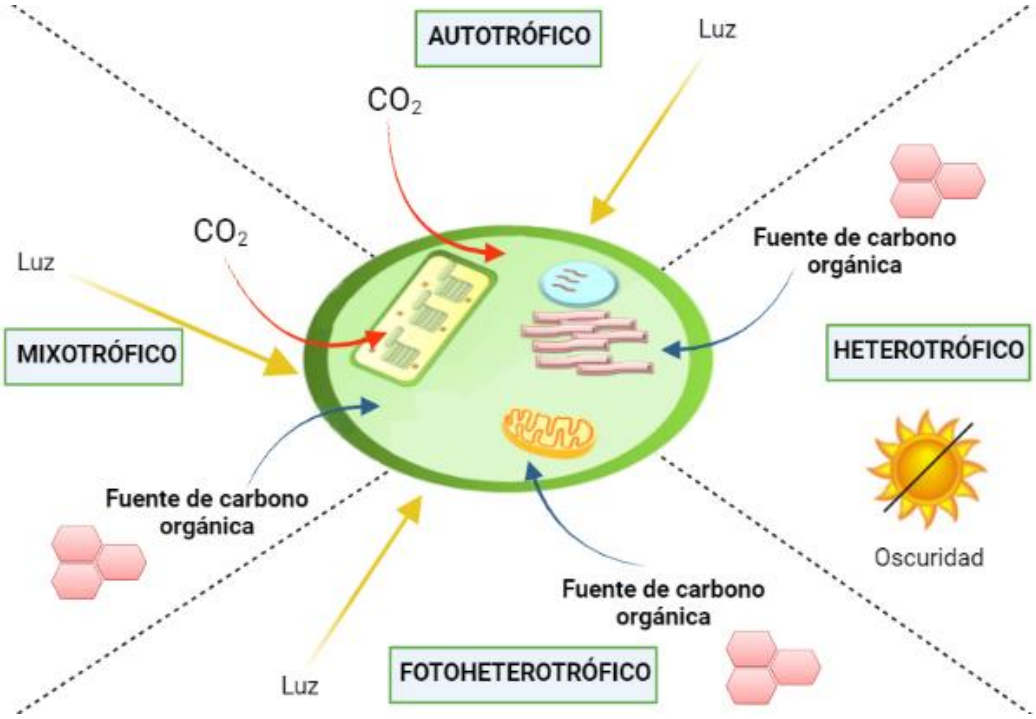

Figura 1. Representación esquemática de los distintos sistemas de nutrición para el cultivo de microalgas y sus requerimientos.

Alternativamente, para ciertas especies de microalgas es posible establecer sistemas heterotróficos. En los mismos no se proporciona CO_2 ambiental ni luz al cultivo, reemplazándoselos por una fuente de carbono orgánica capaz de ser asimilada por la microalga, que sirve como sustrato para procesos como la respiración celular y la generación de biomasa. Sustratos como la glucosa, el glicerol y el acetato son ideales para el rápido desarrollo celular, propiciando la acumulación de metabolitos de reserva como almidón, proteínas, lípidos y vitaminas, así como de diversos pigmentos. También se han utilizado, exitosamente, otros compuestos orgánicos simples como citrato, fumarato, lactato y succinato. Sin embargo, el mayor potencial de dicha modalidad de nutrición se da en la revalorización de residuos con altas cantidades de carbono orgánico total: aguas residuales y residuos domésticos, y desechos de la industria cervecera, entre otras. Por último, la ausencia de luz es esencial para el éxito del cultivo, ya que la misma inhibe parcialmente la síntesis de transportadores de los distintos sustratos del medio al citosol (49–51).

Los sistemas heterotróficos facilitan la obtención de mayores cantidades de biomasa que los sistemas autotróficos en un menor tiempo, reduciendo el tiempo de escalado para un biorreactor convencional de 1000 L de 35 a menos de 5 días (52). Otras ventajas son la posibilidad de utilizar cualquier tipo de biorreactor y el aumento en la biomasa seca por litro. Esta modalidad de nutrición es preferida para la síntesis de lípidos, estando favorecida por la conversión de los sustratos orgánicos a malonyl-CoA, metabolito que ingresa directamente a la ruta de síntesis de ácidos grasos. Entre las desventajas del cultivo heterotrófico de microalgas destacan: los altos costos operativos de los biorreactores, el limitado número de especies capaces de crecer en dichos sistemas, la facilidad de que los cultivos se contaminen, la inhibición del crecimiento por exceso de sustrato, y la imposibilidad de generar metabolitos inducidos por la presencia de luz (51,53).

Como alternativa a la baja productividad de biomasa obtenida en los cultivos autotróficos, y a los altos costos operativos de los cultivos heterotróficos, entre otras desventajas, se han establecido sistemas mixotróficos. Este tipo de sistemas es aplicado a microalgas capaces de fluctuar entre ambas modalidades de nutrición, pudiendo realizar fotosíntesis oxigénica, aprovechando CO_2 como fuente de carbono, a la vez que emplean sustratos orgánicos en la respiración celular. En los sistemas mixotróficos ambos procesos coexisten, siendo la biomasa resultante una sumatoria de los productos de los mismos (54,55).

En los sistemas heterotróficos se generan altas cantidades de CO_2, mientras que en los sistemas autotróficos se genera oxígeno, el cual puede inducir estrés oxidativo en las células. En los sistemas mixotróficos ambos productos se ven disminuidos. Otras ventajas que presenta dicha modalidad son: disminución de los requerimientos lumínicos, resultando en menores costos operativos, disminución de la fotoinhibición en las microalgas, reducción en las pérdidas de biomasa durante horas de oscuridad o por sombreo entre las propias células (compensadas por la respiración aerobia), y la posibilidad de variar entre una modalidad de nutrición y otra según diferentes parámetros ambientales. Además, se ha logrado aplicar cultivos mixotróficos para la remoción de nutrientes (C, N, P, K), y metales pesados (Cu, Zn, Cd, Cr, entre otros). La principal limitación de estos sistemas sigue siendo la facilidad de contaminarse con

organismos que inhiben el crecimiento de las microalgas por competencia directa, además de necesitar el aporte de luz, CO_2, O_2, y una fuente de carbono orgánica al mismo tiempo, y una menor eficiencia en la conversión de energía comparado a los sistemas heterotróficos (56–58).

Por último, es posible cultivar microalgas en sistemas fotoheterotróficos. Similares a los sistemas mixotróficos, en esta modalidad las microalgas requieren un aporte tanto de luz como de una fuente de carbono orgánico, pero no así de CO_2. Esto se debe a que la energía es obtenida únicamente por la fase lumínica de la fotosíntesis (específicamente gracias a la fosforilación cíclica del fotosistema I), sin darse la fijación biológica de carbono, mientras que los compuestos orgánicos son empleados exclusivamente en la síntesis de otras biomoléculas, y no en la respiración celular. Para la obtención de dichos sistemas es común el agregado de inhibidores de la fotosíntesis como el DCMU (59). Al igual que el cultivo mixotrófico, este sistema propicia la acumulación de lípidos y otros metabolitos de reserva, pero ha sido el menos estudiado hasta el momento (60).

En el presente trabajo se intentan establecer cultivos autotróficos, heterotróficos y mixotróficos para la revalorización de aguas residuales hidropónicas, y potencialmente otros residuos, mediante la producción de metabolitos con valor agregado como los lípidos y los carotenoides.

3. Co-cultivos

Los consorcios son conjuntos de microorganismos que crecen en un mismo ambiente y que interaccionan entre sí de diversas maneras, dando lugar a verdaderas comunidades. En la naturaleza se los puede encontrar en hábitats como el suelo y los ecosistemas acuáticos, o en alimentos, rizósferas de plantas e intestinos de animales. Pudiendo llegar a ser ampliamente biodiversos, estas asociaciones se caracterizan por la comunicación de los individuos que las componen, estando mediadas por metabolitos primarios y secundarios, e interacciones superficiales de proteínas y polisacáridos. Dichas señalizaciones moleculares dan lugar a relaciones inter e intra-específicas, como la simbiosis. A su vez, permiten a los distintos integrantes censarse entre sí, para establecer, por ejemplo, relaciones de protección, división de tareas, y otros tipos de mutualismos, que les permiten satisfacer sus necesidades de una manera más eficiente.

Sin embargo, las comunidades también son dinámicas, y dan lugar a la integración de nuevos miembros o a la evolución de los miembros existentes, según sea necesario (61,62).

En los últimos años los científicos se han centrado en explotar las comunidades naturales de microorganismos para mejorar el rendimiento de ciertos procesos, dejando de lado el tradicional modelo de monocultivos axénicos, y dando lugar a los co-cultivos. Estos se componen de al menos dos especies de microorganismos, y se ha visto que no solo aumentan los rendimientos productivos de ciertos metabolitos, sino que disminuyen las probabilidades de contaminación del proceso, al ser auto-regulables (63). Un caso de especial interés son los co-cultivos entre especies de microalgas, o de microalgas con otros microorganismos como bacterias, hongos filamentosos y levaduras.

3.1. Diseño y evaluación de consorcios

A la hora de establecer un co-cultivo es necesario partir de información base en ecología, transcriptómica, metabolómica y metagenómica. Estos datos ayudan a modular una red de posibles interacciones potenciales entre microorganismos para un bioproceso en particular. Sin embargo, la obtención de dicha información no es siempre fácil, ya que muchos consorcios de microorganismos suelen funcionar bajo un modelo de “caja negra”, donde la señalización molecular, poco comprendida, activa conjuntos de genes entre las distintas especies. Aun así, referencias bibliográficas y simulaciones pueden llegar a dilucidar los posibles candidatos para el co-cultivo. Dichos candidatos y sus interacciones deben ser evaluados para seleccionar los microorganismos con mejores rendimientos y dar paso a una optimización y escalado del sistema (63).

La selección de los candidatos parte de un microorganismo primario, que dicta la naturaleza de los demás. A su vez, este está determinado por el medio o residuo a utilizar como fuente nutritiva, así como los sistemas a emplear. El segundo candidato debe, idealmente, potenciar al primero en sus funciones. Según Padmaperuma et al. (2018) (61), este debe cumplir con ciertos requisitos para asegurar el éxito del co-cultivo: (a) no ser tóxico, (b) ser capaz de crecer en el mismo medio, (c) y con una tasa de crecimiento similar; (d) actuar como promotor del crecimiento, (e) proveer nutrientes

y (f) promover la capacidad del candidato primario para utilizar el residuo como nutriente, (g) así como utilizar los desechos del mismo como fuente de nutrientes, (h) poseer estabilidad genética, y (i) funcionar como bioproductor.

Una vez determinados los microorganismos componentes del co-cultivo, se deben establecer el momento y ratio óptimos para la inoculación de los mismos. La densidad celular de los inóculos iniciales de ambas partes, así como la fase en la que se encuentren, son un determinante mayor para el comportamiento del sistema. En el caso de co-cultivos entre microalgas y levaduras la gran mayoría de ensayos se han realizado empleando una relación 1:1 (40). También se ha visto, por ejemplo, que una relación celular 2:1 o 3:1 a la hora de inocular puede resultar en un mayor rendimiento en la producción de lípidos. Esto último fue evaluado para co-cultivos entre dos especies de *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. pyrenoidosa*), y dos especies de levaduras (*Rhodotorula glutinis* y *Candida tropicalis*) (64). Sin embargo, en otros casos el ratio óptimo entre *Chlorella vulgaris* y *Rhodotorula glutinis* fue de 1:1, en un medio de distinta composición y empleando un sistema de biorreactor (65).

Relaciones 3:1 han sido exitosas en co-cultivos entre *Scenedesmus obliquus* y *Candida tropicalis*, así como entre *Chromochloris zofingiensis* y *Xanthophyllomyces dendrorhous*, y *Chlorella vulgaris* y *Yarrowia lipolytica*, mientras que una relación 2:1 ha probado ser más efectiva en el caso de *Chlorella spp*. y *S. cerevisiae*, y *Spirulina platensis* y *R. glutinis*. Los casos en que la levadura se encuentra en una mayor proporción respecto a la microalga no son los más comunes, debido a que tampoco son los más efectivos (66–70). Respecto a los co-cultivos entre especies de microalgas, predominan los ensayos en que se parte de una relación 1:1. En todos los casos se debe considerar que el ratio óptimo dependerá de la naturaleza de los microorganismos, el sistema y la modalidad de nutrición elegida.

3.2. Asociaciones entre microalgas

Los co-cultivos entre especies de microalgas resultan una alternativa atractiva a los monocultivos algales. Esta estrategia ha demostrado, en algunos casos, lograr aumentar los rendimientos en biomasa y lípidos de los cultivos, sobre todo bajo condiciones de

autotrofia (71). La base ecológica de estos co-cultivos se basa en el concepto de que distintas microalgas pueden ocupar distintos nichos. La comunicación entre las mismas (por ejemplo por interacción de metabolitos liberados al medio o exopolisacáridos), lleva no solo a una mayor cantidad de biomasa y lípidos totales, sino al cambio en la composición de los mismos gracias a la activación de rutas metabólicas relacionadas a su biosíntesis (72). Algunas ventajas de estos sistemas son, por ejemplo, la rápida adaptabilidad de las especies al crecer en hábitats similares; un ratio de crecimiento similar, y finalmente una biomasa más homogénea que al co-cultivar microalgas con otros microorganismos como hongos, levaduras o bacterias (73).

Al crecer más de una cepa algal en el mismo medio, se debe tener en cuenta que las mismas competirán, probablemente, por los mismos recursos. Es por esto que se debe analizar la concentración del inóculo inicial de cada especie, así como la disponibilidad de cada nutriente, para evitar el agotamiento temprano de los mismos. Esto también puede ser una ventaja, por ejemplo respecto a la competencia por el nitrógeno del medio, nutriente cuya deficiencia conlleva a un aumento en la acumulación intracelular de lípidos, por el incremento de acetil-CoA (precursor en la síntesis de ácidos grasos), y por la estimulación en la remodelación de las membranas celulares. Dicho fenómeno se puede desencadenar también por la comunicación por metabolitos secundarios entre las especies (74).

La producción de exopolisacáridos por parte de las microalgas es otro factor a tener en cuenta a la hora de establecer co-cultivos, ya que los mismos son sintetizados en condiciones de estrés, y pueden llevar a una disminución en la transferencia de nutrientes hacia el interior celular. Esto ha puesto en duda la rentabilidad de los procesos a escala industrial. Así mismo, el diseño de dichos co-cultivos es difícil desde el punto de vista hidrodinámico (75).

3.3. Asociaciones con levaduras

Como mencionado anteriormente, otros microorganismos como bacterias y hongos filamentosos pueden ser empleados en co-cultivos con microalgas, sin embargo el interés en los mismos es bajo en cuanto a la producción de lípidos y pigmentos. Por otro lado, las levaduras han demostrado ser excelentes acumuladoras intracelulares de

lípidos neutros, como los triglicéridos, entre un 20 – 70 % de su peso seco (81). Esto, sumado a la presencia de sinergismos entre levaduras y microalgas, hace de las mismas una contraparte ideal al establecer co-cultivos.

Las interacciones entre microalgas y levaduras en un co-cultivo se basan en la liberación de metabolitos benéficos al medio de cultivo (figura 2). La capacidad fotosintética de las microalgas les permite liberar O_2 gaseoso, compuesto empleado por las levaduras en la respiración celular. Las mismas también sintetizan azúcares más o menos complejos que son aprovechables por la levadura. Estas a su vez generan CO_2 (producto de la respiración), que es empelado por las microalgas en la fase oscura de la fotosíntesis, así como ácidos orgánicos que pueden llegar a actuar como promotores del crecimiento (69).

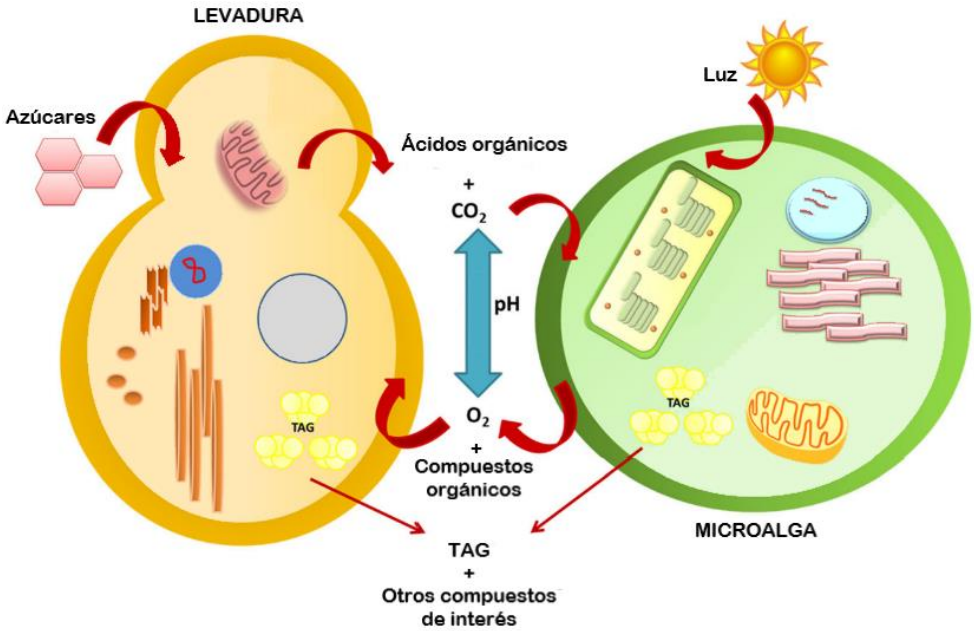

Figura 2. Representación esquemática de la producción e intercambio de compuestos en un co-cultivo de microalgas y levaduras. Extraído y adaptado de Arora et al. (2019) (35).

Las microalgas poseen la capacidad de basificar el medio en el que crecen, mediante la liberación de OH^-, al convertir CO_2 en CO_3^-, y posteriormente consumirlo. Este fenómeno es antagónico a la acidificación del medio por parte de las levaduras, que liberan ácidos orgánicos, llevando a un equilibrio del pH del medio. Es así que el co-

cultivo de microalgas y levaduras ha probado ser una buena manera de aumentar los rendimientos en la producción de biomasa total, lípidos y otros compuestos de interés a partir de sustratos de bajo costo como las aguas residuales (40).

El género *Chlorella* ha sido el más empleado en co-cultivos con levaduras, así como *Scenedesmus*. En cuanto a las levaduras, se busca que sean oleaginosas (acumulando un 60% o más de lípidos en base seca), por lo que resaltan géneros como *Candida* y *Rhodotorula*. La elección de la especie, así como de cepas particulares, afecta directamente la producción lipídica. Según Arora *et al.* (2019), ambos microorganismos deben tener un ratio de crecimiento rápido, un alto contenido lipídico, células de gran tamaño y deben poder crecer en condiciones ambientales extremas o en presencia de contaminantes. A su vez, parámetros del medio (relación C/N, presencia de otros macro y micronutrientes, fuentes de carbono y pH), y ambientales (intensidad lumínica, temperatura y agitación), son claves a la hora de optimizar los procesos (35).

La modalidad de nutrición empleada también ha demostrado ser un factor crucial en la generación de biomasa y metabolitos de interés. Si bien la gran mayoría de ensayos se han realizado en heterotrofia o mixotrofia, buscando revalorizar efluentes con altas cargas de materia orgánica, se han obtenido buenos resultados en autotrofia. A modo de ejemplo, en Zhang et al. (2017), se obtuvieron valores de biomasa total seis veces más altos en un co-cultivo de *Chlorella vulgaris* con *Rhodotorula glutinis* al compararlo con el monocultivo de la primera. Resultados similares se obtuvieron para la producción lipídica (76). En otro estudio se creció a *Scenedesmus obliquus* en conjunto con *Candida tropicalis* en medio BG11, demostrando que una vez más el co-cultivo aumenta los rendimientos tanto en biomasa como en productividad lipídica (77).

Hasta el momento no se han establecido co-cultivos de microalgas u otros organismos para el tratamiento y revalorización de aguas residuales hidropónicas. Es por eso que el presente trabajo plantea el diseño y escalado de co-cultivos entre microalgas y levaduras para la revalorización de efluentes de descarte hidropónico mediante la producción de lípidos y carotenoides.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar el desempeño de distintos co-cultivos de microalgas y levaduras para la revalorización de aguas residuales hidropónicas mediante la producción de biomasa, lípidos y carotenoides.

2. Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de microalgas y levaduras para crecer en aguas residuales de producción hidropónica;

2. Diseñar co-cultivos entre microalgas y levaduras seleccionadas y comparar sus rendimientos en la producción de biomasa, lípidos y carotenoides;

3. Determinar los rendimientos en biomasa, lípidos y carotenoides del mejor co-cultivo al establecer sistemas autótrofos, mixótrofos y heterótrofos;

4. Evaluar la remoción de nitrógeno y fósforo total del efluente al emplear cada sistema.

MATERIALES Y METODOLOGÍAS

1. Cepas y medios de cultivo

1.1. Cepas algales

Se emplearon, en total, seis cepas de microalgas para la etapa de *screening* inicial (Tabla 1), de las cuales una pertenece al *filum* Cyanobacteria (dominio Bacteria), y cinco a la división Chlorophyta (dominio Eukaryota). Una de ellas (*Choricystis minor*), fue aislada a partir de agua estancada eutrofizada en las inmediaciones del Parque Rodó (-34.9224846, -56.1696665 - Montevideo, Uruguay), mientras que las demás fueron adquiridas de Carolina Biological Supply Company (Carolina - Carolina del Norte, Estados Unidos): *Chlorella spp*., *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina y Spirulina major*. Los cultivos *bacteria-free* de dichas algas se obtuvieron por plaqueo en medio BG11-agar y repicado hasta la obtención de colonias aisladas.

1.2. Cepas de levaduras

En el presente trabajo se evaluaron tres cepas de levaduras: *Rhodotorula spp., Candida spp., y Pichia spp.*, siendo todas aislamientos locales almacenados en la colección de cepas del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. Además, como control en los ensayos de *screening* se utilizó una cepa comercial de *S. cerevisiae* (Fleischmann).

1.3. Medios de cultivo

El medio base elegido para los cultivos algales fue BG11, preparado según *Rippka et al*. (1979). El cultivo sólido se logró adicionado agar 8 $g.L^{-1}$, preferido para mantener los *stocks* de microalgas tanto en placas de Petri como en tubos de agar inclinados. Por otro lado, el medio BG11 líquido se empleó en la propagación y generación de inóculos. En el caso de *Dunaliella salina* se adicionaron, al medio base, 58 $g.L^{-1}$ de NaCl, con el objetivo de obtener la salinidad óptima para el crecimiento de dicha especie (79).

Las especies de levaduras se crecieron en placas de medio sólido PDA (Sigma-Aldrich, Merch Group), mientras que los cultivos líquidos se realizaron en medio YES (Extracto de levadura 5 $g.L^{-1}$, glucosa 30 $g.L^{-1}$). A la hora de determinar la acumulación lipídica por parte de las cepas de levaduras se utilizó un medio con limitación de nitrógeno descripto por *Thakur et al.* (1989), y modificado a su vez a propósito del presente trabajo, con la siguiente composición: glucosa 40 $g.L^{-1}$, extracto de levadura 1.5 $g.L^{-1}$, KH_2PO_4 0.75 $g.L^{-1}$, $(NH_4)_2SO_4$ 0.47 $g.L^{-1}$, $CaCl_2.2H_2O$ 0.4 $g.L^{-1}$ y $MgSO_4.7H_2O$ 0.4 $g.L^{-1}$, pH 5.

Para todos los microorganismos utilizados se mantuvieron cultivos *stock* a 4 ° C, tanto en placas de Petri con medio BG11 sólido como en tubos de agar inclinado. Además, para todas las cepas se hicieron criotubos mantenidos a -80 ° C en medio adicionado con glicerol: al 10% para las microalgas y al 20% para las levaduras, según el manual para el manejo de cultivos de Carolina Biological Supply.

1.4. Agua residual hidropónica

El agua residual hidropónica fue aportada por la empresa VerdeAgua, al igual que los datos de composición y caracterización química. La misma fue pre-tratada mediante filtrado en bomba de vacío utilizando un filtro de 0.22 µm. Esto permite disminuir el riesgo de posibles contaminaciones con otros microorganismos y, además, eliminar partículas de sedimentos como la arena o restos de materia orgánica. Para la caracterización físico-química de la misma se realizó, en primer lugar, la determinación de su pH, CE y salinidad. Además, se realizó un espectro de absorbancia del efluente concentrado para corroborar que este no interfiriera con las medidas de absorbancia realizadas durante los ensayos.

2. Diseños experimentales

Como se detalló anteriormente, el diseño de un co-cultivo implica la determinación de ciertos parámetros para su optimización. En la figura 3 se detalla el flujo de trabajo seguido en el presente trabajo. En primer lugar se realizó un screening inicial de microorganismos con el objetivo de evaluar su crecimiento en el efluente, seleccionando así los microorganismos candidatos para los co-cultivos. Luego se determinaron los tipos de interacciones entre los mismos, así como los ratios óptimos de inoculación, para finalmente proceder a la evaluación y selección del mejor co-cultivo. Este se creció, a su vez, bajo distintas modalidades tróficas, estableciendo cultivos heterotróficos y mixotróficos.

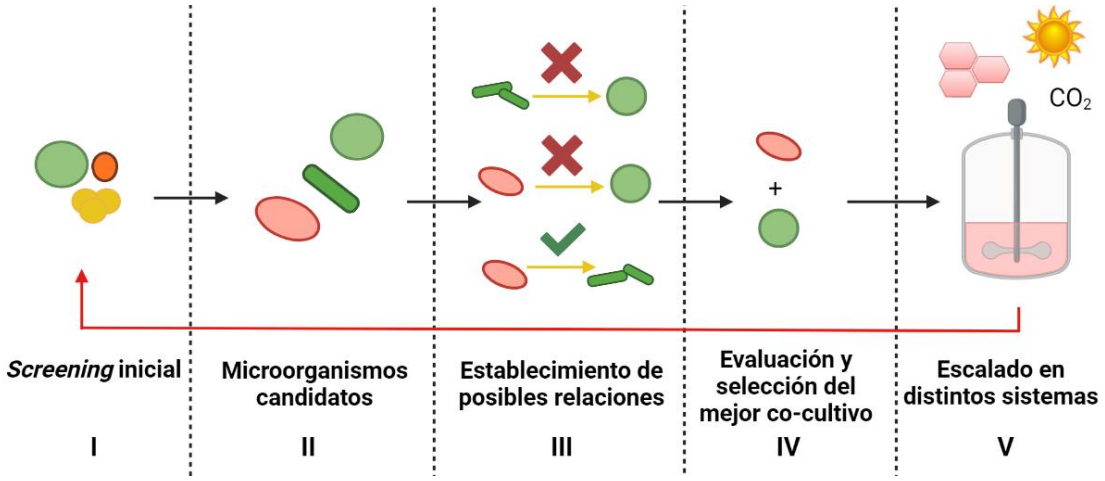

Figura 3. Flujo de trabajo seguido en el diseño experimental del presente trabajo.

2.1. Selección de microalgas

2.1.1. Secreening rápido en placa de 24 pocillos

El primer ensayo experimental realizado tuvo por objetivo determinar la capacidad de las distintas algas candidatas (Tabla 1), para crecer en el efluente. Así mismo, se buscó determinar la concentración óptima para el desarrollo de las mismas. Para esto se llevó acabo un *screening* rápido en placa de 24 pocillos, basado en Salazar et al. (2021), con algunas modificaciones.

Tabla 1. Cepas algales utilizadas en el ensayo de screening en agua residual de hidroponia.

TAXONOMÍA	COLECCIÓN	CÓDIGO
CYANOBACTERIA		
Spirulina major Kützing ex. Gomont	Carolina	#151900
CHLOROPHYTA		
Chlorella vulgaris Beijerinck	Carolina	#152075
Chlorella spp. Beijerinck	Carolina	#152069
Chlamydomonas reinhardtii P.A. Dangeard	Carolina	#152030
Choricystis minor (Skuja) Fott	Aislamiento	-
Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco	Carolina	#152160

Se empleó una placa de 24 pocillos por cepa de microalga ensayada, en la cual se sembró, en los cuatro pocillos de cada columna, una concentración distinta del efluente. Se probó el efluente concentrado y sus diluciones $^1/_2, ^1/_5, ^1/_{10}, ^1/_{20}$ y $^1/_{50}$ en agua destilada estéril. Los pozos de las filas B y C (ver esquema de la Figura 4), se inocularon al 10% con un cultivo en fase de crecimiento exponencial de la microalga deseada, siendo el volumen final de trabajo de 2 mL para todos los pozos de la placa. Las filas A y D se utilizaron como blancos sin sembrar. Todas las placas se crecieron en agitación continua a 220 rpm en shaker orbital, y bajo una PPFD de aproximadamente 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Se midió la OD_{750} diariamente como monitoreo de los cultivos en el lector de placa LifeSciences TECAN Infinite® 200 PRO, hasta la obtención de una meseta en la lectura de la misma.

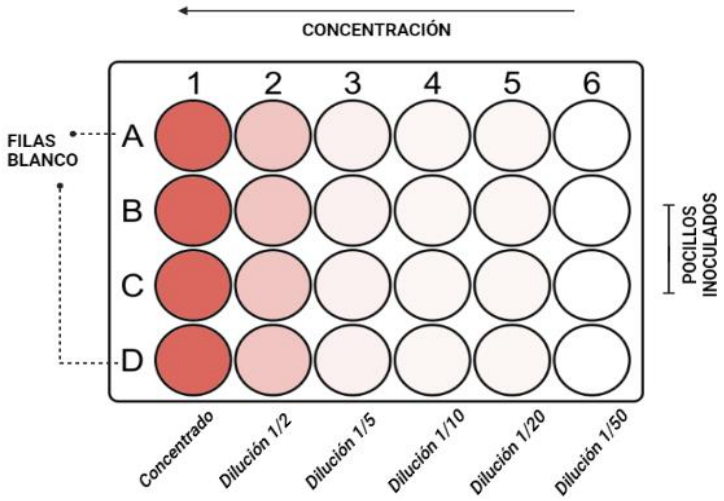

Figura 4. Diseño y distribución en placas de 24 pocillos para el ensayo de *screening* rápido.

2.1.2. Cultivos líquidos en fotobiorreactores (FBR)

Una vez realizado el *screening* rápido se seleccionaron las dos microalgas con el mejor crecimiento en el efluente en placa para realizar cultivos a mayor escala. El objetivo del experimento fue evaluar el comportamiento de las algas, así como la evolución de distintos parámetros fisicoquímicos del medio, en el tiempo y para cultivos en reactores tipo tubulares. Los mismos se diseñaron a partir de botellas Schott con volumen de trabajo de 500 mL finales.

Cada botella Schott se llenó con 500 mL de efluente pre-tratado, inoculándose al 10% con un cultivo en fase exponencial con una OD_{750} aproximada de 0.5. Para el aireado se utilizó una bomba de aire con un caudal (Q_{aire}) de 75 $mL.min^{-1}$, conectada a un filtro de 0.22 µm, y a su vez a una piedra aireadora de 2.5 cm de diámetro. El mezclado del cultivo se dio gracias al movimiento de las mismas burbujas formadas por la aireación.

Cada microalga se creció por triplicados en efluente, así como en medio BG11 utilizado como control. Todos los cultivos se crecieron por aproximadamente 15 días o hasta observar la formación de una meseta en la curva de crecimiento, a 25 ° C y bajo una PPFD de aproximadamente 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ en ciclos de luz/oscuridad de 16:8 hs. Cada día se tomaron muestras para determinar el pH (ver apartado 3.2), y la OD_{750} alcanzada. A partir de esta última se determinó la biomasa generada, mediante una curva de OD_{750} vs peso seco de cada microalga (ver apartado 3.3).

2.2. Selección de levaduras

2.2.1. Screening de levaduras oleaginosas

A las cepas de levaduras de partida se les evaluó la capacidad de acumulación intracelular de lípidos. Aquellas que son capaces de almacenar entre 20 – 70% de su peso seco en lípidos son denominadas como levaduras oleaginosas (81). Para la selección se siguió el procedimiento establecido por *A. Martínez* (2020), con algunas modificaciones. Brevemente, para cada cepa se inocularon 80 mL de medio Thakur modificado al 10% (v/v) con una suspensión de células en suero fisiológico (NaCl 0.9%

(m/v)), de turbidez 1 en la escala McFarland. Estos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron durante cinco días a temperatura ambiente y con agitación en shaker orbital a 150 rpm. Como control de una levadura no oleaginosa se utilizó una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Posteriormente se determinó la biomasa alcanzada (según apartado 3.3), la biomasa lipídica total (según apartado 3.4), y el porcentaje de acumulación de lípidos.

2.2.2. Evaluación de crecimiento en agua residual hidropónica

Las levaduras fueron sometidas a un segundo s*creening* para evaluar la capacidad de crecimiento en agua residual de hidroponia. Para ello se colocaron 80 mL de agua residual hidropónica con adición de glucosa en una concentración de 30 $g.L^{-1}$, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Los mismos se inocularon al 10% (v/v), con una suspensión de células en suero fisiológico de turbidez 1 en la escala McFarland. Los matraces se incubaron durante cuatro días a temperatura ambiente y en agitación constante en shaker orbital (modelo) a 150 rpm. Cada día se determinó, por espectrofotometría, la OD_{600} del cultivo.

3. Crecimiento en co-cultivos

3.1. Co-cultivos en hidrogel

Los co-cultivos en hidrogel se emplearon para determinar el tipo de interacción (sinérgica, neutra o antagónica), y el ratio óptimo de inoculación entre los microorganismos candidatos. Los ratios y co-cultivos ensayados se detallan en las tablas 2 y 3.

El medio se realizó empleando una mezcla de agua residual hidropónica pre-tratada y termostatizada a 40°C y agar, previamente autoclavado y solubilizado a 90 °C, a una concentración final de 0,5% (m/v). Posteriormente se agregaron 2 mL de inóculo del microorganismo elegido a la mezcla y se homogeneizó manualmente hasta la obtención de una mezcla uniforme, de la cual se agregaron 10 mL a las placas correspondientes. Para cada microorganismo y concentración celular se realizó una mezcla independiente.

Tabla 2. Co-cultivos entre microalgas y levaduras y los respectivos ratios ensayados. Se aclara el número inicial de células inoculadas por mililitro de hidrogel.

RATIO	NÚMERO DE CÉLULAS ($x10^5$ cel.mL^{-1})	
Co-cultivo 1	***Chlorella spp.***	***Rhodotorula spp.***
1:1	5.0	5.0
3:1	15.0	5.0
1:0	5.0	-
3:0	15.0	-
0:1	-	5.0
Co-cultivo 2	***C. minor***	***Rhodotorula spp.***
1:1	5.0	5.0
3:1	15.0	5.0
1:0	5.0	-
3:0	15.0	-
0:1	-	5.0

Tabla 3. Co-cultivos entre las cepas de microalgas y los respectivos ratios ensayados. Se aclara el número inicial de células inoculadas por mililitro de hidrogel.

RATIO	NÚMERO DE CÉLULAS ($x10^5$ cel.mL^{-1})	
Co-cultivo	***Chlorella spp.***	***C. minor***
1:1	5.0	5.0
3:1	15.0	5.0
1:3	5.0	15.0
1:0	5.0	-
3:0	15.0	-
0:1	-	5.0
0:3	-	15.0

En el caso de los co-cultivos microalga-levadura se plaqueó a esta última primero, en placas de Petri y dejando solidificar el medio, agregando posteriormente la mezcla con la microalga encima. Los co-cultivos entre microalgas se realizaron de la misma manera pero agregando siempre la mezcla con *C. minor* en la parte inferior de la placa. Como control y a modo de comparación se plaquearon los tres microorganismos en monocultivo, completando la otra mitad del hidrogel con agua residual hidropónica con agar al 0.5% sin inocular (Figura 5). Cada condición se sembró por triplicados, y se dejó incubar las placas durante 14 días a 25 °C y bajo una PPFD de aproximadamente 50 µmol $m^{-2}.s^{-1}$ en ciclos de luz/oscuridad de 16:8 hs.

Al final de los 14 días se resuspendió la totalidad del hidrogel en 80 mL de agua destilada, pipeteando y vortexeando vigorosamente hasta la obtención de una mezcla homogénea. Posteriormente se realizó el recuento celular de las especies en cada co-cultivo por cámara de Neubauer. La determinación del tipo de interacción entre las especies involucradas, y el ratio óptimo de inoculación se llevó a cabo analizando la variación en la densidad celular al compararlas con sus respectivos monocultivos. La separación espacial se realizó esperando visualizar cambios en las concentraciones celulares de las especies en la interfase de ambos hidrogeles.

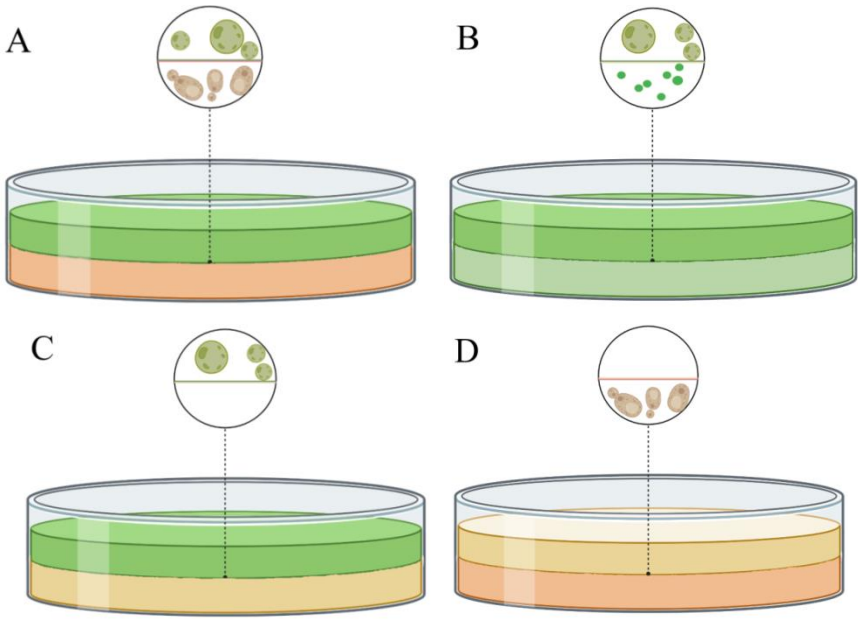

Figura 5. Diseño del ensayo de co-cultivos en hidrogel. **A**. Placa con medio inoculado con *Rhodotorula spp.* (inferior), y una microalga (superior). **B**. Placa con medios inoculados con microalgas. **C**. Control inoculado únicamente con una microalga (superior), y medio con agar sin inocular (superior). **D**. Control inoculado con *Rhodotorula spp.* (inferior), y agar sin inocular (superior).

3.2. Cultivos en reactor de tipo tubular

Una vez determinado el ratio óptimo de inoculación, se procedió al crecimiento de los co-cultivos en efluente a mayor escala en fotobiorreactores de tipo tubular. Para los mismos se empleó el mismo sistema descripto en el apartado 2.1.2. Los sistemas se realizaron por duplicados, inoculándoselos con $5.0x10^5$ cel.mL^{-1} de cada especie y, realizándose, a modo de control, el cultivo de cada especie aislada con la misma concentración celular inicial. Cada sistema se creció aproximadamente por 15 días a 25 ° C y bajo una PPFD de aproximadamente 50 µmol.m^{-2}.s^{-1} en ciclos de luz/oscuridad de 16:8 hs. Cada tres días se realizó el conteo celular de cada especie por recuento en cámara de Neubauer. Al final de los 15 días se realizó una determinación de biomasa total generada (ver apartado 3.2), así como una extracción total de lípidos (ver apartado 3.3), y carotenoides (ver apartado 3.5).

3.3. Sistemas mixótrofos y heterótrofos

Una vez realizados los cultivos en autotrofia, se seleccionó el co-cultivo con un mejor desempeño para establecer sistemas mixótrofos y heterotróficos. El co-cultivo se creció en fotobiorreactores de tipo tubular (descriptos previamente en el apartado 2.3.2). Como control se crecieron las especies en monocultivos. El inóculo inicial de cada especie, tanto en co-cultivo como en cultivo aislado, fue de $1.0x10^6$ cel.mL^{-1}, empleándose agua residual hidropónica con agregado de glucosa al 3% (m/v), como medio. Los sistemas mixotróficos se expusieron a una PPFD aproximada de 50 µmol.m^{-2}.s^{-1} en ciclos de luz/oscuridad de 16:8 hs, mientras que los sistemas heterotróficos se crecieron en total oscuridad, envolviendo los reactores con papel aluminio. Todos los sistemas se crecieron hasta observar la formación de una meseta en el crecimiento, controlándose cada dos días por conteo celular en cámara de Neubauer. Al final del período de incubación se realizó una determinación de biomasa total generada (ver apartado 3.2), así como una extracción total de lípidos (ver apartado 3.3), y carotenoides (ver apartado 3.5). Una vez removida la biomasa del medio se realizó una determinación de fósforo y nitrógeno total al mismo por tercerización del servicio a la empresa Cristar Service (Montevideo, Uruguay). Como controles se cultivaron los microorganismos en monocultivo en ambos sistemas.

4. Métodos analíticos

4.1. Conteo celular

La determinación del número de células de cada especie se realizó por conteo en cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución de la muestra de cultivo y a partir de la misma se tomaron 10 µL para el recuento. Cada recuento se realizó por triplicados.

4.2. Medición de pH y CE

Para determinar el pH y CE de los cultivos se tomaron alícuotas de 10 mL de los mismos y se centrifugaron a 5000 g por 15 minutos, con el objetivo de remover la biomasa celular. El sobrenadante obtenido se trasvasó a otro recipiente, en el cual se determinaron el pH y CE empleando un phímetro y conductímetro (previamente calibrados), respectivamente.

4.3. Determinación de biomasa producida (peso seco)

La biomasa generada (en peso seco), se determinó de dos maneras. En el caso de medidas a tiempo final (caso de los co-cultivos en sistemas autotróficos, mixotróficos y heterotróficos), se tomaron 25 mL de medio, previamente homogenizado, y se centrifugaron en un tubo Eppendorf a 5000 g por 5 min. Posteriormente se descarta el sobrenadante y se seca la biomasa en estufa a 60°C hasta la obtención de un peso constante. La biomasa generada se calcula por diferencia de masa respecto al mismo tubo Eppendorf vacío.

En el caso de curvas de crecimiento (monocultivos de *C. minor* y *Chlorella spp*.), se siguieron los cultivos por medidas de absorbancia a 750 nm en el tiempo, convirtiendo posteriormente las mismas a biomasa seca mediante una curva de OD_{750} en función de la biomasa seca (ver figuras 6 y 7 - Anexo). Para la construcción de la curva se partió de un cultivo crecido a partir del cual se realizaron diluciones 3/5 con un volumen final de 200 mL. A las mismas se les determinó la OD_{750} por espectrofotometría y posteriormente se repitió el procedimiento detallado anteriormente para medidas a tiempo final. Finalmente se determinó la relación lineal mediante un gráfico de OD_{750}

en función de la biomasa en peso seco determinada. El cálculo de biomasa en el tiempo para cada medida se realizó interpolando los valores de absorbancia en la curva.

4.4. Extracción y cuantificación lipídica

La determinación del contenido total de lípidos se realizó por método gravimétrico, a partir de biomasa fresca, siguiendo el procedimiento de extracción detallado por *Gentili & Axelson* (2014) (83), con algunos cambios. Brevemente, se centrifugan 200 mL de cultivo a 5000 g durante 15 minutos, descartando el sobrenadante. A la biomasa obtenida se agregan 8 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), homogenizando con la ayuda de un vórtex. Posteriormente se añaden 2 mL de una solución de NaCl 0.73% y se facilita la separación de fases mediante centrifugación a 350 g durante 2 minutos, recuperando la fase inferior. Esta se mantiene en estufa a 60°C para la evaporación de los solventes y se determina la masa de lípidos por diferencia contra el peso del tubo vacío.

4.5. Extracción y determinación de carotenoides totales

La extracción total de carotenoides se realizó tomando el equivalente a 10 mg de biomasa seca en biomasa fresca congelada y lisándola empleando *beads* de sílica y un agitador. El medio de extracción utilizado consistió de 800 µL de una solución de metanol/diclorometano (3:1 v/v). La mezcla resultante se centrifugó a 8000 g durante 1 minuto, recuperando el sobrenadante y guardando 100 µL para su posterior análisis. A partir del sobrenadante restante se realizó una purificación de carotenoides, añadiendo 1 volumen de hexano acuoso (92% v/v). Se agita vigorosa la mezcla y se deja reposar hasta observar la separación de dos fases. Una vez recuperada la fase superior se añade ½ volumen de KOH 30% en metanol y se agita durante 10 minutos. Por último se añade 1 volumen de agua destilada, se agita durante 1 minuto y se deja reposar, recuperando nuevamente la fase superior. Esta es empleada en la cuantificación y caracterización de carotenoides.

La determinación de la concentración de carotenoides totales se realizó mediante una curva de calibración empleando un estándar de betacaroteno (Natufarma). Para ello se realizó una solución inicial del estándar de 10 $\mu g.mL^{-1}$, a partir de la cual se realizaron

diluciones de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 y 0,5 $\mu g.mL^{-1}$. A las mismas se les midió la absorbancia a 452 nm, construyendo así una curva de absorbancia en función de la concentración (ver figura 8 - Anexo). Para determinar la concentración de carotenoides en las muestras se interpoló la absorbancia a 452 nm del sobrenadante obtenido anteriormente, empleando el método de extracción detallado, en la ecuación resultante de la curva de calibración.

5. Análisis estadístico

Cada muestra fue procesada mínimamente por triplicados, expresando los resultados como el promedio de los valores con su respectivo desvío estándar. Para análisis de significancia se empleó el test de ANOVA o el test HSD de Tukey según correspondiera. Se consideró una diferencia significativa para aquellos casos de valor $p < 0.1$, y muy significativos para $p < 0.05$. Para el análisis se empleó el programa *GraphPad Prism 9* (versión demo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de aguas residuales en la producción hidropónica es una preocupación medioambiental entre los productores y autoridades regulatorias. La solución biotecnológica hasta ahora planteada se basa en el cultivo de microalgas, empleando dicho efluente como medio de cultivo. Sin embargo, es necesario continuar desarrollando alternativas de mayor rendimiento para optimizar y hacer rentables los bioprocesos. Es en base a esto que se planteó el diseño de co-cultivos entre microalgas y levaduras para la revalorización de estos efluentes. Hasta el momento no se ha incursionado en dicha alternativa, por lo que se plantea seleccionar microorganismos candidatos y establecer co-cultivos entre los mismos en sistemas autotróficos, mixotróficos y heterotróficos. Estos últimos dada la posibilidad de co-tratar otro tipo de residuos simultáneamente.

1. Caracterización de agua residual hidropónica

Si bien ya se han logrado cultivar ciertas especies de microalgas en aguas residuales de producción hidropónica, la composición de las mismas varía según la composición inicial de la solución nutritiva y otros factores como las especies vegetales cultivadas y el tiempo de irrigación. Es por esto que se realizó una caracterización de parámetros fisicoquímicos y nutrientes para la misma (Tabla 4). Estos parámetros determinarán, posteriormente, el éxito de las distintas especies para desarrollarse en el agua de descarte.

En la tabla 4 se compara la composición y características del efluente con las de un medio estándar para el cultivo de microalgas (BG11). En primer lugar, se puede observar la diferencia entre los pH de las soluciones, siendo menor en el agua residual, ya que este se adapta al óptimo para el crecimiento de las especies vegetales. La solución nutritiva se compone únicamente por una mezcla de sales disueltas en agua, por lo que es probable que la misma no cuente con capacidad amortiguadora. Esto sumado al hecho de que las microalgas tienden a basificar el medio en el que crecen (85), podría constituir una limitante para el desarrollo de las especies, o podría conllevar

a tener que ajustar constantemente el pH del medio. A su vez, se puede observar que la misma posee una mayor cantidad de sales, reflejado en el alto valor (casi diez veces mayor), de la conductividad eléctrica. Este también podría ser un factor limitante para el bioproceso, sin embargo existen diversas especies, como *D. salina*, que se adaptan a condiciones de estrés salino.

Tabla 4. Características físico-químicas del agua residual hidropónica (efluente), y medio BG11 utilizados en el presente trabajo.

PARÁMETRO	UNIDADES	BG11	EFLUENTE
pH	s. u.	8.0	5.8
CE	$mS.m^{-1}$	24.4	215
N	ppm	246.7	374.4
P	ppm	7.12	93.7
K	ppm	17.94	327
Cu	ppm	0.0	0.086
Zn	ppm	0.0	0.05
Mn	ppm	0.0	0.107
Fe	ppm	1.17	2.53
B	ppm	0.0	0.274
So_4^{-2}	ppm	2.88	165
Na	ppm	413.5	119
Mg	ppm	0.73	31.7
Ca	ppm	19.2	177
Mo	ppm	0.0	0.09

En lo que respecta a las concentraciones de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg), estas son mucho mayores en el efluente que en BG11. A modo de ejemplo, este posee diez veces más fósforo, casi 20 veces más potasio y nueve veces más calcio. Este exceso de nutrientes podría constituir un medio rico para el desarrollo de las distintas especies. No obstante, se debe considerar que, además de la concentración de dichos macronutrientes, se deben respetar los ratios o proporciones entre los mismos. Según el Ratio de Redfield, la proporción idónea de N:P para el cultivo de fitoplancton es de 16:1 (86). Dicha proporción es de 8:1 para el agua residual hidropónica, pudiendo considerarse a la misma como deficiente o reducida en nitrógeno. –Esto indica que, de ambos nutrientes, el nitrógeno podría ser el primero en acabarse frente a un eventual crecimiento de las microalgas, conllevando a que las mismas entren en una etapa de estrés por deficiencia del elemento.

Se destaca, también, la presencia de elementos traza como el Cu, Zn, Fe, Mg y Mo en la solución de descarte. Estos últimos no son usualmente agregados al BG11, sin embargo son esenciales para el crecimiento de las microalgas (87). En base a esto último, se plantea que la solución de descarte podría constituir un medio para la producción de altas cantidades de biomasa algal. Sin embargo, también se destacan altas concentraciones de sulfatos, ion que junto a otros elementos anteriormente mencionados aportan a la alta conductividad y, por ende, estrés osmótico y iónico de la solución.

2. Selección de microalgas

Para la selección de microalgas candidatas a los co-cultivos se comenzó realizando un *screening* rápido en placa de 24 pocillos, obteniendo así curvas de crecimiento de OD_{750} en función del tiempo para cada microalga y dilución de efluente (figura 9). De las seis especies evaluadas, ya existían reportes de crecimiento en dicho tipo de efluente para solo dos de ellas: *D. salina* y *C. vulgaris* (28). Por lo tanto, este es el primer reporte de trabajo con *C. minor*, *S. major* y *C. reinhardtii* en efluente. Para la cepa de *Chlorella* empleada no se conoce la especie, aunque podría presentar un comportamiento similar al de otras especies del mismo género.

Como se puede observar en la figura 9 todas las especies empleadas en el ensayo crecieron exitosamente en el agua residual hidropónica, lo que demuestra que este tipo de efluente es ideal para el crecimiento de algas eucariotas y procariotas, tal como se reportó anteriormente en Salazar et al. (2021) (88). Algunas de ellas, como *D. salina*, *C. reinhardtii* y *S. major* requirieron de un período de adaptación mayor hasta alcanzar la fase exponencial, que comenzó entre el cuarto y séptimo día para las mismas. En el caso de *C. minor* y ambas especies de *Chlorella*, la fase exponencial comenzó entre el segundo y tercer día, siendo especies de crecimiento más rápido y de fácil adaptabilidad a la solución. También, estas últimas alcanzaron una OD_{750} máxima mayor en el período de diez días en que se realizó el ensayo, siendo de 1,04 para *C. minor* y 0,97 y 0,99 para *Chlorella spp*. y *C. vulgaris*. Por otro lado, en *S. major*, *D. salina* y *C. reinhardtii* estos valores fueron de 0,57, 0,49 y 0,43 respectivamente (figura 10).

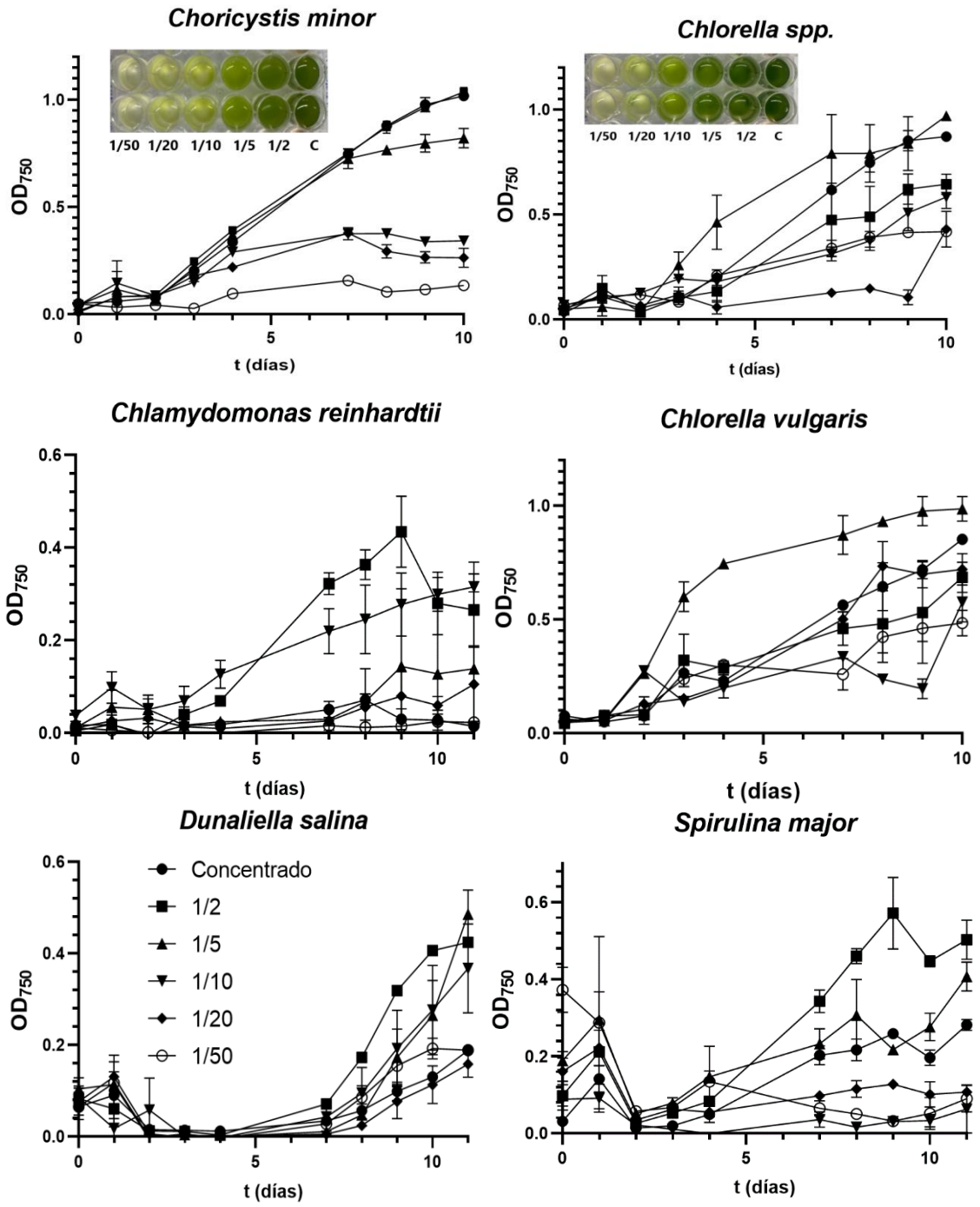

Figura 9. Resultado del *screening* rápido en placa de 24 pocillos. Se muestran las curvas de crecimiento por OD_{750} para cada microalga en las respectivas diluciones de efluente.

Es posible apreciar que el efluente concentrado no es óptimo para el crecimiento de *S. major*, *D. salina* y *C. reinhardtii*, sino que las mismas se desarrollan mejor al diluir al medio la solución. Sin embargo, se puede observar que, al seguir diluyendo el efluente

el crecimiento obtenido es menor. Probablemente el efluente concentrado presente concentraciones de nutrientes que inhiben el crecimiento de dichas microalgas, pero que menores concentraciones no permiten alcanzar altas densidades celulares. Se puede apreciar una leve disminución de la absorbancia en los primeros días de cultivo de S. major. Esto se debe al crecimiento de la misma en aglomerados celulares que dificultaron las medidas de OD.

En el caso de *C. minor* no existe una inhibición por la concentración de efluente, sin embargo si se aprecia que al diluirse el mismo, la OD_{750} máxima alcanzada es menor. Esto podría sustentar la hipótesis de que, para esta microalga, una mayor concentración de nutrientes equivaldría a un mayor rendimiento. Finalmente, para ambas especies de *Chlorella*, se obtuvieron valores de OD_{750} levemente mayores al diluir al quinto la solución, sin embargo, esta diferencia no fue significativa respecto al efluente concentrado según el análisis estadístico. En ambas se observa también una leve disminución en el crecimiento al disminuir la concentración de efluente, siendo la excepción la dilución al medio que fue menor para las dos especies. Esta diferencia podría deberse a variaciones en el inóculo inicial, que afectan en pequeña medida el valor alcanzado. En base a lo discutido anteriormente es que se decidió seguir trabajando con *Chlorella spp*. y *C. minor* como candidatas a los co-cultivos. En un principio también se seleccionó a *Chlorella vulgaris*, pero no se lograron establecer cultivos a mayor escala en el efluente con dicha microalga. Al no haber una diferencia significativa entre el efluente concentrado y la dilución al medio para *C. minor*, y la dilución al quinto para *Chlorella spp*, se decidió seguir trabajando con el mismo sin diluir. Esto evitaría el trabajo y la logística extra de diluir la solución, por ejemplo a escala industrial, ahorrando recursos, tiempo y esfuerzo.

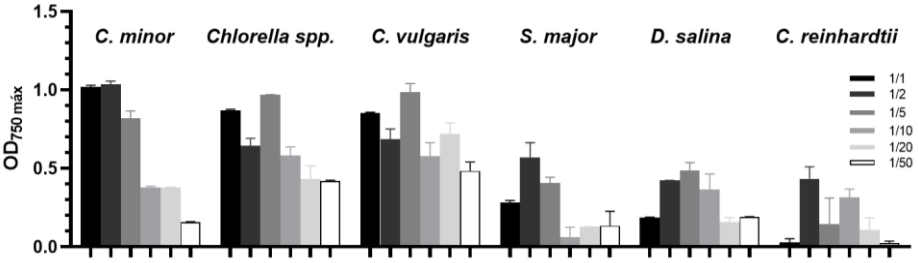

Figura 10. OD_{750} máxima alcanzada para cada microalga y en cada dilución al cabo de 11 días.

Con el objetivo de analizar el crecimiento a mayor escala se establecieron cultivos en frascos Schott como se detalló anteriormente. Estos se realizaron en medio BG11 y efluente, para comparar así la productividad de este último con la de un medio estándar para el cultivo de microalgas, a una escala más representativa que las placas de 24 pocillos. Las curvas de productividad se pueden observar en la figura 11 (Anexo).

En el caso de *Chlorella spp*. se alcanzaron valores de biomasa de 1.19 $g.L^{-1}$ al emplear efluente como medio de cultivo, mientras que para BG11 este fue de 0.39 $g.L^{-1}$, obteniendo productividades máximas de 0.273 y 0.06 $g.L^{-1}.d^{-1}$ respectivamente. Estos valores de biomasa, significativamente mayores en el efluente, confirman lo planteado por otros autores para especies de *Chlorella*, quienes aseguran que el agua residual hidropónica es un medio rico para el crecimiento de dicho género, aún mayores a los de medios estándar para el cultivo de microalgas. Si bien no se conoce la especie de la microalga, los únicos reportes de dicho género para estas condiciones fueron empleando a *Chlorella vulgaris*. En Månsson (2012) y Adam (2019), se obtuvieron, para dicha especie, aproximadamente 0.45 $g.L^{-1}$ de biomasa seca en ambos casos, menos de la mitad de lo reportado en el presente estudio (89,90). En un tercer estudio llevado acabo por Yousif et al. (2022), se obtuvieron 0.23 $g.L^{-1}$ de biomasa seca en efluente (30). En base a lo comentado se destaca el valor de biomasa alcanzada en el presente trabajo como el máximo reportado hasta el momento para cultivos autotróficos en Batch al emplear agua residual hidropónica. Como se comentó anteriormente, cada solución residual de hidroponia es única en su composición en cuanto a nutrientes, lo que podría explicar las diferencias en los valores obtenidos respecto a la bibliografía. También, en dichos trabajos se alcanzan valores de pH altos de aproximadamente 10, lo que podría afectar el crecimiento de las microalgas. Diversos autores presentan alternativas para aumentar los rendimientos como pasar a cultivos mixotróficos y heterotróficos, que para *Chlorella vulgaris* en agua residual hidropónica han conllevado a obtener entre 1.2 y 1.3 $g.L^{-1}$ de biomasa seca respectivamente según Yousif et al. (2022).

Tabla 5. Biomasa alcanzada en los cultivos de *Chlorella spp.* y *C. minor* para cada medio a los 18 y 14 días respectivamente.

	BIOMASA ALCANZADA ($g.L^{-1}$)	
MEDIO	***Chlorella spp.***	***C. minor***
Efluente hiodropónico	1.19 ± 0.15	0.66 ± 0.01
BG11	0.39 ± 0.05	0.12 ± 0.01

Para *C. minor* también se observó una producción de biomasa mayor en efluente que en medio BG11, siendo en el primero de 0.66 $g.L^{-1}$ en base seca, y aproximadamente de 0.12 $g.L^{-1}$ en el segundo (Tabla 5), acompañadas de productividades de 0.15 y 0.03 $g.L^{-1}.d^{-1}$ cada uno. Este aumento significativo de casi seis veces podría deberse, principalmente, a la mayor disponibilidad de nutrientes en el medio, reportado previamente por Menezes et al. (2016) (91) para dos medios estándar: BBM y WC. Aun así, estos reportan valores de biomasa obtenidos de 0.98 y 0.53 $g.L^{-1}$ respectivamente, siendo el primero un 48% mayor que el reportado en el presente estudio. Es importante destacar que no solo un incremento en la concentración de nutrientes fomenta la generación de biomasa, sino que, como ya mencionado, también son de suma importancia las proporciones entre los mismos y el diseño del sistema para su crecimiento. Los autores, además, hacen hincapié en que una mayor disponibilidad de nutrientes debe estar acompañada por una mayor disponibilidad lumínica, siendo esta mayor a la empleada en el presente trabajo. Por otro lado, Braida et al. (2015), reportan valores de aproximadamente 0.15 $g.L^{-1}$ para la misma microalga en medio BG11 y en reactores de tipo tubular, coherente a lo comentado hasta ahora (92). Por último, Menezes et al. (2015) lograron obtener valores de biomasa de aproximadamente 0.5 $g.L^{-1}$ para *C. minor* en medios ricos en NPK (93). En base a esto se plantea que la solución de descarte de hidroponia es un medio nutriente rico para la obtención de altas productividades de biomasa en esta microalga. Empleando otros modos de cultivo, como por ejemplo en continuo, se han obtenido biomasas de hasta 2 $g.L^{-1}$, y añadiendo, además, otras modalidades tróficas como sistemas mixótrofos y heterotróficos, se han alcanzado biomasas de 6.0 y 8.0 $g.L^{-1}$, valores mucho mayores a los reportados en sistemas en Batch autotróficos (94,95).

Sería interesante emplear el efluente de hidroponia en dichos sistemas, intentando maximizar la cantidad de biomasa producida. Actualmente, este estudio constituye el primero realizado con *C. minor* en este tipo de efluente.

En la figura 12 se muestra la evolución del pH en ambos medios de cultivo y para cada microalga cultivada a escala de Schotts. Este fue determinado al buscar estudiar más a fondo las propiedades de la solución de descarte como medio. En ambos casos el pH del medio BG11 se mantiene, aproximadamente, en un rango de 8 ± 1, lo cual se debe a su capacidad amortiguadora, sufriendo una leve basificación. Por otro lado, el efluente varía en casi tres unidades de pH, basificándose de aproximadamente 6 a 8.5. Esto ratifica la hipótesis de que el mismo no posee capacidad *buffer*. Si bien la basificación del efluente no parece ser un problema para el desarrollo de las microalgas bajo estas condiciones, si podría actuar como un factor limitante en cultivos realizados en períodos de tiempo prolongados o en los que se alcancen mayores concentraciones de biomasa.

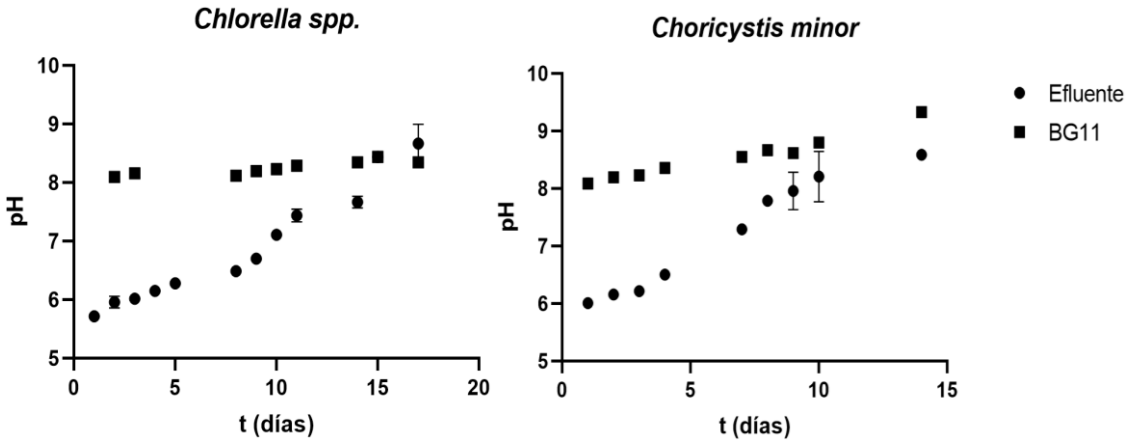

Figura 12. Evolución del pH del medio de cultivo para cada microalga en BG11 y efluente a escala de Schotts.

3. Selección de levaduras

La selección de levaduras consistió en dos estrategias: la selección de levaduras oleaginosas a partir de aislamientos ambientales (Montevideo, Uruguay), y la posterior evaluación del crecimiento en efluente con presencia de glucosa como fuente de carbono en el medio. Aquellas levaduras capaces de acumular más de un 20% de su peso seco en lípidos son consideradas como oleaginosas. Las mismas son de gran importancia para el presente trabajo cuyo objetivo, en parte, es la obtención de dichos

metabolitos. Para la identificación de este tipo de levaduras se partió de tres aislamientos ambientales que se crecieron en medio Thakur modificado. Como control de una levadura no oleaginosa se empleó una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Los resultados se observan en la tabla 6.

En primer lugar se puede observar que la cepa control de *S. cerevisiae* acumuló un 14.65 % de lípidos a los cuatro días de cultivo. Esto es coherente ya que la misma no es una levadura oleaginosa, por lo que era esperado que su porcentaje lipídico fuera menor al 20 %. A. Martínez (2020), obtuvo resultados similares al emplear la misma marca comercial de levadura, concluyendo en que la misma acumula aproximadamente un 17% de su peso seco en lípidos (82).

Entre los aislamientos evaluados, *Pichia spp*. posee un contenido lipídico de apenas un 6 %. Si bien no se conoce la especie, otras especies de *Pichia* no son particularmente conocidas por acumular lípidos neutros como los triglicéridos. En el caso de *P. pastoris*, se ha visto que la misma solo logra aumentar la acumulación de lípidos intracelulares al crecerse en presencia de oleato como única fuente de carbono. El metabolismo de estas levaduras metilotróficas no se encuentra aún del todo descripto (96).

Tabla 6. Contenido lipídico para cada levadura evaluada en medio Thakur modificado. Se muestran los resultados para *S. cerevisiae*, empleada como control de una levadura no oleaginosa.

LEVADURA	CONTENIDO LIPÍDICO (%)
Candida spp.	28.38 ± 4.72
Pichia spp.	6.41 ± 2.64
Rhodotorula spp.	32.05 ± 5.94
S. cerevisiae	14.65 ± 3.02

En el caso de *Rhodotorula spp*. y *Candida spp*. se determinó que las mismas poseen carácter oleaginoso ya que alcanzaron un contenido lipídico del 32.05 y 28.38 % respectivamente. Estos géneros son conocidos por su capacidad de acumulación intracelular de lípidos neutros. Se ha visto que especies del género *Rhodotorula* (*R.*

glacialis y *R. babjevae*), alcanzan el 60 % de su peso en lípidos, mientras que especies del género *Candida* (como *C. albicans*), superan el 70 %.

Continuando con la selección de levaduras candidatas a los co-cultivos, se creció a ambas levaduras oleaginosas identificadas en efluente con glucosa como fuente de carbono. El crecimiento se siguió por OD_{600} durante cuatro días, obteniendo el gráfico mostrado en la figura 13.

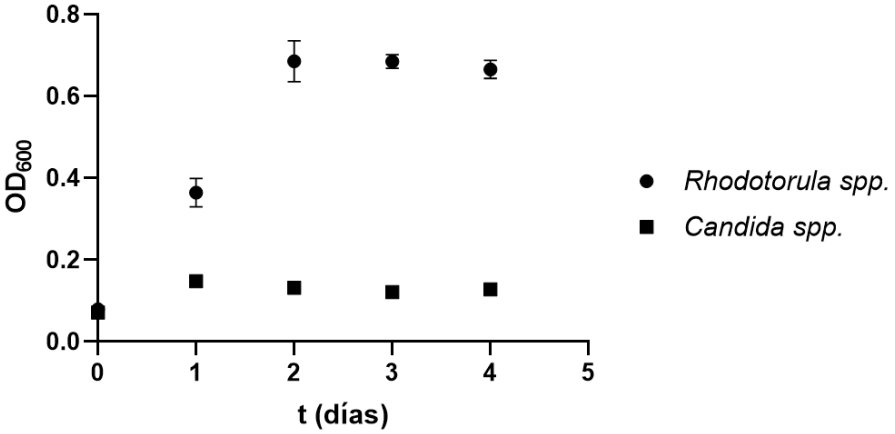

Figura 13. Curvas de crecimiento para *Rhodotorula spp*. y *Candida spp*. en efluente con adición de glucosa (30 $g.L^{-1}$), seguido por OD_{600} durante cuatro días.

Como se aprecia en la figura 13, de las dos levaduras evaluadas solo una (*Rhodotorula spp.*), logró crecer en efluente sin diluír. Es a partir de esta que se evaluarán los co-cultivos con las microalgas seleccionadas. La misma alcanzó una OD_{600} máxima de aproximadamente 0.7, siendo un valor bajo para el crecimiento de levaduras. Es probable que la composición del agua residual no sea la ideal para el desarrollo de las levaduras, pudiendo contener inhibidores o poseer nutrientes que no se encuentren en forma biodisponible para las mismas. Se ha visto que altas concentraciones de sales inhiben el crecimiento de ambos géneros, al no ser, generalmente, halotolerantes (97). Este podría ser el caso del agua residual hidropónica, que como se comentó anteriormente posee una alta concentración salina, así como potencialmente otros inhibidores para las levaduras.

Sería interesante evaluar el crecimiento de estas y otras levaduras conocidas por su gran capacidad de acumulación lipídica como lo son especies de *Yarrowia*, *Lipomyces* o *Kazachstania* (98). Para el caso de la primera ya se han realizado co-cultivos con microalgas, obteniendo buenos resultados en la producción de biomasa y lípidos (99). A su vez, se podría realizar un *screening* similar al de microalgas, diluyendo el efluente para estudiar la presencia de inhibidores en el mismo. También se podría añadir un *screening* de levaduras halotolerantes, aumentando así la probabilidad de un mejor crecimiento en el agua residual.

4. Crecimiento en co-cultivos

4.1. Tipo de interacción y ratio óptimo

Con el objetivo de estudiar el tipo de interacción entre los distintos microorganismos candidatos, así como el ratio óptimo de inoculación, se realizaron co-cultivos en hidrogel de agua residual hidropónica con agar. Para los co-cultivos entre microalgas y levaduras se evaluaron ratios de inoculación de 1:1 y 3:1 (microalga/levadura), mientras que para co-cultivos entre las dos microalgas se evaluaron ratios de inoculación de 1:1, 3:1 y 1:3 (*Chlorella spp.*/*C. minor*). Estos se realizaron con separación espacial entre los microorganismos, como detallado en la figura 5, buscando evaluar la concentración de cada uno en la interfase de contacto del hidrogel, así como en cada fase por separado. Debido a la deshidratación de la matriz no fue posible diferenciar las distintas partes del sistema, por lo que se realizó una homogenización de todo el hidrogel y se procedió al recuento celular de las especies por cámara de Neubauer.

En el caso del co-cultivo 1, entre *Chlorella spp.* y *Rhodotorula spp.* (figura 14), se alcanzó una concentración máxima de células en ambos controles de aproximadamente $9x10^6$ y $8x10^6$ cel.mL^{-1}, para *Chlorella*, y de $1,4x10^6$ cel.mL^{-1} para *Rhodotorula*. Esto demuestra, en primer lugar, que *Rhodotorula* no se desarrolla bien por sí sola en efluente sin una fuente de carbono orgánica. Además, el hecho de que ambos controles inoculados con microalgas, de los cuales uno partió con una concentración inicial tres veces mayor, hayan alcanzado casi la misma concentración celular final (diferencia no significativa según Tukey SDT por $p > 0.01$), indica una posible limitante en el tipo de sistema. Esta limitante está, probablemente, a nivel del intercambio gaseoso, que se da

únicamente por difusión de los gases en el hidrogel (100). Sin embargo, se puede observar que el crecimiento de *Chlorella spp*. se ve favorecido cuando ambas especies se encuentran en co-cultivo. Al inocular ambos microorganismos en una relación 1:1 la concentración celular alcanzada para la misma es de casi $3x10^7$ cel.mL^{-1}, mientras que al ser de 3:1 (microalga/levadura), esta es de aproximadamente $1,5x10^7$ cel.mL^{-1}. Esto representa un aumento de casi un 300 y 200 % respectivamente, y podría estar dado, entre otros factores, por la producción de metabolitos secundarios, como dióxido de carbono y ácidos orgánicos, por parte de las levaduras. Dicho intercambio se ve favorecido por la proximidad de las especies en el hidrogel (101). *Rhodotorula* parece verse favorecida únicamente cuando la inoculación es en relación 1:1, llegando a una concentración celular final de $3,6x10^6$ cel.mL^{-1}. Como mencionado anteriormente, las microalgas podrían estar proporcionando azúcares y oxígeno a las levaduras, promoviendo su crecimiento. Aun así, estas disponen únicamente de azúcares provenientes de las microalgas, por lo que en un sistema autotrófico su crecimiento sigue siendo limitado y es mucho menor al de las microalgas.

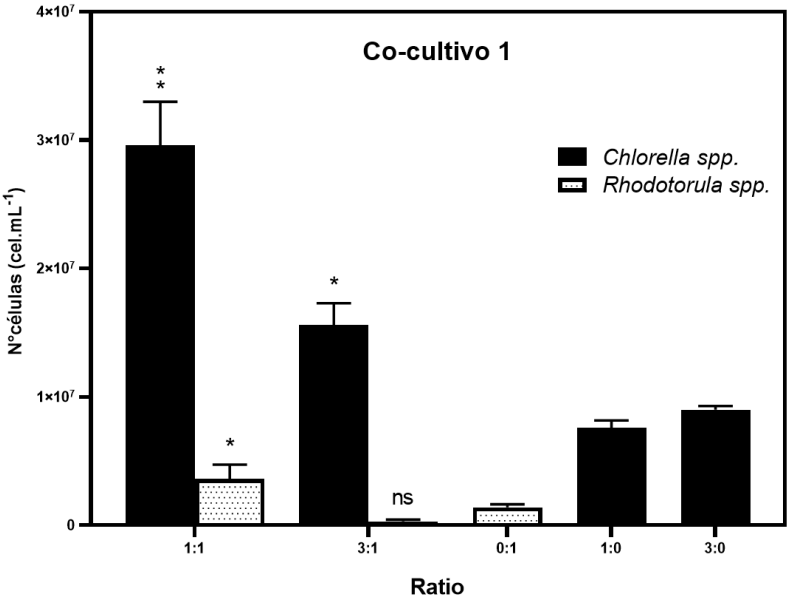

Figura 14. Resultados del conteo celular para el co-cultivo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. en hidrogel con sus respectivos controles. Se indica el resultado del test estadístico al comparar contra el control: no significativo ($p > 0.1$ - ns), significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

Se podría decir que la relación entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*., en relación 1:1, es de tipo sinérgica. Esto se ha visto en trabajos anteriores en otros sistemas, como en cultivos líquidos. Si bien no se conocen las especies de los microorganismos, cultivos de *C. sorokiniana* y *C. vulgaris* con *R. glutinis*, y *C. protothecoides* con *R. toruloides* han arrojado resultados similares (76, 99, 102). En base a esto se decide seguir trabajando con esta relación para el co-cultivo entre *Chlorella spp.* y *Rhodotorula spp.* en ensayos posteriores.

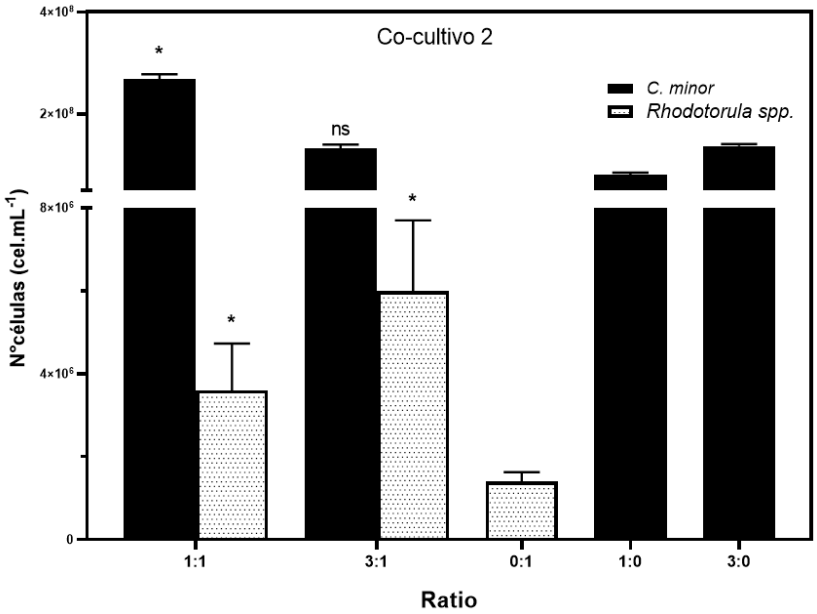

Figura 15. Resultados del conteo celular para el co-cultivo entre *C. minor*. y *Rhodotorula spp*. en hidrogel con sus respectivos controles. Se indica el resultado del test estadístico al comparar contra el control: no significativo ($p > 0.1$ - ns), significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

Los resultados del conteo celular del co-cultivo 2, entre *C. minor* y *Rhodotorula spp*., se muestran en la figura 15. En este se pueden observar resultados similares a los del co-cultivo 1, en el cual se da una interacción de tipo sinérgica o de mutualismo entre las especies al crecer en conjunto en relación 1:1. Esto se puede corroborar al comparar con los respectivos controles de los microorganismos en monocultivo: *C. minor* alcanza una densidad celular de aproximadamente $8{,}0 \times 10^{7}$ cel.mL^{-1}, mientras que al crecer en conjunto a la levadura alcanza una densidad de $2{,}7 \times 10^{8}$ cel.mL^{-1}, un valor más de 300 veces mayor. En el caso de *Rhodotorula spp*., esta también se ve beneficiada de la relación, aumentando tres veces su concentración celular final. Para el caso del cultivo con ratio de inoculación 3:1 (microalga/levadura), se aprecia un aumento significativo

en el crecimiento de la levadura respecto al control en monocultivo, pero sin embargo no sucede lo mismo con la microalga. Este tipo de relación podría ser de comensalismo, en el cual la levadura si se ve favorecida por los azúcares liberados por *C. minor*. De acuerdo a esto es que se elige seguir trabajando con el co-cultivo 2 en un ratio de inoculación 1:1 en ensayos a futuro. Este es el primer trabajo en el que se realizan co-cultivos empleando *C. minor* como microorganismo candidato.

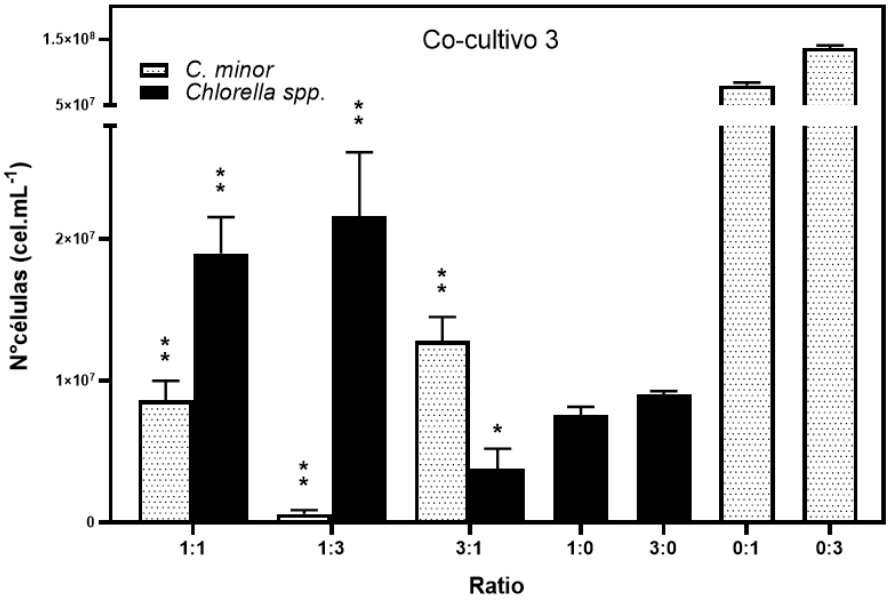

Figura 16. Resultados del conteo celular para el co-cultivo entre *C. minor*. y *Chlorella spp*. en hidrogel con sus respectivos controles. Se indica el resultado del test estadístico al comparar contra el control de la especie en monocultivo: no significativo ($p > 0.1$ - ns), significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

El último co-cultivo evaluado se realizó entre ambas especies de microalgas seleccionadas. En los resultados de la figura 16 se puede observar un claro ejemplo de competencia o antagonismo entre las especies, no siendo beneficioso a la hora de realizar los co-cultivos. Esto es evidente al ver que *C. minor* disminuye aproximadamente un orden en su concentración celular final al encontrarse en presencia de *Chlorella spp*. A medida que la proporción de *Chlorella spp*. aumenta respecto a *C. minor*, esta última disminuye aún más su crecimiento, pasando de una concentración de más de $8x10^7$ cel.mL^{-1} a $1,2x10^7$ en un ratio 3:1 (*C. minor*/*Chlorella spp*.), y menor aún a $8x10^6$ y $6x10^5$ cel.mL^{-1} al aumentar progresivamente la proporción de *Chlorella spp*. en el medio. Es probable que ambas especies compitan por recursos y tengan un nicho

ecológico similar, lo que no las hace compatibles para el crecimiento en consorcio. De todas maneras, si se aprecia que *Chlorella spp*. se ve favorecida en su crecimiento cuando *C. minor* no se encuentra en exceso, como una especie de parasitismo, ya que se ve beneficiada mientras que esta última se ve perjudicada. Si bien el crecimiento en co-cultivo de estas especies no demostró ser sinérgico en estos sistemas, se trabajará a mayor escala con el mismo en relación 1:1 con el objetivo de estudiar más la relación, ya que un aumento en la concentración celular de *Chlorella spp*. podría significar un aumento en la biomasa total del sistema respecto al control.

Es importante considerar que los resultados obtenidos en hidrogel no son necesariamente escalables a otros sistemas, ya que estos pueden afectar en gran medida el tipo de interacción entre los microorganismos. Aun así, este sistema es una manera simple y rápida de evaluar posibles sinergismos en un co-cultivo.

4.2. Cultivos autotróficos en fotobiorreactor

4.2.1. Biomasa y producción lipídica

Una vez determinado el ratio óptimo de inoculación, se crecieron los co-cultivos seleccionados en FBR a escala de Schotts. Durante 15 días se monitoreó la concentración celular de cada especie tanto en el co-cultivo como en cultivo axénico. Respecto al co-cultivo 1:1 entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. se puede apreciar que el número de células por mililitro de la primera aumenta rápidamente hasta llegar a las $7.6x10^7$ cel.mL^{-1} (Figura 17 – A). Este valor es del mismo orden, aunque superior a las $5.1x10^7$ cel.mL^{-1} máximas del control en monocultivo. Algo similar se ve para *Rhodotorula spp*., para la cual no se apreció crecimiento en monocultivo, pero si un crecimiento significativo en presencia de la microalga. Esto conllevó a un aumento del 16% en la biomasa total obtenida (Figura 19). Aun así, el crecimiento de la levadura es mucho menor al de la microalga, probablemente dado la limitada fuente de carbono para esta en el medio, proporcionada únicamente por la microalga. Este efecto corrobora lo anteriormente observado en el co-cultivo en hidrogel, por lo que se podría afirmar que existe un sinergismo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. al crecer en co-cultivo, lo que conlleva a un aumento en la biomasa total obtenida. Como ya mencionado

anteriormente, este tipo de sinergismo entre ambos géneros ya ha sido observado en modalidad autotrófica.

Para el caso del co-cultivo 1:1 entre *Rhodotorula spp*. y *C. minor* no se apreció un aumento significativo en el crecimiento de la microalga respecto al monocultivo, que en ambos casos rondó las $20x10^7$ cel.mL^{-1} (Figura 17 - B). Sin embargo, si se aprecia un leve crecimiento de *Rhodotorula spp*. al encontrarse en presencia de *C. minor*, algo que no se ve en el monocultivo de la misma. Este crecimiento de la levadura no conllevó a una diferencia significativa en la biomasa seca total con respecto al control, por lo que se aprecia una discordancia respecto a los resultados obtenidos en hidrogel. Es posible que la relación sinérgica en este co-cultivo venga dada por la mitigación de factores limitantes encontrados únicamente en el hidrogel, que como se discutió antes puede relacionarse a la aireación del sistema. Esto demuestra que el tipo de sistema empleado es un parámetro importante que influencia la interacción entre dos microorganismos.

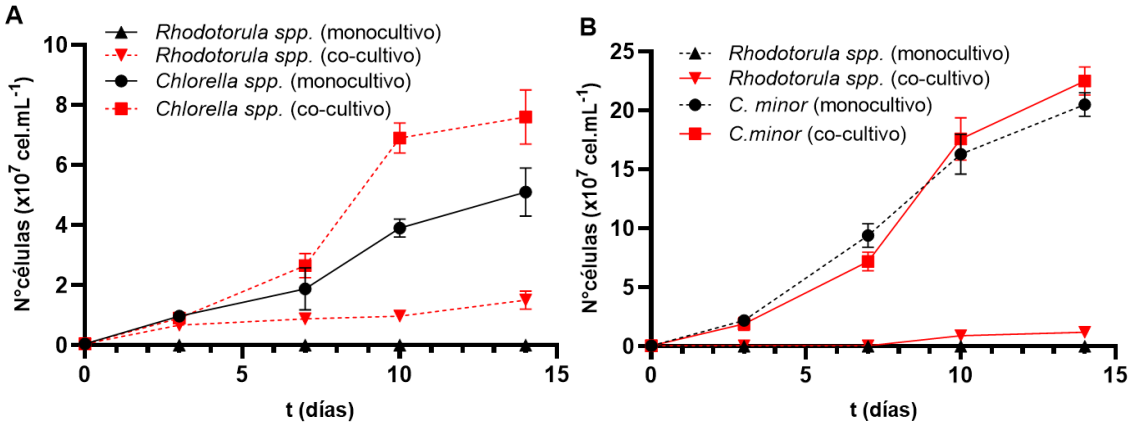

Figura 17. Evolución de la concentración celular (en células por mililitro), para cada especie en el tiempo, tanto en co-cultivo como en cultivo aislado. **A**. Co-cultivo 1 (*Rhodotorula/Chlorella*). **B**. Co-cultivo 2 (*Rhodotorula/C.minor*).

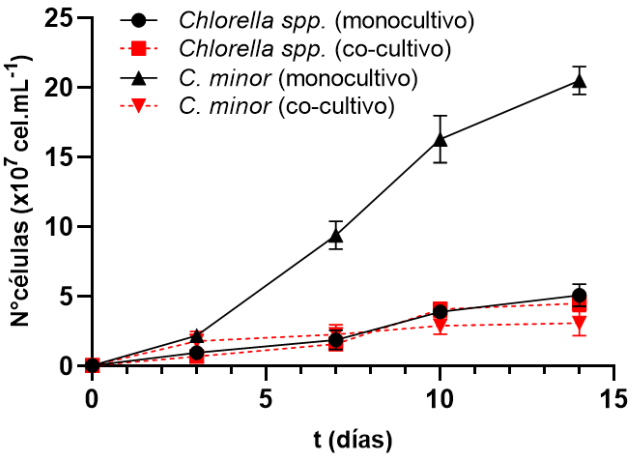

Figura 18. Evolución de la concentración celular (en células por mililitro), para cada especie del co-cultivo 3 (*Chlorella/C. minor*) en el tiempo. Se muestran también los respectivos controles de las especies en monocultivo.

Por último, el co-cultivo entre ambas microalgas resultó al igual que en el ensayo de hidrogel, en una reducción del crecimiento de *C. minor* respecto al control, mientras que no se observó el aumento anteriormente visto en el hidrogel de la concentración celular de *Chlorella spp*. (Figura 18). En este caso la cantidad de biomasa obtenida no varió significativamente respecto a los controles, por lo que se descarta una relación benéfica para el co-cultivo entre estas dos especies en el sistema y condiciones utilizadas.

En cuanto a la producción lipídica, se observa que *Chlorella spp*. alcanzó los 0.2 $g.L^{-1}$ y un contenido lipídico de 0.17 $g.g^{-1}$ (Figura 19). Estos valores son mucho menores a los reportados por otros autores para el crecimiento de dicho género en otros medios. A modo de ejemplo, Zhu et al. (2013a) y Zhu et al. (2013b), reportaron concentraciones lipídicas de 1.11 y 9.87 $g.L^{-1}$ en distintos tipos de aguas residuales para *C. zofingiensis*. Por otro lado, Qiu et al. (2011), obtuvieron 0.81 $g.L^{-1}$ al emplear como medio agua residual de procesamiento de semillas de soja con *C. pyrenidosa*. Resultados similares se han obtenido con *C. vulgaris* en efluentes de destilerías (103–106). Si bien estos medios poseen características completamente diferentes a las aguas residuales hidropónicas, como una alta carga de materia orgánica y baja concentración de nitrógeno, demuestra que el efluente no es quizás el medio ideal para la obtención de lípidos. Esto tendría sentido al considerar que tanto la deficiencia de nitrógeno como de fósforo son desencadenantes del aumento en la acumulación intracelular de lípidos por

parte de las microalgas (107). Respecto a la obtención de lípidos en aguas residuales hidropónicas, Yousif et al. (2022), reportan una concentración lipídica de 0.034 $g.L^{-1}$, siendo este valor mucho menor al alcanzado en el presente trabajo, sin embargo el grupo de trabajo reportó una concentración de biomasa alcanzada de apenas 0.23 $g.L^{-1}$ en autotrofia. En cuanto al contenido lipídico, tanto Yousif et al. (2022), como Bertoldi et al. (2006), reportan valores de entre 0.15 – 0.17 $g.g^{-1}$, coherente a los reportados en esta tesis.

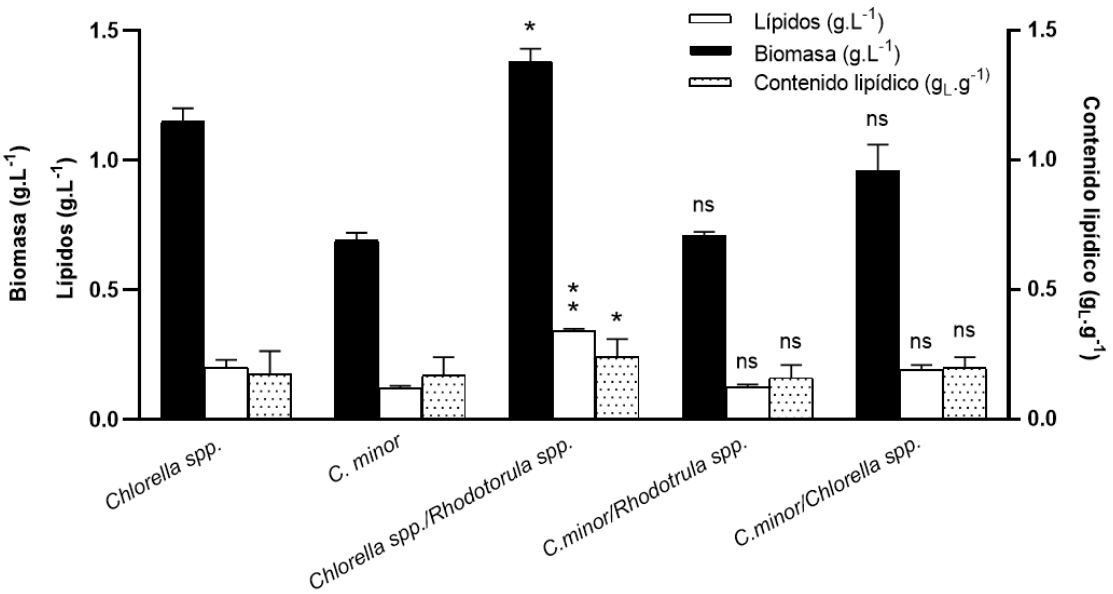

Figura 19. Resultados de biomasa, lípidos y contenido lipídico (en gramos de lípido por gramo de biomasa), para cada microalga en co-cultivo y monocultivo en efluente. No se muestra el control de *Rhodotorula spp*. en monocultivo. Se indica el resultado del test estadístico al comparar contra el control de la especie en monocultivo: no significativo ($p > 0.1$ - ns), significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

Se puede apreciar, en la figura 19, que tanto la concentración de lípidos como el contenido lipídico del co-cultivo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. son mayores que los del control en monocultivo, alcanzándose valores de 0.34 $g.L^{-1}$ y 0.24 $g.g^{-1}$ respectivamente. Ya ha sido ampliamente reportado que los co-cultivos entre microalgas y levaduras oleaginosas puede aumentar significativamente los rendimientos lipídicos de los cultivos algales, por lo que se concluye que el sinergismo entre ambas especies aumenta tanto la producción de biomasa como de lípidos en aguas residuales hidropónicas (35).

El cultivo de *C. minor* resultó en un una concentración lipídica de 0.12 $g.L^{-1}$ y en un contenido lipídico de 0.17 $g.g^{-1}$. Nuevamente se obtuvieron resultados menores a los reportados para otros medios, en los que se han alcanzado contenidos lipídicos de entre el 23 – 48 % para la especie. En el caso de *C. minor* no se tienen referencias en aguas residuales hidropónicas. Esto vuelve a cuestionar la conveniencia de destinar el efluente a la producción de lípidos empleando microalgas. Para el co-cultivo de *C. minor* y *Rhodotorula spp*., y entre *C. minor* y *Chlorella spp*. no se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de lípidos obtenidos respecto a los controles, no habiendo referencias previas de sinergismos entre dichas especies.

En base a lo anteriormente discutido se decidió continuar trabajando en distintos sistemas con el co-cultivo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*., que demostró aumentar la producción de biomasa y lípidos en el efluente. Cabe resaltar que este es el primer reporte de ensayos de co-cultivos en aguas residuales hidropónicas.

4.2.2. Producción de carotenoides

El tercer producto de valor agregado evaluado fueron los carotenoides (Figura 20). Estos metabolitos actúan tanto como auxiliares en la fotosíntesis, así como en respuesta a diversos tipos de estrés en las células, principalmente del tipo oxidativo (38).

Para el monocultivo de *Chlorella spp*. se obtuvo una concentración de 4221.88 $\mu g.L^{-1}$ y un contenido de carotenoides de 3792 $\mu g.g^{-1}$ (3.792 $mg.g^{-1}$) (Tabla 8 - Anexo). Al igual que con la producción de lípidos, la síntesis de estos metabolitos no se vio favorecida por el cultivo en el efluente en modalidad autotrófica, siendo estos valores menores a los reportados en bibliografía para la especie. Por ejemplo, Campenni' et al. (2013), obtuvieron un contenido de carotenoides de 60 $mg.g^{-1}$ para *Chlorella spp*. (108). La síntesis de carotenoides aumenta con condiciones de estrés como la deficiencia de nitrógeno, fósforo, y otros parámetros como alta intensidad lumínica y altas temperaturas. Es posible que ninguna de estas condiciones se haya dado en los cultivos establecidos. Otro parámetro que desencadena la síntesis de carotenoides es el estrés salino (109), que si bien podría darse en el medio, no mostró influenciar los resultados

obtenidos. Estos resultados no se vieron influenciados por el co-cultivo con *Rhodotorula spp*. ni con *C. minor*, sin diferencia significativa entre los valores hallados.

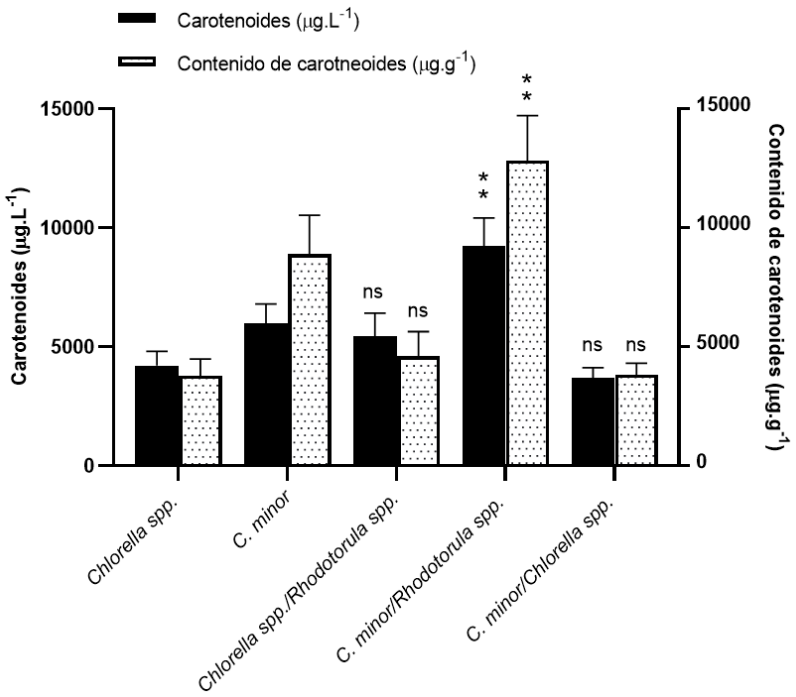

Figura 20. Producción de carotenoides para los co-cultivos en modalidad autotrófica.

El monocultivo de *C. minor* logró alcanzar valores mayores al de *Chlorella spp*., llegando a 5978.13 µg.L^{-1} y 8896.02 µg.g^{-1}. De todos modos, estos valores siguen siendo menores a los reportados por bibliografía. Menezes et al. (2016), reportan valores de 45 y 27 mg.L^{-1} para dos medios de cultivo distintos (91). En este caso el co-cultivo con *Rhodotorula spp.* si demostró aumentar significativamente ambos parámetros, alcanzándose cantidades de carotenoides de 9234.38 µg.L^{-1} y 12825.52 µg.g^{-1} (Figura 20). Aun así, estos siguen siendo bajos respecto a los valores bibliográficos. Si bien en Zhang et al. (2019), se reportó un incremento en la producción de carotenoides al co-cultivar *R. glutinis* y *C. vulgaris* empleando aguas residuales de producción de almidón como medio, los co-cultivos entre microalgas y levaduras no parecen ser una estrategia común para dicho fin (110).

4.3. Sistemas mixotróficos y heterotróficos

4.3.1. Crecimiento y generación de biomasa

Una vez seleccionado el co-cultivo entre *Chlorella spp.* y *Rhodotorula spp*., se procedió a evaluar el crecimiento en modalidad heterotrófica y mixotrófica. Ambos cultivos fueron monitoreados por recuento celular en cámara de Neubauer. Se muestran los resultados en la figura 21. En cuanto al control en monocultivo de *Chlorella spp*., se aprecia un crecimiento significativamente más rápido que en autotrofia para ambas modalidades, alcanzándose la fase estacionaria entre los 7 - 10 días, alcanzándose a los 15 días para los cultivos en autotrofia. Las biomasas alcanzadas por los monocultivos en ambas modalidades fueron mayores a la del monocultivo de *Chlorella spp*. en autotrofia, siendo estas de 1.76 y 1.66 $g.L^{-1}$ para heterotrofia y mixotrofia respectivamente. A partir de esto se concluye que la modalidad trófica más adecuada para la generación de biomasa en *Chlorella spp.* en agua residual hidropónica es la heterotrofia. Yousif et al. (2022) (30), ya habían incursionado en ambas modalidades tróficas para *Chlorella vulgaris* y en efluente, obteniendo biomasas máximas de 1.26 y 1.03 $g.L^{-1}$ en mixotrofia y heterotrofia respectivamente (Figura 22). Estos valores son menores a los obtenidos en el presente trabajo, por lo que se obtuvieron las mayores cantidades de biomasa hasta el momento reportadas para agua residual de hidroponia y en las tres modalidades tróficas ensayadas. Aun así, los investigadores del trabajo mencionado emplearon una concentración de glucosa del 0.5 %, seis veces menor a la empleada en el cultivo de este trabajo. Esto podría ser una limitante para el crecimiento de la microalga.

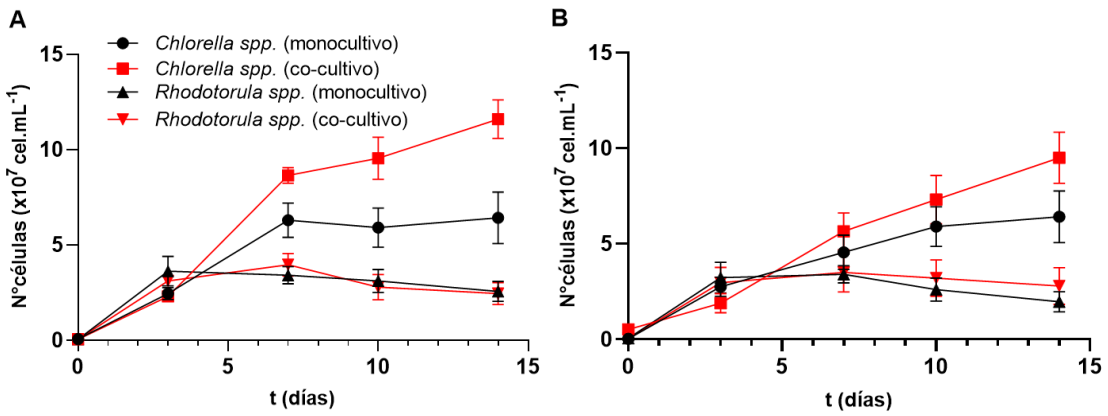

Figura 21. Evolución de la concentración celular (en células por mililitro), para Chlorella spp. y Rhodotorula spp., en co-cultivo y monocultivo, creciendo en sistemas heterotróficos (A), y mixotróficos (B).

Contrario a lo observado en autotrofia, y corroborando lo visto en el ensayo de crecimiento en efluente para levaduras, si se apreció un crecimiento significativo de *Rhodotorula spp*. en las modalidades heterotrófica y mixotrófica. En estos casos no se apreció una diferencia significativa del crecimiento de la levadura entre el co-cultivo y el monocultivo. Esto sustentaría la hipótesis de que el crecimiento de *Rhodotorula spp.* observado en co-cultivo en autotrofia vendría dado únicamente por los azúcares brindados por la microalga.

En el caso de *Chlorella spp*., se puede ver que en ambas modalidades el número de células por mililitro en co-cultivo aumenta significativamente respecto al monocultivo, llegando a las 10 y $12x10^7$ cel.mL^{-1} para mixotrofia y heterotrofia respectivamente. Esto se ve reflejado en la biomasa seca alcanzada en ambos sistemas con respecto al monocultivo, que pasó a ser de 2.67 y 2.08 g.L^{-1}, representando aumentos del 52 y 25 % respectivamente. En la figura 22 se comparan, además, estos valores con los sistemas en autotrofia, respecto a los cuales se aprecia un aumento significativo en la biomasa obtenida a tiempo final. En base a esto se concluye que no solo los sistemas heterotróficos y mixotróficos aumentan la producción de biomasa y reducen el tiempo de crecimiento, sino que el co-cultivo entre ambas especies es sinérgico para dicho parámetro en todas las modalidades ensayadas.

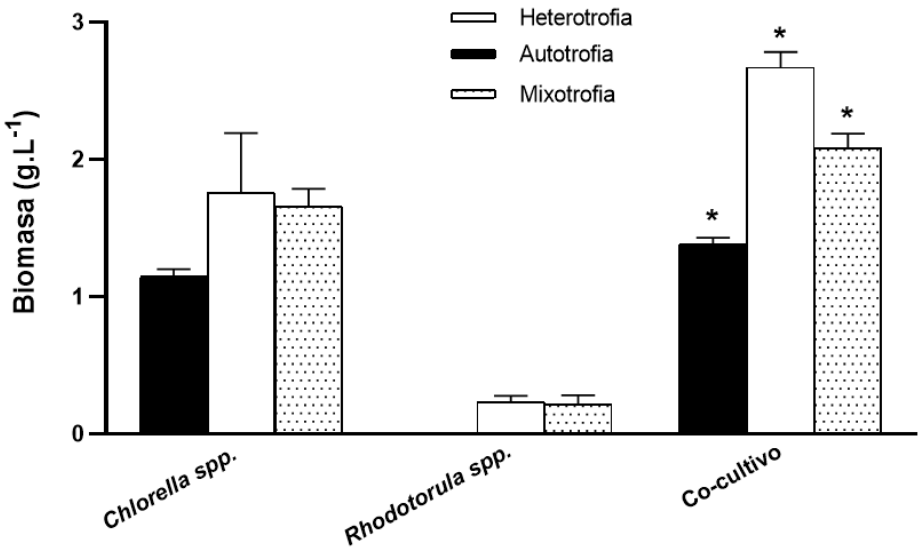

Figura 22. Biomasa alcanzada por el co-cultivo y, cada especie en monocultivo, en los sistemas mixótrofos y heterotróficos. Se comparan con los valores del sistema autotrófico. Se indica el resultado del test estadístico al comparar contra el control del sistema en el monocultivo: no significativo ($p > 0.1$ - ns), significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

Estos ensayos en distintas modalidades sientan las bases para incorporar otro tipo de residuos al cultivo, que pueden también estar relacionados a la industria hidropónica. Idealmente, este segundo residuo debería presentar una alta carga de carbono orgánico, con el fin de sustituir a la glucosa comercial del medio. Una problemática asociada tanto a la producción en hidroponia como a otros sistemas agrícolas es la generación de restos vegetales altos en celulosa y lignina (111). Estos podrían ser tratados para que sus azúcares se encuentren biodisponibles para los microorganismos del co-cultivo, realizando una co-revalorización de residuos, y reduciendo costos para el establecimiento de sistemas heterotróficos y mixotróficos.

En otras investigaciones se han logrado establecer, exitosamente, co-cultivos entre microalgas y levaduras para la revalorización de jugo de caña de azúcar, hidrolizado de bagazo de yuca, almidón y restos de alimentos hidrolizados. Entre las especies de microalgas empleadas destacan *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella pyrenoidosa*, mientras que *Cryptococcus curvatus*, *Torulaspora maleeae*, *R. toruloides*, *R. glutinis* y *Saccharomycopsis fibuligera* (35).

Una posible desventaja de los co-cultivos en modalidad mixotrófica y heterotrófica, cuando el producto de interés es principalmente la biomasa algal, es la gran proporción de biomasa de levadura en el medio, mucho mayor a la que se obtendría en modalidad autotrófica. Para esto, varios autores han planteado la posibilidad de realizar una separación espacial, por ejemplo por inmovilización, de los microorganismos. Esta podría separar a los microorganismos entre sí, permitiendo separar sus respectivas biomasas (112). También, podría separar a los organismos del propio medio, con el objetivo de facilitar la cosecha de la biomasa y a su vez descartar el efluente, lo que facilitaría el proceso desde un punto de vista de la biorremediación (113). Sería interesante evaluar la separación espacial e inmovilización de microorganismos en este tipo de efluente.

4.3.2. Producción lipídica

En la tabla 9 se muestran los resultados de rendimientos lipídicos alcanzados para los cultivos en modalidad mixotrófica y heterotrófica. Como se puede apreciar, el monocultivo de *Chlorella spp*. en heterotrofia alcanzó una concentración lipídica de 0.241 $g.L^{-1}$, significativamente mayor al control de la especie en autotrofia. Esto no se observa respecto a la modalidad mixotrófica, la cual alcanzó una concentración lipídica de 0.19 $g.L^{-1}$. En cuanto a los controles de *Rhodotorula spp*., no se apreció una diferencia significativa entre los mismos, que alcanzaron concentraciones de 0.026 y 0.024 $g.L^{-1}$, significativamente mayores a la autotrofia en la cual no se observó crecimiento. En el caso de los co-cultivos, se encontró que estas concentraciones aumentaron significativamente a 0.39 y 0.29 $g.L^{-1}$ para heterotrofia y mixotrofia respectivamente. Sin embargo, este resultado es engañoso, ya que para todos los cultivos, tanto en monocultivo como en consorcio, en ambas modalidades, llegaron a un contenido lipídico de entre 0.11 – 0.15 $g.g^{-1}$, no siendo significativamente distintos al control de *Chlorella* en autotrofia. El aumento en las concentraciones lipídicas se da únicamente por el aumento en la concentración de biomasa, en función de la cual el parámetro no se encuentra normalizado. En base a esto se puede afirmar que ambas modalidades no favorecen la acumulación de lípidos en este medio. Esto es contradictorio a lo reportado por autores que aseguran ambas modalidades favorecen la acumulación intracelular de lípidos. En Yousif et al. (2019), se vio que la modalidad

mixotrófica aumentaba el contenido de lípidos de 34 % al 44 % comparado al cultivo en heterotrofia en aguas residuales hidropónicas y al 49 % en heterotrofia (90). En ese caso tanto el contenido de NPK como de glucosa difiere sustancialmente de la empleada en el presente trabajo, lo que podría estar causando dichas diferencias. Así, se llega a la hipótesis que este tipo de residuo no es el ideal para la producción de lípidos.

Tabla 9. Lípidos totales (en gramos de lípido por litro de medio de cultivo y gramos de lípidos por gramo de biomasa), para cada sistema en modalidad heterotrófica (H), y mixotrófica (M). Se indica el resultado del test estadístico respecto al control: significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - ******).

	MODALIDAD	**LÍPIDOS TOTALES**	
SISTEMA	**H/M**	**$g.L^{-1}$**	**$g.g^{-1}$**
Chlorella spp.	H	0.241 ± 0,001	0.13 ± 0.05
	M	0.19 ± 0.01	0.14 ± 0.04
Rhodotorula spp.	H	0.026 ± 0.002	0.11 ± 0.02
	M	0.024 ± 0.003	0.11 ± 0.04
Co-cultivo	H	0.39 ± 0.01**	0.14 ± 0.05
	M	0.29 ± 0.01**	0.15 ± 0.05

4.3.3. Producción de carotenoides

En la tabla 10 se muestran los valores de carotenoides totales obtenidos para los cultivos en mixotrofia y heterotrofia. En estos se puede ver un aumento significativo en la concentración de carotenoides de los monocultivos de *Chlorella spp*. respecto al monocultivo en modalidad autotrófica. En el caso de los sistemas heterotróficos, y similar a lo sucedido en el caso de los lípidos, este aumento en la concentración de carotenoides solo viene dado por un aumento en la biomasa total, ya que el contenido lipídico no presentó una diferencia significativa respecto a la autotrofia. Esto podría darse debido a que la síntesis de carotenoides se encuentra regulada por luz, siendo un método muy empleado para la inducción de la producción de carotenoides en microalgas la exposición a estrés lumínico. En heterotrofia los co-cultivos se crecieron

en total oscuridad, pudiendo limitar la síntesis de estos pigmentos (109). De todos modos, no se aprecia una disminución en el contenido de carotenoides, lo que podría descartar una posible inhibición de la biosíntesis.

Por otro lado, el monocultivo de *Chlorella spp*. en mixotrofia si demostró aumentar tanto la concentración de carotenoides en el medio, así como el contenido de carotenoides totales, siendo estos de 21734.38 $\mu g.L^{-1}$ y 13093.00 $\mu g.g^{-1}$ respectivamente. Ha sido ampliamente reportado el hecho de que la mixotrofia puede aumentar la síntesis y acumulación de carotenoides en microalgas (114). Sin embargo, estos valores siguen siendo bajos comparados a valores de bibliografía anteriormente mencionados.

Los monocultivos de *Rhodotorula spp*. resultaron en concentraciones de carotenoides de 130.21 y 110.45 $\mu g.L^{-1}$ en heterotrofia y mixotrofia respectivamente, así como en contenidos de carotenoides de 558.83 y 516.12 $\mu g.g^{-1}$, no habiendo diferencias significativas entre los mismos. En Allahkarami et al. (2021), se determinó el contenido en carotenoides de una especie de *Rhodotorula spp*. en un medio rico en glicerol, obteniendo un rendimiento máximo de 223 $\mu g.g^{-1}$. Si bien este valor es casi el doble de los reportados en el presente estudio, podría ser coherente con el hecho de que el efluente, rico en nitrógeno y fósforo, inhiba la síntesis de este tipo de metabolitos.

El co-cultivo en modalidad heterotrófica no demostró aumentar significativamente la producción de carotenoides, mientras que el mismo en mixotrofia causó una disminución en los valores de carotenoides totales. Nuevamente, solo se ha reportado un caso en el que un co-cultivo entre microalgas y levaduras propicia la síntesis de carotenoides (110), por lo que es posible que la estrategia no sea acertada para dicho fin. Si bien los carotenoides son considerados como estructuras lipídicas, los mismos divergen de los triglicéridos en el metabolismo celular, pudiendo no estar necesariamente asociados al aumento en la producción lipídica por parte de los co-cultivos.

Tabla 10. Carotenoides totales (en microgramo de carotenoide por litro de medio de cultivo y microgramo de carotenoide por gramo de biomasa), para cada sistema en modalidad heterotrófica (H), y mixotrófica (M). Se indica el resultado del test estadístico respecto al control: significativo ($p < 0.1$ - *****), y muy significativo ($p < 0.05$ - **).

	MODALIDAD	**CAROTENOIDES TOTALES**	
SISTEMA	**H/M**	**$\mu g.L^{-1}$**	**$\mu g.g^{-1}$**
Chlorella spp.	H	10328.13 ± 860.10	5868.25 ± 902.41
	M	21734.38 ± 2043.20	13093.00 ± 1230.74
Rhodotorula spp.	H	130.21 ± 15.20	558.83 ± 64.38
	M	110.45 ± 21.30	516.12 ± 98.51
Co-cultivo	H	11921.88 ± 1348.44	4459.55 ± 508.28
	M	13953.13 ± 1195.10**	6719.01 ± 578.45**

Por último y en base a los resultados obtenidos, sería posible mejorar los rendimientos en la producción de lípidos y carotenoides con estrategias en dos etapas (*two-stage cultivation strategies*), y sometiendo el sistema a diversos factores de estrés como intensidad lumínica y concentración salina (38).

5. Remoción de N y P

El enfoque en biorremediación del proyecto fue la evaluación de la remoción de N y P del efluente, siendo uno de los objetivos específicos del trabajo. La estrategia empleada fue el crecimiento en co-cultivos de microalgas y levaduras, y se evaluó específicamente para el conformado por *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. A su vez, se evaluó la capacidad de remoción de dichos nutrientes en modalidad autotrófica, heterotrófica y mixotrófica. Ya que la forma predominante de N en el efluente son los nitratos (NO_3^-), alcanzando un 100% de las especies totales, se decidió analizar dicha especie, así como el P total en el mismo.

Tabla 11. Concentración de NO_3^- y P total (ppm), del sobrenadante obtenido luego del crecimiento de *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. en co-cultivos para las tres modalidades tróficas ensayadas: autotrofia, heterotrofia y mixotrofia.

Modalidad	NO_3^- (ppm) (Remoción)	P_{total} (ppm) (Remoción en %)
Autotrofia	95.80 (48.80%)	15.00 (84.00%)
Heterotrofia	3.30 (98.20%)	35.83 (61.80%)
Mixotrofia	75.00 (59.93%)	40.00 (57.32%)

El co-cultivo seleccionado logró remover exitosamente un 48.8 % del nitrógeno total del medio, así como un 84.0 % del fósforo disuelto, en modalidad autotrófica. Como se aprecia en la Tabla 11, la remoción de NO_3^- aumenta a 98.2 y 75.0 %, las modalidades heterotróficas y mixotróficas respectivamente. En cuanto al P total, se observó que los sistemas en heterotrofia y mixotrofia logran remover un 61.8 y 57.3% respectivamente. En base a esto se corrobora lo planteado por otros autores, quienes aseguran que especies del género *Chlorella* actúan como agentes de biorremoción de nutrientes (115). Entre algunos de ellos, S. Månsson (2012), reporta una remoción del 86 % del amonio del agua residual, y del 47 % para el P total, al emplear a *Chlorella vulgaris* como agente de biorremoción (89). En Y. Adam (2019), se logró una eficiencia de remoción para ambos parámetros superior al 90%, empleando el mismo sistema, mientras que en Salazar et al. (2021) (116), estas fueron de 60 y casi 100 % para N y P respectivamente al emplear una cepa de *Scenedesmus obliquus*. Por último, en un estudio más reciente, Yousif et al. (2022), lograron la remoción de casi el 100 % de N y P en el agua residual empleando nuevamente *Chlorella vulgaris* pero al crecer en heterotrofia y mixotrofia (90).

En base a los resultados obtenidos, se podría decir que el co-cultivo en heterotrofia fue expuesto a una etapa de crecimiento en deficiencia de N. Esto no afectó de manera positiva la acumulación lipídica de los microorganismos, quizás por el exceso de P en el medio. También sería necesario comprobar que el método de extracción es el adecuado

para las microalgas, siendo necesario realizar un control de las mismas creciendo en un medio que favorezca la acumulación de dichos metabolitos.

Las altas concentraciones de nitratos y fósforo en el efluente podrían ser ideales para obtener otras macromoléculas, como por ejemplo producir proteínas unicelulares microbianas (PUC). Las mismas se emplean como suplemento alimenticio animal y humano, y poseen un alto valor en el mercado. Se ha observado que los co-cultivos entre *Chlorella* y *Rhodotorula* aumentan la acumulación celular de proteínas al compararlos con monocultivos de dichas especies. Este podría ser el próximo paso en el diseño de un sistema rentable (117).

La exitosa remoción de fósforo y nitrógeno en los co-cultivos diseñados es un resultado prometedor para la implementación de los mismos como sistemas de tratamiento secundario de residuos. Aun así, sería necesario optimizar la remoción para que los valores se encuentren dentro de lo permitido por el Decreto N°273/979 para descarte directo en cursos de agua, ya que incluso después del tratamiento biológico no se alcanzan dichos máximos establecidos. Otro destino del efluente tratado podría ser el uso como agua de riego, sin embargo sería necesario realizar otros análisis fisicoquímicos para garantizar lo establecido en la norma: conductividad eléctrica (CE), pH, relación adsorción de sodio (RAS)d, cloruros y bicarbonato.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

1. Conclusiones

En el presente trabajo se diseñaron y escalaron co-cultivos entre microalgas y levaduras para la revalorización de aguas residuales de producción hidropónica, evaluándose a los mismos en la producción de biomasa, lípidos y carotenoides.

En primer lugar, se demostró que el agua residual hidropónica constituye un medio rico para el crecimiento de microalgas, logrando crecerse exitosamente seis, siendo este el primer reporte de crecimiento en este tipo de efluente para tres de ellas: *Choricystis minor*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Spirulina major*. Se reporta la mayor cantidad de biomasa obtenida para *Chlorella spp*. en este tipo de efluente y en modalidad autotrófica, heterotrófica y mixotrófica hasta el momento. Estos valores fueron de 1.19, 1.76 y 1.66 $g.L^{-1}$ respectivamente. A su vez, se identificó una cepa de *Rhodotorula spp*. (levadura oleaginosa productora de carotenoides) capaz de crecer en la solución en presencia de glucosa.

A partir de estos dos organismos y una segunda microalga (*C. minor*), se diseñaron co-cultivos, identificándose sinergismos al crecer a cada microalga con la levadura en relación 1:1 en hidrogel. A mayor escala, el co-cultivo entre *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*. demostró aumentar la producción de biomasa respecto a los controles en todas las modalidades tróficas evaluadas, obteniéndose biomasas totales de 1.38, 2.67 y 2.08 $g.L^{-1}$ en autotrofia, heterotrofia y mixotrofia respectivamente. También se observó un aumento significativo en la producción lipídica al crecer ambas especies en consorcio en modalidad autotrófica, no viéndose el mismo efecto para el resto de las modalidades.

Respecto a la producción de carotenoides, la misma se ve favorecida por el co-cultivo de C. *minor* y *Rhodotorula spp*. en autotrofia. También se apreció que la mixotrofia favorece la acumulación de carotenoides en *Chlorella spp*., mientras que el co-cultivo entre esta y *Rhodotorula spp*. no demostró aumentar la cantidad de carotenoides producidos en autotrofia o heterotrofia, observándose el efecto opuesto en los sistemas mixotróficos.

Tanto los rendimientos de lípidos como de carotenoides fueron bajos comparados con valores de bibliografía para otros medios, concluyéndose que el mismo no es el ideal para la obtención de dichos metabolitos. Aun así, la biomasa obtenida podría tener potencial uso como biofertilizantes, así como suplementos y alimento animal o humano. Como aspecto de la biorremediación en la cual se enfoca el proyecto, se logró una remoción máxima del 98.2 % de los nitratos al crecer el co-cultivo de *Chlorella spp.* y *Rhodotorula spp*. en heterotrofia, y un 84.0 % del fósforo total del efluente en el sistema autotrófico.

Finalmente, se destaca este trabajo como el primero en emplear co-cultivos de microalgas y otros organismos para la revalorización y biorremediación de aguas residuales de producción hidropónica.

Perspectivas a futuro

El presente trabajo sienta las bases para continuar estudiando el potencial de los co-cultivos en la biorremediación y revalorización de aguas residuales hidropónicas, concluyendo en resultados alentadores. Es necesario seguir trabajando con esta estrategia y, a su vez, incluir otras con el objetivo de aumentar los rendimientos de biomasa y metabolitos de interés.

En primer lugar, se debería realiza una caracterización de los productos obtenidos en el presente trabajo (lípidos y carotenoides), con el objetivo de determinar que de los mismos sean adecuados para ser empleados en distintos procesos.

Sería pertinente continuar evaluando posibles especies de microalgas productoras de metabolitos de alto valor agregado, así como especies de levaduras, capaces de crecer en el agua residual. Sería de particular interés la identificación de especies y cepas de levaduras halotolerantes y capaces de acumular un mayor porcentaje lipídico, como de los géneros *Yarrowia* y *Lipomyces*. A su vez, es necesario continuar con la búsqueda de posibles interacciones sinérgicas entre ambos tipos de microorganismos. Sería interesante estudiar los sinergismos identificados al separar o inmovilizar los

microorganismos en los co-cultivos, facilitando así la cosecha de biomasa y la biorremediación del efluente.

En cuanto al co-cultivo de *Chlorella spp*. y *Rhodotorula spp*., sería necesario profundizar en la optimización de parámetros del escalado: sistema, aireación, intensidad lumínica, fotoperiodo y concentración de la fuente de carbono según corresponda. También se dejan sentadas las bases para comenzar ensayos incluyendo otros tipos de residuos con alto contenido de carbono orgánico, como desechos vegetales o fuentes de azúcares más complejas.

En cuanto a la producción de metabolitos de interés, sería posible mejorar los rendimientos en la producción de lípidos y carotenoides quizás con estrategias en dos etapas (*two-stage cultivation strategies*), y sometiendo el sistema a diversos factores de estrés como intensidad lumínica y concentración salina. De todos modos, los resultados obtenidos sugerirían incursionar en la producción de otras macromoléculas, siendo prometedora la producción de proteínas unicelulares microbianas (PUC, o *Single-cell proteins*).

REFERENCIAS

1. Mujtaba G, Lee K. Advanced treatment of wastewater using symbiotic co-culture of microalgae and bacteria. Applied Chemistry for Engineering. 2016;27(1):1–9. doi:10.14478/ace.2016.1002

2. Nations U. Revision of World Population Prospects, United Nations. 2015.

3. Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. Foods. 2017;6(7):1–21. doi:10.3390/foods6070053

4. Daszkiewicz T. Food Production in the Context of Global Developmental Challenges. Agriculture (Switzerland). 2022;12(6). doi:10.3390/agriculture12060832

5. Jensen MH. Hydroponics. HortScience. 1997;1018–1020(6):29–35. doi:10.1680/jcien.19.00011

6. Sambo P, Nicoletto C, Giro A, Pii Y, Valentinuzzi F, Mimmo T, Lugli P, Orzes G, Mazzetto F, Astolfi S, et al. Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. Frontiers in Plant Science. 2019;10(July). doi:10.3389/fpls.2019.00923

7. Hosseinzadeh S, Verheust Y, Bonarrigo G, Van Hulle S. Closed hydroponic systems: operational parameters, root exudates occurrence and related water treatment. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2017;16(1):59–79. doi:10.1007/s11157-016-9418-6

8. Sardare MD, Admane S. A Review on Plant Without Soil - Hydroponics. International Journal of Research in Engineering and Technology. 2019;02(03):299–304. doi:10.15623/ijret.2013.0203013

9. Velazquez-Gonzalez RS, Garcia-Garcia AL, Ventura-Zapata E, Barceinas-Sanchez JDO, Sosa-Savedra JC. A Review on Hydroponics and the Technologies Associated for

Medium-and Small-Scale Operations. Agriculture (Switzerland). 2022;12(5):1–21. doi:10.3390/agriculture12050646

10. Sharma N, Acharya S, Kumar K, Singh N, Chaurasia OP. Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. Journal of Soil and Water Conservation. 2018;17(4):364. doi:10.5958/2455-7145.2018.00056.5

11. Baiyin B, Tagawa K, Yamada M, Wang X, Yamada S, Shao Y, An P, Yamamoto S, Ibaraki Y. Effect of nutrient solution flow rate on hydroponic plant growth and root morphology. Plants. 2021;10(9):1–14. doi:10.3390/plants10091840

12. Lee S, Lee J. Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: Types and characteristics of hydroponic food production methods. Scientia Horticulturae. 2015;195:206–215. http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.011. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.011

13. Domingues DS, Takahashi HW, Camara CAP, Nixdorf SL. Automated system developed to control pH and concentration of nutrient solution evaluated in hydroponic lettuce production. Computers and Electronics in Agriculture. 2012;84:53–61. http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2012.02.006. doi:10.1016/j.compag.2012.02.006

14. Park JBK, Craggs RJ, Sukias JPS. Removal of nitrate and phosphorus from hydroponic wastewater using a hybrid denitrification filter (HDF). Bioresource Technology. 2009;100(13):3175–3179. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.036. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.036

15. Gagnon V, Maltais-Landry G, Puigagut J, Chazarenc F, Brisson J. Treatment of hydroponics wastewater using constructed wetlands in winter conditions. Water, Air, and Soil Pollution. 2010;212(1–4):483–490. doi:10.1007/s11270-010-0362-8

16. Park JBK, Craggs RJ, Sukias JPS. Treatment of hydroponic wastewater by denitrification filters using plant prunings as the organic carbon source. Bioresource Technology. 2008;99(8):2711–2716. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.009

17. Park JH, Kim SH, Delaune RD, Cho JS, Heo JS, Ok YS, Seo DC. Enhancement of nitrate removal in constructed wetlands utilizing a combined autotrophic and heterotrophic denitrification technology for treating hydroponic wastewater containing high nitrate and low organic carbon concentrations. Agricultural Water Management. 2015;162:1–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2015.08.001. doi:10.1016/j.agwat.2015.08.001

18. Silva SC, Ferreira ICFR, Dias MM, Barreiro MF. Review and Industry and Market Trend Analysis. Molecules. 2020;25(3406):1–23.

19. 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. doi:10.3390/biom10081153

20. Quach-Cu J, Herrera-Lynch B, Marciniak C, Adams S, Simmerman A, Reinke RA. The effect of primary, secondary, and tertiary wastewater treatment processes on antibiotic resistance gene (ARG) concentrations in solid and dissolved wastewater fractions. Water (Switzerland). 2018;10(1). doi:10.3390/w10010037

21. Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012;19(3):257–275. http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005

22. Paddock MB. Microalgae Wastewater Treatment : a Brief History. Life Sciences, Microbiology. 2019;1(19):1–25. doi:10.20944/preprints201912.0377.v1

23. Plöhn M, Spain O, Sirin S, Silva M, Escudero-Oñate C, Ferrando-Climent L, Allahverdiyeva Y, Funk C. Wastewater treatment by microalgae. Physiologia Plantarum. 2021;173(2):568–578. doi:10.1111/ppl.13427

24. Acién FG, Gómez-Serrano C, Morales-Amaral MM, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it

be to significant urban wastewater treatment? Applied Microbiology and Biotechnology. 2016;100(21):9013–9022. doi:10.1007/s00253-016-7835-7

25. Amenorfenyo DK, Huang X, Zhang Y, Zeng Q, Zhang N, Ren J, Huang Q. Microalgae brewery wastewater treatment: Potentials, benefits and the challenges. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019;16(11). doi:10.3390/ijerph16111910

26. Amaro HM, Salgado EM, Nunes OC, Pires JCM, Esteves AF. Microalgae systems - environmental agents for wastewater treatment and further potential biomass valorisation. Journal of Environmental Management. 2023;337(February). doi:10.1016/j.jenvman.2023.117678

27. Chugh M, Kumar L, Shah MP, Bharadvaja N. Algal Bioremediation of heavy metals: An insight into removal mechanisms, recovery of by-products, challenges, and future opportunities. Energy Nexus. 2022;7(August):100129. https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100129. doi:10.1016/j.nexus.2022.100129

28. Salazar J, Valev D, Näkkilä J, Tyystjärvi E, Sirin S, Allahverdiyeva Y. Nutrient removal from hydroponic effluent by Nordic microalgae: From screening to a greenhouse photobioreactor operation. Algal Research. 2021;55(May):102247. doi:10.1016/j.algal.2021.102247

29. Caffagni De Camargo E, Casali CA, Lombardi AT, Inês M, Lima S. Coupling microalgal cultures with hydroponics: prospection for clean biotechnology processes. J. Algal Biomass Utln. 2015;6(1):88–94.

30. Yousif YID, Mohamed ES, El-Gendy AS. Using chlorella vulgaris for nutrient removal from hydroponic wastewater: experimental investigation and economic assessment. Water Science and Technology. 2022;85(11):3240–3258. doi:10.2166/wst.2022.157

31. Han T, Lu H, Zhao Y, Xu H, Zhang Y, Li B. Two-step strategy for obtaining

dunaliella sp. biomass and β-carotene from anaerobically digested poultry litter wastewater. International Biodeterioration and Biodegradation. 2019;143(May):104714. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.06.002. doi:10.1016/j.ibiod.2019.06.002

32. Liu X ya, Hong Y. Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: a Brief Review. Current Pollution Reports. 2021;7(2):227–245. doi:10.1007/s40726-021-00184-6

33. Kothari R, Pandey A, Ahmad S, Kumar A, Pathak V V., Tyagi V V. Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment. 3 Biotech. 2017;7(4):1–15. doi:10.1007/s13205-017-0812-8

34. Alishah Aratboni H, Rafiei N, Garcia-Granados R, Alemzadeh A, Morones-Ramírez JR. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. Microbial Cell Factories. 2019;18(1):1–17. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4. doi:10.1186/s12934-019-1228-4

35. Arora N, Patel A, Mehtani J, Pruthi PA, Pruthi V, Poluri KM. Co-culturing of oleaginous microalgae and yeast: paradigm shift towards enhanced lipid productivity. Environmental Science and Pollution Research. 2019;26(17):16952–16973. doi:10.1007/s11356-019-05138-6

36. Yeagle PL. The Lipids of Biological Membranes. The Membranes of Cells. 2016:27–56. doi:10.1016/b978-0-12-800047-2.00002-4

37. 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. doi:10.1080/10408398.2013.764841

38. Sun XM, Ren LJ, Zhao QY, Ji XJ, Huang H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. Biotechnology for Biofuels. 2018;11(1):1–16. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9. doi:10.1186/s13068-018-1275-9

39. Sun H, Wang Y, He Y, Liu B, Mou H, Chen F, Yang S. Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. Marine Drugs. 2023;21(2). doi:10.3390/md21020082

40. 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;802:149765. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149765. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149765

41. Hammed AM, Prajapati SK, Simsek S, Simsek H. Growth regime and environmental remediation of microalgae. Algae. 2016;31(3):189–204. doi:10.4490/algae.2016.31.8.28

42. Prathima Devi M, Swamy Y V., Venkata Mohan S. Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. Bioresource Technology. 2013;142:278–286. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.001. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.001

43. Yang C, Hua Q, Shimizu K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal. 2000;6(2):87–102. doi:10.1016/S1369-703X(00)00080-2

44. Adesanya VO, Davey MP, Scott SA, Smith AG. Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. Bioresource Technology. 2014;157:293–304. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.032. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.032

45. Ahmad I, Abdullah N, Koji I, Yuzir A, Eva Muhammad S. Evolution of Photobioreactors: A Review based on Microalgal Perspective. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2021;1142(1):012004. doi:10.1088/1757-899x/1142/1/012004

46. Anas Al-Dailami, Iwamoto Koji, Imran Ahmad, Masafumi Goto. Potential of Photobioreactors (PBRs) in Cultivation of Microalgae. Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology. 2022;27(1):32–44. doi:10.37934/araset.27.1.3244

47. Terry KL, Raymond LP. System design for the autotrophic production of microalgae. Enzyme and Microbial Technology. 1985;7(10):474–487. doi:10.1016/0141-0229(85)90148-6

48. Narala RR, Garg S, Sharma KK, Thomas-Hall SR, Deme M, Li Y, Schenk PM. Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. Frontiers in Energy Research. 2016;4(AUG):1–10. doi:10.3389/fenrg.2016.00029

49. Wen ZY, Chen F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnology Advances. 2003;21(4):273–294. doi:10.1016/S0734-9750(03)00051-X

50. Pleissner D, Lam WC, Sun Z, Lin CSK. Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. Bioresource Technology. 2013;137:139–146. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.088. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.088

51. Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research. 2011;45(1):11–36. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037

52. Barros A, Pereira H, Campos J, Marques A, Varela J, Silva J. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. Scientific Reports. 2019;9(1):1–7. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z. doi:10.1038/s41598-019-50206-z

53. Venkata Mohan S, Rohit M V., Chiranjeevi P, Chandra R, Navaneeth B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. Bioresource Technology. 2015;184:169–178. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.056. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.056

54. Barros A, Guerra LT, Simões M, Santos E, Fonseca D, Silva J, Costa L, Navalho J. Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures. Algal Research. 2017;21:35–41. http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.014. doi:10.1016/j.algal.2016.10.014

55. Gao F, Yang HL, Li C, Peng YY, Lu MM, Jin WH, Bao JJ, Guo YM. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae Chlorella sp. Bioresource Technology. 2019;282(March):118–124. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.011

56. Patel AK, Joun JM, Hong ME, Sim SJ. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. Bioresource Technology. 2019;282(March):245–253. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.024. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.024

57. Patel AK, Choi YY, Sim SJ. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. Bioresource Technology. 2020;300(November 2019):122741. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122741. doi:10.1016/j.biortech.2020.122741

58. Lowrey J, Brooks MS, McGinn PJ. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review. Journal of Applied Phycology. 2015;27(4):1485–1498. doi:10.1007/s10811-014-0459-3

59. Chojnacka K, . F-JM. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. Biotechnology(Faisalabad). 2003;3(1):21–34. doi:10.3923/biotech.2004.21.34

60. Piasecka A, Nawrocka A, Wiącek D, Krzemińska I. Agro-industrial by-product in photoheterotrophic and mixotrophic culture of Tetradesmus obliquus: Production of ω3 and ω6 essential fatty acids with biotechnological importance. Scientific Reports.

2020;10(1):1–11. doi:10.1038/s41598-020-63184-4

61. Padmaperuma G, Kapoore RV, Gilmour DJ, Vaidyanathan S. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. Critical Reviews in Biotechnology. 2018;38(5):690–703. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1390728. doi:10.1080/07388551.2017.1390728

62. Stenuit B, Agathos SN. Deciphering microbial community robustness through synthetic ecology and molecular systems synecology. Current Opinion in Biotechnology. 2015;33(1):305–317. http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.012. doi:10.1016/j.copbio.2015.03.012

63. Sanitá Lima M, Coutinho de Lucas R. Co-cultivation, Co-culture, Mixed Culture, and Microbial Consortium of Fungi: An Understudied Strategy for Biomass Conversion. Frontiers in Microbiology. 2022;12(January):10–13. doi:10.3389/fmicb.2021.837685

64. Liu L, Chen J, Lim PE, Wei D. Dual-species cultivation of microalgae and yeast for enhanced biomass and microbial lipid production. Journal of Applied Phycology. 2018;30(6):2997–3007. doi:10.1007/s10811-018-1526-y

65. Zhang Z, Ji H, Gong G, Zhang X, Tan T. Synergistic effects of oleaginous yeast Rhodotorula glutinis and microalga Chlorella vulgaris for enhancement of biomass and lipid yields. Bioresource Technology. 2014;164:93–99. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.039. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.039

66. Wang R, Tian Y, Xue S, Zhang D, Zhang Q, Wu X, Kong D, Cong W. Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of Scenedesmus obliquus and Candida tropicalis in an autotrophic system. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2016;91(5):1387–1396. doi:10.1002/jctb.4735

67. Jiang X, Liu L, Chen J, Wei D. Effects of Xanthophyllomyces dendrorhous on cell growth, lipid, and astaxanthin production of Chromochloris zofingiensis by mixed

culture strategy. Journal of Applied Phycology. 2018;30(6):3009–3015. doi:10.1007/s10811-018-1553-8

68. Shu CH, Tsai CC, Chen KY, Liao WH, Huang HC. Enhancing high quality oil accumulation and carbon dioxide fixation by a mixed culture of Chlorella sp. and Saccharomyces cerevisiae. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2013;44(6):936–942. http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2013.04.001. doi:10.1016/j.jtice.2013.04.001

69. Xue F, Miao J, Zhang X, Tan T. A new strategy for lipid production by mix cultivation of Spirulina platensis and Rhodotorula glutinis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010;160(2):498–503. doi:10.1007/s12010-008-8376-z

70. Qin L, Wei D, Wang Z, Alam MA. Advantage Assessment of Mixed Culture of Chlorella vulgaris and Yarrowia lipolytica for Treatment of Liquid Digestate of Yeast Industry and Cogeneration of Biofuel Feedstock. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2019;187(3):856–869. doi:10.1007/s12010-018-2854-8

71. Das PK, Rani J, Rawat S, Kumar S. Microalgal Co-cultivation for Biofuel Production and Bioremediation: Current Status and Benefits. Bioenergy Research. 2022;15(1). doi:10.1007/s12155-021-10254-8

72. Ishika T, Moheimani NR, Bahri PA. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017;78(July 2016):356–368. http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110. doi:10.1016/j.rser.2017.04.110

73. Rashid N, Ryu AJ, Jeong KJ, Lee B, Chang YK. Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. Energy Conversion and Management. 2019;196(May):640–648. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.05.106. doi:10.1016/j.enconman.2019.05.106

74. Nagappan S, Devendran S, Tsai PC, Jayaraman H, Alagarsamy V, Pugazhendhi A,

Ponnusamy VK. Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. Process Biochemistry. 2020;91:1–14. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.027. doi:10.1016/j.procbio.2019.11.027

75. Magdouli S, Brar SK, Blais JF. Co-culture for lipid production: Advances and challenges. Biomass and Bioenergy. 2016;92:20–30.

http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.003. doi:10.1016/j.biombioe.2016.06.003

76. Zhang K, Zheng J, Xue D, Ren D, Lu J. Effect of photoautotrophic and heteroautotrophic conditions on growth and lipid production in Chlorella vulgaris cultured in industrial wastewater with the yeast Rhodotorula glutinis. Journal of Applied Phycology. 2017;29(6):2783–2788. doi:10.1007/s10811-017-1168-5

77. Wang S, Wu Y, Wang X. Heterotrophic cultivation of Chlorella pyrenoidosa using sucrose as the sole carbon source by co-culture with Rhodotorula glutinis. Bioresource Technology. 2016;220:615–620. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.010. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.010

78. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology. 1979;111(1):1–61. doi:10.1099/00221287-111-1-1

79. Shariati M, Reza M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in Dunaliella. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. 2011;(August 2011). doi:10.5772/19046

80. Thakur MS, Prapulla SG, Karanth NG. Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B. Enzyme and Microbial Technology. 1989;11(4):252–254. doi:10.1016/0141-0229(89)90101-4

81. Lamers D, van Biezen N, Martens D, Peters L, van de Zilver E, Jacobs-van Dreumel N, Wijffels RH, Lokman C. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production.

BMC Biotechnology. 2016;16(1):1–10. http://dx.doi.org/10.1186/s12896-016-0276-7. doi:10.1186/s12896-016-0276-7

82. Martínez A. Utilización de subproductos industriales para la producción de levaduras oleaginosas como materia prima alternativa de biodiésel. 2020:18–148.

83. Axelsson M, Gentili F. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. PLoS ONE. 2014;9(2):17–20. doi:10.1371/journal.pone.0089643

84. Sakunpak A, Suksaeree J, Monton C, Pathompak P, Kraisintu K. Quantitative analysis of γ-oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2014;4(2):119–123. doi:10.1016/S2221-1691(14)60219-7

85. Antonio Lutzu Advisors G, Giacomo Cao I, Alessandro Concas I. Analysis of the growth of microalgae in batch and semi-batch photobioreactors. Uniwersytet śląski. 2022:343–354. https://iris.unica.it/handle/11584/266200

86. Tyrrell T. Redfield Ratio. Encyclopedia of Ocean Sciences. 2001:2377–2387. doi:10.1006/rwos.2001.0271

87. America PS of. Algal Culturing Techniques. 1st ed. Andersen RA, editor. ELSEVIER Academic Press; 2005.

88. Salazar J, Valev D, Näkkilä J, Tyystjärvi E, Sirin S, Allahverdiyeva Y. Nutrient removal from hydroponic effluent by Nordic microalgae: From screening to a greenhouse photobioreactor operation. Algal Research. 2021;55(March):102247. doi:10.1016/j.algal.2021.102247

89. Månsson S. Cultivation of Chlorella vulgaris in nutrient solution from greenhouse tomato production. 2012:32. http://stud.epsilon.slu.se/4631/

90. Adam Y. Utilization of Chlorella vulgaris for biomass production and treatment of

wastewater from greenhouse farms. SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING. 2019. https://fount.aucegypt.edu/etds

91. Menezes RS, Soares AT, Marques Júnior JG, Lopes RG, da Arantes RF, Derner RB, Filho NRA. Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of Choricystis minor var. minor: a suitable microalga for biodiesel production. Journal of Applied Phycology. 2016;28(5):2679–2686. doi:10.1007/s10811-016-0828-1

92. Braida Vila, Verónica; Campot Moreira, María Pía; Nervi Faggiani, Eliana; Tartaglia Schmidt C. Aplicaciones del cultivo de microalgas en arquitectura sustentable. 2015.

93. Menezes RS, Soares AT, Lopes RG, Magnotti C, Derner RB, Mori CC, Vieira AAH, Antoniosi Filho NR. Evaluation of fatty acid composition of the microalgae Choricystis minor var. minor according to two different nutrient feeding strategies. Journal of Renewable and Sustainable Energy. 2015;7(4). doi:10.1063/1.4926908

94. Sobczuk TM, Chisti Y. Potential fuel oils from the microalga Choricystis minor. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2010;85(1):100–108. doi:10.1002/jctb.2272

95. Oliveira CYB, D'Alessandro EB, Antoniosi Filho NR, Lopes RG, Derner RB. Synergistic effect of growth conditions and organic carbon sources for improving biomass production and biodiesel quality by the microalga Choricystis minor var. minor. Science of the Total Environment. 2021;759:143476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143476. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143476

96. Koch B, Schmidt C, Daum G. Storage lipids of yeasts: A survey of nonpolar lipid metabolism in Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, and Yarrowia lipolytica. FEMS Microbiology Reviews. 2014;38(5):892–915. doi:10.1111/1574-6976.12069

97. Corte L, Rellini P, Lattanzi M, Picchetta C, Fatichenti F, Cardinali G. Diversity of salt response among yeasts. Annals of Microbiology. 2006;56(4):363–368.

doi:10.1007/BF03175033

98. Salvador López JM, Vandeputte M, Van Bogaert INA. Oleaginous yeasts: Time to rethink the definition? Yeast. 2022;39(11–12):553–606. doi:10.1002/yea.3827

99. Chi Z, Zheng Y, Jiang A, Chen S. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011;165(2):442–453. doi:10.1007/s12010-011-9263-6

100. Figueiredo L, Pace R, D'Arros C, Réthoré G, Guicheux J, Le Visage C, Weiss P. Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2018;12(5):1238–1246. doi:10.1002/term.2656

101. Martin N, Bernat T, Dinasquet J, Stofko A, Damon A, Deheyn DD, Azam F, Smith JE, Davey MP, Smith AG, et al. Synthetic algal-bacteria consortia for space-efficient microalgal growth in a simple hydrogel system. Journal of Applied Phycology. 2021;33(5):2805–2815. doi:10.1007/s10811-021-02528-7

102. Santos CA, Caldeira ML, Lopes da Silva T, Novais JM, Reis A. Enhanced lipidic algae biomass production using gas transfer from a fermentative Rhodosporidium toruloides culture to an autotrophic Chlorella protothecoides culture. Bioresource Technology. 2013;138:48–54. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.135. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.135

103. Lois-Milevicich J, Casá N, Alvarez P, Mateucci R, Busto V, de Escalada Pla M. Chlorella vulgaris biomass production using brewery wastewater with high chemical oxygen demand. Journal of Applied Phycology. 2020;32(5):2773–2783. doi:10.1007/s10811-020-02163-8

104. Yuan Z, Wang Z, Takala J, Hiltunen E, Qin L, Xu Z, Qin X, Zhu L. Scale-up potential of cultivating chlorella zofingiensis in piggery wastewater for biodiesel

production. Bioresource Technology. 2013;137:318–325. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.144. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.144

105. Zhu L, Wang Z, Shu Q, Takala J, Hiltunen E, Feng P, Yuan Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. Water Research. 2013;47(13):4294–4302. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004. doi:10.1016/j.watres.2013.05.004

106. Qiu Y, Zu Y, Song C, Xie M, Qi Y, Kansha Y, Kitamura Y. Soybean processing wastewater purification via Chlorella L166 and L38 with potential value-added ingredients production. Bioresource Technology Reports. 2019;7(March):100195. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100195. doi:10.1016/j.biteb.2019.100195

107. Yaakob MA, Mohamed RMSR, Al-Gheethi A, Ravishankar GA, Ambati RR. Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. Cells. 2021;10(2):1–19. doi:10.3390/cells10020393

108. Campenni' L, Nobre BP, Santos CA, Oliveira AC, Aires-Barros MR, Palavra AMF, Gouveia L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga Chlorella protothecoides under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013;97(3):1383–1393. doi:10.1007/s00253-012-4570-6

109. Ren Y, Sun H, Deng J, Huang J, Chen F. Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. Marine Drugs. 2021;19(12). doi:10.3390/md19120713

110. Zhang Z, Pang Z, Xu S, Wei T, Song L, Wang G, Zhang J, Yang X. Improved Carotenoid Productivity and COD Removal Efficiency by Co-culture of Rhodotorula glutinis and Chlorella vulgaris Using Starch Wastewaters as Raw Material. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2019;189(1):193–205. doi:10.1007/s12010-019-03016-y

111. Sharma B, Vaish B, Monika, Singh UK, Singh P, Singh RP. Recycling of Organic Wastes in Agriculture: An Environmental Perspective. International Journal of Environmental Research. 2019;13(2):409–429. https://doi.org/10.1007/s41742-019-00175-y. doi:10.1007/s41742-019-00175-y

112. González-González LM, De-Bashan LE. Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia†. Biology. 2021;10(4):1–20. doi:10.3390/biology10040282

113. 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. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1921691. doi:10.1080/07388551.2021.1921691

114. Fakhra Liaqat, Mahammed Ilyas Khazi, Ali Bahadar, Lu He, Ayesha Aslam, Rabia Liaquat, Spiros N. Agathos JL. Mixotrophic cultivation of microalgae for carotenoid production. Reviews in Aquaculture. 2022;15(1):35–61. doi:https://doi.org/10.1111/raq.12700

115. Bertoldi FC, Sant'anna E, Barcelos-Oliveira JL. Chlorella vulgaris cultivated in hydroponic wastewater. Acta Horticulturae. 2009;843:203–210. doi:10.17660/ActaHortic.2009.843.26

116. Salazar J, Valev D, Näkkilä J, Tyystjärvi E, Sirin S, Allahverdiyeva Y. Nutrient removal from hydroponic effluent by Nordic microalgae: From screening to a greenhouse photobioreactor operation. Algal Research. 2021;55(March):9. doi:10.1016/j.algal.2021.102247

117. Liu H, Li H, Zhong Y, Lu Q, Zhang X, Wang Q, Liu H, Diao Z, Yao C. Co-cultivation of: Rhodotorula glutinis and Chlorella pyrenoidosa to improve nutrient removal and protein content by their synergistic relationship. RSC Advances. 2019;9(25):14331–14342. doi:10.1039/c9ra01884k

ANEXO

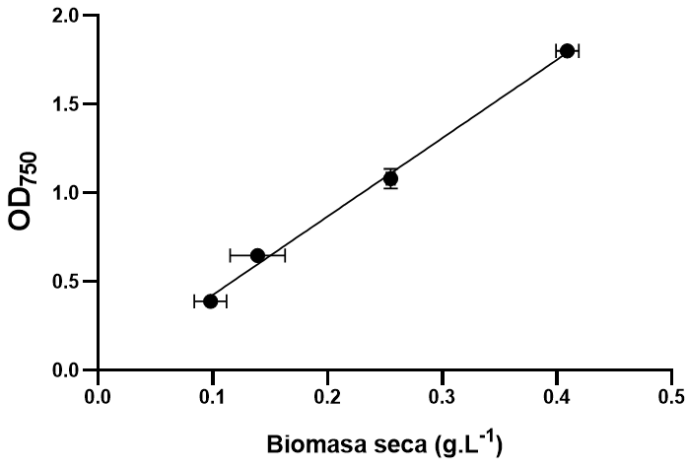

Figura 6. Curva de OD_{750} en función de la biomasa (en peso seco por litro), para *C. minor*.

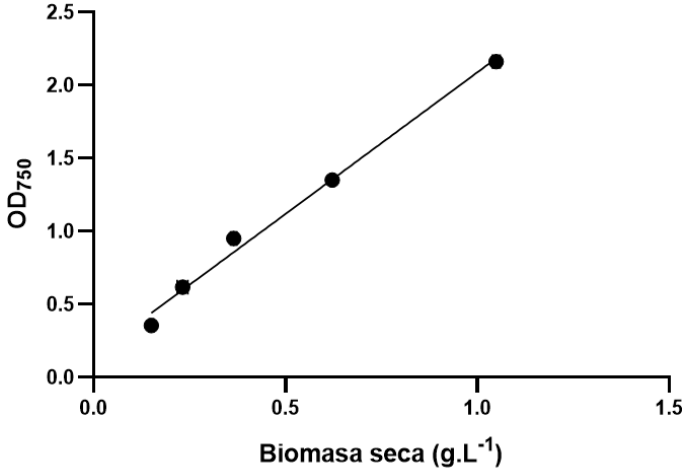

Figura 7. Curva de OD_{750} en función de la biomasa (en peso seco por litro), para *Chlorella spp*.

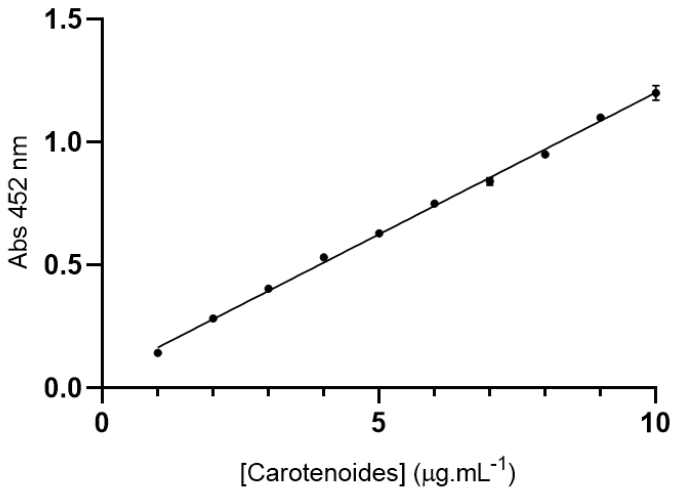

Figura 8. Curva de calibración para carotenoides. Del gráfico se obtiene la siguiente ecuación: y = 0.1152x + 0.0495, R^2 = 0.998, para relacionar absorbancia 452 nm y concentración de carotenoides en microgramo por mililitro.

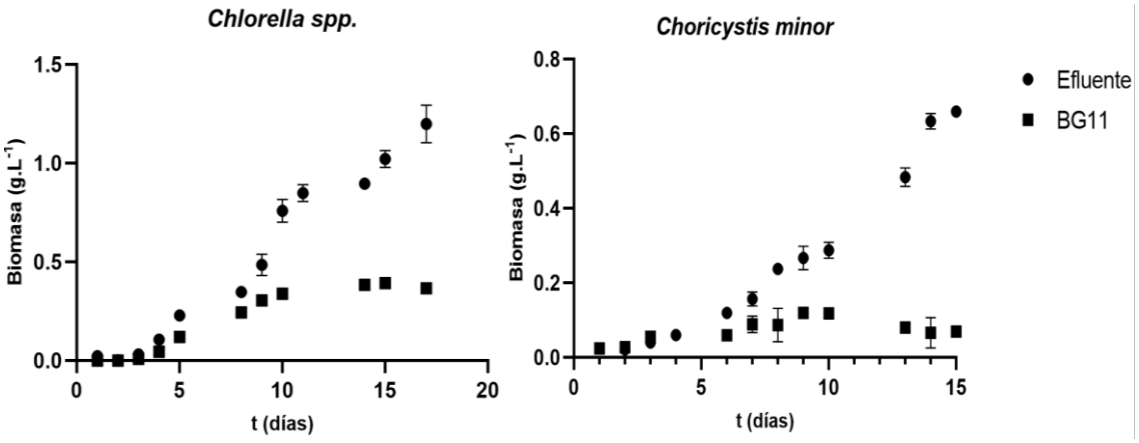

Figura 11. Curvas de productividad para *Chlorella spp.* y *C. minor* en efluente y BG11 a escala de Schotts.

Tabla 7. Biomasa alcanzada, lípidos totales (en gramos por litro de medio de cultivo y gramos por gramo de biomasa), para los distintos cultivos ensayados en autotrofia.

	BIOMASA	**LÍPIDOS TOTALES**	
PRUEBA	**$g.L^{-1}$**	**$g.L^{-1}$**	**$g.g^{-1}$**
Chlorella spp.	1.19 ± 0.05	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.08
C. minor	0.69 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.09
Co-cultivo 1	1,38 ± 0.05	0.34 ± 0.02	0.24 ± 0.09
Co-cultivo 2	0.71 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.09
Co-cultivo 3	0.96 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.07

Tabla 8. Carotenoides totales (en microgramos por litro de medio de cultivo y microgramos por gramo de biomasa), para los distintos cultivos ensayados en autotrofia.

	CAROTENOIDES TOTALES	
PRUEBA	**$\mu g.L^{-1}$**	**$\mu g.g^{-1}$**
Chlorella spp.	4221.88 ± 596.30	3792.10 ± 995.69
C. minor	5978.13 ± 825.5	8896.02 ± 1638.81
Co-cultivo 1	5440.63 ± 974.02	4623.76 ± 1016.40
Co-cultivo 2	9234.38 ± 1179.60	12825.52 ± 1887.72
Co-cultivo 3	2059.38 ± 302.52	2183.08 ± 380.86