

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN INGENIERÍA MENCION TECNOLOGÍAS QUÍMICAS

Título:

**“Aprovechamiento de un efluente cervecero para
la obtención de biomasa microalgal”**

Autor: Ing. Julieta Lois Milevicich

Director de Tesis: Dra. Marina de Escalada Pla

Buenos Aires – Febrero de 2023

DEDICATORIA

A mi esposo, Nicolás.

A Octavia, Brackla, Dresden, Bruja y Darma.

A mis padres, Liliana y Alejandro.

A mi directora y mentora, Marina.

A mis amigos.

A Marcos Cohen.

AGRADECIMIENTOS

A todas las autoridades y personal de la UTN-FRBA, y particularmente al Departamento de Ingeniería Química; a la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva; a las autoridades del Doctorado en Ingeniería de la UTN-FRBA.

Al Centro de Tecnologías Químicas de la FRBA, especialmente a Marina de Escalada Plá, María del Carmen Gutiérrez, Susana Santana, Nahuel Casá, Paola Álvarez, Ricardo Mateucci, Maximiliano Argumedo Moix, Fernando Reina, Víctor Bustos; y a todos quienes me han brindado ayuda y apoyo en gestiones y consultas técnico-científicas durante todo el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial.

Al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, especialmente a Gabriel Ación Fernández y a Elvira Navarro López.

Al Departamento de Industrias, de la Universidad de Buenos Aires.

Al Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco por la donación de las cepas de las microalgas utilizadas y a Isabel Albarracín.

A Hernán Castellani por la gestión y a la cervecería Juguetes Perdidos por el efluente.

A Montserrat Vivas por la revisión del idioma inglés.

Al apoyo financiero que se me ha brindado mediante los siguientes programas, sin los cuales no se podría haber llevado a cabo este trabajo:

- “Programa de Becas de Posgrado Cofinanciadas para la Formación de Doctores en Áreas Prioritarias” de la Universidad Tecnológica Nacional;
- Proyecto de Investigación y Desarrollo (PID): “Producción de Biomasa y productos microalgales: Aprovechamiento de coproductos y residuos de la industria alimentaria” (IPUTIBA0004740TC);
- Proyecto GREENBIOREFINERY: Processing of brewery wastes with microalgae for producing valuable compounds (ERANet-LAC - ELAC2014/BEE-0357).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
LISTADO DE TABLAS	13
LISTADO DE FIGURAS	15
LISTADO DE ECUACIONES	23
LISTADO DE ABREVIACIONES	25
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	27
I.1. Consideraciones generales	27
I.1.1. Microalgas y sus aplicaciones.....	27
I.1.2. Efluente cervecero	45
I.2. Hipótesis	46
I.3. Objetivos generales	46
I.4. Organización	47
I.5. Bibliografía	47
CAPÍTULO II: <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	53
II.1. Introducción.....	53
II.1.1. Nutrientes.....	53
II.1.2. Modos de cultivo	55
II.1.3. Composición de la biomasa	57
II.1.4. Productividad.....	59
II.1.5. Aplicaciones principales.....	59
II.2. Objetivos.....	62
II.3. Materiales y métodos.....	63

II.3.1. Microalga.....	63
II.3.2. Efluente cervecero	64
II.3.3. Determinación de las condiciones de cultivo	65
II.3.4. Caracterización del crecimiento de la biomasa microalgal	68
II.3.5. Caracterización bioquímica de la biomasa microalgal.....	69
II.3.6. Evaluación del Escalado.....	74
II.3.7. Aplicación de la biomasa como bioestimulante para plantas.....	76
II.4. Resultados y discusión	80
II.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo	80
II.4.2. Curvas de crecimiento	86
II.4.3. Composición bioquímica.....	90
II.4.4. Escalado.....	94
II.4.5. Aplicación de la biomasa: bioestimulante para el crecimiento vegetal.....	103
II.5. Conclusiones	110
II.6. Bibliografía.....	113
CAPÍTULO III: <i>SCENEDESMUS QUADRICAUDA</i>	121
III.1. Introducción	121
III.1.1. Nutrientes	121
III.1.2. Modos de cultivo.....	123
III.1.3. Composición de la biomasa	124
III.1.4. Productividad	126
III.1.5. Aplicaciones principales	127
III.2. Objetivos	129
III.3. Materiales y métodos	130
III.3.1. Microalga	130

III.3.2. Efluente cervecero	130
III.3.3. Determinación de las condiciones de cultivo	131
III.3.4. Caracterización del crecimiento de la biomasa microalgal	133
III.3.5. Evaluación del efecto de componentes del medio de mantenimiento.....	134
III.3.6. Determinación de la composición bioquímica	136
III.3.7. Escalado	137
III.3.8. Aplicación de la biomasa: perfil de ácidos grasos	139
III.4. Resultados y discusión	140
III.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo	140
III.4.2. Evaluación del diluyente del efluente y pre-adaptación de la cepa.....	147
III.4.3. Evaluación del efecto de componentes del medio de mantenimiento.....	150
III.4.4. Evaluación de curvas de crecimiento suplementadas	155
III.4.5. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono	158
III.4.6. Composición bioquímica.....	161
III.4.7. Escalado	164
III.4.8. Aplicación de la biomasa: perfil de ácidos grasos	169
III.5. Conclusiones	172
III.6. Bibliografía.....	175
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	181
IV.1. Conclusiones generales	181
IV.2. Recomendaciones.....	182
ANEXO I: Difusión de los resultados de la tesis	185

RESUMEN

La producción de cerveza genera una gran cantidad de efluentes en diferentes etapas del proceso. La carga orgánica total de los efluentes puede ser consumida de manera parcial por las microalgas, representando una ventaja adicional en el tratamiento de estas corrientes para el vertido. Así mismo, la biomasa obtenida tiene diversas posibles aplicaciones debido a su composición bioquímica. Sin embargo, no hay trabajos reportados de cultivo de *Chlorella vulgaris* en efluentes con alta carga de carbono; ni de *Scenedesmus quadricauda* utilizando efluente cervecero. El objetivo de la tesis fue estudiar la producción de dos microalgas utilizando un efluente cervecero para la formulación del medio de cultivo.

Se utilizaron para el presente trabajo dos microalgas autóctonas del país, no axénicas: *C. vulgaris* y *S. quadricauda*. El efluente cervecero fue provisto por una cervecería de la provincia de Buenos Aires. Para ambas microalgas se determinaron los valores iniciales óptimos de demanda química de oxígeno (DQO) y pH que maximizaron el crecimiento celular, mediante el uso de diseños experimentales. Para *S. quadricauda* se estudió adicionalmente la necesidad de suplementación con sales presentes en el medio de mantenimiento.

Posteriormente se procedió al escalado de los cultivos en aproximadamente un orden de magnitud. El sistema propuesto para el escalado de *C. vulgaris* fue en modo batch y en oscuridad total, con medio compuesto por efluente y agua destilada; mientras que el sistema de *S. quadricauda* fue escalado en modo fed-batch por pulsos con iluminación (fotoperíodo de 12 horas con intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR), con medio compuesto por efluente, agua y suplementación de citrato amónico férrico, alimentado cada 6 días. Se caracterizaron los parámetros cinéticos y la composición química de la biomasa. En cuanto a la aplicación de la biomasa obtenida, *C. vulgaris* fue estudiada como bioestimulante para el crecimiento de plantas mientras que los lípidos extraídos de *S. quadricauda* fueron analizados para caracterizar su perfil nutricional.

Los valores iniciales de DQO y de pH que maximizaron el crecimiento de *C. vulgaris*, fueron 18300 mg O₂/L y 6,5. *C. vulgaris* mostró una velocidad específica de crecimiento de $0,232\pm 0,010 \text{ h}^{-1}$ para el biorreactor tanque agitado. La concentración final de biomasa obtenida fue 1,08 g/L, conteniendo 33 %; 27 %; 8 %; 0,42 % y 0,25 % de proteínas, lípidos, carbohidratos, clorofila *a* y carotenoides, respectivamente. En los ensayos para evaluar los efectos similares a fitohormonas, la biomasa en concentración de 2 g/L mostró efectos similares a las auxinas en cuanto al desarrollo

de raíces en semillas; mientras que para el desarrollo de raíces en cotiledones, mostró efectos a partir de 0,5 g/L.

Los valores iniciales de DQO y de pH que maximizaron el crecimiento de *S. quadricauda* a todos los tiempos medidos, fueron 3075 mg O₂/L y 7,25. De la evaluación de la necesidad de suplementación, se encontró que tanto el nitrato de sodio y el sulfato de magnesio, como el citrato amónico férrico (solubilizado con EDTA disódico) tuvieron efectos significativos en el crecimiento de la microalga. *S. quadricauda* mostró rangos de velocidades específicas de crecimiento de cada pulso entre 0,03 y 0,32 d⁻¹ para el biorreactor tanque agitado. La concentración final de biomasa obtenida fue 1,68 g/L, conteniendo 32 %; 27 %; 4 %; 0,17 % y 0,10 % de proteínas, lípidos, carbohidratos, clorofila *a* y carotenoides; respectivamente. El perfil de ácidos grasos, expresado en % de ácidos grasos respecto a ésteres metílicos fue: monoinsaturados 27,6 %; poliinsaturados 27,3 %; saturados 21,9 %; no identificados 23,4%, resultando similar a los de aceites como maíz, palma, canola, soja; con buenas relaciones entre ácidos grasos omega-3 y omega-6 respecto a los saturados.

Se concluyó que ambas microalgas pudieron adaptarse y crecer satisfactoriamente a los medios formulados a base del efluente cervecero. Se pudieron caracterizar los parámetros cinéticos y la composición bioquímica. Fue posible escalar satisfactoriamente la producción de ambas microalgas hasta una capacidad de trabajo nominal de 3 L. *C. vulgaris* pudo ser cultivada en régimen heterotrófico, con alto de contenido de carbono en el medio, y sin necesidad de suplementación ni iluminación. *S. quadricauda* requirió de iluminación y suplementación con citrato amónico férrico. La biomasa de ambas cepas, obtenida aprovechando el efluente cervecero, podría ser utilizada como bioestimulante para el crecimiento de plantas o como fuente de aceites comestibles con un adecuado perfil nutricional. De este modo, se recircularían los nutrientes del efluente cervecero para la producción de nuevos insumos.

ABSTRACT

Beer manufacturing industry produces a large amount of wastewater along the different process stages. Microalgae are able to partially consume the organic material load in the effluents, representing an additional advantage in wastewater treatment prior to discharge. The obtained biomass may be suitable to diverse application due to its biochemical composition. Nonetheless, there are not published works about *Chlorella vulgaris* growing in high carbon load wastewater, neither about *Scenedesmus quadricauda* cultivated in brewery effluent. The aim of this thesis was to study the production of two microalgae using a brewery wastewater in the culture media formulation.

Two non-axenic autochthonous microalgae were used for this work: *C. vulgaris* and *S. quadricauda*. The wastewater was provided by a brewery in Buenos Aires province. For both strains were determined the optimal initial values of chemical oxygen demand (COD) and pH that maximised the cell growth, using statistical experimental designs. For *S. quadricauda*, was further studied the need for supplementation with the salts used in the maintenance medium.

Then, the culture scaling was carried out in approximately one magnitude order. The scaled *C. vulgaris* system was in batch mode with total darkness, with a medium composed by effluent and distilled water; while the *S. quadricauda* system was scaled up in fed-batch mode by pulses with lighting (12 h photoperiod with light intensity of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR), with a medium composed by the effluent, water and ammonium ferric citrate supplementation, fresh fed every 6 days. The biomass kinetic parameters and chemical composition were characterised. Regarding the application of the obtained biomass, *C. vulgaris* was studied as plant growth bio-stimulant, while the lipids extracted from *S. quadricauda* were analysed for a nutritional profile characterisation.

Initial COD and pH values that maximised *C. vulgaris* growth were 18300 mg O₂/L and 6.5. *C. vulgaris* showed a specific growth rate of $0.232\pm 0.010 \text{ h}^{-1}$ for the stirred tank bioreactor. The final biomass concentration achieved was 1.08 g/L; containing 33 %, 27 %, 8 %, 0.42 %, and 0.25 % of proteins, lipids, carbohydrates, chlorophyll *a* and carotenoids, respectively. In phytohormones-like effect assays, the biomass in a 2 g/L concentration showed auxin-like effects regarding to root development, while the effects on cotyledon developing roots were observed from 0.5 g/L of biomass concentration.

The initial COD and pH values that maximised *S. quadricauda* growth at all measure times were 3075 mg O₂/L and 7.25. In addition, it was found that sodium nitrate, magnesium sulfate, as well as ferric ammonium citrate (solubilized with disodium EDTA) had significant effects on the microalgae growth. The specific growth rate ranges showed by *S. quadricauda* for each pulse, were in the range 0.03 and 0.32 d⁻¹ for the stirred tank bioreactor. The biomass final concentration achieved was 1.68 g/L, containing 32 %, 27 %, 4 %, 0.17 %, and 0.10 % of proteins, lipids, carbohydrates, chlorophyll *a*, and carotenoids; respectively. The fatty acid profile, expressed as % fatty acids respect to methyl esters, was: monounsaturated 27.6 %; polyunsaturated 27.3 %; saturated 21.9 %; unidentified 23.4 %, turning out to be similar to the profiles of some vegetable oils such as corn, palm, canola, soybean; and showing good omega-3 and omega-6 fatty acids ratios related to saturated ones.

It was concluded that both microalgae were able to adapt and grow satisfactorily to the brewery effluent-based formulated media. It was possible to characterise the kinetic parameters and the biochemical composition. The production scaling up was satisfactory for both strains, up to a 3 L nominal work capacity. *C. vulgaris* was able to grow in a heterotrophic regime, with a high carbon content medium, and without supplementation. *S. quadricauda* required light and supplementation with ferric ammonium citrate. The microalgae biomass, obtained by taking advantage of the brewing wastewater, could be used as a biostimulant for plant growth or as a source of edible oils with an adequate nutritional profile. In this way, the brewery effluent nutrients would be recirculated to the obtaining of new inputs.

LISTADO DE TABLAS

Capítulo I

Tabla I - 1: Aplicaciones comerciales de las microalgas.	33
---	----

Capítulo II

Tabla II - 1: Caracterización fisicoquímica del efluente cervecero “Juguetes Perdidos”	65
--	----

Tabla II - 2: Diseño central compuesto con dos variables independientes, pH y DQO, en cinco niveles con el punto central triplicado. Entre paréntesis se muestran los valores según el diseño.	67
---	----

Tabla II - 3: Diseño central compuesto con dos variables independientes a cinco niveles y un punto central por triplicado.	80
---	----

Tabla II - 4: Coeficientes de los términos de los polinomios de segundo orden de las variables independientes, ΔDO y ΔUFC , a los diferentes intervalos de tiempo estudiados.	84
--	----

Tabla II - 5: Optimización múltiple mediante utilización de la función deseabilidad, se presentan los valores estimados y los valores experimentales (media y desvío estándar, n=3).	85
---	----

Tabla II - 6: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado.	87
--	----

Tabla II - 7: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado para el sistema en pequeña escala y los dos sistemas de mayor escala.	98
---	----

Tabla II - 8: Porcentaje en peso base seca de lípidos, proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides contenidos en la biomasa.	101
--	-----

Capítulo III

Tabla III - 1: Diseño central compuesto con dos variables independientes, pH y DQO, en cinco niveles con el punto central triplicado. Entre paréntesis se muestran los valores según el diseño.	132
--	-----

Tabla III - 2: Concentraciones de los cinco componentes ensayados como variables independientes, expresadas en mg/L de medio final.	135
--	-----

Tabla III - 3: Diseño central compuesto con dos variables independientes a cinco niveles y un punto central por triplicado.	140
--	-----

Tabla III - 4: Optimización múltiple mediante utilización de la función deseabilidad, se presentan los valores estimados y los valores experimentales (media).....	146
Tabla III - 5: Parámetros cinéticos de ajuste. Letras distintas en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas.	148
Tabla III - 6: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).....	157
Tabla III - 7: Parámetros de ajuste según el modelo de Gompertz modificado y concentración final de biomasa.....	158
Tabla III - 8: Velocidades específicas de crecimiento y concentraciones máximas de biomasa de cada etapa de seis días del cultivo fed-batch por pulsos.	167
Tabla III - 9: Porcentaje en peso base seca de lípidos, proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides contenidos en la biomasa. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas para cada metabolito ($p < 0,05$).	167
Tabla III - 10: determinación de ácidos grasos, resultados expresados en gramos de ácido graso por cada 100 gramos de ésteres metílicos.	170

LISTADO DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura I - 1: Esquemas de sistemas abiertos: a) tipo estanque circular agitado; b) tipo estanque forma V; c) tipo *open-pond* agitado rectangular; d) tipo pista o *raceway* con agitación. Adaptado de dos Santos et al. (2020). 32
- Figura I - 2: Representaciones de fotobiorreactores cerrados: a) tipo panel plano; b) tipo tubular; c) bolsas plásticas; d) reactor con módulo de membrana. Adaptado de dos Santos et al. (2020). 33
- Figura I - 3: Empaques comerciales de *Spirulina Platensis* y *Chlorella vulgaris* grado alimenticio en polvo Organikal®. Imagen adaptada del fabricante: <https://hgl.la/>..... 36
- Figura I - 4: Productos cosméticos Estée Lauder®. Imagen adaptada del fabricante: <https://www.esteelauder.ca/>. 40
- Figura I - 5: Bioestimulantes a base de microalgas de la marca AgriAlgae®. Imagen adaptada del fabricante: <https://www.algaenergy.es/>. 43
- Figura I - 6: Esquema gráfico conceptual de la captura de carbono mediante el uso de microalgas. Adaptado de Onyeaka et al. (2021). 44
- Figura I - 7: Gránulos de PHB en cianobacterias: a) cepa salvaje; b) cepa mutante. Adaptado de Markl et al. (2018). 44

Capítulo II

- Figura II - 1: *Chlorella vulgaris*. Adaptado de Ramaraj et al. (2016). 53
- Figura II - 2: Imagen microscópica de *C. vulgaris*, tomada de un inóculo conservado en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de UTN-FRBA, en aumento 100x. 63
- Figura II - 3: Efluente cervecero brindado por “Juguetes Perdidos”. 64
- Figura II - 4: Imagen de las muestras de estándar de aceite de canola finalizadas las reacciones del método SFV. 71
- Figura II - 5: Imagen de las muestras de estándar de SAB finalizado el tratamiento según el método de Lowry 72

Figura II - 6: Imagen de las muestras de estándar de glucosa finalizadas las reacciones del método fenol-sulfúrico.....	73
Figura II - 7: Imagen de un extracto de pigmentos de <i>C. vulgaris</i> en solución de acetona 90%..	74
Figura II - 8: Plantines de soja verde luego de 6 días de incubación de las semillas. Foto gentilmente provista por el equipo de investigadores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería.	78
Figura II - 9: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (Δ DO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 6 días de incubación.....	81
Figura II - 10: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (Δ DO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 13 días de incubación.....	82
Figura II - 11: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (Δ DO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 20 días de incubación.....	83
Figura II - 12: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (Δ UFC) luego de 13 días de incubación.	84
Figura II - 13: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 1, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.	88
Figura II - 14: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 2, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.	88
Figura II - 15: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 3, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.	89
Figura II - 16: Concentración de biomasa final, expresada en gramos de masa seca de biomasa por litro de cultivo. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Sistema 1: efluente cervecero diluido con	

LISTADO DE FIGURAS

agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.....	91
Figura II - 17: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos, expresadas en porcentaje de peso de biomolécula por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas para el mismo metabolito. Sistema 1: efluente cervecero diluido con agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.	92
Figura II - 18: Concentración de clorofila a y carotenoides, expresadas en porcentaje de peso de pigmento por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas para el mismo pigmento. Sistema 1: efluente cervecero diluido con agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.	93
Figura II - 19: Biorreactores en régimen de oscuridad total, al momento de iniciar la incubación.	94
Figura II - 20: Curvas de crecimiento correspondientes al sistema cultivado en biorreactor tanque agitado, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.	96
Figura II - 21: Curvas de crecimiento correspondientes al sistema cultivado en frasco Erlenmeyer de 5L con agitación orbital, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.	97
Figura II - 22: Biorreactores al final del período de cultivo, al momento de la cosecha final de biomasa.....	98

Figura II - 23: Foto microscópica de los sistemas A) biorreactor Erlenmeyer de 5L, B) biorreactor tanque agitado, a las 60 horas de incubación. Las líneas de fondo corresponden a los recuadros de 0,0025 mm ² de superficie de la cámara de Neubauer.	100
Figura II - 24: Porcentaje de aminoácidos libres por peso de proteínas totales. Las barras muestran la media ± el desvío estándar.	104
Figura II - 25: Porcentaje de desarrollo de raíces en plantines de soja verde por sobre el control (100%, agua destilada con BG11). Las barras muestran la media ± el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y para una misma concentración de biomasa (p<0,05; n=3).	105
Figura II - 26: Porcentaje de desarrollo de raíces en cotiledones por sobre el control (100%, agua destilada con BG11). Las barras muestran la media ± el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y para una misma concentración de biomasa (p<0,05; n=4).	107
Figura II - 27: Porcentaje de expansión de cotiledones de pepino por sobre el control (100%, BG11). Las barras muestran la media ± el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05; n=4).	109
Figura II - 28: Índice de germinación.	110
Capítulo III	
Figura III - 1: Morfología de <i>Scenedesmus</i> sp. UKM9, adaptado de Mohd Udaiyappan et al. (2021)	121
Figura III - 2: imagen microscópica de <i>S. quadricauda</i> , tomada de un inóculo conservado en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de UTN-FRBA, en aumento 100x.	130
Figura III - 3: Biorreactor tanque agitado esterilizado previo a la inoculación y sistema de iluminación.....	138
Figura III - 4: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (Δ DO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 6 días de incubación.	141
Figura III - 5: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (Δ DO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 13 días de incubación.	142

LISTADO DE FIGURAS

Figura III - 6: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 20 días de incubación.	143
Figura III - 7: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (ΔUFC) luego de 6 días de incubación.	144
Figura III - 8: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (ΔUFC) luego de 20 días de incubación	145
Figura III - 9: Imagen de <i>S. quadricauda</i> del sistema con valores iniciales de DQO 1580 mg O ₂ /L y pH 6,9; a los 13 días de incubación.....	146
Figura III - 10: Sistemas incubados en efluente con diluyente agua y BG11, con inóculos pre-adaptados y sin adaptar; a los 7 días de incubación.	147
Figura III - 11: Curvas de crecimiento, medido por densidad óptica a 680 nm, de los sistemas con efluente diluido con agua y medio de mantenimiento; y utilizando un inóculo pre-adaptado y sin pre-adaptar.....	148
Figura III - 12: Curvas de crecimiento, medido por recuento celular en cámara de Neubauer, de los sistemas con efluente diluido con agua y medio de mantenimiento; y utilizando un inóculo pre-adaptado y sin pre-adaptar.....	150
Figura III - 13: Sistemas del diseño factorial a los 12 días de incubación.	151
Figura III - 14: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento de la densidad óptica (DO/DO_0), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 12 días de incubación.	151
Figura III - 15: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento de la densidad óptica (DO/DO_0), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 21 días de incubación.	152
Figura III - 16: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento del recuento celular (N/N_0), en células por mililitro, de la biomasa luego de 12 días de incubación.	153
Figura III - 17: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento del recuento celular (N/N_0), en células por mililitro, de la biomasa luego de 21 días de incubación.	153

Figura III - 18: Curvas de crecimiento para el Sistema 1, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.....	155
Figura III - 19: Curvas de crecimiento para el Sistema 2, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.....	156
Figura III - 20: Curvas de crecimiento para el Sistema 3, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.....	156
Figura III - 21: Fotos de los sistemas 1, 2 y 3 (S1, S2 y S3, respectivamente) de <i>S. quadricauda</i> a los A) 6 días y B) 20 días de incubación.....	158
Figura III - 22: Crecimiento de la biomasa medida por densidad óptica a 680 nm (eje vertical izquierdo) y demanda química de oxígeno del medio de cultivo en mg O ₂ /mL (eje vertical derecho), de los Sistemas 2 y 3.	160
Figura III - 23: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos, expresadas en porcentaje de peso de biomolécula por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media ± el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias significativas (p<0,05) para un mismo metabolito.	161
Figura III - 24: Concentración de clorofila a y carotenoides, expresadas en porcentaje de peso de pigmento por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media ± el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias significativas entre sistemas (p<0,05).	163
Figura III - 25: Biorreactor tanque agitado con cultivo de <i>S. quadricauda</i> . Imágenes tomadas durante la incubación y toma de muestras.	164
Figura III - 26: Seguimiento de la biomasa en los biorreactores por densidad óptica a 680 nm. Las barras muestran la media ± el desvío estándar del método.	165
Figura III - 27: Seguimiento de la biomasa en los biorreactores por recuento en cámara de Neubauer. Las barras muestran la media ± el desvío estándar del método.....	166

LISTADO DE FIGURAS

Figura III - 28: Porcentaje de ácidos grasos por grupo de saturación en los lípidos de <i>S. quadricauda</i>	170
--	-----

LISTADO DE ECUACIONES

Capítulo II

Ecuación II - 1: Polinomio de segundo grado de ajuste de las variables dependientes.	66
Ecuación II - 2: Ecuación de Gompertz modificada	69
Ecuación II - 3: Cálculo de la concentración de clorofila a	73
Ecuación II - 4: Cálculo de la concentración de carotenoides	74
Ecuación II - 5: Número de Reynolds	75
Ecuación II - 6: Número de potencia	75
Ecuación II - 7: Potencia consumida [W].....	75
Ecuación II - 8: Potencia volumétrica [W.m ⁻³].....	75
Ecuación II - 9: Porcentaje de hidrólisis de proteínas.....	77
Ecuación II - 10: Expresión de h determinada por el método del OPA.	77
Ecuación II - 11: índice de germinación	80

Capítulo III

Ecuación III - 1: Polinomio de ajuste de las variables dependientes.	135
Ecuación III - 2: Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial de crecimiento ..	139
Ecuación III - 3: Índice hipocolesterolémico	140
Ecuación III - 4: Índice aterogénico	140
Ecuación III - 5: Índice trombogénico	140

LISTADO DE ABREVIACIONES

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AI: Índice aterogénico

ATP: Adenosintrifosfato

BAP: 6-bencilaminopurina

bs: Base seca

CCD: Diseño experimental central compuesto

Chl: Clorofila

DCS: Disrupción sónica celular

DHA: Ácido docosahexaenoico

DO: Densidad óptica (absorbancia)

DPA: Ácido docosapentaenoico

DQO: Demanda química de oxígeno

DW: Durbin-Watson

EF: Efluente

EPA: Ácido eicosapentaenoico

EPS: Polisacárido extracelular

HE: Hidrólisis enzimática

HI: Índice hipocolesterolémico

HR: Humedad relativa

IAA: Ácido indol-3-acético

IAM: Indol-3-acetamida

IBA: Ácido indol-3-butírico

IG: Índice de germinación

lag: Fase de latencia

μ_{max} : Velocidad específica máxima de crecimiento

N/D: No determinado

Np: Número de potencia

OPA: O-ftalaldehído

P/S: Relación ácidos grasos poliinsaturados y saturados

P: Potencia consumida

PA: Pre-adaptación

PAR: Radiación fotosintéticamente activa

PCA: Plate count agar

PHB: polihidroxibutirato

Pv: Potencia volumétrica

R^2_{adj} : R-cuadrado ajustado

Re: Número de Reynolds

SAB: Seroalbúmina bovina

Sc: Solución

SFV: Sulfo-fosfo-vainillina

TI: Índice trombogénico

UFC: Unidad formadora de colonia

UV: Ultravioleta

ΔDO : Diferencia entre densidad óptica medida en un día y medida en el día 0

ΔUFC : Diferencia entre UFC medidas en un día y medidas en el día 0

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1. Consideraciones generales

I.1.1. Microalgas y sus aplicaciones

El estudio de las microalgas y sus aplicaciones se ha ido incrementando en los últimos años. El mercado de las microalgas durante el 2018, se estimó en 1,7 mil millones de dólares, con una tendencia creciente del 5% anual. Su potencial rol en diversos procesos sustentables y de economía circular ha incrementado los esfuerzos por evaluar distintos aspectos de su genética, composición, crecimiento, rendimientos y aplicación de su biomasa en distintas industrias (Posten & Walter, 2012).

Desde la perspectiva del dilema de la competencia por la tierra entre la producción de cultivos para alimentación o para combustibles, una de las ventajas que muestran respecto a los organismos fotosintéticos superiores es tener un mayor rendimiento de biomasa por unidad de área ocupada. Según mediciones en laboratorio, las microalgas superan a las plantas, cinco veces o más, en la capacidad de convertir la energía lumínica en energía química de la biomasa (Posten & Walter, 2012). A pesar de tener la ventaja de generar mayor rendimiento de biomasa, ocupando tierras no cultivables, pudiendo utilizar efluentes, subproductos y otros nutrientes recuperados, y sumando la posibilidad de captura de dióxido de carbono y óxido nitroso; la aplicación comercial del cultivo de microalgas aún tiene desafíos técnico-económicos por superar. Uno de ellos es el costo del medio de cultivo, que puede alcanzar hasta el 70% del costo de la producción de la biomasa (Ronga et al., 2019; Zhu et al., 2019).

Debido a la necesidad global de encontrar fuentes de energía renovables o con menor impacto ambiental, y de reducir emisiones; se ha dado lugar a numerosos estudios en los cuales las microalgas forman parte de conceptos de biorrefinerías, donde se evalúan sus potenciales funciones en tratamiento de efluentes, absorción de emisiones y metales pesados, materias primas para combustibles, promotores en el cultivo de plantas superiores, formulaciones de alimentación animal, suplementos de alimentación humana, principios activos para la industria cosmética y otras moléculas de alto valor agregado, entre otros (Mata et al., 2010).

I.1.1.1. Estructura, morfología

El término “microalgas” denota un grupo de microorganismos fotosintéticos; que pueden contener o no las organelas fotosintéticas denominadas plástidos. Las microalgas, como grupo, abarcan desde células procariotas como cianobacterias hasta parte del subreino Viridiplantae (eucariotas) (Friedl et al., 2012). Son organismos de estructura relativamente sencilla, lo cual les permite crecer rápidamente (Faried et al., 2017; Posten & Walter, 2012). Se estima que existen más de 50 mil especies de microalgas (Mata et al., 2010). Los tamaños celulares rondan el rango 2 – 200 μm . Los principales componentes de su biomasa son proteínas, lípidos y carbohidratos. Algunas especies como *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis* sp., *Desmodesmus* sp., y *Botryococcus braunii* pueden alcanzar porcentajes de lípidos entre 45 y 64%; especies como *Chlorella vulgaris* y cianobacterias, por ejemplo, *Spirulina* (o *Arthrospira*), pueden alcanzar valores de proteínas de hasta 60%. En condiciones de estrés algunas especies como *C. zoofingensis* y *C. vulgaris* pueden alcanzar porcentajes de carbohidratos en el rango de 41 – 67 % de (Kaur et al., 2022).

Las cianobacterias, que forman parte del conjunto considerado colectivamente como “microalgas” (Mapstone et al., 2022), son organismos procariotas Gram-negativos fotoautotróficos. Estas microalgas procariotas poseen sistemas fotosintéticos, respiratorios y genéticos, pero no están delimitados entre sí por membranas. En este tipo de microorganismos, que no poseen plástidos, la reacción fotosintética tiene lugar dentro de las membranas tilacoides. Poseen clorofilas *a*, *b* y *d*, así como los carotenoides y ficobiliproteínas como pigmentos accesorios para llevar a cabo la reacción de fotosíntesis con producción de oxígeno. Las cianobacterias son conocidas por su capacidad de adaptación de diversas y extremas condiciones; lo cual deriva en un gran número de aplicaciones, existentes y en investigación (Friedl et al., 2012; Kumar & Singh, 1979).

Algunas de las microalgas eucariotas que se encuentran involucradas actualmente en procesos de en comercialización o investigación, son:

- Rhodophyta, que se compone de algas rojas que son multicelulares o filamentosas en su mayoría, y contienen clorofilas *a* y *d* así como ficobiliproteínas; siendo *Porphyridium* una de las microalgas más representativas de este filo;
- Prymnesiophyta (o Haptophyta), son células flageladas y contienen clorofilas *a*, *c*₁ y *c*₂, así como el carotenoide fucoxantina. Se encuentran principalmente como parte del fitoplancton. Se estudian los géneros *Isochrysis* y *Pavlova* como fuentes de ácidos grasos insaturados;

- Eustigmatophyta: pueden encontrarse en agua y suelos, y forman zoosporas. Contienen clorofila *a* y carotenoides. La más estudiada en los últimos tiempos es *Nannochloropsis*;
- Las microalgas estudiadas en el presente trabajo pertenecen al filo Chlorophyta. Son organismos eucariotas, y como tales, poseen nucléolo, mitocondrias y cromatóforos. Contienen clorofilas *a* y *b*, así como varios carotenoides que se producen en mayor cantidad en diferentes condiciones de estrés. Pueden almacenar almidón, el cual las algas de este filo producen dentro de los cloroplastos; y muchas de ellas, contienen paredes celulares compuestas principalmente de celulosa. Las de mayor aplicación comercial de este filo son *Chlorella*, *Haematococcus* y *Dunaliella* (Richmond, 2008).

I.1.1.2. Sistemas de cultivo

Los procesos industriales involucrados no son conocidos en profundidad por el momento. Existen varios factores a superar para lograr el cultivo de microalgas a gran escala. Si bien las microalgas pueden utilizar dióxido de carbono atmosférico, para lograr mayores productividades es necesaria una fuente emisora de dicho gas cercana al sitio de producción. Por otro lado, dada la necesidad de disponibilidad de cierta cantidad de horas e irradiación de luz solar, los sitios productivos suelen ser desérticos y lejanos de las zonas industrializadas. Un tercer factor a tener en cuenta es la necesidad de mezclado para favorecer la difusión de gases y el acceso a la luz, lo cual deriva en la necesidad de reactores y/o servicios auxiliares (Posten & Walter, 2012).

Entre las principales condiciones de cultivo a optimizar se encuentran: las condiciones de iluminación, las fuentes de nutrientes, el pH y la temperatura. La iluminación es una de las condiciones de cultivo más importantes, que genera una limitación relevante en varias especies de microalgas. Entre los factores a estudiar se encuentran si la fuente lumínica es la luz solar y/o luz artificial, la intensidad de iluminación y el fotoperíodo; el ángulo de incidencia y la densidad del cultivo. Muchas especies de microalgas no crecen adecuadamente bajo un régimen de iluminación continua, lo que resulta en la aplicación de fotoperíodos que simulen las condiciones naturales de crecimiento (dos Santos et al., 2020; Posten & Walter, 2012). En modos de cultivo fotoautotróficos, es importante maximizar la conversión lumínica para lograr mayores productividades, sin embargo, la densidad de los cultivos genera un gradiente de exposición lumínica; pudiendo provocar saturación o fotoinhibición en la capa de superior del cultivo, disminuyendo la eficiencia de la conversión de la energía lumínica. Como alternativa para evitar

o mejorar dicha situación, es la agitación continua del cultivo, con el fin de homogenizar el acceso a la luz (Richmond, 2008).

La temperatura es otra variable relevante en el cultivo de microalgas. El efecto de la temperatura en la insaturación de los lípidos de las microalgas es un tema ya estudiado. A temperaturas menores de las óptimas, se incrementa el porcentaje de lípidos insaturados, posiblemente como un mecanismo de protección del aparato fotosintético mediante la conservación de la fluidez de las membranas celulares (en este caso particular, las tilacoides). También puede llevar al aumento del contenido de polioles y aminoácidos y sus derivados. Por otro lado, el aumento de la temperatura puede promover la producción de carotenoides en algunas microalgas (Richmond, 2008). En líneas generales, las microalgas suelen tolerar bien temperaturas 15°C por debajo de su rango de temperatura óptima de crecimiento, sin embargo, sólo toleran 2 – 4°C por encima de dicho rango sin pérdida relevante de biomasa (Mata et al., 2010).

Otro factor importante a considerar es la salinidad del medio, especialmente si el medio de cultivo no será específicamente formulado. En general, las microalgas pueden cultivarse en rangos de salinidad de entre 12 y 40 g/L, siempre que el pH también sea tolerable para la especie. Los macronutrientes que requieren las microalgas en general son nitrato, u otra sal de nitrógeno; fosfato; carbono, dependiendo la especie lo requerirá principalmente en forma de dióxido de carbono o de bicarbonato; la relación entre estos tres elementos se aproxima a 106C:16N:1P en la mayoría de los medios de cultivo. También son relevantes las concentraciones de azufre, potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio; y como microelementos, se alimentan al cultivo boro, cobre, manganeso, cinc, molibdeno, cobalto, vanadio, selenio, silicio, etc. (dos Santos et al., 2020).

El mezclado es un factor que influye en el acceso a los sustratos, así como afecta en la distribución celular, la disipación del calor y de los metabolitos extracelulares, y facilita la transferencia de gases. Especialmente en cultivos foto- y mixotróficos, se requiere de la agitación para homogeneizar el acceso a la luz. La agitación óptima depende de cada especie, dado que tienen distintas tolerancias al estrés hidrodinámico; y debe investigarse particularmente para cada cultivo (Mata et al., 2010).

El modo de cultivo más comúnmente utilizado para microalgas es el modo batch, donde se carga una cantidad de nutrientes y un inóculo; en cultivo fototróficos se alimenta generalmente dióxido de carbono, y suelen requerir de agitación para mejorar el mezclado. En este modo pueden presentarse las fases típicas de una curva de crecimiento: fase de latencia o de adaptación; fase de

crecimiento exponencial; fase estacionaria; y fase de muerte. Otros modos semi- y continuos son cultivo en quimiostato, donde el caudal de alimentación es igual al caudal de cosecha; el turbidistato donde se mantiene constante la concentración de biomasa, el fed-batch donde la alimentación es continua o por pulso y la cosecha por etapas periódicas. También existen sistemas inmovilizados, por ejemplo, en alginato para remoción de contaminantes en efluentes (Richmond, 2008; Halim & Wan Haron, 2021).

Las microalgas pueden crecer en regímenes fotoauto-, mixo- y heterotrófico. No todas las especies tienen la capacidad de utilizar dos de ellos, o los tres, posiblemente por la falta de mecanismos de incorporación y asimilación de los sustratos disponibles, y/o la falta de rutas metabólicas que permitan el aprovechamiento de los mismos. Cuando existe la posibilidad de incubación mixo- o heterotrófica, se trata de mecanismos que presentan ventajas como mayores densidades celulares, menor o nula dependencia de la iluminación y posibilidad de utilización de fuentes de nutrientes de bajo costo (El-Sheekh et al., 2014).

Existen varios diseños ampliamente estudiados, entre los reactores abiertos se encuentran los rectangulares con agitación mecánica, los tipos pista o *raceway* de agitación asistida, los tanques circulares y los de sección cónica (Figura I - 1); los fotobiorreactores cerrados pueden ser del tipo tubular, paneles planos e incluso bolsas plásticas (Figura I - 2) (dos Santos et al., 2020).

La ventaja de cultivar microalgas en *open-ponds* (reactores abiertos al ambiente, con o sin asistencia de mezclado y burbujeo) es su bajo costo de mantenimiento y operación, al utilizar la luz solar como fuente de fotones para la fotosíntesis; y el uso de tierras no aptas para cultivos de plantas. Como contra partida, este tipo de sistemas de cultivo tienen un alto riesgo de contaminación externa, se requiere de una fuente de provisión de agua para reposiciones por evaporación y la penetración de la luz es limitada. Generalmente, se consiguen bajas concentraciones de biomasa (Azizi et al., 2020; Ende & Noke, 2019).

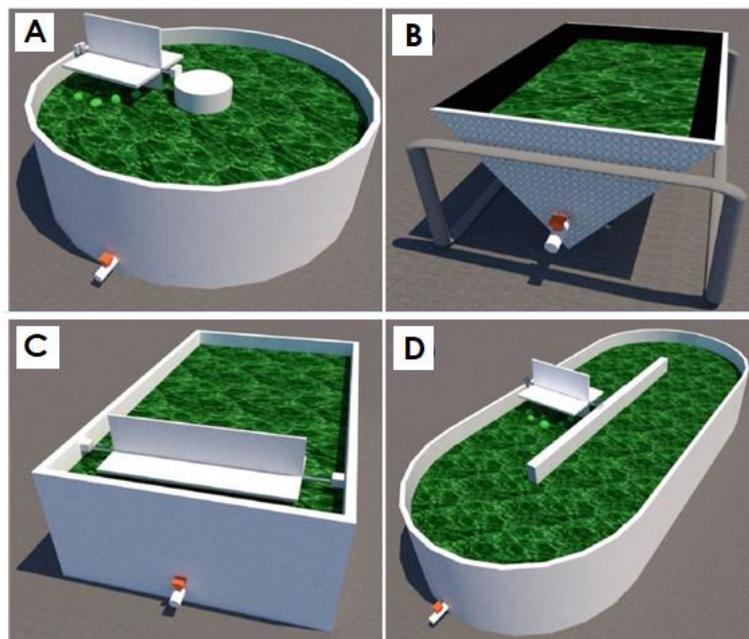


Figura I - 1: Esquemas de sistemas abiertos: a) tipo estanque circular agitado; b) tipo estanque forma V; c) tipo *open-pond* agitado rectangular; d) tipo pista o *raceway* con agitación. Adaptado de dos Santos et al. (2020).

Los fotobiorreactores permiten alcanzar mayores concentraciones de biomasa, mejor control de los parámetros de cultivo, menor pérdida de agua y gases, y minimización de la contaminación; pero su costo de construcción y operación representa una desventaja desde este punto de vista. El escalado presenta otra dificultad a superar en el uso de biorreactores, así como otros factores a tener en cuenta como la formación de biopelículas, acumulación de oxígeno, necesidad de un sistema de enfriamiento, entre otros (Mata et al., 2010).

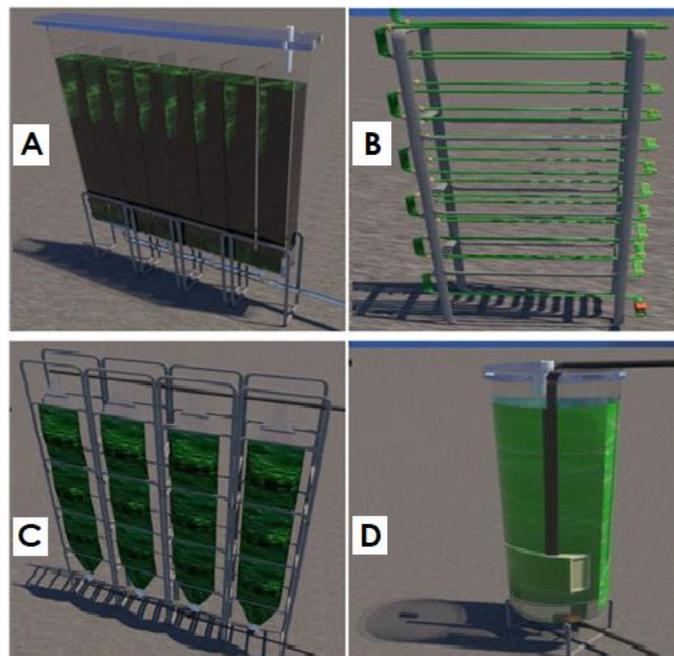


Figura I - 2: Representaciones de fotobiorreactores cerrados: a) tipo panel plano; b) tipo tubular; c) bolsas plásticas; d) reactor con módulo de membrana. Adaptado de dos Santos et al. (2020).

I.1.1.3. Aplicaciones

Un bajo porcentaje de las especies de microalgas conocidas se comercializan actualmente. Cerca de treinta géneros y especies se encuentran en explotación comercial en la actualidad (Friedl et al., 2012). La Tabla I - 1 resume las aplicaciones comerciales de estas especies.

Tabla I - 1: Aplicaciones comerciales de las microalgas.

Posición taxonómica	Género, especie	Procedencia, condición de crecimiento	Aplicaciones / compuestos
Cyanobacteria	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	Agua con alta salinidad y pH	Pigmentos, proteínas
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Agua dulce	Toxinas
Chlorophyta, Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Agua dulce	Proteínas recombinantes
	<i>Dunaliella</i>	Marina	β -caroteno, glicerol
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Agua dulce	Ácidos grasos, astaxantina
	<i>Scenedesmus / Desmodesmus</i>	Agua dulce	Luteína, acuicultura

Chlorophyta, Trebouxiophyceae	<i>Botryococcus braunii</i>	Agua dulce	Aceite, carbohidratos
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua dulce	Ácidos grasos, carbohidratos
Chlorophyta, Chlorodendrophyceae	<i>Tetraselmis</i>	Marina, de estuarios, agua dulce	Ácidos grasos poli insaturados, α -tocoferol, esteroles, cosmética, acuicultura, tratamiento de efluentes, remoción de cadmio
Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	Marina, de estuarios, agua dulce	Ácidos grasos poli insaturados, ficoeritrina, actividad antiviral, polisacáridos sulfatados, antioxidantes, avicultura
Bacillariophyta (Stramenopiles)	<i>Chaetoceros</i>	Marina, alta salinidad, termófila	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos, β -1,3-glucano
	<i>Cyclotella cryptica</i>	Agua dulce	Lípidos, β -1,3-glucano, bioacumulación de metales.
	<i>Haslea ostrearia</i>	Agua dulce	Ácidos grasos poli insaturados, ácido linoleico, marenina, isoprenoides
	<i>Nitzschia alba</i>	Agua dulce, posible heterotrofia	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos
	<i>Odontella aurita</i>	Marina	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos, β -caroteno, fucoxantina, vitaminas, cosmética
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Agua dulce, posible heterotrofia	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos, acuicultura
	<i>Skeletonema costatum</i>	Marina	Ácidos grasos poli insaturados, actividad antibacterial, β -1,3- glucano, cosmética, acuicultura, tratamiento de efluentes, biodegradación de compuestos fenólicos
	<i>Thalassiosira</i>	Marina	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos, carotenoides, fucoxantina, acuicultura, tratamiento de efluentes, biodegradación de compuestos fenólicos
Eustigmatophyceae (Stramenopiles)	<i>Monodopsis subterranea</i>	Agua dulce	Ácidos grasos poli insaturados
	<i>Nannochloropsis</i>	Marina, de estuarios, agua dulce	Ácidos grasos poli insaturados, lípidos, carotenoides, β -1,3- glucano, avicultura, acuicultura
Rhaphidophyceae (Stramenopiles)	<i>Olithodiscus sp.</i>	Marina	Lípidos, β -1,3-glucano

Haptophyta (Stramenopiles)	<i>Isochrysis galbana</i>	Marina	Ácidos grasos poli insaturados, esteroides, alquenonas, acuicultura, tratamiento de efluentes
	<i>Pavlova lutheri</i>	Marina	Ácidos grasos poli insaturados, α -tocoferol, esteroides, alquenonas, cosmética, acuicultura, tratamiento de efluentes, remoción de cadmio
Dinophyta (Chromalveolates)	<i>Cryptecodinium cohnii</i>	Marina, heterotrófica	Ácidos grasos poli insaturados, pigmentos, extractores promotores de bifidobacterias y <i>Lactobacillus</i> , alimentación animal, acuicultura
Euglenoids (Excavata)	<i>Euglena gracilis</i>	Agua dulce, posible heterotrofia	Ácidos grasos poli insaturados, α -tocoferol, lípidos, β -1,3-glucano

I.1.1.3.1. Nutrición

Hace varias décadas se ha comenzado el estudio de las microalgas como fuentes de proteínas para la nutrición humana. La calidad nutricional de las proteínas está determinada por el contenido, proporción y disponibilidad de aminoácidos. La mayor parte de los perfiles de aminoácidos de microalgas son similares o superiores a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud. A pesar de esto, su incorporación a la dieta humana no ha sido tan masiva debido al costo de producción comparado con otras fuentes de proteínas; además de su color oscuro, su olor y sabor invasivos (Becker, 2007). Algunos pigmentos se utilizan como colorantes de origen natural en la industria alimenticia, como pueden ser betacaroteno, ficocianina, astaxantina y clorofila (Cuellar-Bermudez et al., 2015). Actualmente se comercializan las microalgas como nutraceúticos en forma de comprimidos, polvos o cápsulas. Las cuatro principales microalgas que se comercializan *Spirulina* y *Chlorella* con producciones anuales entre 4000 y 7000 toneladas respectivamente, *Dunaliella* con una producción de alrededor de 1600 ton, y *Haematococcus* con 350 ton (Fernández et al., 2021).



Figura I - 3: Empaques comerciales de *Spirulina Platensis* y *Chlorella vulgaris* grado alimenticio en polvo Organikal®. Imagen adaptada del fabricante: <https://hgl.la/>.

Algunas de las microalgas son utilizadas también como fuente de proteínas para alimentación animal. En particular, el mercado de la acuicultura ha crecido un 6,3% anual en los últimos años (Ende & Noke, 2019). La industria de la acuicultura creció a ritmo acelerado en las últimas décadas, ya que la demanda de alimentos mundial continúa en constante crecimiento. El principal componente del alimento utilizado en acuicultura son los derivados de pescado. La producción de estos ingredientes se ha estancado como resultado en un incremento en el precio de los mismos que afecta los costos de producción en acuicultura. Esto ha abierto el espacio para la búsqueda de ingredientes alternativos, como microalgas y sus derivados (Guedes et al., 2015). Los compuestos nutricionales presentes en las microalgas son necesarios para el cultivo artificial de moluscos, donde cumplen una función de inmunoestimulantes que sólo pueden incluir a través de la dieta (Paniagua-Michel, 2015). La capacidad de algunas microalgas de acumular intracelularmente pigmentos como los carotenoides, resulta de especial interés para los criaderos de salmónidos, como las truchas. Se ha encontrado que la cantidad de carotenoides (pigmentos que dan el color rosa anaranjado característico) en la carne muscular fue superior cuando la dieta contenía *Chlorella* (Gouveia et al., 1998). Si bien el estudio de utilización de microalgas en acuicultura es amplio, también se han evaluado los potenciales beneficios en otros animales. Por ejemplo, se ha

encontrado que la suplementación de *Chlorella* en la dieta de cabras mejoró la producción de leche y el perfil de ácidos grasos de la misma (Kholif et al., 2017).

Si bien el motor del desarrollo de la comercialización de microalgas fue su contenido proteico, se espera un incremento en su producción para obtención de ácidos grasos poliinsaturados para aplicación nutricional. Típicamente, las microalgas generan ácidos grasos de entre 12 y 24 carbonos de longitud, y con distintos grados de saturación. En las especies reportadas de la división filogenética Chlorophyta, las longitudes de cadena que se presentan en mayor proporción van de 14 a 18 carbonos (Barreira et al., 2015). En las últimas décadas ha ido aumentando el interés en los aceites de microalgas que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga, como el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido docosapentaenoico (DPA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) de la serie omega-3; los cuales tienen propiedades beneficiosas para la salud. La fuente más reconocida de PUFA son los aceites de pescado, sin embargo, la recolección anual de carne de pescado no alcanza a cubrir la ingesta diaria recomendada de estos PUFA omega-3 de cadena larga para la población mundial. Los aceites de microalgas presentan una alternativa sin el olor característico a pescado que contienen sus aceites, además del potencial de cubrir la demanda mundial (Paniagua-Michel, 2015; Ryckebosch et al., 2012). Se conoce que los ácidos grasos poliinsaturados son beneficiosos para la salud, y algunos de ellos tienen potencial como agentes anti-aterogénicos y anti trombogénicos. Por otro lado, algunos ácidos grasos saturados como el ácido láurico, mirístico y palmítico están reconocidos como factores de riesgo para la salud. Se han desarrollado índices para predecir el potencial beneficio en la salud de los alimentos en función de su perfil de ácidos grasos. Entre éstos se encuentra el índice aterogénico, el cual indica la relación entre ácidos grasos que promueven la aterogénesis, es decir, la adhesión de lípidos a las células del sistema inmune y circulatorio, y los ácidos grasos con propiedades anti aterogénicas y de prevención de enfermedades coronarias; el índice trombogénico, el cual relaciona los ácidos grasos que fomentan, con aquellos que previenen, la formación de trombos en los capilares sanguíneos. Además de ser rica en ácidos grasos poliinsaturados, una dieta correctamente balanceada tiene una relación específica entre ácidos $\Omega 3$ y $\Omega 6$ (Fernández et al., 2007; Garaffo et al., 2011). Ryckebosch et al. (2014) reportó relaciones $\Omega 6/\Omega 3$ de 0,053 hasta 2,0 para ocho cepas distintas de microalgas.

El betacaroteno, un pigmento carotenoide de uso nutricional, se obtiene principalmente de *Dunaliella salina*, la cual genera mayor composición del pigmento a mayor salinidad del medio de cultivo. Este pigmento se utiliza principalmente como precursor atóxico de la vitamina A y

como antioxidante en formulaciones de alimentación animal y cosmética, teniendo una tasa de biodisponibilidad superior al producido por la vía sintética. Se encuentra especialmente estudiada su utilización en acuicultura como suplemento dietario en salmónidos, mediante la adición del compuesto o de la biomasa microalgal en la formulación alimentaria (Gouveia et al., 1998; Paniagua-Michel, 2015).

Otro pigmento que se comercializa a partir de microalgas es la astaxantina, que se obtiene principalmente de las microalgas del género *Haematococcus*. Se utiliza por sus propiedades antioxidantes en productos alimenticios y cosméticos, como también se lo adiciona a las formulaciones de alimentos en acuicultura (Paniagua-Michel, 2015).

I.1.1.3.2. Tratamiento de efluentes

Varias especies de microalgas, entre ellas *Chlorella* y *Scenedesmus*, tienen la posibilidad de crecer en mixotrofia consumiendo el contenido orgánico del sustrato. Si bien los efluentes a lo largo del mundo se tratan hoy por procesos aeróbicos convencionales, estos demandan de una cantidad relevante de energía; es una de las razones por las cuales se necesitan desarrollar otros procesos de tratamiento que involucren un menor consumo energético a la par de una recuperación de parte de los componentes de los efluentes. El fósforo es un contaminante en los efluentes difícil de remover. Las microalgas son capaces de adaptarse a distintos tipos de efluentes, consumiendo de los mismos carbono, nitrógeno y fósforo; y asimilando metales pesados; generando a su vez, oxígeno (cuando hay fotosíntesis) que podría reducir la necesidad de aireación por agitación de los métodos convencionales. Así mismo, no se producen subproductos del tratamiento de efluentes, como barros con precipitados. Varios tipos de efluentes han sido tratados, ya sea por remoción total o parcial de los contaminantes, por microalgas: efluentes de criaderos de peces y de granjas porcinas; descargas de efluentes urbanos, incluso hay especies capaces de crecer en efluentes con restos de aceite de motor y de la industria de producción de colorantes químicos (dos Santos et al., 2020; Figueroa et al., 2018; Pittman et al., 2011; Rawat et al., 2011).

Hay varios factores que influyen en la capacidad de las microalgas de adaptarse y crecer satisfactoriamente en efluentes. No sólo afecta la concentración de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo) y la relación entre ellos, sino también la concentración inicial de inóculo y la presencia de bacterias patógenas, microorganismos competidores o zooplancton predador. En efluentes municipales luego del tratamiento secundario, se ha encontrado que *Chlorella* y *Scenedesmus* han podido remover más del 80% del nitrógeno y todo el fósforo presente en los mismos. En efluentes

de zonas agrícolas, que suelen contener mayores porcentajes de N y P, también se ha podido remover más del 80% del nitrógeno (Pittman et al., 2011). Los porcentajes de remoción de algunos parámetros reportados están entre 26 y 70 % de la demanda química de oxígeno (DQO); de 23,5 a 55 % del carbono total; y desde 65,1 hasta el 100% de remoción de amonio (dos Santos et al., 2020). En efluentes de industria frigorífica, la remoción de amonio llegó al 97% y la de fósforo al 97% utilizando *Scenedesmus* (Kandasamy et al., 2021). La remoción de nitrógeno puede alcanzar hasta el 93% y la de fósforo hasta 41% en efluentes de industria cervecera incubando *S. obliquus* (Ferreira et al., 2017).

La bio-absorción de metales pesados en efluentes, como níquel y zinc, ha alcanzado 80 – 90 % mediante el crecimiento de *D. salina* (Faried et al., 2017). Se ha encontrado que la remoción de cromo, cobre y cadmio ha alcanzado 96, 98 y 98 %, respectivamente, con *Scenedesmus* sp; remoción de cobalto 64 % mediante *Arthrospira platensis*; hierro 100% mediante el uso de *Desmodesmus subspicatus* (Kandasamy et al., 2021).

I.1.1.3.3. Biocombustibles

De las aplicaciones más estudiadas hasta el momento en microalgas, se encuentra su utilización para la obtención de biodiesel. Si bien ya existe hoy en día la comercialización de biodiesel, el mismo se obtiene a partir de aceites vegetales. Esto genera controversia respecto al uso de las tierras cultivables y el costo de oportunidad de destinar los cultivos a la alimentación humana. Las microalgas pueden ser cultivadas en tierras no aptas para la agricultura, o bien en biorreactores, obteniendo en muchos casos productividades por unidad de área muchos mayores a las de los cultivos tradicionales (Faried et al., 2017). Se han reportado contenidos lipídicos de hasta 70% del peso total seco de biomasa microalgal, lo que representa una gran ventaja en comparación con las plantas superiores (dos Santos et al., 2020).

El enfoque de biorrefinería integrada, donde se consuma dióxido de carbono y sea posible realizar un tratamiento de efluentes al mismo tiempo que se genera biodiesel, resulta objeto de interés en los estudios. Así mismo, luego de la extracción de los lípidos, el remanente de biomasa podría aplicarse para sustrato en fermentaciones posteriores, suplementación en alimentos para animales, aporte de nutrientes a los suelos, entre otras (Mata et al., 2010).

Las productividades de lípidos reportadas para más de 30 especies de microalgas se encuentran dentro del rango de 11 a 142 mg.L⁻¹.d⁻¹; mientras que para las mismas especies se reportó productividades por área de entre 0,57 a 130 g.m⁻².d⁻¹ . Algunas especies como *B. braunii* pueden

alcanzar hasta 75% de lípidos en su masa, pero la productividad es muy baja. Otras especies pueden tener productividades superiores, pero su porcentaje de lípidos suele rondar en 20 – 50%. Las condiciones de cultivo se deben optimizar, no sólo para mejorar la productividad de lípidos, sino que para obtener perfiles de ácidos grasos adecuados para biodiesel (Mata et al., 2010).

La biomasa microalgal puede transformarse por pirólisis en combustibles sólido, líquido y gaseoso. El aceite obtenido por pirólisis de biomasa tiene un potencial energético de entre 23 y 30 MJ/kg (Ferreira et al., 2017). Existen otras vías estudiadas para obtener combustibles líquidos a partir de biomasa microalgal, entre ellas, se encuentran la producción de bioetanol o biometanol, a partir de aquellas especies que acumulan mayor cantidad de carbohidratos; y de biogás mediante la co-digestión de la biomasa con residuos agrícolas o efluentes agroindustriales (dos Santos et al., 2020; Faried et al., 2017). Se ha estudiado también el uso de biomasa de microalgas como sustrato para la producción de biohidrógeno mediante la fermentación anaeróbica con *Enterobacter aerogenes*, obteniendo productividades de entre 135 y 168 mL H₂.g⁻¹, correspondiendo el mayor valor a biomasa obtenida a partir de uso de efluentes como nutrientes (Ferreira et al., 2017).

I.1.1.3.4. Industria cosmética y farmacéutica



Figura I - 4: Productos cosméticos Estée Lauder®. Imagen adaptada del fabricante: <https://www.esteelauder.ca/>.

La investigación de nuevas plataformas de producción de biofármacos se orienta hacia la seguridad del organismo a utilizar, y bajo costo de producción con la funcionalidad apropiada de la molécula

a producir. El interés está puesto especialmente en las células vegetales y plantas superiores, ya que tienen el potencial de ser plataformas robustas y de bajo costo (Bañuelos-Hernández et al., 2015).

Se han ensayado prototipos de vacunas para humanos y veterinarias en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dunaliella salina*, como vacunas contra el virus de la hepatitis B, el virus del papiloma humano, el virus de la fiebre porcina, entre otras. Así mismo, se han logrado obtener algunos anticuerpos y otras proteínas recombinantes a partir de *C. reinhardtii* y se han ensayado en *Phaeodactylum tricornutum* y *D. salina*, como anticuerpos monoclonales contra el virus de la hepatitis B, el antígeno del ántrax y el virus del herpes, la proteína alfoficocianina, la enzima luciferasa, entre otras (Bañuelos-Hernández et al., 2015).

Se ha estudiado la bioactividad de algunos de los polímeros extracelulares (EPS) que son producidos por microalgas. Entre las aplicaciones reportadas para algas rojas se encuentran los EPS con actividades antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenos; para las diatomeas se han encontrado EPS antivirales, antiinflamatorios y analgésicos; y en algas verdes, además de los ya mencionados, se han encontrado moléculas con propiedades antibióticas y antifúngicas. La identificación de la estructura de estas moléculas sigue presentando un desafío, por lo cual aún no se puede explicar completamente la correlación entre su estructura y las bioactividades observadas (Xiao & Zheng, 2016).

Las microalgas tienen dos tipos de aplicación en las formulaciones cosméticas: como excipiente cumpliendo funciones de estabilizador o tensioactivo; o como principio activo. Algunos de los productos en el mercado utilizan, o utilizaron, extracto *Chlorella vulgaris* por sus supuestas propiedades antiinflamatorias y promoción de la síntesis de colágeno, extracto de *Arthrospira maxima* para la promoción de la regeneración natural de la piel, extracto de *Nannochloropsis oculata* por sus supuestas propiedades antienvjecimiento de la piel. Se ha reportado que la biomasa rica en pigmentos que actúan como antioxidantes, por ejemplo los pigmentos fotosintéticos carotenoides (astaxantina o luteína) o ficoeritrina; compuestos fenólicos o en polisacáridos; puede brindar protección contra la radiación ultravioleta y el daño oxidativo de la piel debido a su poder antioxidante (Figuroa et al., 2018; Ryu et al., 2015; Sun et al., 2016).

I.1.1.3.5. Bioestimulantes y biofertilizantes

Se llama bioestimulantes a derivados de material orgánico que, aplicados en cantidades moderadas, son capaces de estimular el desarrollo y crecimiento de cultivo. Los procesos

fisiológicos de las plantas son controlados por los reguladores del crecimiento. Las auxinas intervienen en los procesos de gravitropismo y fototropismo, respuestas ante estímulos de la fuerza gravitatoria y fuentes luminosas respectivamente; en el desarrollo y crecimiento de raíces; en la turgencia; en el proceso de elongación y en la división celular. Las citoquininas participan del desarrollo de tallos y raíces, en la movilización de los nutrientes, la pérdida de viabilidad de las hojas, la interrupción del aletargamiento de yemas, la germinación y en la división celular. El ácido abscísico regula la maduración de las semillas y la respuesta de la planta al estrés. Las giberelinas regulan la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la expansión foliar y la floración. Las fitohormonas tienen numerosas interacciones entre sí, las cuales pueden ser tanto sinérgicas como antagónicas dependiendo del proceso (Kapoor et al., 2021; Ronga et al., 2019).

Se han identificado en numerosos microorganismos como bacterias, algas y microalgas, fitohormonas endógenas. Las auxinas, giberelinas y el etileno se han identificado en cianobacterias; y algas verdes, rojas y marrones. Las citoquininas y el ácido abscísico se han encontrado no sólo en los linajes mencionados, sino también en diatomeas (Lu & Xu, 2015). Los compuestos activos contenidos en las microalgas están en la pared celular o vinculados a otras estructuras, por lo cual es necesario recurrir a procesos de ruptura celular para su liberación. Se han estudiado procesos de secado, crio-procesamiento, ruptura por alta presión, tratamientos enzimáticos, entre otros. El procesamiento de la biomasa debe ser preferentemente suave, dado que se requiere liberar los compuestos de la estructura celular, pero sin llegar a su desnaturalización. Los biofertilizantes son productos que contienen microorganismos vivos o sustancias naturales, que presentan la capacidad de restaurar el suelo, mejorar sus propiedades o influir en sus reacciones químicas, de modo de promover el crecimiento de las plantas (Figueroa et al., 2018; Ronga et al., 2019; Stirk et al., 2013).

Se han evaluado aplicaciones foliares de *Arthrospira platensis* en pimientos dulces obteniendo mayores rendimientos. La aplicación de *Arthrospira vaginicola* en plantines de pepino, calabazas y tomates permitió obtener incrementos en el peso seco de biomasa, en el largo de raíces y cantidad de hojas. Mientras que la aplicación de *C. sorokiniana* incremento el peso y longitud de plantas de trigo. Se ha encontrado que la aplicación de extractos de *C. kessleri* mejoró el crecimiento de plantines de haba, mientras que *S. quadricauda* y *C. vulgaris* mostraron efectos sobre raíces de remolacha azucarera. Los extractos de *D. salina* y *P. tricornutum* han demostrado la capacidad de proteger plantas de pimientos del estrés salino, reduciendo la producción de radicales superóxidos. También se ha encontrado que la aplicación de biomasa de *S. dimorphus* mostró mejoras en

parámetros como tiempo de germinación, número de raíces, cantidad de flores y de ramas. Se han reportado incrementos en los rendimientos de diferentes cultivos tratados con consorcios de bacterias y microalgas; o de dos o más cepas de microalgas, por ejemplo, especies de cianobacterias y Chlorophyta (Kapoor et al., 2021).



Figura I - 5: Bioestimulantes a base de microalgas de la marca AgriAlgae®. Imagen adaptada del fabricante: <https://www.algaenergy.es/>.

I.1.1.3.6. Otras aplicaciones

Hay una necesidad e interés mundial de mitigar las emisiones de dióxido de carbono. En este contexto, se ha comenzado a estudiar el secuestro de CO₂ mediante el cultivo de microalgas. Tienen mayor eficiencia fotosintética que las plantas y algunas especies pueden utilizar gases de escape, tolerando altos porcentajes de dióxido de carbono y la presencia de óxidos de azufre y nitrógeno. El secuestro de CO₂ resulta interesante dentro de un concepto de biorrefinería, combinando este proceso junto a la remediación de efluentes; y obteniendo biomasa para generación de combustibles o productos de valor a partir de la misma (Zhang & Liu, 2021).

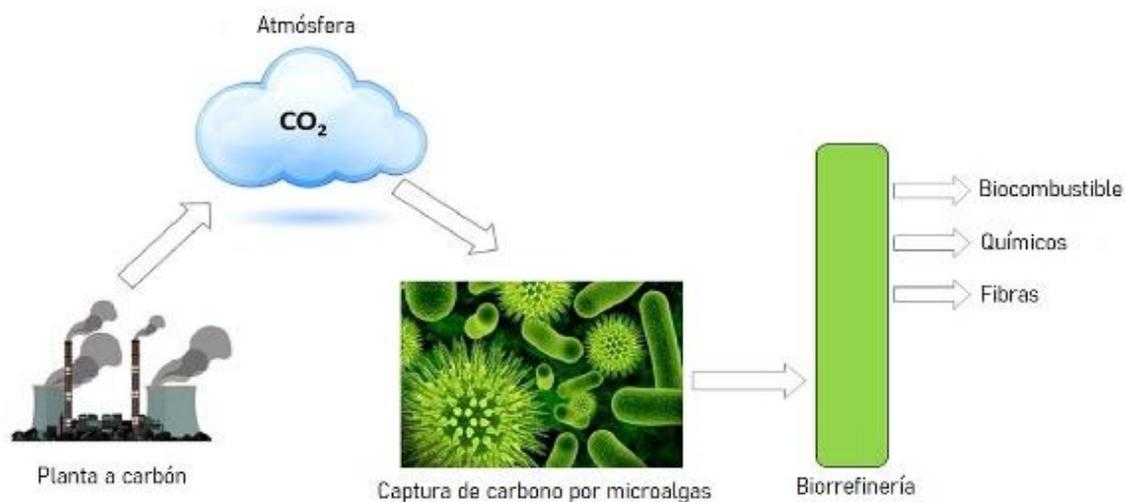


Figura I - 6: Esquema gráfico conceptual de la captura de carbono mediante el uso de microalgas. Adaptado de Onyeaka et al. (2021).

Otra aplicación que está comenzando a explorarse son biomateriales a base de microalgas, en función de una tendencia global a encontrar alternativas a los materiales derivados del petróleo. Las microalgas producen una variedad de intermediarios de bioplásticos, por citar uno, el polihidroxibutirato (PHB), que es un polímero de la familia de los poliésteres (Fernández et al., 2021).

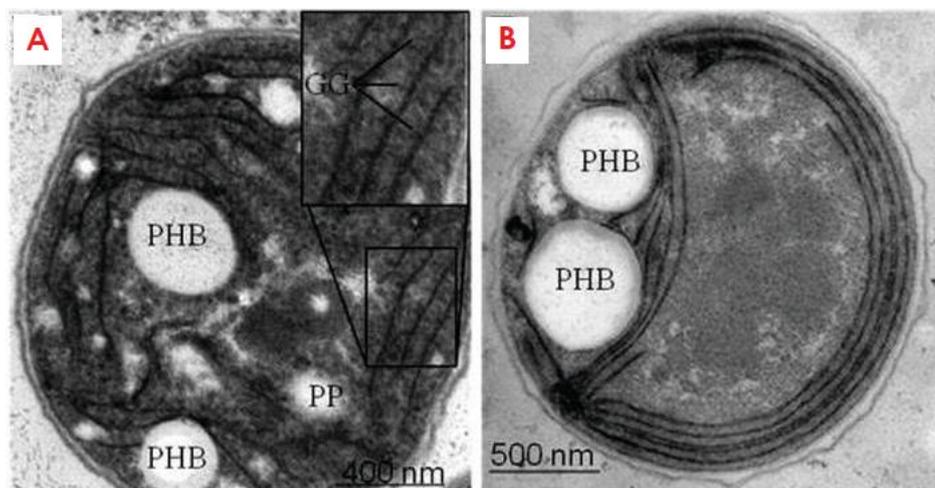


Figura I - 7: Gránulos de PHB en cianobacterias: a) cepa salvaje; b) cepa mutante. Adaptado de Markl et al. (2018).

I.1.2. Efluente cervecero

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida en el país, casi duplicando el consumo anual per cápita de la siguiente en valores de consumo. La venta de cerveza en la Argentina superó los 21 millones de hectolitros anuales. El consumo local se caracterizó en los últimos años por un aumento en el segmento “premium”, lo cual favoreció la proliferación de pequeñas y micro cervecías en todo el país. El mercado argentino de cervezas artesanales se expande un 30% anual, siguiendo la tendencia mundial al desarrollo de pequeños y micro emprendimientos (Ablin, 2014; Winkelman et al., 2019).

A nivel mundial, la producción de cerveza del año 2015 fue mayor de 2 billones de hectolitros, siendo la quinta bebida más consumida. El rango de generación de efluentes de esta industria es amplio, estimándose en 2 a 10 litros de efluentes líquidos por cada litro de cerveza producido. El efluente se conforma de restos de cerveza y purgas intermedias, agua de lavado y agua de refrigeración. Estos efluentes tienen alta carga orgánica debido a la presencia de azúcares, almidón solubilizado etanol, entre otros. Generalmente se tratan en reactores anaeróbicos previo a la descarga. Los rangos de demanda química de oxígeno (DQO) para los efluentes cerveceros tienen una amplia variabilidad, por ejemplo, la DQO medida para un efluente de una compañía industrial de Portugal fue de $628 \pm 18 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; sin embargo, si el efluente es una purga de cañería o descarte de producto final, los valores de DQO pueden ascender hasta $170000 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, debido al remanente de carbohidratos y/o etanol y glicerol. Un efluente proveniente de una cervecía artesanal en Argentina, provincia de Santa Fé, presentó una DQO de $120920 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (Ferreira et al., 2017; Fillaudeau et al., 2008; Seluy & Isla, 2014).

Las cervecías artesanales se caracterizan por tener procesos manuales o semi-automáticos; teniendo dificultad para acceder a financiación, a las habilitaciones para operar, a adquirir materias primas e infraestructura, etc. Muy pocas cervecías artesanales han podido resolver el tema del vertido de efluentes para cumplir con la normativa local vigente (Civitaresi et al., 2017).

El mosto contiene aproximadamente 90% de carbohidratos en su composición. Entre los principales se pueden mencionar la sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas. Las dextrinas son compuestos no metabolizables para muchas de las levaduras, por ejemplo, son consumidas sólo en caso de agotamiento de los monosacáridos. En el mosto también se encuentran compuestos nitrogenados de proporciones variadas en función del origen del cereal, método de

molienda, condiciones de cultivo, etc. De estos compuestos mencionados, aquellos asimilables por los microorganismos son aminoácidos libres, iones amonio y pequeños péptidos. (He et al., 2014).

I.2. Hipótesis

De acuerdo a lo expuesto luego de la revisión del arte previo, surgen las siguientes hipótesis:

- *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda*, ambas microalgas no axénicas, pueden adaptarse a crecer en un medio de cultivo conteniendo efluente de cervecería artesanal de alta carga orgánica.
- Es posible caracterizar el crecimiento de las microalgas, calculando parámetros cinéticos según el modelo de Gompertz; así como la composición bioquímica de la biomasa obtenida.
- Los cultivos de ambas microalgas son escalables en un orden de magnitud.
- La biomasa de *C. vulgaris* tiene una potencial aplicación como bioestimulante.
- Los lípidos extraídos de la biomasa de *S. quadricauda* tienen una potencial aplicación como ácidos grasos para suplemento nutricional.

I.3. Objetivos generales

A partir de las hipótesis planteadas, se establece el siguiente objetivo general para abordar el trabajo de tesis:

Contribuir a la mejora de la sustentabilidad de las plantas cerveceras, a través de propuestas innovadoras que permitan aprovechar sus efluentes como insumos para la producción de microalgas.

Para lograr este objetivo se estudiará el comportamiento de dos microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* en un medio de cultivo a base del efluente cervecero. A continuación, se resumen los objetivos específicos, que serán explicitados en los correspondientes capítulos subsiguientes.

En el Capítulo II se evaluará la posibilidad de adaptación de *Chlorella vulgaris* a un medio conteniendo efluente cervecero, para aprovechar los nutrientes presentes en el mismo, determinando los valores iniciales óptimos de pH y concentración de efluente. Se caracterizarán los parámetros cinéticos del crecimiento y la composición bioquímica de la biomasa generada. Se

evaluará el escalado del cultivo y la potencial aplicación de la biomasa generada como bioestimulante.

En el Capítulo III se evaluará la posibilidad de *Scenedesmus quadricauda* de aprovechar los nutrientes del efluente cervecero, evaluando los valores óptimos de pH y concentración de efluente al inicio del cultivo. Se determinará qué sales se necesitan suplementar. Se caracterizarán los parámetros cinéticos y la composición bioquímica de la biomasa. Se buscará escalar del cultivo y evaluar la potencial aplicación de los lípidos extraídos de la biomasa generada.

I.4. Organización

El presente trabajo se organiza del siguiente modo:

- En el CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN se presenta, en primer lugar, la revisión bibliográfica general y actualizada sobre las microalgas y el efluente cervecero. Luego se plantean las hipótesis de trabajo, seguidas de los objetivos generales. Para finalizar, se encuentra el presente apartado (donde se explica la estructura general de la presente tesis); y la bibliografía citada en este capítulo.
- El CAPÍTULO II: *CHLORELLA VULGARIS* abarca el trabajo realizado con la microalga mencionada. Comienza por una revisión bibliográfica específica para el género; seguida de los objetivos particulares para esta sección. A continuación, se detallan los materiales y métodos aplicados para la investigación en *C. vulgaris*. Sigue el apartado de resultados y discusión de los mismos. Para finalizar, se encuentran las conclusiones particulares del trabajo con *C. vulgaris* y la bibliografía consultada para el capítulo.
- El CAPÍTULO III: *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* sigue una estructura similar a la mencionada en el ítem anterior. En ambos capítulos se incluyen aplicaciones potenciales de la correspondiente biomasa obtenida.
- En el CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES se analizan las conclusiones generales para ambas microalgas, cerrando con un apartado de recomendaciones a futuro.

I.5. Bibliografía

Ablin, A. (2014). *El mercado de cerveza*. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/sectores.php?secc=alcoholicas>

Azizi, S., Bayat, B., Tayebati, H., Hashemi, A., & Pajoum Shariati, F. (2020). Nitrate and phosphate removal from treated wastewater by *Chlorella vulgaris* under various light regimes

within membrane flat plate photobioreactor. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, n/a(n/a), e13519. <https://doi.org/10.1002/ep.13519>

Bañuelos-Hernández, B., Beltrán-López, J. I., & Rosales-Mendoza, S. (2015). Chapter 18—Production of Biopharmaceuticals in Microalgae. En S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 281-298). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00018-2>

Barreira, L., Pereira, H., Gangadhar, K. N., Custódio, L., & Varela, J. (2015). Chapter 13—Medicinal Effects of Microalgae-Derived Fatty Acids. En S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 209-231). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00013-3>

Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

Civitaresi, H. M., Niembro, A. A., & Dondo Bühler, M. B. (2017). *Desafíos para desarrollar una agroindustria local. Hacia una tipología de productores de cerveza artesanal en Bariloche*. <https://rid.unrn.edu.ar/jspui/handle/20.500.12049/3990>

Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190-209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>

dos Santos, M. G. B., Duarte, R. L., Maciel, A. M., Abreu, M., Reis, A., & de Mendonça, H. V. (2020). Microalgae Biomass Production for Biofuels in Brazilian Scenario: A Critical Review. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10180-1>

El-Sheekh, M. M., Bedaiwy, M. Y., Osman, M. E., & Ismail, M. M. (2014). Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Obliquus*. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*, 2(2), 20-28.

Ende, S. S. W., & Noke, A. (2019). Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1565-1571. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1697-6>

Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 893-913. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>

Fernández, F. G. A., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V., & Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, 61, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>

Fernández, M., Ordóñez, J. A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., & Hoz, L. de la. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 101(1), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006>

Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A. S. S., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., Reis, A., & Gouveia, L. (2017). *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1316-1327. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.232>

- Figuroa, F. L., Korbee, N., Abdala-Díaz, R., Álvarez-Gómez, F., Gómez-Pinchetti, J. L., & Acién, F. G. (2018). 6—Growing algal biomass using wastes. En D.-P. Häder & G. S. Erzinger (Eds.), *Bioassays* (pp. 99-117). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00006-1>
- Fillaudeau, L., Bories, A., & Decloux, M. (2008). 35 - Brewing, winemaking and distilling: An overview of wastewater treatment and utilisation schemes. En J. Klemeš, R. Smith, & J.-K. Kim (Eds.), *Handbook of Water and Energy Management in Food Processing* (pp. 929-995). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845694678.6.929>
- Friedl, T., Rybalka, N., & Kryvenda, A. (2012). 2 Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. En *Microalgal Biotechnology: Potential and Production* (pp. 11-38). De Gruyter. <https://www.degruyter.com/view/book/9783110225020/10.1515/9783110225020.11.xml>
- Garaffo, M. A., Vassallo-Agius, R., Nengas, Y., Lembo, E., Rando, R., Maisano, R., Dugo, G., & Giuffrida, D. (2011). *Fatty Acids Profile, Atherogenic (IA) and Thrombogenic (IT) Health Lipid Indices, of Raw Roe of Blue Fin Tuna (Thunnus thynnus L.) and Their Salted Product "Bottarga"*. Scientific Research Publishing. <http://www.scirp.org/Journal/Paperabs.aspx?paperid=7235>
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Rema, P., & Empis, J. (1998). Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: Effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. *Aquaculture International*, 6(4), 269-279. <https://doi.org/10.1023/A:1009251714573>
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2015). Chapter 8—Application of Microalgae Protein to Aquafeed. En S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 93-125). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00008-X>
- Halim, A. A., & Wan Haron, W. N. A. (2021). Immobilized Microalgae using Alginate for Wastewater Treatment. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 29(3). <https://doi.org/10.47836/pjst.29.3.34>
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Kandasamy, S., Narayanan, M., He, Z., Liu, G., Ramakrishnan, M., Thangavel, P., Pugazhendhi, A., Raja, R., & Carvalho, I. S. (2021). Current strategies and prospects in algae for remediation and biofuels: An overview. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102045. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102045>
- Kapooore, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107754>
- Kaur, A., Taggar, M. S., Kalia, A., & Singh, M. (2022). Nitrate-Induced Carbohydrate Accumulation in *Chlorella sorokiniana* and its Potential for Ethanol Production. *BioEnergy Research*, 15(1), 253-263. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10292-2>
- Kholif, A. E., Morsy, T. A., Matloup, O. H., Anele, U. Y., Mohamed, A. G., & El-Sayed, A. B. (2017). Dietary *Chlorella vulgaris* microalgae improves feed utilization, milk production and concentrations of conjugated linoleic acids in the milk of Damascus goats. *The Journal of Agricultural Science*, 155(3), 508-518. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000824>
-

- Kumar, H. D., & Singh, H. N. (1979). Comparative Morphology. En H. D. Kumar & H. N. Singh (Eds.), *A Textbook on Algae* (pp. 11-25). Macmillan Education UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-16144-7_2
- Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends in Plant Science*, 20(5), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Mapstone, L. J., Leite, M. N., Purton, S., Crawford, I. A., & Dartnell, L. (2022). Cyanobacteria and microalgae in supporting human habitation on Mars. *Biotechnology Advances*, 59, 107946. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107946>
- Markl, E., Grünbichler, H., Lackner, M., Markl, E., Grünbichler, H., & Lackner, M. (2018). Cyanobacteria for PHB Bioplastics Production: A Review. *Algae*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81536>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, Nidia. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Onyeaka, H., Miri, T., Oibileke, K., Hart, A., Anumudu, C., & Al-Sharify, Z. T. (2021). Minimizing carbon footprint via microalgae as a biological capture. *Carbon Capture Science & Technology*, 1, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.ccst.2021.100007>
- Paniagua-Michel, J. (2015). Chapter 16—Microalgal Nutraceuticals. En S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 255-267). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00016-9>
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Posten, C., & Walter, C. (2012). *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. De Gruyter.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*, 9(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Ryckeboosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24(6), 128-130. <https://doi.org/10.1002/lite.201200197>
- Ryckeboosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160, 393-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.087>
- Ryu, B., Himaya, S. W. A., & Kim, S.-K. (2015). Chapter 20—Applications of Microalgae-Derived Active Ingredients as Cosmeceuticals. En S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine*
-

Microalgae (pp. 309-316). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00020-0>

Seluy, L. G., & Isla, M. A. (2014). A Process To Treat High-Strength Brewery Wastewater via Ethanol Recovery and Vinasse Fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(44), 17043-17050. <https://doi.org/10.1021/ie500438j>

Stirk, W. A., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains1. *Journal of Phycology*, 49(3), 459-467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>

Sun, Z., Li, T., Zhou, Z., & Jiang, Y. (2016). Microalgae as a Source of Lutein: Chemistry, Biosynthesis, and Carotenogenesis. En C. Posten & S. Feng Chen (Eds.), *Microalgae Biotechnology* (pp. 37-58). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2015_331

Winkelman, B., Colino, E., Martín Civitaresi, H., Winkelman, B., Colino, E., & Martín Civitaresi, H. (2019). El Sistema Agroalimentario Localizado de la cerveza artesanal de San Carlos de Bariloche, Argentina. *RIVAR (Santiago)*, 6(18), 34-58. <https://doi.org/10.35588/rivar.v6i18.4174>

Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>

Zhang, S., & Liu, Z. (2021). Advances in the biological fixation of carbon dioxide by microalgae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(6), 1475-1495. <https://doi.org/10.1002/jctb.6714>

Zhu, S., Feng, S., Xu, Z., Qin, L., Shang, C., Feng, P., Wang, Z., & Yuan, Z. (2019). Cultivation of *Chlorella vulgaris* on unsterilized dairy-derived liquid digestate for simultaneous biofuels feedstock production and pollutant removal. *Bioresource Technology*, 285, 121353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121353>

CAPÍTULO II: *CHLORELLA VULGARIS*

II.1. Introducción

Chlorella vulgaris es una de las microalgas con mayor número de aplicaciones estudiadas. El género *Chlorella* ha sido objeto, por su potencial biotecnológico, de numerosos estudios desde mediados del siglo pasado.

La forma reportada de *Chlorella* es esférica u ovoidal, unicelular, de diámetro entre 2 y 10 μm para la cepa *vulgaris*. Es una célula rígida sin motilidad de rápida reproducción asexual; la cual genera cuatro hijas (o autosporas) por cada célula madre, aunque hay casos donde se generan hasta 16 autosporas. Posee una pared celular rígida, que aumenta su dureza a medida que la célula gana madurez. Se han reportado espesores medios de 82 nm en fase de crecimiento exponencial, que aumentan a 114 nm en fase estacionaria, pudiendo llegar hasta 200 nm. La célula presenta un solo cloroplasto de doble membrana envolvente (Canelli et al., 2021; Endo et al., 1974; Ibrahim & Elbaily, 2020; Richmond, 2008; Safi et al., 2014).

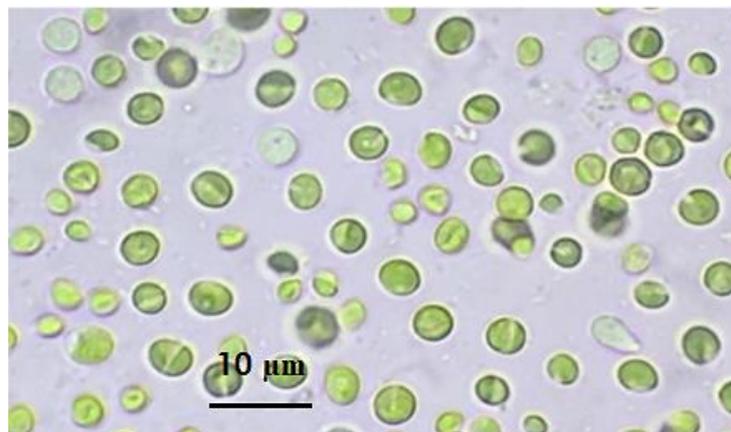


Figura II - 1: *Chlorella vulgaris*. Adaptado de Ramaraj et al. (2016).

II.1.1. Nutrientes

Varios estudios sobre los requerimientos nutricionales de este género han demostrado que los nutrientes N, Mg, K, P, S, Fe, Zn y Mn son necesarios para el crecimiento de la microalga tanto régimen autotrófico como heterotrófico; mientras que el cloruro fue determinado como necesario sólo en el crecimiento autotrófico. En relación con otros elementos que son requeridos en la

mayoría de las especies de algas, el Ca, Cu y Mb se han establecido como necesarios para *Chlorella* sólo cuando la única fuente de nitrógeno es nitrato. No se ha podido comprobar la necesidad de boro. Los elementos que representan el mayor porcentaje del total de la composición de *Chlorella* y *Scenedesmus* son C, O, H, N, P, K, Mg, S y Fe. La mayoría de las especies de *Chlorella* puede tolerar una amplia variación en la concentración de sales que contienen los nutrientes, por lo cual la composición del medio no suele ser un parámetro crítico en muchos cultivos. De igual modo, han mostrado tolerancia a las variaciones de pH. Se trata de una microalga resistente a condiciones adversas varias y a la contaminación microbiológica, respondiendo a las distintas condiciones de cultivo con variaciones en su composición. Condiciones de deficiencia de nitrógeno y/o fósforo; o exceso de dióxido de carbono, hierro o exposición solar, por ejemplo, reducen la productividad de biomasa y aumentan los contenidos de lípidos y/o carbohidratos. En cambio, condiciones de cultivo y concentraciones de nutrientes, por ejemplo nitrógeno, controladas y optimizadas llevan a incrementos en el contenido de proteínas y mejores productividades de biomasa (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Rodrigues-Sousa et al., 2021; Safi et al., 2014).

Las fuentes de nitrógeno más comunes en el cultivo de microalgas son sales de amonio, de nitrato y urea; para los dos últimos, la microalga los debe reducir a amonio, por lo cual tiende a utilizar preferentemente esta forma. La forma en la cual se suministra el nitrógeno tiene efectos en la evolución del pH del cultivo: el consumo de ion amonio lleva a una reducción progresiva del pH, mientras que el consumo de nitrato produce el efecto contrario; el valor de pH se mantiene relativamente constante cuando la sal es urea. El uso de sales de amonio puede generar mayor inhibición en el crecimiento debido a los valores más bajos de pH que se desarrollan en el cultivo a medida que se consume la fuente de nitrógeno. Se ha reportado que la presencia de proteínas en el medio de cultivo no incrementa la utilización de sustrato por parte de *C. vulgaris* en crecimiento mixotrófico. La deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo produce modificaciones en la composición de la biomasa: el contenido de proteínas se reduce, al menos a la mitad del contenido en disponibilidad de N; mientras que aumenta el contenido de lípidos y carbohidratos, siempre que haya disponibilidad suficiente de carbono. Las especies de *Chlorella* que se han estudiado, han respondido de dos formas distintas a la deficiencia de nitrógeno: algunas especies incrementan en mayor porcentaje los ácidos grasos, pudiendo variar la composición entre ácidos grasos libres y triglicéridos, mientras que otras aumentan principalmente el contenido de carbohidratos. Se ha encontrado que junto al aumento de lípidos, ante condiciones de deficiencia de nitrógeno, ocurre

un aumento del daño del sistema fotosintético (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Endo et al., 1974; Peng et al., 2019; Zhang et al., 2013).

El carbono se suministra en forma de dióxido de carbono para cultivos de microalgas fotoautotróficos. El efecto del pH y la temperatura en la solubilidad del mismo deben tenerse en cuenta, especialmente porque algunas especies de microalgas pueden asimilar la especie CO_2 , mientras que otras HCO_3^- . Muchas especies de *Chlorella* pueden crecer en regímenes mixo- y heterotróficos, en los cuales las fuentes de carbono son compuestos orgánicos (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Si la relación carbono total frente a nitrógeno total aumenta, puede aumentar la velocidad de crecimiento y obtener mayores concentraciones finales y productividades mediante el cambio de régimen a mixotrófico (en presencia de luz) o heterotrófico (en ausencia). La presencia de carbono asimilable en el medio lleva a *Chlorella* a dejar el régimen puramente fotoautotrófico (Gao et al., 2019; Kong et al., 2020).

Respecto a los macroelementos que se suministran típicamente a *Chlorella*, el potasio es el catión de mayor porcentaje en el citoplasma de las células vegetales, además de tener un rol en el funcionamiento de enzimas para síntesis de carbohidratos; el azufre compone la cisteína y los sulfolípidos que contiene *Chlorella*; el magnesio y el cloruro participan del proceso de fotosíntesis, siendo el primero constituyente de la clorofila y el segundo relacionado a la actividad de los cloroplastos. Se ha reportado que la concentración óptima de potasio se encuentra en alrededor de 650 mg/L, a mayores niveles se inhibe el crecimiento. Entre los micronutrientes que requiere *Chlorella*, el manganeso, el cobre y el hierro son necesarios para el crecimiento fotoautotrófico, ya que juegan un papel en el proceso de fotosíntesis. El zinc es constituyente de la enzima que participa de la fijación de dióxido de carbono y el molibdeno de la enzima reductora de nitrato (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Papapolymerou et al., 2014).

II.1.2. Modos de cultivo

La eficiencia del uso de la energía lumínica de un cultivo de algas se ve afectada por la limitación que tienen las células para utilizar luz de alta intensidad. En este aspecto, *Chlorella* tiene una intensidad de saturación de la fotosíntesis relativamente baja, de entre 4000 y 30000 lux dependiendo de la cepa. Aquellas especies con valores de intensidad de saturación más altos son las más adecuadas para los cultivos en masa del tipo fotoautotrófico. Para especies de *Chlorella* y dependiendo de la aplicación final de la biomasa o composición deseada, los regímenes mixo- y

heterotróficos suelen permitir alcanzar mayores productividades (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Mohammad Mirzaie et al., 2016).

Existen estudios sobre la optimización del uso de la luz en cultivo fotoautotróficos de *Chlorella*. Se encontró que a $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el régimen de luz que mayor productividad alcanzó fue 24 horas de iluminación continua, seguido por los regímenes 16 horas y 12 horas de iluminación continua. El mismo patrón, aunque con menores productividades, se encontró con la intensidad lumínica de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Azizi et al., 2020). En sistemas tipo estanque abierto, la profundidad óptima de los mismos es entre 15 y 50 cm, para permitir el acceso a la iluminación, especialmente al final de la etapa exponencial. Otras limitaciones que se presentan en estos sistemas es la necesidad de control de contaminación, evaporación de agua; mientras que la temperatura, fotoperíodo e intensidad depende de la estación del año y condiciones ambientales. El control de las condiciones de cultivo y la limitación de densidad celular que se dan en los sistemas abiertos, se puede mejorar migrando a un sistema cerrado en un fotobiorreactor (Safi et al., 2014).

Existen efectos de la temperatura sobre la tasa de fotosíntesis; dichos efectos son particulares de cada especie de *Chlorella*. En forma general, la disminución de la temperatura desacelera reacción de la fotosíntesis. Uno de los mecanismos propuestos para la sensibilidad a las bajas temperaturas es el cambio de fluidez de los lípidos de las membranas, lo cuales pasan a formar primero un gel y luego, a menores temperaturas, comienzan a cristalizar. Las membranas tilacoides, donde ocurre la fotosíntesis, se ven afectadas por el cambio en la fluidez de los lípidos. Se ha reportado que las células vegetales que son más resistentes a las bajas temperaturas poseen una composición lipídica general más insaturada y de cadenas más cortas, lo que reduce las temperaturas de cristalización de estos compuestos, representando con mayor fluidez. Incluso han sido reportados cambios en la composición de la misma cepa de *Chlorella*, cultivada a distintas temperaturas: aquellos cultivos realizados a menores temperaturas mostraron un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados. Esto podría deberse a la adaptabilidad de la microalga a la temperatura de cultivo (Borowitzka & Borowitzka, 1988).

Varios estudios han demostrado que para *Chlorella*, los modos de cultivo mixo- y heterotrófico pueden alcanzar mayores concentraciones de biomasa y productividades, que el modo fotoautotrófico, así como mayores velocidades de crecimiento (Endo et al., 1974). Shen et al. (2019) reportaron productividades 381% y 150% superiores para los modos mixo- y heterotróficos, respectivamente. Arora & Philippidis (2021) reportaron que los cultivos en hidrolizado de bagazo

de sorgo en modos mixo- y heterotróficos superaron en 100% o más la concentración final en bs, para tres especies de *Chlorella*, que el cultivo fotoautotrófico en medio de mantenimiento. Un régimen mixotrófico permite superar limitaciones al crecimiento debido a la dificultad de penetración de la luz en cultivos densos o cuando el efluente es oscuro o tiene sólidos en suspensión. Para consorcios de microalgas y bacterias, el régimen heterotrófico puede resultar ventajoso cuando la degradación de los compuestos orgánicos en moléculas más simples, facilitan el consumo de éstos por parte de las microalgas (Cuellar-Bermudez et al., 2017). En aquellos cultivos donde la iluminación es determinante en la tasa de crecimiento (especialmente en modos fotoautotróficos) el costo de iluminación pasa a ser el mayor en el conjunto de costos de cultivar biomasa microalgal. El modo de cultivo heterotrófico, cuando es posible de aplicarse, presenta las ventajas de ser menos costoso al no requerir de una fuente de energía lumínica, así como resulta más sencillo de construir y operar en gran escala, y permite lograr mayores densidades celulares. Dentro de las desventajas que se requieren sortear para su aplicación se encuentran la selección de una cepa que pueda efectivamente adaptarse al régimen en oscuridad, la posible contaminación bacteriana y la inhibición por los sustratos orgánicos (El-Sheekh et al., 2014). También se debe tener en cuenta que el cultivo heterotrófico depende de los compuestos orgánicos del medio como fuente de carbono y energía, con lo cual el agotamiento en éstos puede derivar rápidamente en una fase de muerte (Mohammad Mirzaie et al., 2016).

II.1.3. Composición de la biomasa

El contenido de proteínas en la biomasa de *Chlorella* suele encontrarse en el rango entre 42 y 58%, y su perfil de aminoácidos es aceptable, o incluso superior al recomendado para la nutrición humana. Adicionalmente, se ha reportado que tienen una alta capacidad emulsionante, lo cual genera otra potencial aplicación en la industria alimenticia (Safi et al., 2014). Se han reportado amplios rangos de concentraciones de proteínas en cepas de *Chlorella*, estando entre 21 – 39% en régimen heterotrófico; y entre 41 – 60 % en régimen mixotrófico (El-Sheekh et al., 2014). Algunas especies de *Chlorella* incubadas con efluentes varios, como municipales o de acuicultura, han presentado entre 12 – 35 % de contenido proteico (Ajala & Alexander, 2020).

En condiciones normales de crecimiento, se han reportado contenidos de lípidos de *Chlorella* entre 5 y 40%, aunque en condiciones de estrés el porcentaje puede aumentar hasta 58%. Los grupos principales encontrados en este género son fosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutrales (Safi et al., 2014). Algunos rangos de porcentaje de lípidos encontrados en bibliografía son 13,2 – 32,2 % para

C. vulgaris en medio conteniendo líquido sin esterilizar de digestión de efluentes lácteos (Zhu et al., 2019); entre 43 – 46 % para *C. protothecoides* en medio con hidrolizado de alcachofa, con y sin sales de suplemento (Cheng et al., 2009).

El-Sheekh et al. (2014) reportaron contenidos de carbohidratos dentro del rango aproximado 7 – 14 % en biomasa de *C. vulgaris*, en regímenes mixo- y heterotróficos, en medio de mantenimiento con concentración variable de molasas. El valor superior del rango corresponde al sistema con mayor contenido de carbono orgánico en el medio. Se ha encontrado que cepas de *C. vulgaris* han podido alcanzar porcentajes de hasta 48 – 54 % de carbohidratos cuando se la sometió a estrés por deficiencia de nitrógeno (Ho et al., 2013; Kaur et al., 2022). Algunas especies pueden excretar polisacáridos extracelulares (EPS) en condiciones de deficiencia de nitrógeno y fósforo (Li et al., 2021). Bernaerts et al. (2018) pudieron establecer que de la composición de los carbohidratos de *C. vulgaris*, 1,8% bs eran polisacáridos de almacenamiento; 9,3% polisacáridos de pared celular y 0,5% extracelulares.

La clorofila es el pigmento más abundante en la biomasa de *Chlorella*. Puede encontrarse en condiciones normales de cultivo entre 1 y 2% bs de la biomasa. En segundo lugar y con la función de ser pigmentos accesorios, se encuentran los carotenoides: asociados a la clorofila en las membranas tilacoides o asociados a las gotas de lípidos en los cloroplastos (Safi et al., 2014). Se han encontrado valores medios de 1,85 % de clorofila total y 0,36% de carotenoides en biomasa de *C. pyrenoidosa* en cultivo batch mixotrófico (Wang et al., 2020). Arora & Philippidis (2021) compararon el contenido de pigmentos a lo largo de cultivos de especies de *Chlorella* en los tres modos de cultivo; reportando que los sistemas fotoautotróficos presentaron alrededor de 1,23% bs de pigmentos totales, mientras que los sistemas mixo- y heterotróficos presentaron valores totales entre 0,53 – 0,59% bs. Otros pigmentos de interés que pueden encontrarse en algunas especies de *Chlorella* son luteína y astaxantina, aunque en menores concentraciones (Ibrahim & Elbaily, 2020). Se pudieron determinar contenidos de luteína de hasta 0,51% bs en *C. protothecoides* (Wang et al., 2019). Kong et al. (2020) reportaron que el contenido de pigmentos desarrollado en la biomasa de *C. vulgaris* parecería estar correlacionado con el grado de fotosíntesis y de asimilación de fuentes de carbono. Las cantidades de pigmentos fueron mayores en régimen fotoautotrófico y en mixotrófico cuando la fuente de carbono eran moléculas más complejas y por lo tanto su asimilación era más difícil para la célula.

II.1.4. Productividad

Las productividades reportadas para la biomasa de *Chlorella* son muy variables, dependiendo del medio de cultivo y las condiciones de incubación. A gran escala en un fotobiorreactor *offshore* con efluente municipal e inyección de CO₂ se reportaron hasta 6,4 g.m⁻².d⁻¹ (Cuellar-Bermudez et al., 2017). Jin et al. (2021) condujeron un cultivo de *C. sorokiniana* en un biorreactor escala piloto de 1000 L con 300 L de volumen operativo inicial, en el cual obtuvo productividades a distintos valores de oxígeno disuelto entre 64,5 y 73,5 g.L⁻¹.d⁻¹. Dos especies de *C. vulgaris* fueron cultivadas en biorreactores abiertos de capa fina (5-6 mm de profundidad) de volúmenes 200 y 600 L, obteniendo productividades de 4,3 y 22 g.m⁻².d⁻¹ (Masojídek et al., 2021).

En escalas medias (25 L) *Chlorella* sp. mostró una productividad de 920 mg.L⁻¹.d⁻¹ utilizando también efluente municipal y con iluminación continua (Richmond, 2008), mientras que *C. pyrenoidosa* (50 L) alcanzó un valor de 11,8 g.L⁻¹.d⁻¹ en medio de cultivo con efluente industrial de una fábrica de catalizadores centrifugado con alto contenido de amonio (Wang et al., 2020).

A escala laboratorio se han reportado productividades muy variables. En régimen batch mixotrófico se han obtenido productividades medias de 394 mg.L⁻¹.d⁻¹ para *C. vulgaris* en medio conteniendo líquido sin esterilizar de digestión de efluentes lácteos (Zhu et al., 2019); para *C. vulgaris* en medio basal deficiente en nitrato fue de 153 – 180 mg.L⁻¹.d⁻¹ (Ho et al., 2013). En cultivo continuo en fotobiorreactor de *C. protothecoides* en efluente urbano municipal se obtuvo 0,4 – 0,6 g.L⁻¹.d⁻¹ (Ramos Tercero et al., 2014); y en cultivos batch y fed-batch, 0,2 g.L⁻¹.d⁻¹ para *Chlorella* sp. en líquido de digestión de efluentes con alto contenido de nitrógeno (Nwoba et al., 2019). Shen et al. (2019) reportaron productividades para *C. vulgaris* en medio BG11 (con acetato de sodio como fuente de carbono) de 55; 212 y 84 mg.L⁻¹.d⁻¹ en regímenes auto-, mixo- y heterotróficos, respectivamente. Guldhe et al. (2017) encontraron productividades de entre 350 y 500 mg.L⁻¹.d⁻¹ para *C. sorokiniana* en crecimiento heterotrófico en efluente de acuicultura.

II.1.5. Aplicaciones principales

La principal aplicación de *Chlorella* a escala comercial, es el uso en nutrición humana. En el año 2015 se produjeron en Asia más de 3500 toneladas anuales de biomasa. Se encuentran en mercado suplementos nutricionales a base de biomasa de *Chlorella*, así como aditivos colorantes o emulsionantes. También se ha aplicado *Chlorella* en nutrición animal. Se estima que aproximadamente un tercio de la producción comercial de la microalga se destina a este mercado.

Dado que contiene carotenoides, se utiliza para alimentar peces que deben presentar cierta pigmentación, lo cual se logra con ingesta de estos pigmentos. Adicionalmente, se mostró como alimento potencial en avicultura, mejorando el color de las yemas de los huevos. Es necesario realizar algún pretratamiento para la aplicación en la industria animal, dado que su pared celular gruesa puede dificultar la digestión y el aprovechamiento de los componentes de la biomasa (Ibrahim & Elbaily, 2020; Safi et al., 2014). Se han reportado mejoras en la salud de animales de granja mediante la suplementación de *Chlorella* en las raciones del alimento. La adición de hidrolizados de la microalga en el alimento de gallinas ponedoras incrementó el contenido de betacaroteno en las yemas de los huevos, dada la composición de la biomasa y a la bioaccesibilidad de sus pigmentos. También se ha estudiado la capacidad de la microalga de transportar y facilitar la asimilación de selenio y yodo en aves de granja (Kotrbaček et al., 2015)

Una de las aplicaciones más estudiadas en los últimos años de la especie *Chlorella* es el tratamiento de efluentes por remoción de carbono, nitrógeno y fósforo. En escalas de laboratorio, *C. vulgaris* fue capaz de remover el 70% de la demanda química de oxígeno (DQO) de un efluente municipal, así como *C. pyrenoidosa* pudo remover hasta el 100% de compuestos nitrogenados de un efluente de tinturas y más del 75% y 80% del amonio y fósforo de un efluente activado, respectivamente. *C. protothecoides* removió en cuatro días de incubación más del 90% del nitrógeno y fósforo, y el 74% de la DQO, de un efluente cervecero tratado anaeróbicamente. En escalas del orden de decenas de litros, *C. sorokiana* y *Chlorella sp.* pudieron remover el 80% o más de los contaminantes, acetonitrilo, amonio, nitrógeno, fósforo, carbono, contenidos en efluentes de tipo municipal. En mayores escalas, se han reportado eficiencias de remoción superiores al 75% en nitrógeno, mayores al 90% en fósforo y por encima de 85% para carbono con *Chlorella* en efluentes municipales y de la industria láctea, utilizando iluminación solar (Cuellar-Bermudez et al., 2017; Darpito et al., 2015). Así mismo, se ha podido demostrar la capacidad de *Chlorella sp* para la remoción de metales pesados contenidos en efluentes (Dahiya et al., 2012).

Ferreira et al., (2019) han estudiado la extracción de compuestos como polifenoles e hidrolizados de proteínas utilizando agua en estado subcrítico (a temperaturas mayores de 100°C) como solvente. El contenido de compuestos polifenólicos que se pudo recuperar de biomasa de *Chlorella sp.* va del 5 al 20% en peso, obteniendo las mayores actividades antioxidantes con extracciones a temperaturas entre 100 y 175°C. Se identificaron en la biomasa los compuestos ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico (Zakaria et al., 2017)

El estudio de bioestimulantes y biofertilizantes ha cobrado interés en los últimos tiempos. Los productores “orgánicos” suelen tener menores rendimientos que aquellos que aplican las técnicas tradicionales de la agricultura. Debido al perfil bioquímico de la biomasa rico en nitrogenasas, nitrato-reductasas, minerales y aminoácidos, los biofertilizantes a base de *Chlorella* tienen efectos como promotores del crecimiento (Ibrahim & Elbaily, 2020; Ronga et al., 2019). Se han encontrado efectos positivos en el crecimiento de plantas de lechuga, en la germinación de semillas de *Lactuca sativa*, en el crecimiento de cultivos de maíz (Safi et al., 2014). Se han reportado estudios de aplicación de extractos de *C. vulgaris* con efectos positivos en la germinación de lechuga, el desarrollo de raíces de remolacha y el aumento de la masa en plantines de tomate (Chiaiese et al., 2018). Stirk et al. (2013) encontraron las auxinas (fitohormonas que regulan el desarrollo de raíces y la predominancia apical, entre otros) ácido indol-3-acético e indol-3-acetamida; y diferentes citoquininas (fitohormonas que regulan, entre otros, el desarrollo de tallos laterales a partir de las yemas), en *C. vulgaris* incubada en medio Bristol. Se encontró que *C. vulgaris* y *Chlorella* sp. no presentaron efectos similares a las giberelinas (fitohormonas que regulan la germinación), presentando índices de germinación por debajo del 100%; sin embargo, tuvieron efectos positivos sobre el desarrollo de raíces adventicias en semillas de soja en hasta un 500% y en la expansión de cotiledones de pepino en hasta un 60% por encima del control (Morillas-España et al., 2022).

Se ha encontrado que especies de *Chlorella* son capaces de acumular grandes cantidades de lípidos, cuyo perfil de ácidos grasos es aceptable para la producción de biodiesel, comparándolo con distintos estándares. Sin embargo, el costo de producción del biodiesel microalgal es aún superior al precio de este *commodity*. Se han explorado distintas optimizaciones en los costos de biodiesel a partir de microalgas, como buscar alternativas económicas a la glucosa en cultivos heterotróficos. Aún quedan varios puntos por optimizar, como la separación de la biomasa (generalmente por centrifugación) que representa hasta un 30% del costo total de producir este combustible. Por otro lado, la biomasa remanente de la extracción de lípidos, por su contenido de carbohidratos, puede utilizarse de sustrato para producción de etanol por fermentación (Cheng et al., 2009; Darpito et al., 2015; Safi et al., 2014); o bien para combustión, siendo su capacidad calorífica calculada entre 21,1 y 24,3 MJ.kg⁻¹ (Zhu et al., 2019). *Chlorella* se ha estudiado en profundidad para su aplicación en la producción de biodiesel debido a su robustez ante las condiciones ambientales y la competencia inter especie, y su rapidez de reproducción (Kim et al., 2016). Uno de los principales retos que se presentan al momento de optimizar la producción de lípidos a partir de

esta microalga, es que la productividad de la biomasa, generalmente, tiene comportamiento opuesto, dificultando la maximización de la productividad de los lípidos (Ge et al., 2018).

Las microalgas con capacidad de acumular carbohidratos, especialmente almidón y polisacáridos, resulta de interés para la producción de bioetanol por fermentación, dado que el proceso de sacarificación de la biomasa microalgal es menos costoso que en el caso de biomasa lignocelulósica. Para que el proceso sea viable económicamente, es necesario encontrar cepas que produzcan gran contenido de carbohidratos, sin necesidad de recurrir a condiciones de mucho estrés, de ese modo, no perder productividad general de biomasa y, por ende, de sustrato de fermentación. También requiere de optimizaciones en los procesos de separación dado que los mismos representan una parte relevante del costo (Ho et al., 2013; Kaur et al., 2022).

Los trabajos reportados en cultivos mixo- y heterotrófico con cepas de *Chlorella* presentan rangos de contenido de carbono orgánico en el medio, medido como DQO, de alrededor de 177 mg O₂.L⁻¹ (Wang et al., 2020), 512 mg O₂.L⁻¹ (Ge et al., 2018), 1480 mg O₂.L⁻¹ (Zhu et al., 2019). Gupta et al. (2017) reportaron ensayos en efluentes, con valores de máximos de DQO aplicada en el medio de cultivo, de 1000 mg O₂.L⁻¹ para *C. pyrenoidosa* y 3665 para *C. vulgaris* en efluente de industria porcina; y 5000 mg O₂.L⁻¹ para *C. pyrenoidosa* en efluente sintético. Son escasos los estudios realizados en efluentes que presenten valores de DQO por encima de 5000 mg O₂.L⁻¹.

II.2. Objetivos

Los objetivos planteados para el trabajo con *Chlorella vulgaris* fueron los siguientes:

- Determinar los valores óptimos de demanda química de oxígeno y de pH del medio de cultivo que maximizan la concentración final de biomasa;
- Caracterizar el crecimiento de la microalga en las condiciones óptimas de cultivo, determinando sus parámetros cinéticos;
- Caracterizar la composición bioquímica de la biomasa obtenida;
- Evaluar el escalado en biorreactor del tipo tanque agitado y en frasco Erlenmeyer con agitación orbital.
- Evaluar su potencial aplicación como promotor de germinación y enraizamiento.

II.3. Materiales y métodos

II.3.1. Microalga

Se utilizó una cepa no axénica de *Chlorella vulgaris*, proveniente del río Chubut (Salomón et al., 2005); gentilmente donada por el Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. El número de identificación del cepario de origen es LMPA39.

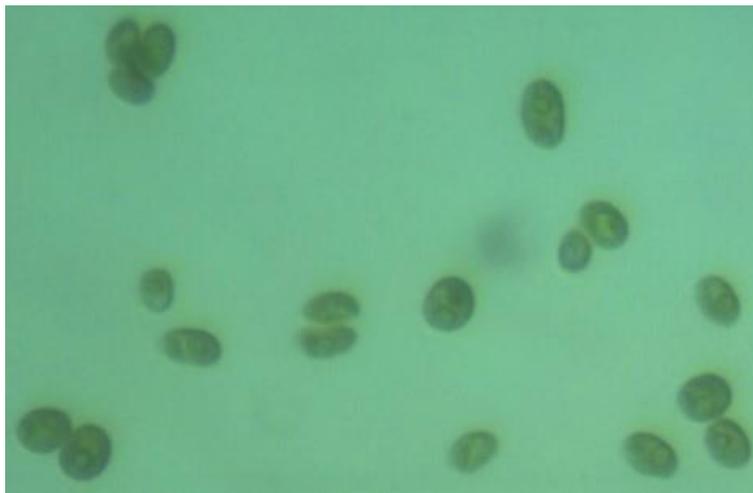


Figura II - 2: Imagen microscópica de *C. vulgaris*, tomada de un inóculo conservado en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de UTN-FRBA, en aumento 100x.

II.3.1.1. Mantenimiento

El mantenimiento de la cepa de microalga para el presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires (UTN-FRBA).

Se mantuvieron los cultivos de *Chlorella vulgaris* en medio de mantenimiento BG-11 (Stanier et al., 1971), el cual se preparó con sales y reactivos de grado analítico (Biopack™, BA, Argentina), agua desionizada por membrana y se ajustó el valor de pH con solución 1M de NaOH. El medio preparado se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C.

La propagación de la cepa se realizó mediante pasajes seriados, en ambiente aséptico, de cultivos con aproximadamente cinco semanas de antigüedad, en proporción 1:40 en 40 mL medio fresco, en frascos Erlenmeyer de 125 mL. Los frascos Erlenmeyer se incubaron a 26°C, sin agitación, con

un fotoperíodo de 12 h e iluminación fluorescente blanca fría con irradiación de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (medido con sensor PAR LP471 conectado a un radiómetro Delta Ohm HD2302.0).

II.3.2. Efluente cervecero

El efluente utilizado para el desarrollo de la presente tesis fue el líquido remante en la cañería de transporte del mosto hervido al fermentador, recolectado por la purga, de la planta de producción de la cerveza artesanal “Juguetes Perdidos”. La empresa está ubicada en la localidad de Caseros, de la provincia de Buenos Aires. La ventaja de utilizar este efluente es su origen, dado que se trata de materias primas aptas para consumo humano (elaboración de cerveza), y su recolección in-situ, sin pasar por ningún sistema previo de tratamientos de efluentes. De este modo, se garantiza la ausencia de metales pesados que luego podrían acumularse en la biomasa.



Figura II - 3: Efluente cervecero brindado por “Juguetes Perdidos”.

Todos los lotes utilizados para los diferentes ensayos presentaron valores de demanda química de oxígeno (DQO) de $32000 \pm 3000 \text{ mg O}_2/\text{L}$. La determinación del valor de DQO de los lotes se realizó al momento de la recepción, utilizando el kit de determinación de COD 20 – 1500 $\text{mg O}_2/\text{L}$ de HACH® basado en el Standard Method 5220 D.

En la Tabla II - 1 se muestran las demás características fisicoquímicas del efluente. Todos los lotes fueron conservados, fraccionados, congelados en un freezer a -18°C hasta su utilización. Al momento de la utilización, se descongeló en agua tibia a $30 - 40^{\circ}\text{C}$.

Tabla II - 1: Caracterización fisicoquímica del efluente cervecero “Juguetes Perdidos”

Característica fisicoquímica	Valor promedio	Método analítico
pH	6,1	SM 4500-H ⁺ B
Conductividad [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$]	877	SM 2510 B
Turbidez – Sólidos sedimentables en 10 minutos [$\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$]	8	SM 4500 F
Turbidez – Sólidos sedimentables en 2 horas [$\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$]	17	SM 4500 F
Carbono orgánico total (TOC) [$\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{L}^{-1}$]	16484	SM 22 ^a ed. Met. 5310 B
Nitrógeno total (TN) [$\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$]	1238	Kjeldhal (catalizador Devarda)
Fósforo total (TP) [$\text{mg}\cdot\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$]	95,2	ICP-OES
Nitratos [$\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$]	<10	UNE-EN ISP 10304-1
Nitritos [$\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$]	<0,01	SM 4500-NO ₂
Amonio [$\text{mg}\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$]	11,3	Ammonia Test kit HACH. Salicylate Method

II.3.3. Determinación de las condiciones de cultivo

II.3.3.1. Diseño experimental

Para evaluar los efectos de la concentración de efluente, medida en DQO, y el valor de pH inicial en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la microalga así como sobre el crecimiento de las bacterias acompañantes de la cepa no axénica, se generó un diseño experimental central compuesto (CCD) con dos variables independientes en cinco niveles, y el punto central del diseño por triplicado. El diseño y los análisis de los resultados, se llevaron a cabo con el software *Statgraphics Centurion XV* (V 2.15.06, 2007, USA).

Los rangos de valores de DQO y de pH a evaluar fueron determinados a partir de ensayos previos preliminares. Las variables de respuesta, o variables dependientes definidas para el análisis fueron, el aumento de la densidad óptica medida a 680 nm respecto al valor tomado en el día 0 (ΔDO); y el aumento en el valor decimal del recuento de unidades formadoras de colonia de microorganismos aeróbicos totales, respecto al valor determinado en el día 0 (ΔUFC). Se consideró día 0 a la medición realizada inmediatamente luego de la inoculación de los sistemas.

Las variables dependientes se ajustaron por regresión lineal a un polinomio de segundo grado por un procedimiento de regresión múltiple, que permitió evaluar los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables independientes (Ho et al., 2013; Montgomery, 2005):

$$\Psi = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_{11}x_1^2 + B_{22}x_2^2 + B_{12}x_1x_2$$

Ecuación II - 1: Polinomio de segundo grado de ajuste de las variables dependientes.

Donde Ψ es la variable dependiente analizada, x_1 y x_2 representan la DQO del medio de cultivo y el pH, respectivamente; B_0 es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño; B_1 y B_2 son los coeficientes de los términos lineales; B_{11} y B_{22} son los coeficientes de los términos cuadráticos; y B_{12} es el coeficiente de interacción entre variables independientes.

El análisis de significancia estadística fue realizado por ANOVA seguido de un test de Tukey para un valor de $\alpha = 0,95$; para determinar diferencias significativas. Para determinar la bondad de los ajustes, se consideran satisfactorios aquellos modelos que presentaron valores de R^2_{adj} igual o mayores a 0,95 y valores de Durbin – Watson (DW) mayores a 1. Para el ajuste de modelos no lineales se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XV*.

La optimización múltiple de las variables dependientes se realizó mediante la función deseabilidad, la cual es la media geométrica de las funciones de deseabilidad individuales de cada variable de salida. Éstas toman el valor de 0 cuando la respuesta de la variable dependiente es indeseable, y toma el valor de 1 ante una respuesta deseable (Rudnykh & López-Ríos, 2018). Para ejecutar esta optimización se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XV*.

II.3.3.2. Preparación de los sistemas

Los sistemas del diseño experimental se prepararon con los valores de pH y DQO indicados en la Tabla II - 2. La dilución del efluente cervecero se realizó con medio de mantenimiento BG-11 y el pH se ajustó con soluciones de NaOH 1M o HCl 1N según fuese necesario.

El volumen de líquido utilizado en los sistemas fue 30 mL, colocados dentro de frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidad. Los frascos y su contenido fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C, de modo de garantizar que los microorganismos aerobios que pudiesen ser determinados, fuesen exclusivamente provenientes de la cepa no axénica.

Tabla II - 2: Diseño central compuesto con dos variables independientes, pH y DQO, en cinco niveles con el punto central triplicado. Entre paréntesis se muestran los valores codificados según el diseño.

DQO del sistema	pH inicial
9150 (0)	7.2 (0)
9150 (0)	7.2 (0)
9150 (0)	7.2 (0)
9150 (0)	6.5 (-2)
9150 (0)	7.9 (+2)
4750 (-1)	6.8 (-1)
4750 (-1)	7.5 (+1)
13700 (+1)	6.8 (-1)
13700 (+1)	7.5 (+1)
180 (-2)	7.2 (0)
18300 (+2)	7.2 (0)

Se inocularon los sistemas con 3 mL de suspensión de *Chlorella vulgaris*, en medio de mantenimiento agotado, de densidad óptica (DO) a 680 nm \approx 2,0. A continuación, se tomaron las muestras para las determinaciones del día 0.

Luego se incubaron los sistemas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente blanca de irradiación de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, y agitación orbital continua de 100 rpm (Cole Parmer, modelo OS-200, EEUU). Las posteriores tomas de muestra y determinaciones se realizaron a los 6, 13 y 20 días de incubación.

II.3.3.3. Seguimiento de la biomasa y de los microorganismos aeróbicos

La concentración de biomasa se determinó por densidad óptica (DO) a 680 nm de longitud de onda como se indica en Kuo et al. (2015) y Wang et al. (2010), utilizando agua desmineralizada como blanco, mediante un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón).

Los microorganismos aerobios totales, que forman parte del consorcio de *C. vulgaris*, se determinaron por siembra directa en agar PCA (Plate Count Agar) utilizando la técnica de diluciones seriadas. Las placas se incubaron por 48 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ (APHA, 1998).

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.3.4. Caracterización del crecimiento de la biomasa microalgal

II.3.4.1. Preparación de los sistemas

Una vez determinadas las condiciones óptimas de concentración de efluente y pH iniciales (18300 mg O₂/L y 6,5; respectivamente), se procedió a preparar sistemas para la evaluación de parámetros cinéticos.

- Sistema 1: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h.
- Sistema 2: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a oscuridad total.
- Sistema 3: Efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h.

El volumen de líquido utilizado en los sistemas fue 60 mL, colocados dentro de frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Los frascos y su contenido fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C.

Se inocularon los sistemas con 6 mL de suspensión de *Chlorella vulgaris*, en medio de mantenimiento agotado, de DO a 680 nm \approx 2,0. A continuación, se tomaron las muestras para las determinaciones del tiempo 0.

Luego se incubaron los sistemas durante 6 días a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente blanca de irradiación de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, y agitación orbital continua de 100 rpm (Cole Parmer, modelo OS-200, EEUU). Se tomaron muestras a lo largo del período de incubación para el seguimiento del crecimiento de la microalga y las cepas acompañantes.

II.3.4.2. Seguimiento de la biomasa microalgal

La concentración de biomasa microalgal se determinó por DO a 680 nm de longitud como se indica en Kuo et al. (2015) y Wang et al. (2010), utilizando agua desionizada como blanco, utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón). Además de realizar la determinación de la DO a 680 nm, como se explicó previamente, se realizaron recuentos celulares mediante observación microscópica (Trino, modelo XSZ-146AT, China), utilizando una cámara de Neubauer como se recomienda en bibliografía (Raposo et al., 2010). La determinación de la masa en base seca (bs) se llevó a cabo según Raposo et al. (2010) adaptado. Se tomaron 99 mL de

cultivo, se centrifugaron a 6700 x g por 5 min (Dragon Lab, modelo D2012, China), se lavaron los pellets con agua destilada y se centrifugaron nuevamente. Luego la biomasa se secó en estufa a 90°C hasta peso constante.

Se tomaron muestras desde la inoculación hasta los 6 días de tiempo de incubación. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.3.4.3. Correlación DO 680 nm – masa seca

Se determinó la correlación entre concentración medida en base seca de la biomasa por volumen de cultivo y densidad óptica a 680 nm. Un lote del Sistema 3, fue llevado a cabo a fin de determinar la correlación entre la medición de la concentración de biomasa mediante DO y la determinación de masa seca.

II.3.4.4. Modelado de las curvas de crecimiento

Los datos obtenidos del seguimiento del crecimiento de la biomasa, tanto por DO como por recuento en cámara, se ajustaron mediante la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990).

$$\ln(N/N_0) = C \cdot \exp\{-\exp[(\mu_{max}/C) \cdot (lag - t) + 1]\}$$

Ecuación II - 2: Ecuación de Gompertz modificada

Donde N/N_0 representa la relación entre el valor medido de biomasa (por DO a 680 nm o por recuento en cámara de Neubauer) en el tiempo t y el valor medido a $t = 0$ h; C es el valor máximo alcanzado en la relación de valores medidos (en escala logarítmica); μ_{max} es la velocidad específica máxima alcanzada (en h^{-1}); lag es el tiempo de fase de adaptación de la cepa (en h); y t es el tiempo de incubación (en h).

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.3.5. Caracterización bioquímica de la biomasa microalgal

II.3.5.1. Preparación de los sistemas

Con las condiciones óptimas de concentración de efluente y pH iniciales determinadas (18300 mg O_2/L y 6,5; respectivamente), se procedió a preparar sistemas para la evaluación de la composición bioquímica. Se trata de los mismos sistemas (en cuanto a composición y condiciones de iluminación) que los evaluados para determinar los respectivos parámetros cinéticos. Para el

estudio de composición bioquímica, se adicionó un sistema en oscuridad total, y un cuarto sistema, fotoautotrófico, como control.

- Sistema 1: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h.
- Sistema 2: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a oscuridad total.
- Sistema 3: Efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h.
- Sistema 4 (control): Medio de mantenimiento BG-11, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h.

El volumen de líquido utilizado en los sistemas fue 60 mL, colocados dentro de frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Los frascos y su contenido fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C.

Se inocularon los sistemas con 6 mL de suspensión de *Chlorella vulgaris*, en medio de mantenimiento agotado, de DO a 680 nm \approx 2,0.

Luego se incubaron los sistemas durante 6 días a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente blanca de irradiación de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR (aquellos sistemas con iluminación), y agitación orbital continua de 100 rpm (Cole Parmer, modelo OS-200, EEUU).

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.3.5.2. Determinación de masa seca

La determinación de masa seca se llevó a cabo según explicado en el apartado II.3.4.3. Correlación DO 680 nm – masa seca

II.3.5.3. Determinación de la concentración de lípidos

Se tomaron alícuotas de aproximadamente 3 mg de biomasa (bs) para la determinación de concentración de lípidos por el método colorimétrico de sulfo-fosfo-vainillina (SFV), el cual se describe en Mishra et al. (2014). Se obtuvieron pellets de biomasa por centrifugación de las muestras 6700 x g por 5 min, eliminando el sobrenadante.

Se realizó una curva de calibración colorimétrica a partir de un estándar de aceite de canola (Krol™, Argentina). Para la dosificación del aceite de canola, se utiliza una dilución en cloroformo. El cloroformo se deja evaporar antes de proceder con la metodología.

Tanto los pellets como los patrones se trataron con 2 ml de ácido sulfúrico 98% por 10 min a 100°C, inmediatamente cumplido el tiempo, se enfriaron en baño de hielo por 5 min. Luego se adicionó a cada muestra la solución de SFV y se dejó reaccionar por 15 min en estufa a 37°C.

Luego se midieron las muestras del estándar y de biomasa en espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón) a longitud de onda 530 nm, utilizando agua desionizada como blanco.



Figura II - 4: Imagen de las muestras de estándar de aceite de canola finalizadas las reacciones del método SFV.

II.3.5.4. Determinación de la concentración de proteínas

Se tomaron alícuotas de entre 2 y 3 mg de biomasa (bs) para la determinación de concentración de proteínas por el método colorimétrico de Lowry et al. (1951). La biomasa se centrifugó a 6700 x g por 5 min, eliminando el sobrenadante.

El tratamiento de la biomasa se realizó según indicado en Rearte et al. (2018), hidrolizando los pellets con 1,5 ml de NaOH 0,1M a 95°C (en baño de agua) por 1 h. Luego de la hidrolisis se centrifugaron las muestras a 6700 x g por 15 min y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes para determinar en contenido de proteínas utilizando el método de Lowry et al. (1951). El estándar de calibración utilizado fue seroalbúmina bovina (SAB) en solución de 1 mg/mL.

Se adicionó el reactivo de Lowry a los tubos que contenían el estándar de calibración, así como a los que contenían la muestra de los sobrenadantes de los hidrolizados, se agitó y dejó reaccionar por 15 min. Seguidamente se añadió el reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó nuevamente y dejó reaccionar por 30 min.

Luego se midieron el estándar de SAB y las muestras procedentes de la hidrólisis de la biomasa se midieron en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón) a longitud de onda 750 nm, utilizando agua desionizada como blanco.



Figura II - 5: Imagen de las muestras de estándar de SAB finalizado el tratamiento según el método de Lowry

II.3.5.5. Determinación de la concentración de carbohidratos

Para la hidrólisis de los pellets de biomasa, recolectados por centrifugación a 6700 x g por 5 min, se realizó según una adaptación de los tratamientos básicos de Rearte et al. (2018) y Schneegurt et al. (1994). Aproximadamente 3 mg de biomasa (bs) se suspendieron en 1,5 ml de NaOH 1M y se agitaron por 1 min. Luego, se centrifugaron las muestras a 6700 x g por 15 min. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes de los hidrolizados para la determinación de concentración de carbohidratos por el método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Se utilizó glucosa como patrón para la curva de calibración del método, en solución de NaOH 1M.

Tanto al estándar de calibración como a los hidrolizados de la biomasa se les adicionó la solución de fenol al 80% y a continuación ácido sulfúrico al 98%, dejando reaccionar 20 min a 25°C.

El patrón de glucosa y las muestras procedentes de la hidrólisis de la biomasa se midieron en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón) a una longitud de onda de 490 nm, utilizando agua desionizada como blanco.

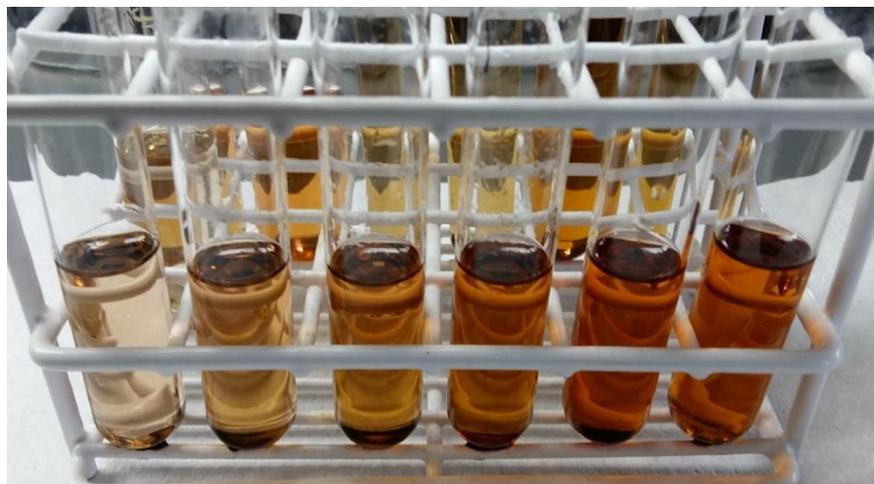


Figura II - 6: Imagen de las muestras de estándar de glucosa finalizadas las reacciones del método fenol-sulfúrico.

II.3.5.6. Determinación de la concentración de pigmentos

El proceso de extracción de los pigmentos, clorofila *a* y carotenoides; a partir de los pellet de biomasa (centrifugados a 6700 x g por 5 min) fue realizado mediante una adaptación del método descrito por Wegmann & Metzner (1971). Se tomaron alícuotas de aproximadamente 3 mg de biomasa (bs), a los cuales se les adicionó 3 ml de solución de acetona al 90%, posteriormente se sonicó por 5 min en baño de hielo (Qsonica, modelo Q55, EEUU) y se dejó reposar a 4°C por 24 h en total oscuridad.

Luego se midieron las muestras por barrido espectral entre 400 y 700 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, modelo UV-1700, Japón). El porcentaje en base seca de pigmentos se calcularon con las ecuaciones (Wegmann & Metzner, 1971):

$$Chl\ a\ (\mu g/ml) = 10,3 \cdot abs_{663nm} - 0,918 \cdot abs_{644nm}$$

Ecuación II - 3: Cálculo de la concentración de clorofila *a*

$$Carotenoides\ (\mu g/ml) = 4,20 \cdot abs_{453nm} - 0,0264 \cdot [Chl\ a\ (\mu g/ml)]$$

Ecuación II - 4: Cálculo de la concentración de carotenoides

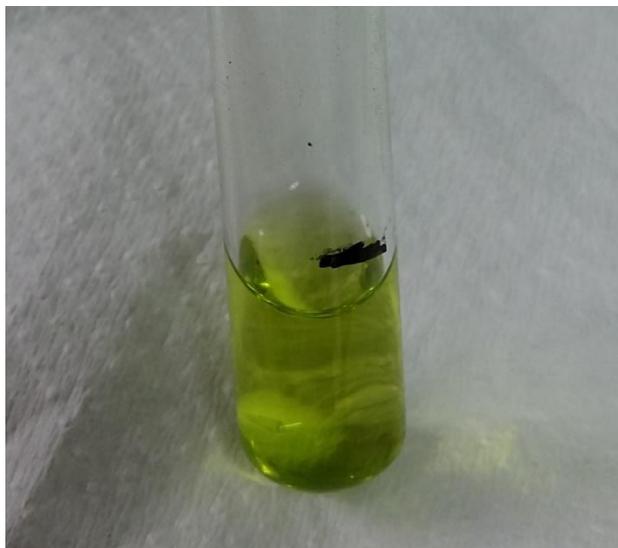


Figura II - 7: Imagen de un extracto de pigmentos de *C. vulgaris* en solución de acetona 90%.

II.3.6. Evaluación del Escalado

Se procedió a escalar el Sistema 2, utilizando dos biorreactores de mayor capacidad: un frasco Erlenmeyer de mayor capacidad (nominal 5 L) así como un tanque agitado (nominal 3 L; Applikon Biotechnology, modelo my-Control, Países Bajos).

II.3.6.1. Condiciones de incubación

El medio de cultivo compuesto de efluente cervecero diluido con agua desionizada para alcanzar la DQO óptima determinada de 18300 mg O₂/L, fue esterilizado dentro de los recipientes en autoclave durante 20 min a 121°C. El pH inicial se ajustó a 6,5.

El volumen de líquido utilizado en el reactor tanque agitado fue de 1,5 L, mientras que en el frasco Erlenmeyer de 5 L de capacidad fue de 1,2 L. En ambos casos, se inoculó con una alícuota en medio de mantenimiento agotado, DO a 680 nm \approx 2,0, que representó el 10% del volumen total.

Se utilizó en el reactor tanque agitado un aireador comercial de aplicación para acuarios domésticos (Figura II - 19) para suministrar un caudal de aire constante durante todo el período de incubación. El aireador impulsa un caudal de aire de 21 ± 1 mL/s a 1 atm y 5°C.

II.3.6.1.1. Cálculo de la velocidad de agitación

Se estimó la velocidad de agitación de los sistemas en base a la potencia volumétrica comparada con la del Sistema 2 descrito en II.3.4. Caracterización del crecimiento de la biomasa microalgal, utilizando las ecuaciones a continuación, indicadas por Argumedo Moix (2018):

$$Re = \frac{N \cdot ds^2 \cdot \rho}{\mu}$$

Ecuación II - 5: Número de Reynolds

$$N_p = \frac{1,94 \cdot VL^{1/3}}{Re^{0,2} \cdot ds}$$

Ecuación II - 6: Número de potencia

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot ds^5$$

Ecuación II - 7: Potencia consumida [W]

$$Pv = \frac{P}{VL}$$

Ecuación II - 8: Potencia volumétrica [W.m⁻³]

Donde N es la velocidad de rotación [s⁻¹]; ds es el diámetro del frasco Erlenmeyer o diámetro del impulsor del biorreactor tanque agitado [m]; ρ es la densidad del medio de cultivo [kg.m⁻³] y μ la viscosidad del cultivo [kg.m⁻¹. s⁻¹]; VL es el volumen del cultivo [m³].

II.3.6.2. Curvas de crecimiento

Se cultivaron los sistemas por 72 horas, tomando muestras, a diferentes intervalos, durante el tiempo de incubación para la determinación de densidad óptica a 680 nm y del recuento en cámara de Neubauer, según detallado en II.3.4.2. Seguimiento de la biomasa microalgal Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Las curvas de crecimiento se ajustaron mediante la ecuación de Gompertz modificada, según indicado en II.3.4.4. Modelado de las curvas de crecimiento

II.3.6.3. Composición bioquímica

Finalizado el tiempo total de incubación de 72 horas, se procedió a tomar muestras para la determinación de concentración de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos (clorofila y carotenoides). Las determinaciones se llevaron a cabo según descrito en II.3.5. Caracterización bioquímica de la biomasa microalgal

II.3.6.4. Determinación de demanda química de oxígeno

Finalizado el tiempo total de incubación de 72 horas, se procedió a tomar muestras cultivo. Se separó la biomasa por centrifugación a 6700 x g por 5 min y se tomó el sobrenadante para las determinaciones de DQO. Se utilizó el kit HACH® basado en el Standard Method 5220 D.

II.3.7. Aplicación de la biomasa como bioestimulante para plantas

La biomasa cosechada del biorreactor y del Erlenmeyer fue centrifugada, lavada, liofilizada (Christ Mod Alpha, Osterode am Harz, Alemania) y el polvo de ambos sistemas se mezcló, homogenizó, envasó y envió para análisis al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, donde se ensayó la aptitud de la biomasa obtenida para la producción de bioestimulantes.

II.3.7.1. Pretratamientos de la biomasa

Se determinó el contenido de proteínas de la biomasa liofilizada mediante el método de Lowry, modificado según describen González López et al. (2010). Luego, la biomasa liofilizada se humedeció hasta una concentración aproximada de 25 g/L bs para realizar cuatro pretratamientos distintos, previos a los ensayos de bioestimulación. En todos los casos, se aplicó en los ensayos la suspensión completa resultante del pretratamiento.

- Pretratamiento 1: Biomasa sometida a disrupción celular sónica, seguida a continuación por la hidrólisis enzimática.
- Pretratamiento 2: Biomasa sometida a disrupción celular sónica, sin hidrólisis enzimática.
- Pretratamiento 3: Biomasa sometida a hidrólisis enzimática, sin disrupción sónica.
- Pretratamiento 4: Biomasa sin hidrólisis enzimática ni disrupción sónica.

La disrupción celular de la biomasa se realizó por ultrasonido durante 40 min a 24 kHz en un procesador ultrasónico (UP 400S, Hielsher Ultrasonics, Germany).

La hidrólisis enzimática se realizó en dos etapas según descrito en Romero García et al. (2012): una etapa se llevó a cabo por 120 min a pH = 8, mediante ajuste con NaOH 1M, y 50°C para acción de la enzima Alcalase® al 4%; la siguiente etapa se llevó a cabo por 60 min a pH = 7, ajustando con H₂SO₄ 1M, para la acción de la enzima Flavourzyme®; la duración total de las dos etapas fue de 180 min. Una etapa posterior de desactivación de enzimas se llevó a cabo a 75°C por 15 min.

Se realizó un seguimiento del % m/m de aminoácidos libres sobre el total de proteínas durante el proceso de hidrólisis enzimática; midiendo el contenido de los mismo a los 0, 60, 120 y 180 minutos del proceso, según el método colorimétrico descrito por Nielsen et al. (2001), que utiliza la reacción de o-ftalaldehído (OPA) con los grupos libres α de los aminoácidos para generar un derivado que absorbe a 340 nm de longitud de onda, utilizando serina como patrón. Las ecuaciones y los parámetros de entrada para el cálculo del porcentaje de aminoácidos libres se encuentran descritos por Romero García et al. (2012) y por Navarro-López et al. (2020).

$$\%_{hidrólisis} = h/h_{tot}$$

Ecuación II - 9: Porcentaje de hidrólisis de proteínas

$$h = (serinaNH_2 - \beta) / \alpha$$

Ecuación II - 10: Expresión de h determinada por el método del OPA.

Donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados, h_{tot} es el número de enlaces peptídicos totales (de valor 8), $serinaNH_2$ es la medida de absorbancia, α y β parámetros de valor definido 1 y 0,4; respectivamente (Navarro-López et al., 2020).

II.3.7.2. Evaluación de efecto similar a auxinas

II.3.7.2.1. Inducción de raíces en *Vigna radiata* (L.) Wilczek

Se realizó un ensayo de inducción de raíces en semillas de soja verde, cuya técnica está basada en aquella descrita por Ranglová et al. (2021), con el fin de determinar si la biomasa de *C. vulgaris* cultivada en efluente cervecero tiene propiedades para la inducción de raíces en plantines, similares a las de las auxinas.

Se utilizaron semillas de soja verde (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), se las sumergió por 4 min en solución de hipoclorito al 0,33% y luego fueron lavadas por 24 h con agua de la red. Se plantaron a 1 cm de profundidad en bandejas conteniendo perlita húmeda. Las bandejas se incubaron en

cámara a 27°C con 60-65% humedad relativa (HR) e iluminación blanca fluorescente ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por siete días, hasta que mostraron hojas unifoliadas expandidas, y hojas trifoliadas enrolladas sin expansión. Los plantines se separaron de los cotiledones mediante un corte a 3 cm por encima de los mismos.



Figura II - 8: Plantines de soja verde luego de 6 días de incubación de las semillas. Foto gentilmente provista por el equipo de investigadores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería.

Los plantines se situaron en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de suspensión de biomasa microalgal en agua destilada en concentración 0,5 y 2 g/L bs, por cada pretratamiento mencionado en el punto II.3.7.1. Pretratamientos de la biomasa Como control, se utilizó igual volumen de medio de mantenimiento BG-11. Como patrón de referencia se utilizó ácido indol-3-butírico (IBA) en las concentraciones 0,3; 0,7 y 1,0 mg/L. Los tubos se situaron nuevamente en la cámara de incubación en las mismas condiciones mencionadas previamente, por siete días.

Luego de la incubación, se contaron el número de raíces desarrolladas de más de 1 mm de longitud. Las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado.

II.3.7.2.2. Inducción de raíces en cotiledones de *Cucumis sativus* L.

Se realizó una prueba de inducción de raíces en cotiledones de pepino, con el objetivo de determinar si la biomasa tiene propiedades para la inducción de raíces de manera similar a las de las auxinas. La técnica está basada en aquella descrita por Zhao et al. (1992).

Se utilizaron semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.), se las sumergió por 5 min en solución de hipoclorito al 2% y luego fueron lavadas con agua de la red. Se depositaron en bandejas plásticas conteniendo medio nutritivo Knop (Rychter & Mikulska, 1990) con 0,7% de agar. Se llevaron a una cámara oscura a aproximadamente 22°C por tres días.

Los cotiledones con hipocótilos entre 1 y 2 mm de longitud fueron separados del resto del plantín; se colocaron en placas de Petri conteniendo papel de filtro humedecido con 3 ml de suspensión de biomasa microalgal en agua destilada en concentración 0,5 y 2 g/L bs de cada uno de los cuatro diferentes tratamientos de la misma. Como control se utilizó medio de mantenimiento para microalgas BG-11. Como patrón se utilizó IBA en las concentraciones 0,3; 0,7 y 1,0 mg/L.

Luego de un período de incubación de cinco días en oscuridad y a aproximadamente 22°C, se contaron el número de raíces desarrolladas en las bases de los cotiledones. Las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado.

II.3.7.3. Evaluación de efecto similar a citoquininas

II.3.7.3.1. Test de expansión de cotiledones de *Cucumis sativus* L.

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad de la biomasa tratada de *C. vulgaris* de presentar efectos similares a las citoquininas, según se describe en Zhao et al. (1992). Se utilizaron semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.), se las sumergió por 5 min en solución de hipoclorito al 2% y luego fueron lavadas con agua de la red. Se depositaron en bandejas plásticas conteniendo medio nutritivo Knop (Rychter & Mikulska, 1990) con 0,7% de agar y se colocaron en una cámara oscura a aproximadamente 22°C por tres días.

Se tomaron aquellos cotiledones sin hipocótilo y se separaron de los plantines por escisión. Se colocaron en placas de Petri conteniendo papel de filtro humedecido con 3 ml de suspensión de biomasa microalgal en agua destilada en concentración 0,5 y 2 g/L bs de cada uno de los cuatro diferentes tratamientos de la misma. Como control se utilizó medio de mantenimiento BG-11. Como patrón se utilizó 6-bencilaminopurina (BAP) en las concentraciones 1, 5 y 10 mg/L.

El peso de diez cotiledones se registró antes y después de la incubación en oscuridad por tres días a aproximadamente 22°C, y luego de secarlos con papel. Se comparó el aumento de peso entre muestras. Las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado.

II.3.7.4. Evaluación de efecto similar a giberelinas

II.3.7.4.1. Índice de germinación

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad bioestimulante de la biomasa durante la germinación, evaluando si existe un efecto similar al que tienen las giberelinas. Para cada muestra, se utilizaron 100 semillas de berro. Se las colocó en placas de Petri estériles con papel de filtro

Whatman N°5. Se adicionaron las semillas, agua destilada como control, o la biomasa de *C. vulgaris* en 0,1 ó 0,5 g/L bs de concentración de cada tratamiento.

Las semillas se incubaron en oscuridad a 24°C por 3 días. El índice de germinación se determinó con la siguiente ecuación (Ranglová et al., 2021):

$$IG = \frac{G(\%) \cdot L}{Gw(\%) \cdot Lw}$$

Ecuación II - 11: índice de germinación

Donde *IG* es el índice de germinación expresado en porcentaje; *G* es el porcentaje de semillas germinadas, determinado visualmente; *L* es la longitud de la radícula, medido mediante el software *Image J*; en las muestras sometidas al tratamiento de biomasa. *Gw* y *Lw* son los parámetros para el control.

II.4. Resultados y discusión

II.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo

En la Tabla II - 3 se muestran los resultados de las variables dependientes del diseño central compuesto para los cinco niveles de pH y DQO ensayados: el aumento de la densidad óptica de la biomasa (ΔDO) y el aumento en el logaritmo de UFC de aerobios mesófilos totales (ΔUFC), ambos respecto al día 0 de inoculación, medidos a los 6, 13 y 20 días de incubación.

Tabla II - 3: Diseño central compuesto con dos variables independientes a cinco niveles y un punto central por triplicado.

DQO efluente	pH inicial	ΔDO_{6d-0d}	ΔDO_{13d-0d}	ΔDO_{20d-0d}	ΔUFC_{6d-0d}	ΔUFC_{13d-0d}	ΔUFC_{20d-0d}
9150 (0)	7,2 (0)	2,0 ±0,1	3,5 ±0,4	4,1 ±0,2	1,8 ±0,1	2,9 ±0,1	1,1 ±0,1
9150 (0)	7,2 (0)	1,9 ±0,2	3,0 ±0,3	5,9 ±0,5	2,4 ±0,1	2,8 ±0,1	1,6 ±0,1
9150 (0)	7,2 (0)	2,1 ±0,1	2,4 ±0,8	5,1 ±0,4	2,4 ±0,1	2,9 ±0,1	1,6 ±0,2
9150 (0)	6,5 (-2)	2,6 ±0,1	3,9 ±0,5	6,5 ±0,5	2,5 ±0,1	2,9 ±0,1	0,73 ±0,09
9150 (0)	7,9 (+2)	2,6 ±0,1	3,1 ±0,6	5,2 ±0,1	1,3 ±0,2	1,3 ±0,1	1,1 ±0,2
4750 (-1)	6,8 (-1)	1,01 ±0,03	2,8 ±0,3	3,2 ±0,1	2,72 ±0,05	3,10 ±0,02	3,09 ±0,02
4750 (-1)	7,5 (+1)	0,695 ±0,002	2,6 ±0,6	6,3 ±0,5	2,53 ±0,02	3,00 ±0,01	3,03 ±0,04
13700 (+1)	6,8 (-1)	2,8 ±0,1	4,9 ±0,4	8 ±1	2,5 ±0,6	2,76 ±0,04	1,2 ±0,3
13700 (+1)	7,5 (+1)	2,7 ±0,2	4,5 ±0,5	6,1 ±0,5	3,0 ±0,2	1,6 ±0,2	1,2 ±0,1
180 (-2)	7,2 (0)	0,9 ±0,2	1,8 ±0,2	2,6 ±0,1	1,5 ±0,1	1,3 ±0,1	0,34 ±0,07
18300 (+2)	7,2 (0)	2,8 ±0,2	5,049 ±0,001	7,6 ±0,6	1,5 ±0,1	1,7 ±0,1	0,51 ±0,06
15800	6,6	5,2 ±0,7	4,99 ±0,03	5,5 ±0,1	3,0 ±0,2	1,9 ±0,1	1,35 ±0,07

18000	7,0	6,6 ±0,4	7,1 ±0,2	7,5 ±0,8	2,07 ±0,05	3,1 ±0,2	0,70 ±0,04
-------	-----	----------	----------	----------	------------	----------	------------

Puede observarse un aumento de la densidad óptica, aún a altos valores de DQO, para la microalga en todos los intervalos considerados hasta los 20 días. Por otro lado, los microorganismos aerobios del consorcio de la microalga mostraron una tendencia a alcanzar los mayores recuentos a los 13 días, para luego disminuir hacia los 20 días.

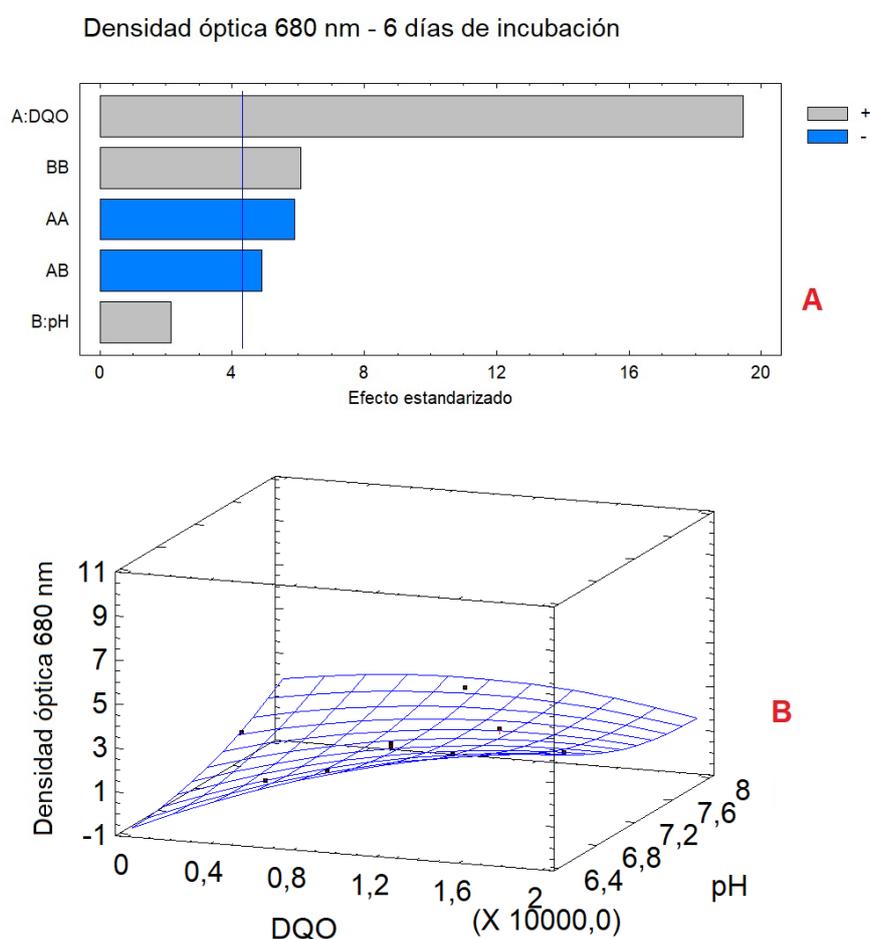


Figura II - 9: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 6 días de incubación.

Se encontraron efectos significativos ($p < 0,05$) de las variables estudiadas, DQO y pH, sobre las respuestas de la densidad óptica del cultivo, y del recuento de aerobios mesófilos totales a los 6 y 13 días (Figura II - 9: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la

densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 6 días de incubación. Figura II - 10, Figura II - 11).

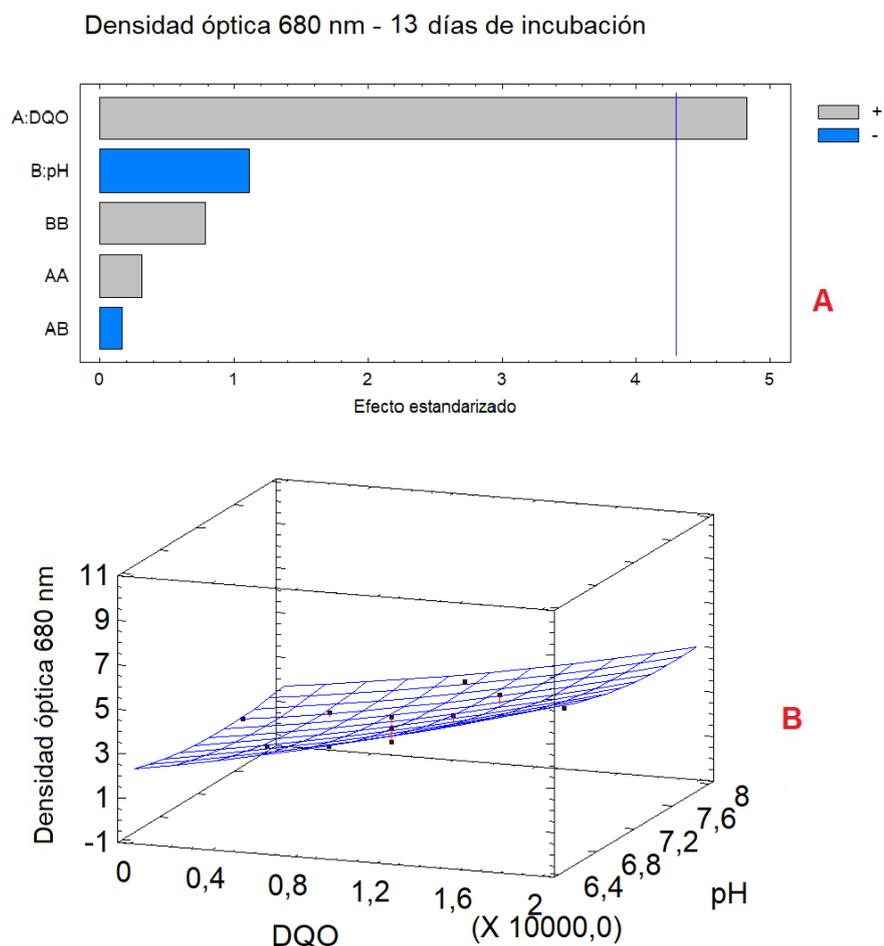


Figura II - 10: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 13 días de incubación.

Se observa en las Figura II - 9, Figura II - 10 y Figura II - 11 (gráfico A, Diagrama de Pareto) un efecto positivo de la DQO sobre el crecimiento, medido en densidad óptica, de *C. vulgaris*. A los 6 días de incubación, también son significativos ($p < 0,05$) el efecto cuadrático negativo de la DQO y el efecto cuadrático positivo del pH, así como la interacción antagonica de ambas variables independientes. Los efectos cuadráticos indican que existe un valor dentro del rango estudiado de la variable independiente en el cual la variable de respuesta se maximiza, si es cuadrático negativo; o se minimiza, si es cuadrático positivo. La interacción antagonica entre variables independientes evidencia que, ante la variación de valores de una de ellas, el efecto en la otra se invierte. Por

ejemplo, se puede observar a valores bajos de DQO, cómo aumenta DO al incrementar el pH y ese efecto se revierte al observar la respuesta DO en función del pH a valores altos de DQO (Figura II - 9B).

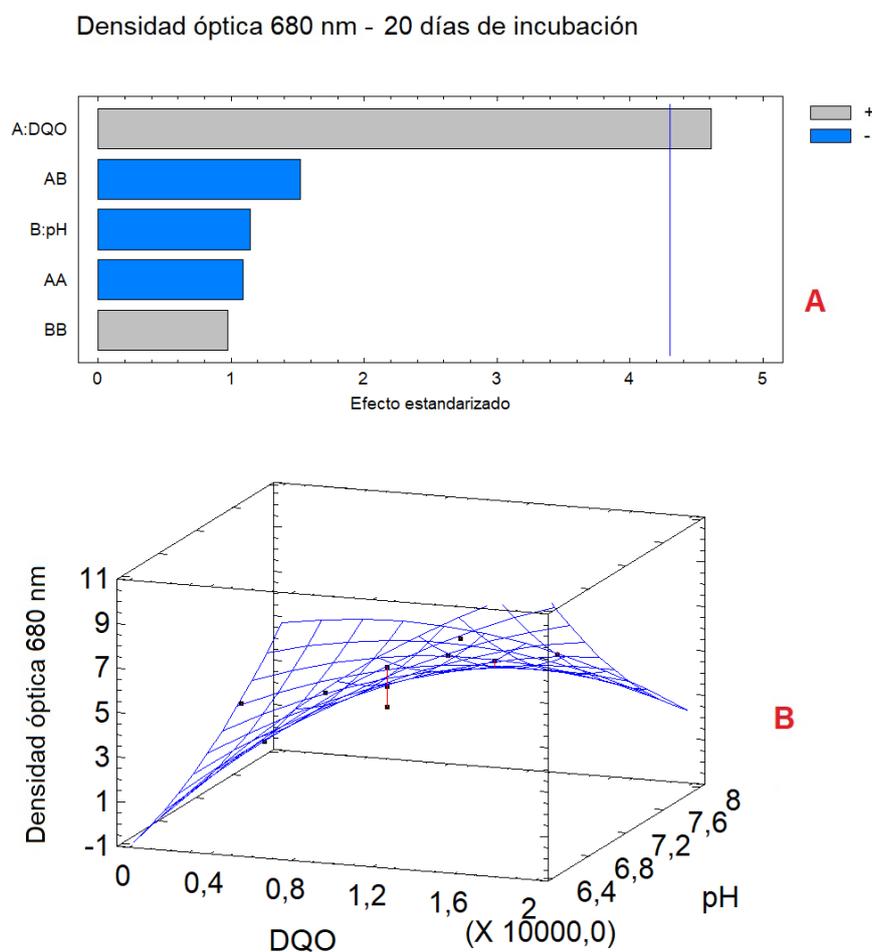


Figura II - 11: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 20 días de incubación.

Como se observa en la Figura II - 12, sólo el pH tuvo efecto negativo significativo ($p < 0,05$) en el recuento de aerobios mesófilos totales, observado a los 13 días de incubación. No se encontraron efectos significativos de las variables independientes sobre el crecimiento de aerobios totales a los 6 y 20 días.

Los coeficientes de regresión de los polinomios de segundo grado (Ecuación II - 1) que permiten representar las superficies de respuestas analizadas (Figura II - 9 a Figura II - 12), se muestran en

la Tabla II - 4: Coeficientes de los términos de los polinomios de segundo orden de las variables independientes, ΔDO y ΔUFC , a los diferentes intervalos de tiempo estudiados. Los valores en negrita, representan los términos significativos ($p < 0,05$).

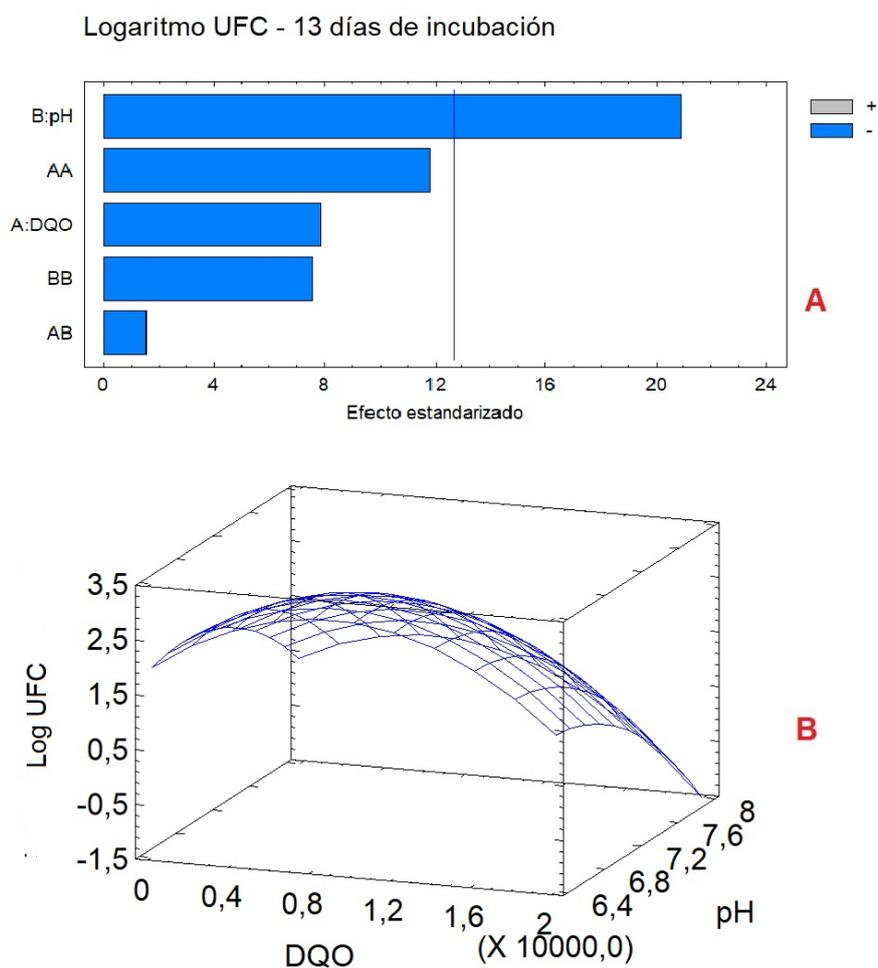


Figura II - 12: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (ΔUFC) luego de 13 días de incubación.

Tabla II - 4: Coeficientes de los términos de los polinomios de segundo orden de las variables independientes, ΔDO y ΔUFC , a los diferentes intervalos de tiempo estudiados.

Coeficiente	ΔDO_{6d-0d}	ΔDO_{13d-0d}	ΔDO_{20d-0d}	ΔUFC_{6d-0d}	ΔUFC_{13d-0d}	ΔUFC_{20d-0d}
Constante	37,7	41,1	51,4	-17,6	-43,5	118
A:DQO	0,00145	0,000356	0,00401	-4,39E-05	0,000519	-0,00290
B:pH	-12,1	-10,7	-17,6	6,70	13,6	-27,4
AA	-8,50E-09	2,64E-09	-1,50E-08	-6,96E-09	-1,43E-08	1,34E-09

CAPÍTULO II: *CHLORELLA VULGARIS*

AB	-0,000162	-3,09E-05	-0,000479	2,00E-05	-4,12E-05	0,000394
BB	0,962	0,730	1,47	-0,540	-1,01	1,56

Los valores resaltados en “Negrita” corresponden a los términos significativos ($p < 0,05$).

Se realizaron optimizaciones múltiples de las variables dependientes, mediante la función deseabilidad, que permite optimizar varias variables de respuesta al mismo tiempo (Barrios-Córdova et al., 2020). Se analizaron dos posibles optimizaciones, las cuales se muestran en la Tabla II - 5: un escenario en el cual se maximiza el crecimiento en a los 6, 13 y 20 días, como Optimización Múltiple 1; y otro escenario en el cual se maximiza el crecimiento en a los 6, 13 y 20 días, al mismo tiempo que se minimiza el crecimiento de los aerobios mesófilos a los 13 días, como Optimización Múltiple 2. Las condiciones calculadas por ambas optimizaciones múltiples se volvieron a ensayar para corroborar la robustez el modelo, mostrando los resultados en la misma tabla.

Tabla II - 5: Optimización múltiple mediante utilización de la función deseabilidad, se presentan los valores estimados y los valores experimentales (media y desvío estándar, $n=3$).

		Variables independientes			Variables dependientes			
		Deseabilidad	DQO	pH	ΔDO_{6d-0d}	ΔDO_{13d-0d}	ΔDO_{20d-0d}	ΔUFC_{13d-0d}
Optimización múltiple 1	Valor óptimo estimado	1,00	15800	6,6	3,32	5,11	9,29	-
	Valor experim.	-	-	-	5,5±0,7	4,99±0,03	5,5±0,1	-
Optimización múltiple 2	Valor óptimo estimado	0,95	18300	7,0	2,55	5,03	7,00	1,34
	Valor experim.	-	-	-	6,7±0,4	7,1±0,2	7,5±0,8	0,70±0,04

Se observó que en las condiciones calculadas como óptimas, la microalga creció rápidamente, acercándose al valor máximo de concentración ya a los 6 días de incubación. Para cada condición ensayada se observó que no hay diferencias significativas entre las mediciones realizadas a distintos tiempos de incubación, lo cual permite suponer que la microalga crece rápidamente, alcanzando la fase de crecimiento estacionario luego de los seis días.

Los resultados de ambas optimizaciones se incluyeron como retroalimentación al diseño. Realizando una nueva optimización de maximización del crecimiento a los 6 días, se obtuvieron las condiciones de cultivo: 18300 mg O₂/L de demanda química de oxígeno y 6,5 de valor de pH

inicial. Bajo dichas condiciones, se alcanzó un valor de DO 680 nm luego de 6 días de incubación de 7,8; estando en el orden de los obtenidos en la optimización múltiple 2, presentados en la Tabla II - 5.

Se observó que *C. vulgaris* fue capaz de crecer en un medio conteniendo una alta concentración de carbono, a pesar de estar en consorcio con microorganismos aerobios. Podría inferirse que la microalga fue capaz de controlar el crecimiento de las bacterias del consorcio. Se ha reportado que las cepas de *Chlorella* pueden ser muy competitivas en el crecimiento y mostrar propiedades biocidas (Hong et al., 2014; Marchão et al., 2018).

Por otro lado, se ha reportado que altas concentraciones de carbono en el medio de cultivo podría inhibir el crecimiento de las microalgas, por ejemplo, el crecimiento de *C. pyrenoidosa* fue inhibido a concentraciones de 5000 mg O₂/L (Gupta et al., 2017). Es notable remarcar que las condiciones óptimas calculadas de DQO para esta cepa autóctona fue 18300 mg O₂/L. Algunos componentes presentes en el efluente podrían también causar inhibición del crecimiento de *C. vulgaris*; se ha reportado que concentraciones de amonio entre 17 y 143 mg/L pueden inhibir el crecimiento de *Chlorella*, sin embargo, se encontró una baja concentración de dicha especie en el efluente utilizado en el presente trabajo. También algunos tipos de carbohidratos pueden influenciar el crecimiento en forma de promotores, como se ha reportado para la glucosa y la maltosa (Kong et al., 2020). El efluente proviene del hervido del mosto, por lo cual puede inferirse que debe haber glucosa y maltosa presentes en cantidades relevantes en el mismo. Estos factores mencionados previamente podrían explicar, al menos en parte, la no inhibición del crecimiento observada. Casá et al. (2022) utilizaron la misma cepa autóctona del presente trabajo, con la cual reportaron el crecimiento satisfactorio a muy altas concentraciones de DQO.

De este apartado se concluyó que fue posible determinar valores óptimos iniciales de DQO y pH que maximizan el aumento de la biomasa y mantienen al mínimo el crecimiento de los microorganismos que acompañan la cepa no axénica. A partir de estos valores determinados, se procedió a estudiar los parámetros cinéticos y la composición de la biomasa obtenida.

II.4.2. Curvas de crecimiento

En las Figura II - 13,

Figura II - 14 y Figura II - 15 se muestran los resultados experimentales obtenidos (puntos); y el ajuste correspondiente (línea sólida para DO, línea punteada para recuento) realizado según el

modelo de Gompertz (Ecuación II - 2) para el Sistema 1, efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h; el Sistema 2, efluente cervecero diluido con agua desionizada, expuesto durante la incubación a oscuridad total; y el Sistema 3, efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11, expuesto durante la incubación a un ciclo de luz de 12 h. En la Tabla II - 6 se indican para cada sistema los parámetros C , μ_{\max} y el período de latencia lag . La variable C denota el valor asintótico de la función, el cual se interpreta como el mayor valor alcanzado del logaritmo de la variable dependiente, μ_{\max} es el máximo valor alcanzado de la velocidad específica de crecimiento, en h^{-1} ; y lag es período de latencia en horas.

Tabla II - 6: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado.

		Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Densidad óptica	C	2,9±0,1 ^a	2,7±0,1 ^a	2,9±0,1 ^a
	μ_{\max} (h^{-1})	0,18±0,01 ^b	0,17±0,02 ^b	0,15±0,01 ^b
	lag (h)	7,3±1,5 ^d	9,2±2 ^d	7,0±2,3 ^d
	$R^2_{\Delta_i}(\%); DW$	99,02; 1,82	99,51; 3,37	99,12; 2,75
Recuento en Cámara (cel/mL)	C	2,9±0,1 ^a	2,9±0,3 ^a	3,2±0,2 ^a
	μ_{\max} (h^{-1})	0,15±0,01 ^{bc}	0,13±0,02 ^b	0,17±0,02 ^c
	lag (h)	N/D	N/D	N/D
	$R^2_{\Delta_i}(\%); DW$	95,76; 1,73	97,88; 1,96	92,13; 1,58

Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Se observó que no hubo diferencias significativas en el valor de C máximo alcanzado en los tres sistemas; para la velocidad específica de crecimiento, se observó que sólo el sistema 3, cuando fue medido por recuento en cámara, mostró un valor significativamente mayor que los otros dos sistemas.

Respecto a la fase lag , todos los sistemas mostraron valores similares cuando se midieron por densidad óptica, sin embargo, no fue posible determinar dicha fase de crecimiento en las mediciones por recuento celular y fue asignado el valor $lag = 0$ en el modelo de ajuste.

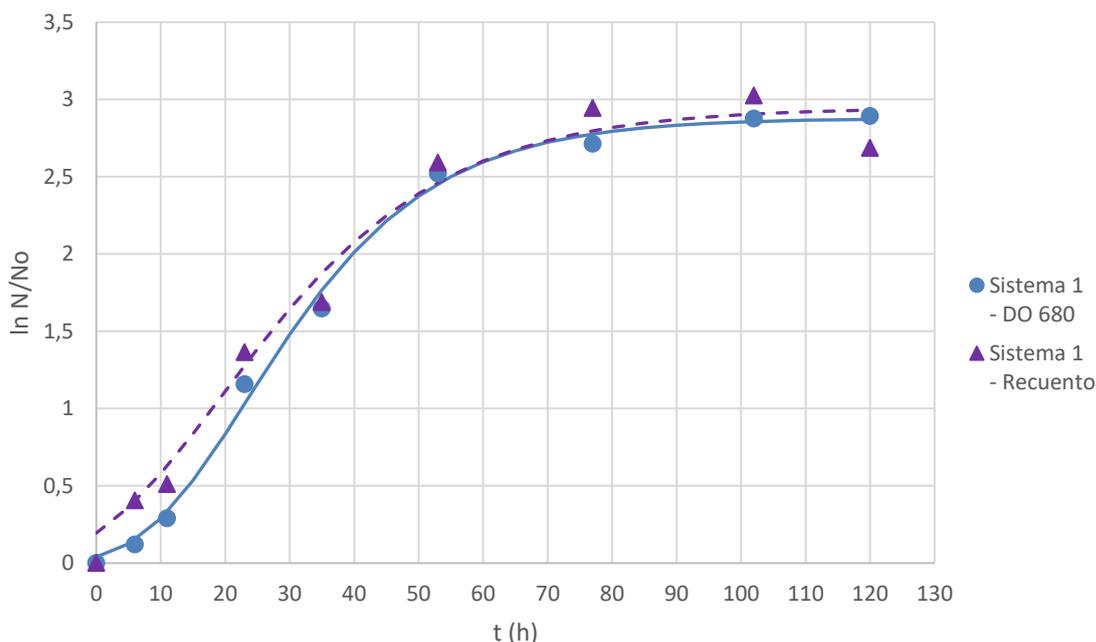


Figura II - 13: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 1, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

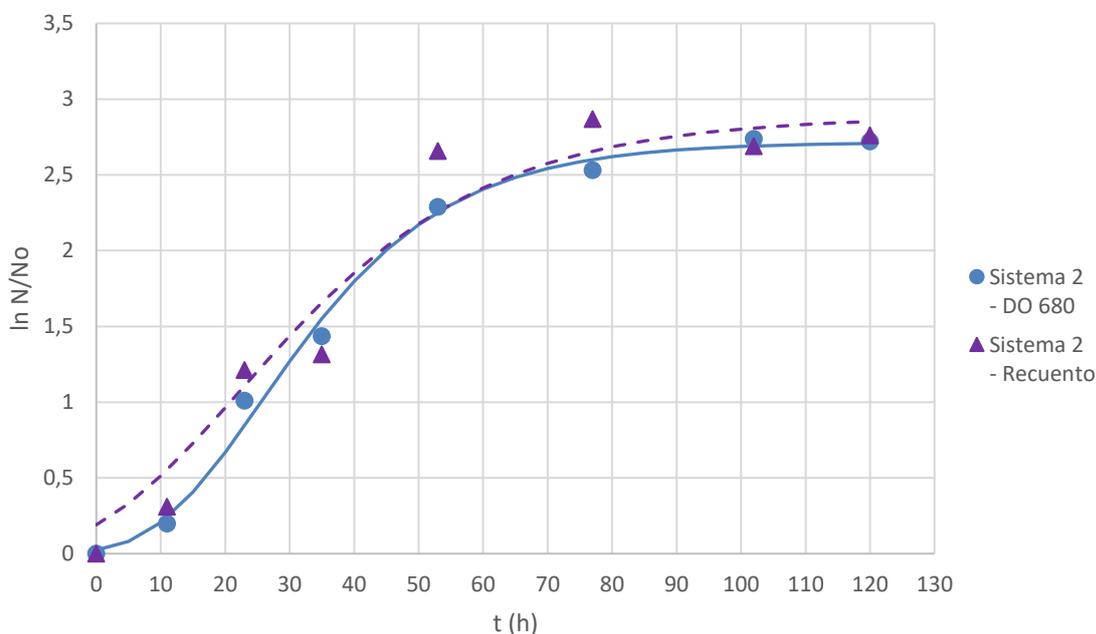


Figura II - 14: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 2, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

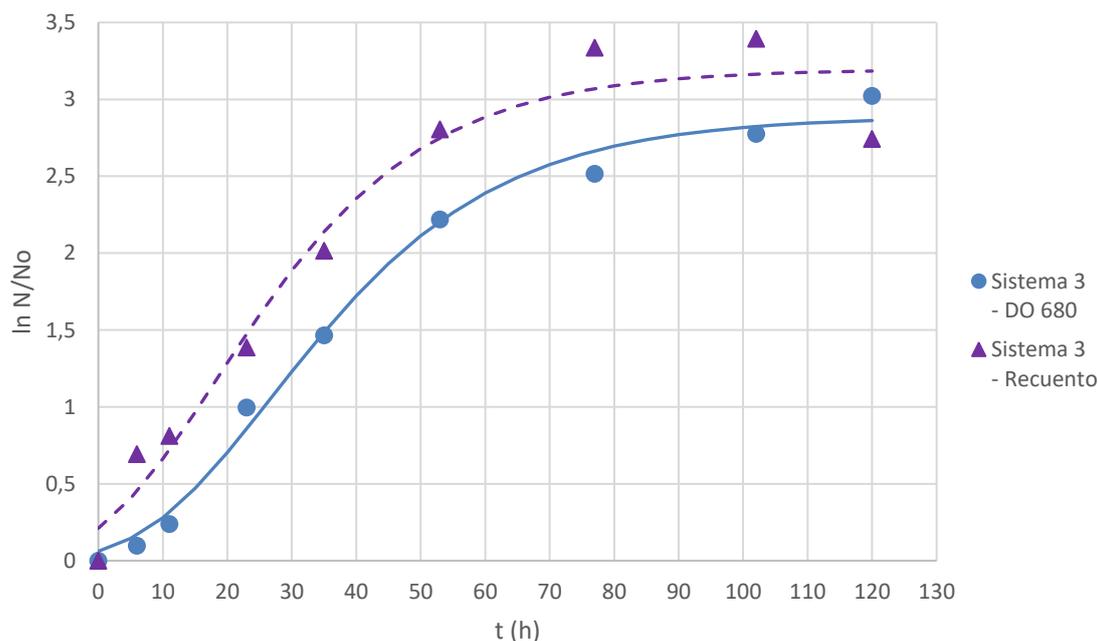


Figura II - 15: Curvas de crecimiento correspondientes al Sistema 3, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

Se observó que *C. vulgaris* fue capaz de adaptarse rápidamente al medio conteniendo efluente, resultando en la inexistencia de una fase de latencia para todos los sistemas, cuando se mide por recuento en cámara. Por otro lado, al modelar los resultados del seguimiento de la densidad óptica, se observa una fase de latencia. Una posible explicación para la observación de una fase de latencia cuando se mide por densidad óptica es el comienzo de la división celular a continuación de la inoculación, teniendo en cuenta que *Chlorella* se divide en cuatro células hijas (Safi et al., 2014), lo cual se evidencia con un rápido aumento del número de células por recuento. Sin embargo, la medición por absorción de luz a la longitud 680 nm puede mantenerse constante al comienzo del cultivo y mostrar una fase de latencia en el modelado de los datos, posiblemente porque aún no se desarrolla el contenido total de pigmentos necesario para la detección a través de la DO. Endo et al. (1974) reportaron la ausencia de fase de latencia de *C. regularis* en cultivo heterotrófico. Arora & Philippidis (2021) indicaron la ausencia de fase de latencia, así como una velocidad específica de crecimiento muy superior en los primeros días de incubación, en tres especies de *Chlorella* incubadas en modos mixo- y heterotróficos.

En todas las curvas de crecimiento (Figura II - 13 a Figura II - 15) es posible observar que se alcanza la fase estacionaria luego de tres días, aproximadamente entre 75 y 80 horas de cultivo.

También se observa que los valores de C y μ_{max} alcanzados por los tres sistemas, por ambos métodos de medición son similares. Esto significaría que la absorbancia del cultivo a 680 nm tiene correlación con el aumento del número de células. Las velocidades específicas máximas de crecimiento obtenidas a partir de la modelización fueron mayores a las reportadas para *Chlorella* sp. en efluente cervecero con 3000 mg O₂/L de 0,97 d⁻¹ (Farooq et al., 2013); *Chlorella* sp. GD en efluente de industria porcina con 500 mg O₂/L de 0,89 d⁻¹ (Kuo et al., 2015); y para *C. vulgaris* 31 en modos mixo- y heterotróficos, por adición de glucosa, maltosa y acetato en el medio, de 0,390-0,523; 0,447-0,507 y 0,382-0,490 d⁻¹ respectivamente (Kong et al., 2020).

La comparación de parámetros entre el Sistema 1 y 2 muestra que no es necesaria la exposición a la luz para el crecimiento de *C. vulgaris* en el efluente cervecero, pudiendo inferir que la cepa de *Chlorella* aquí utilizada se adapta al modo de crecimiento heterotrófico. Las concentraciones finales de biomasa alcanzadas fueron 1,59±0,27; 1,63±0,17 y 2,25±0,14 g/L; y las productividades máximas 0,29; 0,28 y 0,34 g.L⁻¹.h⁻¹ para los Sistemas 1, 2 y 3, respectivamente.

Fue posible determinar los parámetros cinéticos de los sistemas ensayados, mediante el ajuste al modelo de Gompertz, y realizar la comparación entre los mismos. Cabe destacar que los parámetros del sistema heterotrófico fueron muy similares a los del sistema mixotrófico.

II.4.3. Composición bioquímica

II.4.3.1. Determinación de masa seca

En la Figura II - 16 se muestran los resultados de la concentración final de biomasa, expresada en g/L, alcanzada luego de 6 días de incubación. Los tres sistemas formulados con efluente mostraron concentraciones finales significativamente superiores al sistema de control, siendo el Sistema 3 el que mayor concentración alcanzó.

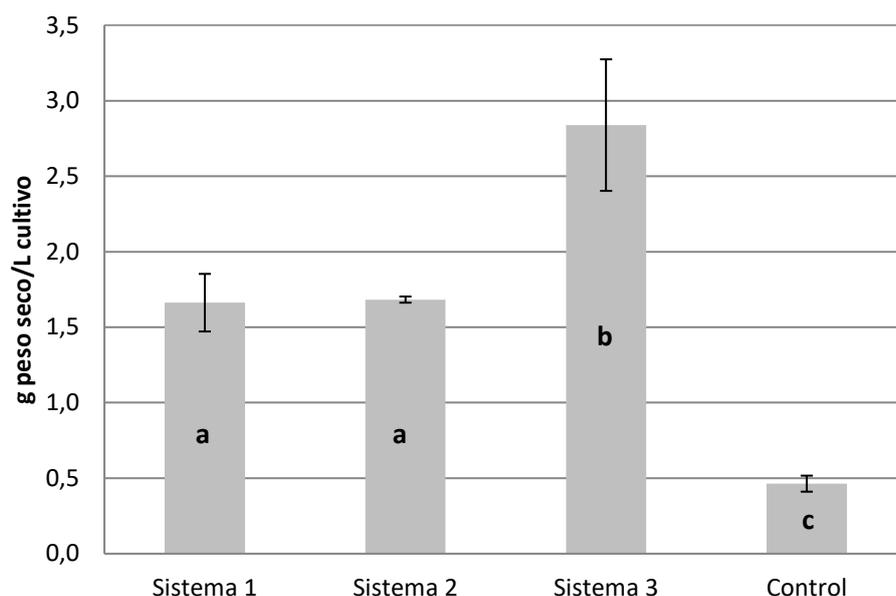


Figura II - 16: Concentración de biomasa final, expresada en gramos de masa seca de biomasa por litro de cultivo. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Sistema 1: efluente cervecero diluido con agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.

Las concentraciones finales alcanzadas por los Sistemas 1, 2 y 3 fueron $1,7 \pm 0,2$; $1,68 \pm 0,02$ y $2,8 \pm 0,4$ g/L respectivamente. Los valores de concentración final reportados en bibliografía para *C. vulgaris* y *C. protothecoides* en efluente cervecero fueron de 1,3 a 1,35 g/L (Marchão et al., 2018). Nwoba et al. (2019) informaron valores entre 1,1 y 1,5 g/L para *Chlorella sp.* utilizando un efluente digerido de industria alimenticia, mientras que Farooq et al. (2013) mostraron concentraciones de 1,5 g/L para *C. vulgaris* cultivada en efluente cervecero esterilizado. Las concentraciones finales de biomasa alcanzadas con los sistemas mixo- y heterotróficos aquí ensayadas se encuentran dentro del orden de las reportadas en la bibliografía en sistemas similares.

II.4.3.2. Determinación de concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos

En la Figura II - 17 se muestran los contenidos, expresados en porcentaje de masa de analito por masa de biomasa en base seca, de lípidos, carbohidratos y proteínas. El porcentaje de proteínas obtenido estuvo en el rango 30 – 50 %. El porcentaje de lípidos se encontró entre 20 y 31% para aquellos sistemas con efluente dentro de su formulación (Sistemas 1 a 3), mientras que fue del 8% para el sistema de control. El sistema 2 mostró el mayor porcentaje de carbohidratos, seguido por los sistemas 1 y 3. El sistema control desarrolló el menor contenido de carbohidratos.

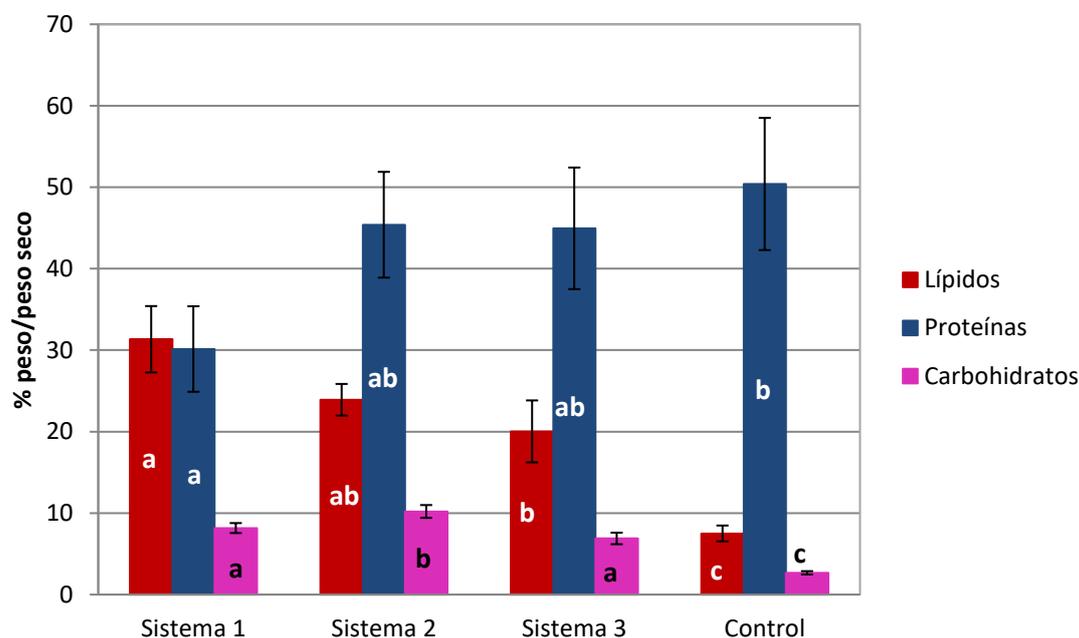


Figura II - 17: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos, expresadas en porcentaje de peso de biomolécula por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas para el mismo metabolito. Sistema 1: efluente cervecero diluido con agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.

El contenido de proteínas obtenido por un modo de cultivo heterotrófico es generalmente menor al que puede alcanzarse mediante los modos auto-y mixotrófico (El-Sheekh et al., 2014; Ende & Noke, 2019). Se observó que el Sistema 1 tuvo menor contenido proteico que el sistema de control aun teniendo la misma exposición de intensidad lumínica y fotoperíodo. Teniendo en cuenta que el Sistema 3 no tuvo diferencias significativas con el sistema de control, se puede inferir que los nutrientes del medio BG11 son necesarios para el desarrollo de proteínas. Según Ende & Noke, (2019) es posible optimizar el contenido de proteínas mediante la cosecha de la biomasa en el punto adecuado de la curva de crecimiento.

Ante la deficiencia de nitrógeno, puede aumentar el contenido en peso de lípidos y carbohidratos en detrimento de la cantidad de proteínas (Ördög et al., 2012; Zhu et al., 2014a; Zhu et al., 2014b). Esta tendencia se puede observar en los Sistemas 1 a 3. Los modos de cultivo mixo- y heterotróficos promueven el desarrollo de lípidos en la composición, el cual también se ve influenciado por la fuente de carbono; alcanzando hasta aproximadamente un 25% en la

composición (Kong et al., 2020). El valor de lípidos alcanzado por Kong et al. (2020) es similar al del presente trabajo.

Los porcentajes de lípidos, carbohidratos y proteínas obtenidos del análisis de la biomasa se encontraron en el orden de los reportados en la bibliografía, según descrito en II.1.3. Composición de la biomasa

II.4.3.3. Determinación de concentración de pigmentos

Los sistemas 3 y control mostraron un contenido pigmentos aproximadamente cuatro veces superior al contenido de los sistemas 1 y 2, cuyo medio de cultivo se compuso de agua destilada y efluente cervecero, como se observa en la Figura II - 18.

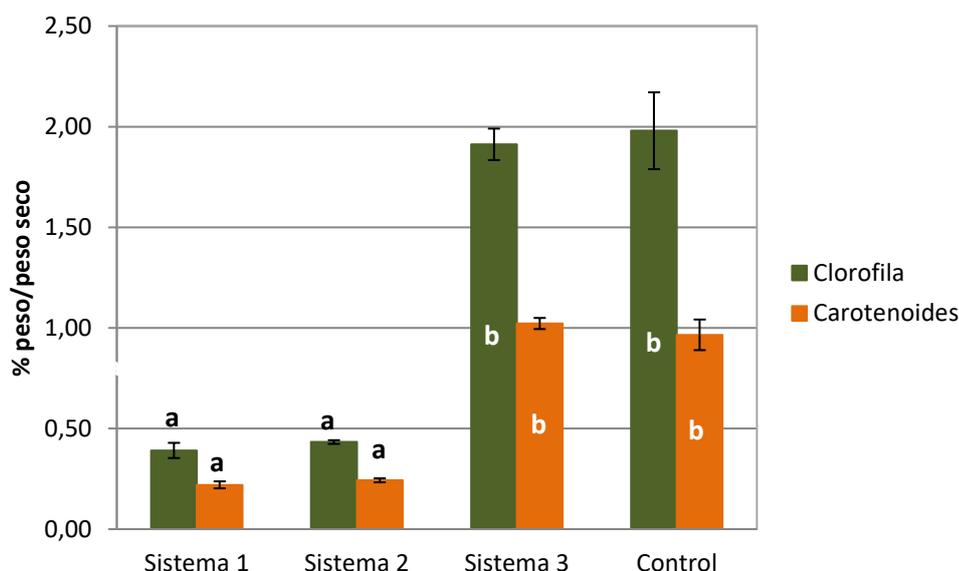


Figura II - 18: Concentración de clorofila a y carotenoides, expresadas en porcentaje de peso de pigmento por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas para el mismo pigmento. Sistema 1: efluente cervecero diluido con agua desionizada + 12 h ciclo de luz; Sistema 2: efluente cervecero diluido con agua desionizada, oscuridad total; Sistema 3: efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz. Control: medio de mantenimiento BG-11 + 12 h ciclo de luz.

Kong et al. (2020) sugieren que un alto contenido de carbono y la ausencia de luz puede reprimir la fotosíntesis, cambiando el modo trófico de crecimiento. Veloso et al. (1991) indican que un contenido de clorofila menor a 1% puede indicar falta de nutrientes en el cultivo. En los sistemas ensayados, puede observarse que aquellos sistemas que contienen BG11 muestran un contenido

de clorofila mayor a este valor, mientras que los sistemas que contienen sólo agua y efluente, se encuentran por debajo. Mohammad Mirzaie et al. (2016) sugirieron que la falta de nitrógeno en el medio de cultivo puede llevar a la canibalización de la clorofila, la cual supone para la célula una fuente rica en nitrógeno de fácil consumo.

El porcentaje total de pigmentos de los sistemas mixo- y heterotróficos se encontró del rango reportado en la bibliografía (apartado II.1.3. Composición de la biomasa), así como los valores encontrados para la biomasa en condiciones autotróficas.

II.4.4. Escalado

De los sistemas evaluados en los puntos II.4.2. Curvas de crecimiento y II.4.3. Composición bioquímica (Sistemas 1 a 3) se observó que no hubo diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento medida por DO. Respecto a la composición de la biomasa obtenida, se observó que el Sistema 2 no presentó diferencias significativas en los contenidos de lípidos y proteínas cuando se lo comparó con los Sistemas 1 y 3. Adicionalmente, el Sistema 2 presenta las ventajas de no requerir suplementación ni iluminación durante la incubación. Por estas razones, se decidió escalar el Sistema 2.



Figura II - 19: Biorreactores en régimen de oscuridad total, al momento de iniciar la incubación.

II.4.4.1. Agitación

El valor de potencia volumétrica obtenida para los sistemas en frasco Erlenmeyer de 250 mL (80 mm de diámetro, 100 rpm de agitación orbital, 60 mL de volumen operativo) fue de 36,5 W/m³. Para el sistema escalado en frasco Erlenmeyer de 5L, el valor de potencia volumétrica a la mínima velocidad de agitación permitida por el agitador orbital (212 mm de diámetro, 60 rpm de agitación, 1,2 L de volumen operativo) fue de 39,6 W/m³. Para el biorreactor tanque agitado (impulsor tipo hélice de 45mm, 500 rpm de agitación, 1,5 L de volumen operativo) fue de 35,6 W/m³. El escalado de sistemas biotecnológicos por potencia volumétrica (P/V) constante es bastante utilizado, como criterio único o en combinación con otros parámetros, como el coeficiente de transferencia de oxígeno o el estrés hidrodinámico. Se ha utilizado exitosamente como criterio de escalado piloto e industrial (Marques et al., 2010; Xu et al., 2017).

Para los frascos Erlenmeyer se calculó el número de fase *ph*, según las ecuaciones presentadas por Argumedo Moix (2018), obteniendo los valores adimensionales de 3,52 y 1,57 para los frascos de 250 mL y 5 L de capacidad respectivamente. Ambos sistemas presentaron valores por encima del valor crítico de 1,26; indicando que tuvieron un correcto mezclado.

El valor de potencia volumétrica depende de la velocidad de agitación al cubo (Ecuación II - 7). Sin embargo, se observó un fenómeno de precipitación de la biomasa en el fondo del recipiente cuando se realizaron ensayos preliminares en el biorreactor tanque agitado con turbina Rushton, aun utilizando velocidad de agitación entre 100 y 700 rpm; con potencias volumétricas entre 3,5 y 1200 W/m³, respectivamente. Por este motivo se decidió avanzar con un agitador tipo hélice (*marine impeller*). Algunas especies de *Chlorella* tiene una alta eficiencia de sedimentación, aún sin la adición de agentes externos, debido que producen polisacáridos con propiedades floculantes en su pared celular (Alam et al., 2014). También se ha encontrado que algunas microalgas sedimentan en presencia de bacterias en cultivos de consorcio (Lee et al., 2013). Otro factor que puede afectar positivamente la auto floculación de *Chlorella*, es un régimen turbulento que aumenta el tamaño de los flóculos y promueve la producción de polisacáridos que ayudan a la formación de los mismos (Li et al., 2021). Esto podría explicar, en parte, la sedimentación observada ante la utilización de la turbina Rushton. Por otro lado, las líneas de flujo del agitador tipo hélice son axiales, manteniendo las microalgas en suspensión (Doran, 2012).

Se puede concluir que con la especie de *Chlorella* utilizada en el presente trabajo, y en las condiciones aquí ensayadas, tanto el valor de potencia volumétrica como la selección de un impulsor adecuado, fueron claves para el correcto escalado del sistema.

II.4.4.2. Curvas de crecimiento

En las Figura II - 20 y Figura II - 21, se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento celular medido por DO o recuento en cámara Neubauer, para el sistema del biorreactor tanque agitado y del biorreactor de Erlenmeyer, respectivamente. Los puntos muestran los valores experimentales; mientras que las líneas corresponden al ajuste realizado según el modelo de Gompertz (Ecuación II - 2). En las mismas se pueden observar las diferentes etapas en el crecimiento de la microalga en modo batch en los respectivos biorreactores (Figura II - 22). En la Tabla II - 7 se indican para cada sistema los parámetros C , μ_{\max} (h^{-1}) y el período de latencia lag (h).

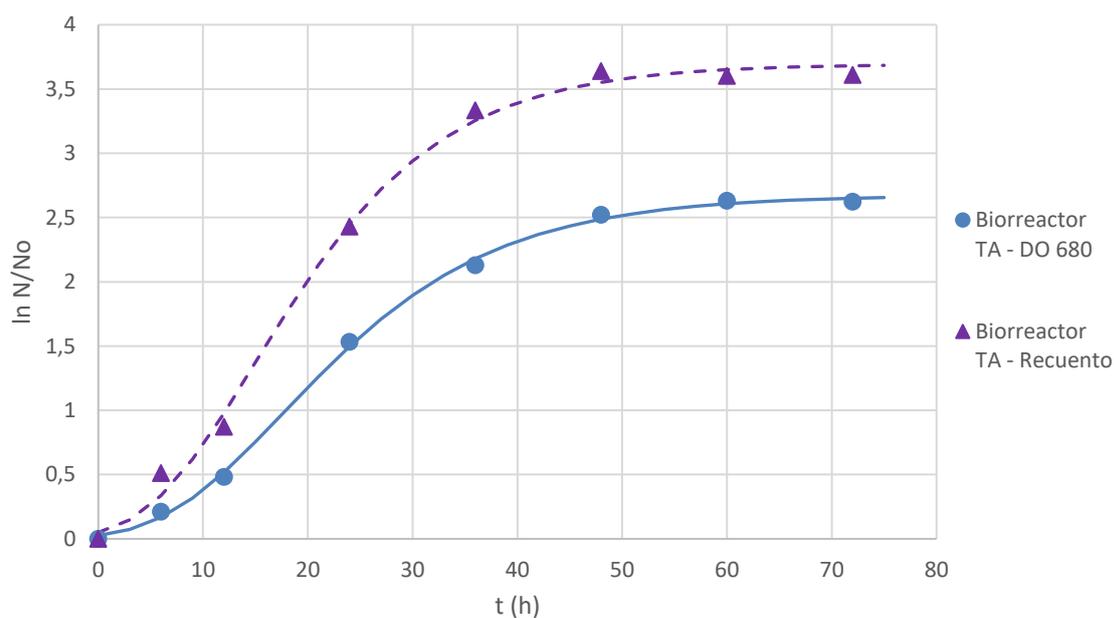


Figura II - 20: Curvas de crecimiento correspondientes al sistema cultivado en biorreactor tanque agitado, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

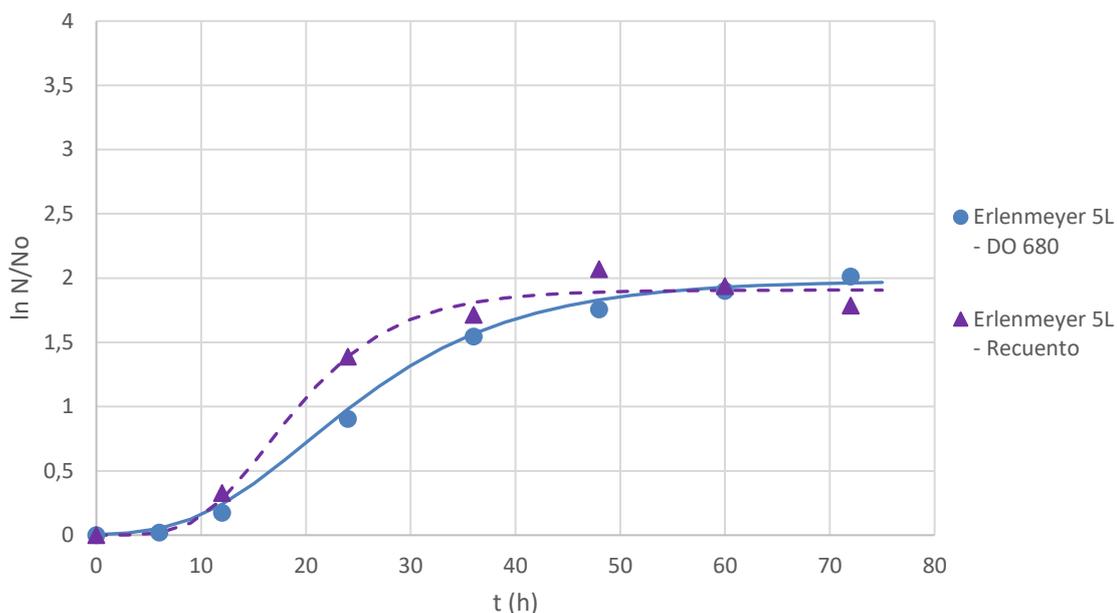


Figura II - 21: Curvas de crecimiento correspondientes al sistema cultivado en frasco Erlenmeyer de 5L con agitación orbital, medido por densidad óptica (DO) a 680 nm y por recuento celular en cámara de Neubauer. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

Se observó que *C. vulgaris* fue capaz de adaptarse a los sistemas y mostrar crecimiento en los mismos. La fase estacionaria comienza a alcanzarse alrededor de las 40 a 50 horas de cultivo para el sistema en el biorreactor tanque agitado, y aproximadamente entre las 30 y 45 horas para el sistema en el frasco Erlenmeyer de 5 L de capacidad total. En la Tabla II - 7, además se comparan con los parámetros del Sistema 2, obtenido a menor escala, descrito en el punto II.4.2. Curvas de crecimiento



Figura II - 22: Biorreactores al final del período de cultivo, al momento de la cosecha final de biomasa.

Tabla II - 7: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado para el sistema en pequeña escala y los dos sistemas de mayor escala.

		Erlenmeyer 250 mL	Biorreactor TA	Erlenmeyer 5 L
Densidad óptica	C	2,7±0,1 ^a	2,674±0,035 ^a	1,980±0,030 ^c
	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,17±0,02 ^{ab}	0,232±0,010 ^{bc}	0,181±0,010 ^{ab}
	lag (h)	9,2±2 ^{ab}	6,19±0,64 ^{bc}	9,2±2 ^a
	R^2_{Aj} (%); DW	99,51; 3,37	99,88; 3,30	99,87; 1,91
Recuento en Cámara (cel/mL)	C	2,9±0,3 ^a	3,694±0,078 ^b	1,907±0,092 ^c
	μ_{\max} (h ⁻¹)	0,13±0,02 ^a	0,362±0,029 ^d	0,287±0,072 ^{cd}
	lag (h)	N/D	4,7±1,0 ^c	9,7±2,3 ^{ab}
	R^2_{Aj} (%); DW	97,88; 1,96	99,61; 2,52	97,87; 2,33

Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se comparan los parámetros obtenidos por ambos métodos de medición en el mismo conjunto.

Del mismo modo que se mencionó en el punto II.4.2. Curvas de crecimiento, se observan algunas diferencias entre las mismas variables (μ_{\max} y lag) cuando se analizan por distintos métodos de medición para un mismo sistema. Una posible explicación de este comportamiento puede ser la forma de división celular de la especie *Chlorella*, que presenta cuatro hijas por cada célula madre

(Safi et al., 2014), resultando en un rápido crecimiento del número de células visibles pero, posiblemente en las primeras horas, sin la totalidad del contenido de pigmentos que detecta el método de densidad óptica a 680 nm. Es interesante resaltar que, para el biorreactor tanque agitado, la curva de crecimiento obtenida con los datos de recuento celular presenta mayores valores C y μ_{\max} en comparación con los obtenidos por densidad óptica, y al mismo tiempo, una menor fase *lag* (Figura II - 20 y Tabla II - 7). Sin embargo, en el sistema escalado en Erlenmeyer de 5L se observa que se invierte esta tendencia (Figura II - 21 y Tabla II - 7). Posiblemente la agitación mediante la turbina hélice y burbujeo, mejora el acceso a nutrientes del medio y oxígeno disuelto, permitiendo un mejor crecimiento celular, evidenciado en un mayor número de células. En el caso del Erlenmeyer de 5 L, el crecimiento celular se manifiesta por células de mayor tamaño, aumentando la densidad óptica sin mejorar el parámetro de cantidad de células. Este fenómeno puede observarse en la Figura II - 23, donde se muestra una foto microscópica del cultivo en el frasco Erlenmeyer y el tanque agitado, a las 60 horas de incubación. Se observa que el primero tiene menor cantidad de células de mayor diámetro, mientras que el segundo presenta un recuento mayor de tamaño más pequeño. Se ha reportado el aumento de tamaño de las células de *Chlorella* bajo condiciones de estrés, como exposición a la radiación UV (Malanga & Puntarulo, 1995) y alta salinidad del medio (Kim et al., 2016), debido a la generación intracelular de gotas de aceite y gránulos de almidón. La deficiencia de nutrientes en el medio, como el nitrógeno, también puede inducir la acumulación de lípidos y/o carbohidratos (Kaur et al., 2022; Mujtaba et al., 2012).

También se observa en la Tabla II - 7 que el biorreactor tanque agitado mostró una tendencia a tener los mejores parámetros cinéticos. Presentando la menor fase *lag* y mayores valores de C y velocidad específica de crecimiento, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros calculados según las mediciones de recuento celular. Esto se encuentra en línea con lo expuesto en el párrafo anterior.

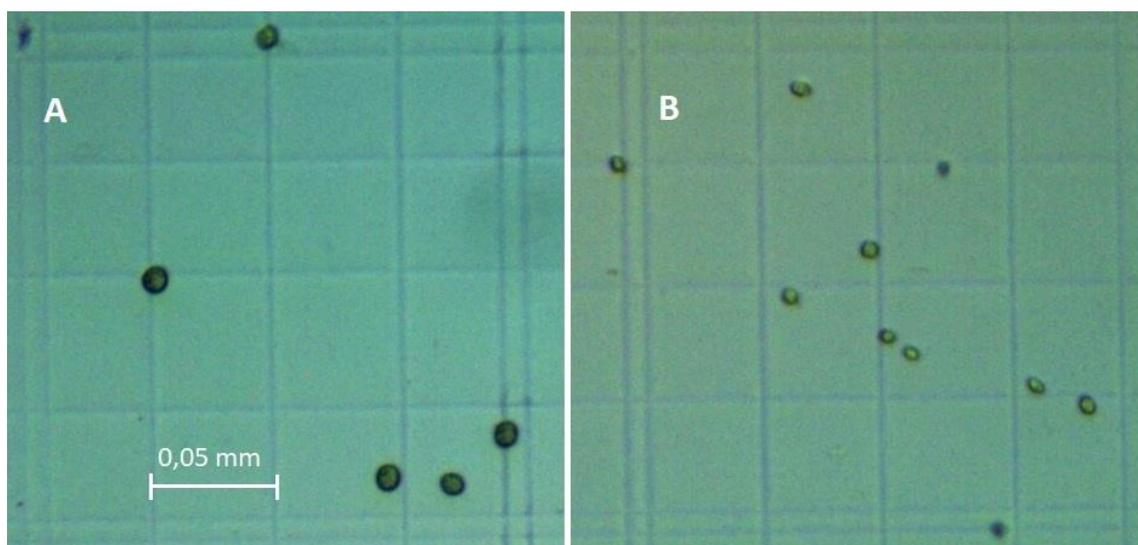


Figura II - 23: Foto microscópica de los sistemas A) biorreactor Erlenmeyer de 5L, B) biorreactor tanque agitado, a las 60 horas de incubación. Las líneas de fondo corresponden a los recuadros de 0,0025 mm² de superficie de la cámara de Neubauer.

La concentración final de biomasa obtenida fue 1,08 y 0,85 g/L para el biorreactor tanque agitado y para el Erlenmeyer de 5 L, respectivamente, siendo el valor del primer sistema un 27% mayor al del segundo.

Las productividades calculadas para ambos sistemas escalados fueron de 6,0 g.L⁻¹.d⁻¹ para el biorreactor tanque agitado, y 3,6 g.L⁻¹.d⁻¹ para el biorreactor Erlenmeyer 5 L. La productividad del Sistema 2, sin escalar, fue de 6,7 g.L⁻¹.d⁻¹. Se han reportado algunos casos de productividades similares a las obtenidas en el presente trabajo, como 7,3 g.L⁻¹.d⁻¹ para *C. pyrenoidosa* 15-2070 en cultivo mixotrófico en efluente industrial de alto contenido de amonio (Wang et al., 2020); 5,3 g.L⁻¹.d⁻¹ para *C. vulgaris* LMPA39 cultivada en suero de ricota (Casá et al., 2022) y 4,2 g.L⁻¹.d⁻¹ para *C. protothecoides* cultivada en hidrolizado de polvo de alcaucil suplementado con sales (Cheng et al., 2009).

Fue posible cultivar satisfactoriamente *C. vulgaris* en los sistemas escalados, en modo heterotrófico, así como también determinar los parámetros cinéticos de los mismos y realizar la comparación de los valores obtenidos en los escalados con los valores del ensayo en el apartado II.4.2. Curvas de crecimiento

II.4.4.3. Composición bioquímica

Finalizado el tiempo total de incubación, se cosechó la biomasa para realizar la determinación de lípidos, proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides.

En la Tabla II - 8 se muestran los valores de porcentaje en peso de biomoléculas y pigmentos para los dos sistemas escalados, y el sistema sin escalar que fue incubado bajo las mismas condiciones de oscuridad.

Tabla II - 8: Porcentaje en peso base seca de lípidos, proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides contenidos en la biomasa.

% peso / peso seco de biomasa	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos	Clorofila <i>a</i>	Carotenoides
Reactor TA	27,2±6,4 ^a	32,5±5,2 ^{ab}	7,8±1,7 ^a	0,4242±0,075 ^a	0,247±0,039 ^a
Reactor Erlenmeyer 5L	36,5±8,6 ^a	30,8±5,0 ^a	13,7±2,9 ^b	0,234±0,042 ^b	0,144±0,023 ^b
Sistema 2 (Erl. 250 mL)	23,9±1,9 ^a	45,4±6,5 ^b	10,20±0,79 ^{ab}	0,4330±0,0092 ^a	0,243±0,010 ^a

Letras distintas en la misma columna denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Gao et al., (2019) reportaron porcentajes de lípidos para *Chlorella sp.* de entre 2,5 y 36,5% para distintas relaciones de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo; Guldhe et al. (2017) mostraron para *C. sorokiniana* cultivada heterotróficamente en efluente de industria de acuicultura, contenidos de lípidos de entre 26 y 39,1%. La productividad de lípidos para ambos sistemas escalados fue 1,6 g.L⁻¹.d⁻¹ para el biorreactor tanque agitado, y 1,3 g.L⁻¹.d⁻¹ para el biorreactor Erlenmeyer 5L. La productividad del Sistema 2, sin escalar, fue de 1,6 g.L⁻¹.d⁻¹. Chen et al. (2011) reportaron productividades de lípidos de entre 0,7 y 1,9 g.L⁻¹.d⁻¹ para *C. protothecoides* en régimen heterotrófico, y entre 0,04 y 0,18 g.L⁻¹.d⁻¹ para *Chlorella sp.* en régimen fotoautotrófico.

Liu & Chen (2016) informaron que el género *Chlorella* puede llegar a contener hasta un 68% en peso de proteínas. Peng et al. (2019) encontraron, para *C. vulgaris* cultivada en efluentes domésticos con distintos regímenes tróficos, contenidos de proteínas aproximadamente entre 36 y 50%. Para proteínas, la productividad encontrada del Sistema 2, sin escalar, fue de 3,0 g.L⁻¹.d⁻¹; mientras que para los sistemas escalados fue 1,9 g.L⁻¹.d⁻¹ en el biorreactor tanque agitado, y 1,1 g.L⁻¹.d⁻¹ en el biorreactor Erlenmeyer 5L. Guldhe et al. (2017) reportaron una productividad de

proteínas de hasta $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para *C. sorokiana* cultivada en modo heterotrófico en efluente de industria de acuicultura representando el $\approx 28\%$ de la composición de biomasa.

En las condiciones ensayadas, se encontraron porcentajes entre 7,8 y 13,7 % de carbohidratos en la biomasa. Los valores reportados en bibliografía varían ampliamente: Ho et al. (2013) mostraron contenidos de carbohidratos de hasta 51% para *C. vulgaris* incubada en medio de mantenimiento BG-11 con deficiencia de nitrógeno y bajo distintos regímenes de iluminación, Guldhe et al. (2017) obtuvieron $\approx 35\%$ de carbohidratos en peso seco en los sistemas de *C. sorokiniana* cultivada heterotróficamente en efluente de acuicultura, y Bernaerts et al., (2018) determinaron para biomasa seca de *C. vulgaris* comercial un 2,8 % de polisacáridos almacenados internamente y 9,3% polisacáridos de pared celular.

Retomando la discusión del punto II.4.4.2. Curvas de crecimiento, donde se indica que las diferencias observables entre los parámetros cinéticos de ambos sistemas escalados podrían deberse a los distintos tamaños de células mostrados en la Figura II - 23; se observa que el sistema cultivado en el Erlenmeyer de 5 L, el cual tiene un mayor tamaño celular, es también el que presenta mayores porcentajes de carbohidratos ($p < 0,05$) y una tendencia a mayor contenido lipídico y menor contenido proteico. Estos valores serían consistentes con el aumento de tamaño celular en condiciones de estrés reportado por Malanga & Puntarulo (1995) y Kim et al. (2016), debido a la acumulación de gotas de aceite y gránulos de almidón.

Respecto a la producción de pigmentos, es importante destacar que aún en condiciones heterotróficas, se obtuvieron porcentajes de pigmentos en el rango de 0,23 a 0,42% para clorofila *a* y entre 0,14 y 0,25% para carotenoides, correspondiendo los menores valores al biorreactor Erlenmeyer de 5 L ($p < 0,05$) (Tabla II-8). Al respecto, algunos autores han reportado que las células de *Chlorella* cultivadas heterotróficamente siguen produciendo una cierta cantidad de clorofila, carotenoides y tocoferoles; aunque estas cantidades pueden ser mucho menores que en regímenes con iluminación, se evidencia que las células siguen manteniendo los sistemas fotosintéticos, al menos parcialmente, funcionales. Los valores reportados para *C. vulgaris* en régimen heterotrófico utilizando molasas como fuente de carbono estuvieron en el rango de 0,36 a 0,64% (m/v) de clorofila (*a+b*) y 0,030 a 0,041% (m/v) de carotenoides (El-Sheekh & Fathy, 2009; Endo et al., 1974). Por otro lado, los valores reportados para *C. pyrenoidosa* en régimen mixotrófico batch en efluente de alto contenido de amonio, en un fermentador de 50 L alcanzaron aproximadamente 1,9% y 0,3% de clorofilas totales y carotenoides, respectivamente (Wang et al., 2020).

A partir de las determinaciones presentadas en este apartado, se concluyó que el escalado de *C. vulgaris* en el biorreactor tanque agitado no produjo un cambio significativo en la composición de la biomasa, cuando se la compara con la del sistema en menor escala. Para el sistema escalado en el biorreactor Erlenmeyer 5L, se pudo observar un detrimento del contenido de proteínas y de pigmentos en comparación al sistema en Erlenmeyer 250 mL.

II.4.4.4. Demanda química de oxígeno

El valor inicial de DQO de los cultivos escalados fue de 18300 mg O₂/L, valor alcanzado mediante dilución con agua destilada del efluente cervecero. Finalizado el tiempo total de incubación de 72 horas, se procedió a medir el valor de DQO del sobrenadante del líquido cosechado. Se obtuvieron los valores de 11675 y 13325 mg O₂/L, para los sistemas cultivados en el biorreactor tanque agitado y en el frasco Erlenmeyer 5 L, respectivamente. El resultado indica que el valor de DQO se redujo aproximadamente 36% y 27% en cada caso. La relación de reducción de DQO entre sistemas de 1,33; representando que el sistema biorreactor tanque agitado, redujo la DQO en un 33% más que el sistema frasco Erlenmeyer. En este sentido, este resultado se encuentra en concordancia con los rendimientos de biomasa finales; comparando los valores de concentración final de biomasa alcanzados, el tanque agitado obtuvo un 27% más de biomasa (bs). Casá et al. (2022) reportaron un 26% de remoción de DQO de un suero de ricota de alto contenido de carbono, siendo el valor inicial 78000 mg O₂/L, utilizado como sustrato para cultivo de *C. vulgaris*; Zhu et al. (2019) informaron un 32% de remoción de DQO para un líquido de digestión anaeróbica de efluentes de industria láctea de aproximadamente 1500 mg O₂/L iniciales.

II.4.5. Aplicación de la biomasa: bioestimulante para el crecimiento vegetal

II.4.5.1. Pretratamientos de la biomasa

El contenido de proteínas informado para la muestra liofilizada fue de 43,6% bs, estando este valor en concordancia con el obtenido en nuestro laboratorio. En la Figura II - 24 se muestran los porcentajes en peso de aminoácidos (aa) libres respecto a peso de proteínas totales obtenidos durante para los Pretratamiento 1, biomasa sometida a disrupción celular sónica (DCS), seguida a continuación por la hidrólisis enzimática (HE); y Pretratamiento 3, biomasa sometida a hidrólisis enzimática (HE), sin disrupción sónica. Al finalizar el tratamiento, ambos sistemas (Pretratamientos 1 y 3) finalizan con un porcentaje de aa libres de aprox. 62%.

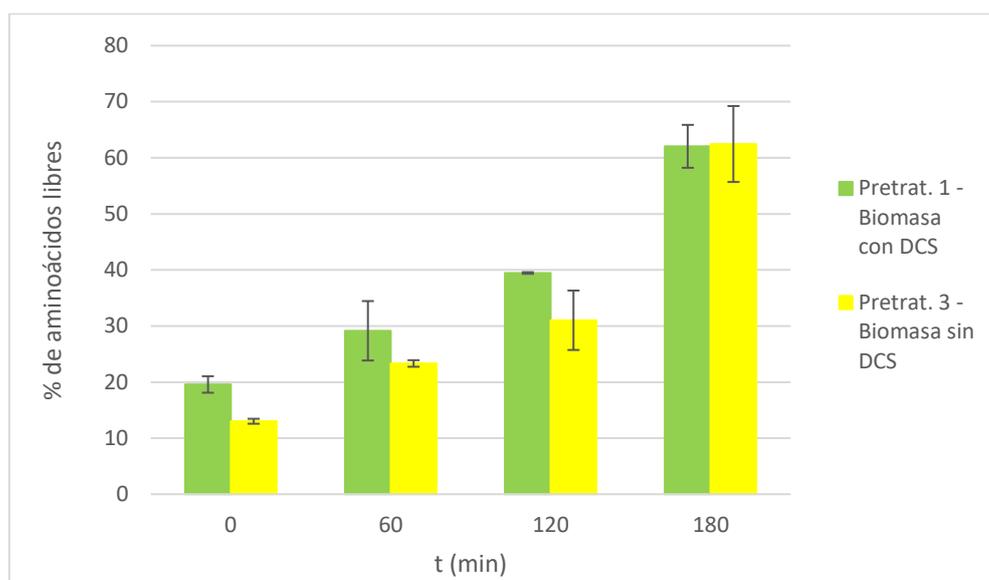


Figura II - 24: Porcentaje de aminoácidos libres por peso de proteínas totales. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar.

Los aminoácidos se encuentran entre los componentes que tienen propiedades bioestimulantes (Michalak et al., 2017); por lo cual se optó por un tratamiento de hidrólisis enzimática que permite una mejor conservación de la estructura de ciertos aminoácidos (Romero García et al., 2012). El porcentaje de aminoácidos libres obtenido es similar a los valores reportados, para el mismo proceso de hidrólisis, por Navarro-López et al. (2020) de 65 y 57% para *S. almeriensis* con y sin previa disrupción ultrasónica, respectivamente.

II.4.5.2. Evaluación de efecto similar a auxinas

II.4.5.2.1. Inducción de raíces en *Vigna radiata* (L.) Wilczek

Las auxinas son las fitohormonas que tienen el principal rol en el desarrollo de raíces adventicias (Jing & Strader, 2019). En la Figura II - 25 se muestran los porcentajes de desarrollo de raíces de distintos tratamientos aplicados a plantines de soja verde *Vigna radiata* (L.) Wilczek. El tratamiento control fue medio de mantenimiento BG-11, cuyo número de raíces desarrolladas representa el 100%. El producto comercial es una solución bioestimulante a base de hidrolizado de microalgas y otros componentes bioactivos, cuya concentración recomendada de aplicación es 2 g/L (marca confidencial). Se observa que todos los tratamientos con biomasa, al menos en concentración 2 g/L, muestran una tendencia a promover el desarrollo de raíces por encima del 100% del control; y a superar el desarrollo obtenido con el producto comercial, mostrando valores

similares a los obtenidos con el patrón, una auxina sintética específica, ácido indol-3-butírico en 0,3 mg/L de concentración. Los valores superiores al 100% obtenidos para los pretratamientos 1 a 3 a la mayor concentración, parecen evidenciar que es necesaria algún tipo de ruptura de la biomasa, sea por disrupción sónica y/o por hidrólisis, para liberar los compuestos con efecto similar a auxinas.

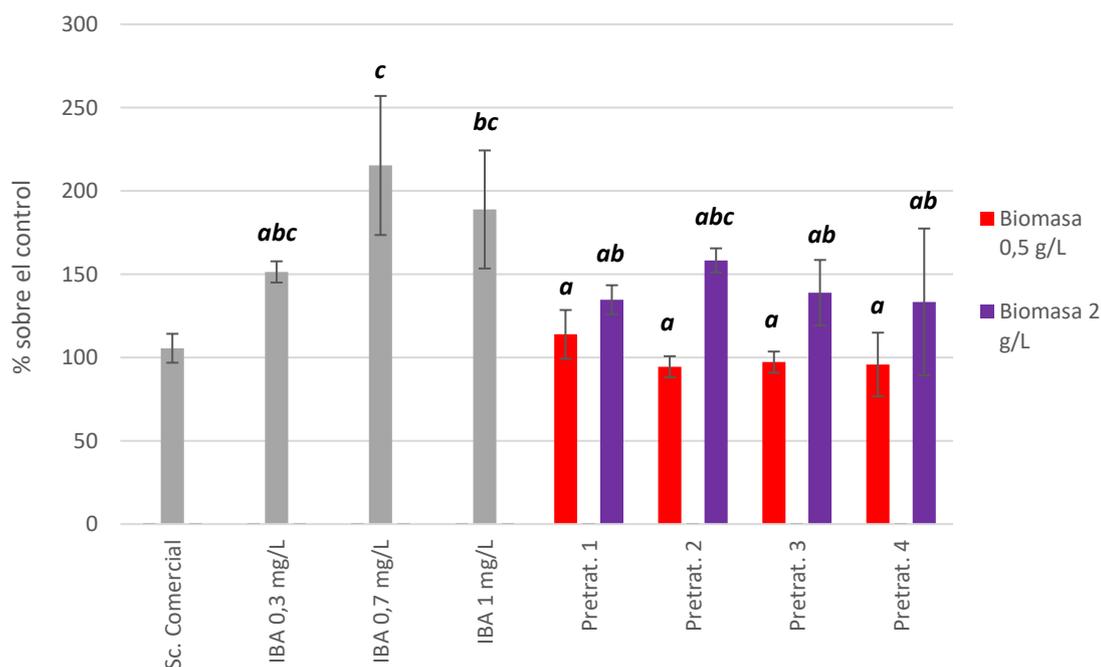


Figura II - 25: Porcentaje de desarrollo de raíces en plantines de soja verde por sobre el control (100%, agua destilada con BG11). Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y para una misma concentración de biomasa ($p < 0,05$; $n=3$).

Pretratamiento 1: Biomasa sometida a disrupción celular sónica (DCS), seguida a continuación por la hidrólisis enzimática (HE); Pretratamiento 2: Biomasa sometida a disrupción celular sónica (DCS), sin hidrólisis enzimática; Pretratamiento 3: Biomasa sometida a hidrólisis enzimática (HE), sin disrupción sónica y Pretratamiento 4: Biomasa sin hidrólisis enzimática ni disrupción sónica.

Navarro-López et al. (2020) reportaron porcentajes entre 37,7 y 164,2 % de desarrollo de raíces respecto al control, para el tratamiento con 2 g/L de biomasa de *S. almeriensis* con distintos pretratamientos, similares a los realizados en el presente trabajo. Mientras que obtuvieron mejores resultados con la aplicación de 0,5 g/L de biomasa, debido a un posible efecto inhibitorio de los productos celulares. En el caso de la cepa de *C. vulgaris* en las condiciones aquí ensayadas, dicho efecto inhibitorio no se evidencia. Se ha reportado que *C. vulgaris* mostró efectos comparables a

0,3 mg/L de concentración de IBA, cuando la concentración de biomasa en el tratamiento fue de 2 g/L (Ranglová et al., 2021).

Stirk et al. (2013) encontraron en 24 especies de microalgas las auxinas ácido indol-3-acético (IAA) e indol-3-acetamida (IAM), encontrándose la primera en *C. vulgaris* MACC-755 en mayor concentración (aproximadamente 29 veces) respecto a la segunda. Esta tendencia se presentó en 19 de las 24 cepas de microalgas investigadas. También resaltó que *C. vulgaris* se encontró en el grupo de microalgas que presentó mayor concentración final de biomasa y mayor concentración de auxinas luego de cuatro días de cultivo.

Las auxinas sintéticas, como el IBA, son más estables en solución acuosa y en los tejidos vegetales, que las naturales. Posiblemente es una de las causas de la diferencia en el desarrollo de raíces cuando se las compara con auxinas naturales como el IAA (Eliasson & Areblad, 1984).

II.4.5.2.2. Inducción de raíces en cotiledones de *Cucumis sativus* L.

En la Figura II - 26; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los porcentajes de desarrollo de raíces de distintos tratamientos aplicados a cotiledones de pepino *Cucumis sativus* L. El tratamiento control fue medio BG-11, cuyo número de raíces desarrolladas representa el 100%. Se observó que todos los tratamientos con biomasa mostraron un desarrollo de raíces superior al control y a los tratamientos con el patrón IBA en 0,3 y 0,7 mg/L de concentración. Los porcentajes obtenidos con la biomasa son similares a los alcanzados con el tratamiento comercial (solución bioestimulante a base de hidrolizado de microalgas, marca confidencial), y con el patrón IBA en 1 mg/L de concentración.

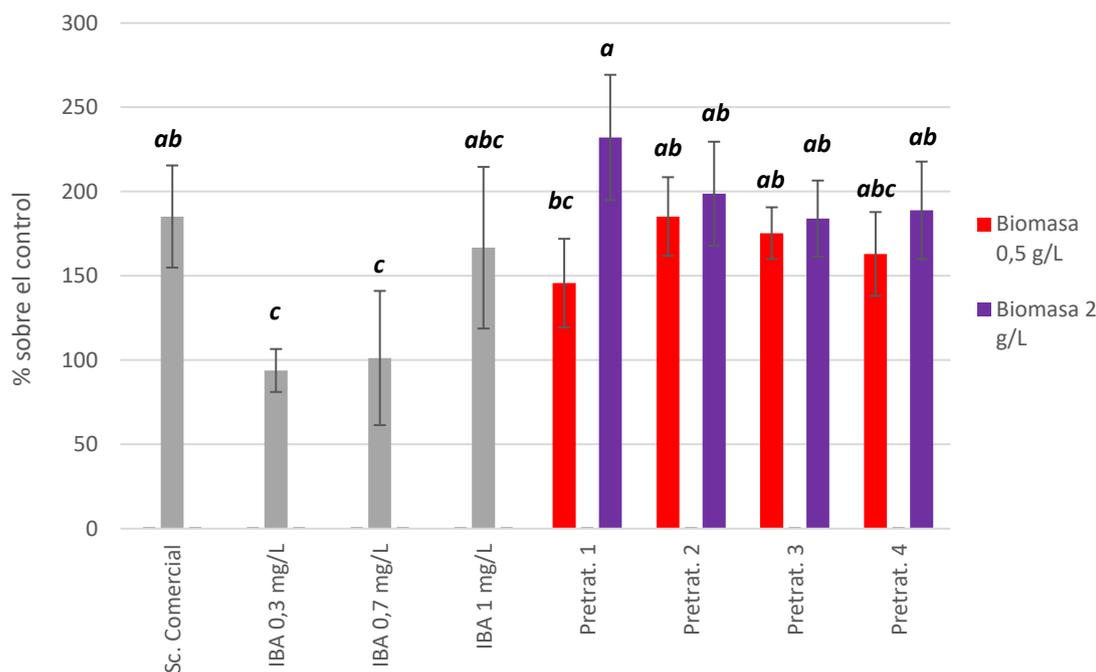


Figura II - 26: Porcentaje de desarrollo de raíces en cotiledones por sobre el control (100%, agua destilada con BG11). Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y para una misma concentración de biomasa ($p < 0,05$; $n=4$).

Plaza et al. (2018) reportaron que la aplicación de biomasa hidrolizada enzimáticamente de *Arthrospira Bio Veg-F025* y *Scenedesmus almeriensis* incrementó el peso de raíces en *Petunia x hybrida* desarrolladas en un 32%. Jirásková et al. (2009) informaron contenidos de auxinas de 0,45 a 4,45 nmol/g bs para el compuesto IAA en siete cepas de *Chlorella* ensayadas, el cual fue encontrado en mayor concentración que el IAM. No se encontraron otras auxinas en la composición. Se reportó que *C. sorokiniana* excreta la mayor parte del IAA al medio (Khasin et al., 2018), lo cual podría explicar el efecto inductor de raíces del Pretratamiento 4, el cual no tiene ningún tipo de ruptura celular.

Comparando las Figura II - 25 y Figura II - 26 se puede observar que *C. vulgaris* aquí ensayada tiene un mejor rendimiento como inductor del desarrollo de raíces en cotiledones de pepino, en comparación con el desarrollo de raíces obtenido en plantines de soja. El efecto de las auxinas como promotor de raíces puede verse afectado por el contenido de giberelinas, citoquininas, etileno. Así mismo, el efecto rara vez puede correlacionar con la concentración dado que la sensibilidad de los receptores de fitohormonas en los tejidos varía (Gaspar et al., 2003; Ghimire et al., 2022).

II.4.5.3. Evaluación de efecto similar a citoquininas

En la Figura II - 27 se muestran los porcentajes aumento de masa de cotiledones de pepino *Cucumis sativus L.* a los que se les aplicaron distintos tratamientos. Como tratamiento control se utilizó medio BG-11, cuyo aumento de peso por 10 unidades representa el 100%. Los tratamientos con biomasa microalgal mostraron una tendencia a porcentajes de expansión menores que el control, mientras que la solución comercial a base de hidrolizado de microalgas y el patrón 6-bencilaminopurina, una citoquinina específica, en todas las concentraciones ensayadas, mostraron valores similares o superiores al 100%.

Stirk et al. (2013) realizaron la determinación de 19 citoquininas en 24 especies de microalgas, entre las cuales se encuentra *C. vulgaris* con un contenido total entre los menores encontrados. Ranglová et al. (2021) reportaron efectos similares a este tipo de fitohormonas en *C. vulgaris* cuando la concentración de biomasa en los tratamientos fue entre 2 y 3 g/L. Las citoquininas y las auxinas tienen un efecto antagónico en el control del desarrollo de raíces, de tallos y de hojas. Las auxinas regulan la predominancia apical: cuando se remueve en una planta el ápice o yema apical, fuente de producción de auxinas, el contenido de citoquininas aumenta permitiendo desarrollar brotes laterales. El aumento en el contenido de estas últimas puede deberse a que las auxinas, cuando están en alta concentración, inhiben la producción de citoquininas. También se ha encontrado que la aplicación externa de auxinas en yemas laterales inhibe el crecimiento de los brotes, evidenciando que la inhibición de la producción de citoquininas no es el único mecanismo de control de las auxinas sobre el crecimiento de brotes (Gaspar et al., 2003). Esto podría explicar cómo, teniendo un efecto similar a las auxinas, no se observa un efecto significativo similar a las citoquininas.

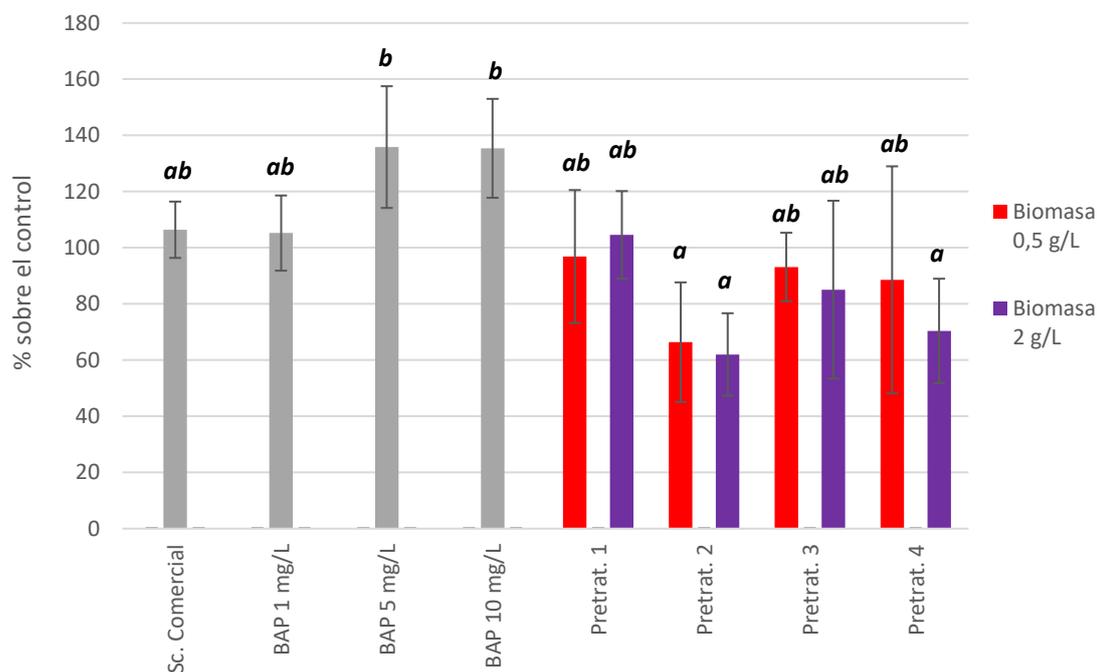


Figura II - 27: Porcentaje de expansión de cotiledones de pepino por sobre el control (100%, BG11). Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; $n=4$).

II.4.5.4. Evaluación de efecto similar a giberelinas

Las giberelinas son fitohormonas relacionadas con el proceso de germinación (Hilhorst & Karszen, 1992). En este sentido, la Figura II - 28 muestra los valores de índice de germinación para semillas de berro sometidas a tratamiento con biomasa de *C. vulgaris* en 0,1 y 0,5 g/L de concentración. Se utilizaron concentraciones menores a 1 g/L dado que, según indican Navarro-López et al. (2020), valores mayores han mostrado efectos inhibitorios en la germinación. El valor de referencia de 100 % corresponde al control realizado con agua destilada.

Se observó que el Pretratamiento 1, el cual fue sometido tanto a disrupción celular sónica como a hidrólisis enzimática, mostró un índice de germinación que parece mostrar una tendencia a ser mayor al control (agua destilada). Los tratamientos de ruptura e hidrólisis se realizan con el objetivo de incrementar el contenido de aminoácidos y poliaminas relacionados con el desarrollo y crecimiento de plantas (Navarro-López et al., 2020). Se ha reportado que la ruptura de la biomasa, por ejemplo por molienda, puede aumentar el índice de germinación respecto a un tratamiento sin ruptura (Ennis et al., 2017). Las auxinas, en ciertas concentraciones relativas a las giberelinas, pueden inhibir el proceso de germinación (Do et al., 2020). Ranglová et al. (2021)

reportaron que los mejores valores de índice de germinación obtenidos se lograron a la menor concentración de biomasa de *C. vulgaris* ensayada, de 0,5 g/l bs.

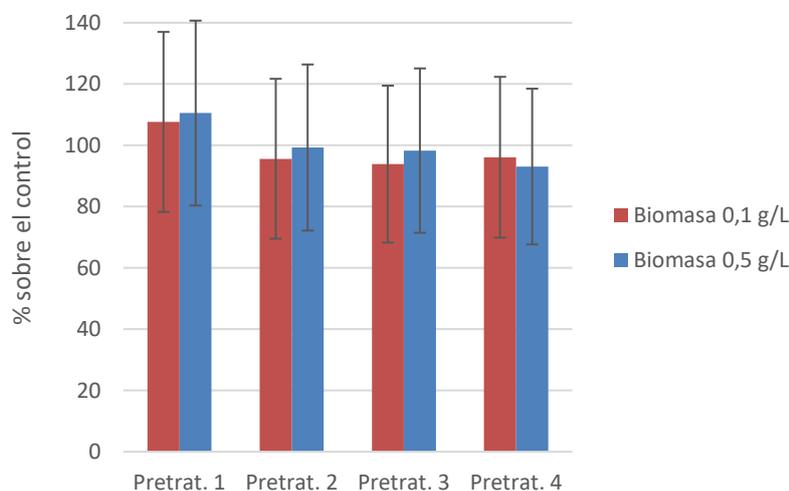


Figura II - 28: Índice de germinación.

Se pudieron determinar los efectos de la biomasa (con y sin pretratamientos) similares a las fitohormonas auxinas, citoquininas y giberelinas. *C. vulgaris* presentó resultados satisfactorios en las pruebas de actividad similar a las auxinas, pudiendo superar al control y al patrón comercial en al menos algunos de los tratamientos.

II.5. Conclusiones

Dentro de las conclusiones obtenidas del análisis del presente capítulo, se resalta el hecho de que fue posible cultivar una cepa de *Chlorella vulgaris* autóctona y no axénica, en un medio de cultivo compuesto principalmente de efluente cervecero. Del análisis del diseño central compuesto realizado, se desprende que la concentración de efluente afecta la concentración final de biomasa obtenida a todos los tiempos de incubación medidos. En este sentido, el valor óptimo de DQO en el medio de cultivo obtenido de análisis del diseño que maximiza la concentración de biomasa medida a 6, 13 y 20 días es de 18300 mg O₂/mL, que corresponde al valor máximo ensayado. Mientras que el pH óptimo resultó 6,5. En estas condiciones se maximiza el crecimiento de biomasa microalgal y simultáneamente se minimiza el crecimiento de bacterias acompañantes de la cepa no axénica. A partir de las curvas de crecimiento preliminares, se pudieron establecer períodos de incubación no superiores a los 6 días. Cabe destacar que, a pesar de la alta

concentración de carbono en el medio de cultivo, el crecimiento de esta cepa de *C. vulgaris* no se vio inhibida. Esta especie particular fue capaz de tolerar y desarrollarse con concentraciones de carbono en el medio no habían sido reportadas en bibliografía hasta el momento.

Las curvas de crecimiento pudieron ajustarse satisfactoriamente al modelo de Gompertz modificado, pudiendo estimar los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento, valor asintótico de la curva y duración de la fase de latencia. A partir de la caracterización del crecimiento de la microalga en este medio se pudo concluir que no es necesaria la iluminación ni la dilución con medio de mantenimiento para el crecimiento de la cepa de *C. vulgaris* en las condiciones ensayadas en el presente trabajo.

Las concentraciones finales de biomasa en los sistemas conteniendo efluente cervecero al menos triplicaron a la alcanzada por el sistema foto autotrófico. Se encontraron valores entre 30 y 45% de proteínas en base peso seco para los sistemas mixo- y heterotróficos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre los mismos. El mayor contenido de proteínas de aproximadamente 50% se obtuvo en el sistema control, autotrófico. El porcentaje de lípidos fue entre 20 y 30% bs aproximadamente en los sistemas mixo- y heterotróficos, mientras que los carbohidratos representaron entre 10 y 3 % aproximadamente. Respecto al contenido de pigmentos, se encontraron diferencias significativas entre los sistemas que contenían medio de mantenimiento respecto a los sistemas cuyo diluyente fue agua destilada.

El sistema heterotrófico pudo ser escalado satisfactoriamente, por un lado, en un biorreactor tanque agitado con burbujeo de aire y agitación mediante impulsor tipo hélice, y por otro lado en un Erlenmeyer de mayor capacidad con agitación orbital.

La microalga mostró crecimiento en ambos sistemas escalados, habiendo sido posible modelizar la curva de crecimiento mediante el modelo de Gompertz modificado. Los parámetros cinéticos del cultivo en el biorreactor tanque agitado no tuvieron diferencias significativas en la medición por densidad óptica, sin embargo, tanto el valor asintótico como la velocidad específica de crecimiento fueron significativamente superiores a los parámetros obtenidos con el sistema incubado en Erlenmeyer de 250 mL. En los sistemas escalados fue posible determinar la fase de latencia por ambos métodos de medición, arrojando en ambos casos un menor valor para el sistema en tanque agitado en comparación con el sistema en Erlenmeyer. Pudo observarse como en el tanque agitado, en las primeras horas de cultivo, se encuentra mayor número celular de menor diámetro, mientras que en el sistema en Erlenmeyer 5 L el número es menor pero el diámetro

celular es mayor. Las productividades obtenidas para los sistemas escalados fueron $6,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y $3,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para el tanque agitado y frasco Erlenmeyer, respectivamente, mientras que para el sistema en menor escala, fue de $6,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos entre el sistema en pequeña escala y el sistema escalado en el tanque agitado. De ambos sistemas escalados, se encontró que aquel en el reactor Erlenmeyer mostró un contenido de carbohidratos significativamente mayor y una tendencia a mayor porcentaje de lípidos y menor porcentaje de proteínas. Todos los sistemas heterotróficos mostraron desarrollo de cierto contenido de pigmentos. El sistema escalado incubado en el Erlenmeyer de 5 L desarrolló cantidades significativamente menores de clorofila *a* y carotenoides, que los sistemas de menor escala y escalado en reactor tanque agitado.

Para los sistemas escalados, se verificó que la demanda química de oxígeno se redujo durante la incubación de *C. vulgaris* desde un valor inicial de $18300 \text{ mg O}_2/\text{L}$ hasta $11675 \text{ mg O}_2/\text{L}$ para el sistema incubado en el biorreactor tanque agitado y $13325 \text{ mg O}_2/\text{L}$ para el sistema en el frasco Erlenmeyer de 5 L de capacidad.

La biomasa obtenida del escalado pudo ser utilizada como bioestimulante del crecimiento vegetal mostrando efectos similares a las auxinas en cuanto a la inducción de raíces en plantines de soja verde y en cotiledones de pepino. Por otro lado, la biomasa microalgal mostró poseer efecto parcialmente similar al de las giberelinas, en cuanto a la germinación de semillas de berro, mientras que el efecto de las citoquininas, en cuanto al aumento de masa de cotiledones de pepino, no fue observable. En general, tanto la ruptura sónica como hidrólisis enzimática de la biomasa microalgal, mejoran sus propiedades como bioestimulante de crecimiento vegetal.

Es posible concluir que la cepa de *C. vulgaris* autóctona del Río Chubut fue capaz de aprovechar el efluente cervecero como fuente de carbono de alta concentración para su crecimiento heterotrófico; convirtiéndolo así en biomasa microalgal con potencial utilización como bioestimulante para plantas. De este modo se aprovechan nutrientes del efluente, lo cual reduce su carga contaminante pero además la pérdida de nutrientes recirculándolos a la economía a través de procesos sustentables.

II.6. Bibliografía

- Ajala, S. O., & Alexander, M. L. (2020). Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 11(3), 311–326. <https://doi.org/10.1007/s40095-019-00333-0>
- Alam, Md. A., Wan, C., Guo, S.-L., Zhao, X.-Q., Huang, Z.-Y., Yang, Y.-L., Chang, J.-S., & Bai, F.-W. (2014). Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.021>
- APHA. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association.
- Argumedo Moix, M. C. (2018). *Influencia del mezclado en la producción de biomasa y composición bioquímica de Spirulina platensis LMPA-55*. <http://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/20.500.12272/3900>
- Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021). Unraveling metabolic alterations in *Chlorella vulgaris* cultivated on renewable sugars using time resolved multi-omics. *Science of The Total Environment*, 800, 149504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149504>
- Azizi, S., Bayat, B., Tayebati, H., Hashemi, A., & Shariati, F. P. (2020). Nitrate and phosphate removal from treated wastewater by *Chlorella vulgaris* under various light regimes within membrane flat plate photobioreactor. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, n/a(n/a), e13519. <https://doi.org/10.1002/ep.13519>
- Barrios-Córdova, A., Vaquera-Huerta, H., Romero-Padilla, J. M., Crossa, J., Burguete-Hernández, E., Barrios-Córdova, A., Vaquera-Huerta, H., Romero-Padilla, J. M., Crossa, J., & Burguete-Hernández, E. (2020). Estudio comparativo de técnicas de optimización multirespuesta en diseños experimentales. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 21(2). <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2020.21n2.016>
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research*, 32, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.017>
- Borowitzka, M. A., & Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press.
- Canelli, G., Murciano Martínez, P., Austin, S., Ambühl, M. E., Dionisi, F., Bolten, C. J., Carpine, R., Neutsch, L., & Mathys, A. (2021). Biochemical and Morphological Characterization of Heterotrophic *Cryptocodinium cohnii* and *Chlorella vulgaris* Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2226–2235. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05032>
- Casá, N. E., Lois-Milevicich, J., Alvarez, P., Mateucci, R., & de Escalada Pla, M. (2022). *Chlorella vulgaris* cultivation using ricotta cheese whey as substrate for biomass production. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02685-3>
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
-

- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., & Wu, Q. (2009). Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(5), 777–781. <https://doi.org/10.1002/jctb.2111>
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M. C., & Roupael, Y. (2018). Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01782>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aleman-Nava, G. S., Chandra, R., Garcia-Perez, J. S., Contreras-Angulo, J. R., Markou, G., Muylaert, K., Rittmann, B. E., & Parra-Saldivar, R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, 24, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.018>
- Dahiya, A., Todd, J. H., & McInnis, A. (2012). Wastewater Treatment Integrated with Algae Production for Biofuel. En R. Gordon & J. Seckbach (Eds.), *The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology* (pp. 447–466). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1_24
- Darpito, C., Shin, W.-S., Jeon, S., Lee, H., Nam, K., Kwon, J.-H., & Yang, J.-W. (2015). Cultivation of *Chlorella protothecoides* in anaerobically treated brewery wastewater for cost-effective biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(3), 523–530. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1292-4>
- Do, T. C. V., Tran, D. T., Le, T. G., & Nguyen, Q. T. (2020). Characterization of Endogenous Auxins and Gibberellins Produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under Phototrophic and Mixotrophic Cultivation Modes toward Applications in Microalgal Biorefinery and Crop Research. *Journal of Chemistry*, 2020, e4910621. <https://doi.org/10.1155/2020/4910621>
- Doran, P. (2012). *Bioprocess Engineering Principles* (2nd ed.). Academic Press.
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eliasson, L., & Areblad, K. (1984). Auxin effects on rooting in pea cuttings. *Physiologia Plantarum*, 61(2), 293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb05911.x>
- El-Sheekh, M. M., Bedaiwy, M. Y., Osman, M. E., & Ismail, M. M. (2014). Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Obliquus*. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*, 2(2), 20–28.
- El-Sheekh, M. M., & Fathy, A. A. (2009). Variation of Some Nutritional Constituents and Fatty Acid Profiles of *Chlorella vulgaris* Beijerinck Grown under Auto and Heterotrophic Conditions. *International Journal of Botany*. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijb/2009/153-159.pdf>
- Ende, S. S. W., & Noke, A. (2019). Heterotrophic microalgae production on food waste and by-products. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1565–1571. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1697-6>
- Endo, H., Nakajima, K., Chino, R., & Shirota, M. (1974). Growth Characteristics and Cellular Components of *Chlorella regularis*, Heterotrophic Fast Growing Strain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(1), 9–18. <https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861121>
-

- Ennis, C. J., Clarke, J., Neate, K., Cerejeira, J., & Tull, L. (2017). Hydrothermal Extraction of Microalgae Fatty Acid Influences Hydrochar Phytotoxicity. *Frontiers in Environmental Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2017.00047>
- Farooq, W., Lee, Y.-C., Ryu, B.-G., Kim, B.-H., Kim, H.-S., Choi, Y.-E., & Yang, J.-W. (2013). Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. Strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, 132, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.034>
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Ferreira, A. F., Tavares, M. L. A., Vladic, J., Vidović, S., Cvetkovic, D., Melkonyan, L., Avetisova, G., Goginyan, V., & Gouveia, L. (2019). Scenedesmus obliquus microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(5), 1169–1186. <https://doi.org/10.1002/bbb.2032>
- Gao, F., Yang, H.-L., Li, C., Peng, Y.-Y., Lu, M.-M., Jin, W.-H., Bao, J.-J., & Guo, Y.-M. (2019). Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 282, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011>
- Gaspar, Th., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crèvecoeur, M., Penel, CL., Greppin, H., & Dommès, J. (2003). Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(2), 85. <https://doi.org/10.1079/IVP2002393>
- Ge, S., Qiu, S., Tremblay, D., Viner, K., Champagne, P., & Jessop, P. G. (2018). Centrate wastewater treatment with *Chlorella vulgaris*: Simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production. *Chemical Engineering Journal*, 342, 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.058>
- Ghimire, B. K., Kim, S.-H., Yu, C.-Y., & Chung, I.-M. (2022). Biochemical and Physiological Changes during Early Adventitious Root Formation in *Chrysanthemum indicum* Linné Cuttings. *Plants*, 11(11), Art. 11. <https://doi.org/10.3390/plants11111440>
- González López, C. V., García, M. del C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>
- Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>
- Gupta, S., Pandey, R. A., & Pawar, S. B. (2017). Bioremediation of synthetic high-chemical oxygen demand wastewater using microalgal species *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioremediation Journal*, 21(1), 38–51. <https://doi.org/10.1080/10889868.2017.1282936>
- Hilhorst, H. W. M., & Karssen, C. M. (1992). Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 225–238. <https://doi.org/10.1007/BF00024561>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource Technology*, 135, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>
-

- Hong, Y., Xu, K., & Zhan, J. (2014). Growth relationships of a lipid-producing *Chlorella*-alga with common microalgae in laboratory co-cultures. *Microbiology*, 83(4), 366–375. <https://doi.org/10.1134/S0026261714040055>
- Ibrahim, I. A., & Elbaily, Z. I. (2020). Importance of chlorella and different applications. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 65(1), 16–34.
- Jin, H., Chuai, W., Li, K., Hou, G., Wu, M., Chen, J., Wang, H., Jia, J., Han, D., & Hu, Q. (2021). Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* for biomass production. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(10), 4138–4151. <https://doi.org/10.1002/bit.27890>
- Jing, H., & Strader, L. C. (2019). Interplay of Auxin and Cytokinin in Lateral Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>
- Jirásková, D., Pouličková, A., Novák, O., Sedláková, K., Hradecká, V., & Strnad, M. (2009). High-Throughput Screening Technology for Monitoring Phytohormone Production in Microalgae 1. *Journal of Phycology*, 45(1), 108–118. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00615.x>
- Kaur, A., Taggar, M. S., Kalia, A., & Singh, M. (2022). Nitrate-Induced Carbohydrate Accumulation in *Chlorella sorokiniana* and its Potential for Ethanol Production. *BioEnergy Research*, 15(1), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10292-2>
- Khasin, M., Cahoon, R. R., Nickerson, K. W., & Riekhof, W. R. (2018). Molecular machinery of auxin synthesis, secretion, and perception in the unicellular chlorophyte alga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. *PLOS ONE*, 13(12), e0205227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205227>
- Kim, B.-H., Ramanan, R., Kang, Z., Cho, D.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2016). *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. *Biomass and Bioenergy*, 85, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.12.026>
- Kong, W., Yang, S., Wang, H., Huo, H., Guo, B., Liu, N., Zhang, A., & Niu, S. (2020). Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02089-1>
- Kotrbaček, V., Doubek, J., & Doucha, J. (2015). The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: A review. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2173–2180. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0516-y>
- Kuo, C.-M., Chen, T.-Y., Lin, T.-H., Kao, C.-Y., Lai, J.-T., Chang, J.-S., & Lin, C.-S. (2015). Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, 194, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.026>
- Lee, J., Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2013). Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 131, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.130>
- Li, L., Chen, W., Wang, Y., Zhang, Y., & Chen, H. (2021). Effect of hydrodynamics on autoflocculation and gravity sedimentation of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102259. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102259>
-

- Liu, J., & Chen, F. (2016). Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects. En C. Posten & S. Feng Chen (Eds.), *Microalgae Biotechnology* (pp. 1–35). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2014_286
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.
- Malanga, G., & Puntarulo, S. (1995). Oxidative stress and antioxidant content in Chlorella vulgaris after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, *94*(4), 672–679. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00983.x>
- Marchão, L., da Silva, T. L., Gouveia, L., & Reis, A. (2018). Microalgae-mediated brewery wastewater treatment: Effect of dilution rate on nutrient removal rates, biomass biochemical composition, and cell physiology. *Journal of Applied Phycology*, *30*(3), 1583–1595. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1374-1>
- Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2010). Bioprocess scale-up: Quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *85*(9), 1184–1198. <https://doi.org/10.1002/jctb.2387>
- Masojídek, J., Ranglová, K., Rearte, T. A., Celis Plá, P. S. M., Torzillo, G., Benavides, A. M. S., Neori, A., Gómez, C., Álvarez-Gómez, F., Lukeš, M., Caporgno, M. P., Abdala, R., Miazek, K., Massocato, T. F., da Silva, J. C., Atzmüller, R., Al Mahrouqui, H., Estrella, F. S., & Figueroa, F. L. (2021). Changes in photosynthesis, growth and biomass composition in outdoor Chlorella g120 culture during the metabolic shift from heterotrophic to phototrophic cultivation regime. *Algal Research*, *56*, 102303. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102303>
- Michalak, I., Chojnacka, K., & Saeid, A. (2017). Plant Growth Biostimulants, Dietary Feed Supplements and Cosmetics Formulated with Supercritical CO₂ Algal Extracts. *Molecules*, *22*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/molecules22010066>
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, *155*(Supplement C), 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mohammad Mirzaie, M. A., Kalbasi, M., Mousavi, S. M., & Ghobadian, B. (2016). Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of Chlorella vulgaris under agricultural waste medium. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *46*(2), 150–156. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.995812>
- Montgomery, D. C. (2005). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa Wiley.
- Morillas-España, A., Ruiz-Nieto, Á., Lafarga, T., Ación, G., Arbib, Z., & González-López, C. V. (2022). Biostimulant Capacity of Chlorella and Chlamydomonium Species Produced Using Wastewater and Centrate. *Biology*, *11*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/biology11071086>
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by Chlorella vulgaris after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, *123*, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>
- Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Ación, F. G., & Gouveia, L. (2020). Biostimulant Potential of Scenedesmus obliquus Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, *25*(3), 664. <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>
-

- Nielsen, P. m., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nwoba, E. G., Mickan, B. S., & Moheimani, N. R. (2019). Chlorella sp. Growth under batch and fed-batch conditions with effluent recycling when treating the effluent of food waste anaerobic digestate. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3545–3556. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01878-7>
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., van Staden, J., & Lovász, C. (2012). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed Chlorella minutissima cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9711-2>
- Papapolymerou, G., Gougoulias, N., Spiliotis, X., Karayannis, V., Kantas, D., Papadopoulos, S., Kokkalis, A., & Ntoufas, L. (2014). Effect of different concentrations of macronutrients on the growth rate and cultivation of algae specie Chlorella vulgaris. *Analele Universității Din Craiova - Biologie, Horticultura, Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului*, 19, 557–562.
- Peng, Y.-Y., Gao, F., Hang, W.-J. W., Yang, H.-L., Jin, W.-H., & Li, C. (2019). Effects of organic matters in domestic wastewater on lipid/carbohydrate production and nutrient removal of Chlorella vulgaris cultivated under mixotrophic growth conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(11), 3578–3584. <https://doi.org/10.1002/jctb.6161>
- Plaza, B. M., Gómez-Serrano, C., Acién-Fernández, F. G., & Jimenez-Becker, S. (2018). Effect of microalgae hydrolysate foliar application (Arthrospira platensis and Scenedesmus sp.) on Petunia x hybrida growth. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2359–2365. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1427-0>
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y., & Dussadee, N. (2016). Cultivation of Green Microalga, Chlorella vulgaris for Biogas Purification. *International Journal of New Technology and Research*, 2(3), 263569.
- Ramos Tercero, E. A., Sforza, E., Morandini, M., & Bertucco, A. (2014). Cultivation of Chlorella protothecoides with Urban Wastewater in Continuous Photobioreactor: Biomass Productivity and Nutrient Removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1470–1485. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0629-9>
- Ranglová, K., Lakatos, G. E., Câmara Manoel, J. A., Grivalský, T., Suárez Estrella, F., Acién Fernández, F. G., Molnár, Z., Ördög, V., & Masojídek, J. (2021). Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 Chlorella strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. *Algal Research*, 53, 102136. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102136>
- Raposo, M. F. de J., Oliveira, S. E., Castro, P. M., Bandarra, N. M., & Morais, R. M. (2010). On the Utilization of Microalgae for Brewery Effluent Treatment and Possible Applications of the Produced Biomass. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(3), 285–292. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00433.x>
- Rearte, T. A., Vélez, C. G., Beligni, M. V., Figueroa, F. L., Gómez, P. I., Flaig, D., & de Iorio, A. F. (2018). Biological characterization of a strain of Golenkinia (Chlorophyceae) with high oil and carotenoid content induced by increased salinity. *Algal Research*, 33, 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.014>
-

- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Rodrigues-Sousa, A. E., Nunes, I. V. O., Muniz-Junior, A. B., Carvalho, J. C. M., Mejia-da-Silva, L. C., & Matsudo, M. C. (2021). Nitrogen supplementation for the production of *Chlorella vulgaris* biomass in secondary effluent from dairy industry. *Biochemical Engineering Journal*, *165*, 107818. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107818>
- Romero García, J. M., Ación Fernández, F. G., & Fernández Sevilla, J. M. (2012). Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, *112*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*, *9*(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Rudnykh, S. I., & López-Ríos, V. I. (2018). ELECCIÓN DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA DISEÑOS ÓPTIMOS BAJO RESTRICCIONES. *Revista EIA*, *15*(30), 13–24.
- Rychter, A. M., & Mikulska, M. (1990). The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. *Physiologia Plantarum*, *79*(4), 663–667. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb00041.x>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Salomón, R., Albarracín, I., & Pío, G. (2005). *Sensibilidad de Chlorella vulgaris y Scenedesmus quadricauda a la Cipermetrina. Fase preliminar*. Servicio de Toxicología del Sanatorio de Niños. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Sensibilidad+de+Chlorella+vulgaris+y+Scenedesmus+quadricauda+a+la+Cipermetrina.+Fase+preliminar&author=Ruth+Salom%C3%B3n&publication_year=2005
- Schneegurt, M. A., Sherman, D. M., Nayar, S., & Sherman, L. A. (1994). Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142. *Journal of Bacteriology*, *176*(6), 1586–1597. <https://doi.org/10.1128/jb.176.6.1586-1597.1994>
- Shen, X.-F., Qin, Q.-W., Yan, S.-K., Huang, J.-L., Liu, K., & Zhou, S.-B. (2019). Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, *31*(3), 1589–1596. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01765-1>
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, *35*(2), 171–205.
- Stirk, W. A., Ördög, V., Novák, O., Rolčík, J., Strnad, M., Bálint, P., & van Staden, J. (2013). Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains1. *Journal of Phycology*, *49*(3), 459–467. <https://doi.org/10.1111/jpy.12061>
- Veloso, V., Reis, A., Gouveia, L., Fernandes, H. L., Empis, J. A., & Novais, J. M. (1991). Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology*, *38*(2), 115–119. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90141-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90141-6)
-

- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. In Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang, Q., Yu, Z., & Wei, D. (2020). High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* through the bioconversion of high ammonium in wastewater. *Bioresource Technology*, 313, 123499. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123499>
- Wang, Z., Zhou, R., Tang, Y., Wang, Z., Feng, B., & Li, Y. (2019). The growth and lutein accumulation in heterotrophic *Chlorella protothecoides* provoked by waste *Monascus* fermentation broth feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21), 8863–8874. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10150-4>
- Wegmann, K., & Metzner, H. (1971). Synchronization of *Dunaliella* cultures. *Archiv Für Mikrobiologie*, 78(4), 360–367. <https://doi.org/10.1007/BF00412276>
- Xu, S., Hoshan, L., Jiang, R., Gupta, B., Brodean, E., O'Neill, K., Seamans, T. C., Bowers, J., & Chen, H. (2017). A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion. *Biotechnology Progress*, 33(4), 1146–1159. <https://doi.org/10.1002/btpr.2489>
- Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, M. R., Omar, R., & Siajam, S. I. (2017). Subcritical Water Technology for Extraction of Phenolic Compounds from *Chlorella* sp. Microalgae and Assessment on Its Antioxidant Activity. *Molecules*, 22(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/molecules22071105>
- Zhang, Y.-M., Chen, H., He, C.-L., & Wang, Q. (2013). Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLOS ONE*, 8(7), e69225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069225>
- Zhao, Z. R., Wu, Z. L., Huang, G. Q., & Li, G. R. (1992). An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11(4), 209. <https://doi.org/10.1007/BF02115479>
- Zhu, S., Feng, S., Xu, Z., Qin, L., Shang, C., Feng, P., Wang, Z., & Yuan, Z. (2019). Cultivation of *Chlorella vulgaris* on unsterilized dairy-derived liquid digestate for simultaneous biofuels feedstock production and pollutant removal. *Bioresource Technology*, 285, 121353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121353>
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014a). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>
- Zhu, S., Wang, Y., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014b). Enhanced Accumulation of Carbohydrate and Starch in *Chlorella zofingiensis* Induced by Nitrogen Starvation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(7), 2435–2445. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1183-9>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Riet, K. van 't. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.
-

CAPÍTULO III: *SCENEDESMUS QUADRICAUDA*

III.1. Introducción

Scenedesmus es una de las microalgas que más se ha estudiado en los últimos años para aplicaciones de tratamiento de efluentes y para la producción de biocombustibles. Se caracterizan por tener un arreglo en número par en agregados que se denominan cenocitos, de a 2, 4, 8 y hasta 16 células, debido a su posibilidad de realizar hasta cuatro divisiones sucesivas durante la reproducción asexual. Las especies del género *Scenedesmus* tienen propiedades bastante homogéneas, poseen paredes multicapa y una capa de esporopolenina que rodea todo el cenocito (Akgül et al., 2017; Borowitzka & Borowitzka, 1988; Trainor, 1996). Pueden encontrarse como células individuales o múltiplos de dos. Se han reportado tamaños de cenocitos de dos células de entre 6,2 y 8,3 μm . La morfología de *Scenedesmus* cambia en función de los nutrientes disponibles. Se ha encontrado que ante deficiencia de nitrógeno, cambia su forma predominante de cenocitos de dos células a cenocitos de cuatro, seis u ocho con antenas, teniendo el número de células por cenocito y largo de las antenas alguna correlación con la deficiencia de nitrógeno en el medio y acumulación de energía en compuestos ricos en carbono (Gour et al., 2016; Pancha et al., 2014).

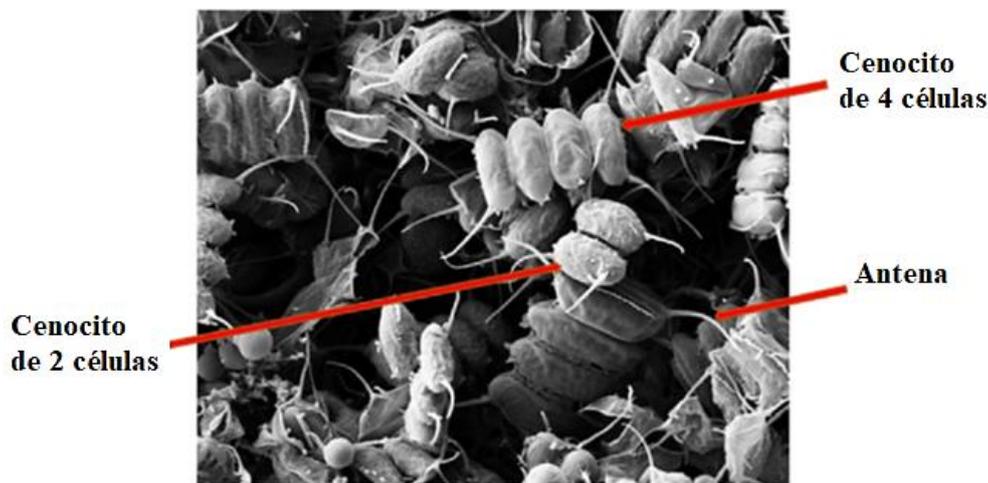


Figura III - 1: Morfología de *Scenedesmus* sp. UKM9, adaptado de Mohd Udaiyappan et al. (2021)

III.1.1. Nutrientes

Scenedesmus puede asimilar nitrógeno en forma de iones nitrato y amonio, aunque es capaz de romper urea con ayuda de la molécula de ATP. Esto permite suplir los medios de cultivo de gran

escala con urea, lo cual representa una ventaja de costo y facilidad de manejo. La adaptación al uso de urea como fuente de N, cuando el inóculo proviene de crecimiento con nitrato, toma aproximadamente un día, cuando la intensidad de luz es suficiente; caso contrario la adaptación puede no llegar a llevarse a cabo. Se ha observado que el crecimiento mejora si la fuente suministrada es amonio, sin embargo, al llegar a una fase exponencial el crecimiento puede inhibirse por el detrimento del pH producido por la liberación de protones durante el consumo del amonio. Por otro lado, se ha visto una tendencia de los cultivos de *Scenedesmus* a ser atacados por bacterias si el suplemento de N no es en forma de iones (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Shashirekha et al., 2016; Xin et al., 2010). La deficiencia de nitrógeno induce un cambio en la velocidad de crecimiento y la composición de la biomasa. Ante la falta de nitrógeno, la velocidad máxima de crecimiento disminuye, así como el porcentaje del contenido de proteínas, por otro lado, aumenta el porcentaje de contenido de lípidos en algunas especies, o el porcentaje de carbohidratos en otras. Así mismo, puede sufrir cambios en su morfología según el nivel de deficiencia de nitrógeno (Anand & Arumugam, 2015; Pancha et al., 2014; Richmond, 2008).

La cantidad de fósforo recomendada se encuentra en relación al nitrógeno en el rango 6,8 - 10 N/P. Las algas verdes requieren mayores contenidos de nitrógeno y fósforo que otros tipos (Abinandan et al., 2015). Se ha reportado que para *S. dimorphus* el valor óptimo de la fuente de fósforo $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ fue de 4 mg/L. La deficiencia de fósforo reduce la actividad enzimática y la síntesis de ATP; y concentraciones por encima del óptimo reducen el crecimiento celular (Zhang et al., 2021).

En modo de crecimiento fotoautotrófico, *Scenedesmus* utiliza mejor el carbono en forma de bicarbonato de sodio, por lo cual el pH óptimo de cultivo suele ser ligeramente alcalino. Sin embargo, a estos valores de pH se ha observado que el nitrógeno debe estar como nitrato para mejorar el rendimiento. Los mayores rendimientos utilizando urea se han obtenido con valores de pH entre 6 y 7 (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Zhao et al. (2012) observaron, contrariamente, que el crecimiento fotoautotrófico se ve favorecido por el burbujeo de dióxido de carbono y desfavorecido por la presencia de bicarbonato en el medio de cultivo. Song et al. (2021) encontraron que en régimen mixotrófico con acetato como fuente de carbono, la mayor concentración final de biomasa de *S. obliquus* se alcanzó con urea como fuente de nitrógeno; sin embargo, el mayor porcentaje de lípidos se alcanzó con amonio.

Los macronutrientes encontrados en las cenizas de la biomasa de *S. obliquus* fueron K, Na, Mg, Ca, P, S, Fe (Borowitzka & Borowitzka, 1988). El sodio, magnesio y potasio influyen en la capacidad de *Scenedesmus* de asimilar el fosfato del medio (Shashirekha et al., 2016). La presencia de Na afecta poco la velocidad de crecimiento de *Scenedesmus*, a distintas concentraciones dependiendo de la especie. (Anand et al., 2019)

El hierro es un microelemento esencial con un importante papel en el metabolismo celular de las microalgas. Interviene en los procesos de fotosíntesis, respiración, fijación del nitrógeno y síntesis de ADN; su deficiencia puede llevar a la degradación de los pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a*. Cultivos ricos en hierro muestran parámetros asociados a la absorción de energía luminosa superiores. Así mismo, la disponibilidad de hierro afecta positivamente la asimilación del nitrógeno en *S. quadricauda*; sin embargo, al mismo tiempo disminuye la fracción de proteínas desarrollada y favorece la generación de lípidos y carbohidratos (Richmond, 2008; Rueler & Ades, 1987).

III.1.2. Modos de cultivo

Scenedesmus es capaz de crecer en los tres tipos de regímenes conocidos para las microalgas: fotoautotrófico, mixotrófico y heterotrófico. En régimen heterotrófico, tiene tendencia a tolerar mejor y consumir más rápidamente carbono cuando éste se encuentra en baja concentración, o su relación de concentración respecto a nitrógeno y fosfato es baja. El crecimiento en presencia de una fuente orgánica de carbono se ve especialmente estimulado en deficiencia o ausencia de luz (Shashirekha et al., 2016). Sin embargo, se ha reportado que se alcanzan menores concentraciones finales sin iluminación respecto a un régimen fotoautotrófico (Di Caprio et al., 2015), o que un régimen mixotrófico, donde éste alcanzó más del doble de concentración final de *S. obliquus* que durante una incubación heterotrófica (El-Sheekh et al., 2014). Con una tendencia opuesta, *S. obliquus* duplicó la concentración de biomasa final en régimen heterotrófico respecto al fotoautotrófico y la igualó respecto al mixotrófico. Rai & Gupta (2017) reportaron bajo crecimiento de *S. abundans* en régimen heterotrófico, obteniendo para el mismo un orden de magnitud menor en la concentración final de biomasa respecto al valor para el régimen fotoautotrófico. Kamalanathan et al. (2017) reportaron que la biomasa final alcanzada de *Scenedesmus* sp. con un régimen heterotrófico, en base seca, duplicó al valor final del régimen fotoautotrófico. Así mismo, el sistema con régimen mixto heterotrófico seguido de mixotrófico, logró triplicar el valor alcanzado con el sistema fotoautotrófico.

La glucosa favorece el crecimiento mixo- y heterotrófico debido a su metabolización sencilla, mientras que otros azúcares requieren de mayor número de pasos metabólicos para su aprovechamiento; mostrando correlación entre la concentración de glucosa alimentada y la cantidad de biomasa obtenida (Gim et al., 2014). Song et al. (2021) encontraron una correlación positiva entre la concentración de acetato en un régimen mixotrófico para *S. obliquus* en medio de mantenimiento suplementado.

En algunos trabajos de crecimiento en régimen mixotrófico se reporta una correlación entre la biomasa obtenida y la longitud de la etapa de iluminación del fotoperíodo (Yaakob et al., 2019). Así mismo, este régimen de cultivo puede aumentar la productividad de lípidos, al permitir mayor concentración de biomasa y con mayor porcentaje de lípidos (Gim et al., 2014). Los regímenes mixo- y heterotróficos pueden promover la acumulación de carbohidratos, en algunos casos, en detrimento de los lípidos. Ambas biomoléculas son reservas de energía de las microalgas, que se acumulan dentro de la célula, pudiéndose observar un aumento de su tamaño (Kamalanathan et al., 2018).

Hodaifa et al. (2010) reportaron que, para *S. obliquus* cultivada en medio con efluente de prensado de aceitunas, la temperatura que optimizó la velocidad específica de crecimiento fue aproximadamente 30°C; para menores temperaturas disminuye levemente mientras que para temperaturas superiores cae abruptamente, de modo que el valor de μ_{\max} a 35°C es similar al valor obtenido a 20°C. Sin embargo, la productividad fue máxima a $\approx 20^\circ\text{C}$, cayendo a la mitad a temperaturas de 15, 25 y 30 °C. Esto podría deberse a la influencia de la temperatura en la solubilidad del dióxido de carbono. Yaakob et al. (2019) encontraron que tanto la temperatura como el fotoperíodo influyen en la producción de biomasa en modo mixotrófico utilizando un efluente de la industria frigorífica avícola, y que la interacción entre ambas variables tiene un efecto sinérgico. Respecto al contenido de carbohidratos, ambas variables también presentaron una interacción sinérgica, mientras que no influyeron de manera significativa sobre el contenido de proteínas o de lípidos.

III.1.3. Composición de la biomasa

La biomasa de *Scenedesmus* obtenida de cultivos abiertos en modo fotoautotrófico presentó un contenido de proteínas entre 50 y 56%, con un perfil de aminoácidos de alto valor nutricional (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Cuando el modo de cultivo cambia a mixo- y heterotrófico, el porcentaje puede disminuir al rango 28 – 50 % (El-Sheekh et al., 2014). Exponer al cultivo de

Scenedesmus a deficiencia de nitrógeno puede disminuir el contenido de proteínas hasta 16,9%; debido posiblemente a la canibalización de los compuesto nitrogenados para la utilización del nitrógeno en rutas metabólicas de mantenimiento (Pancha et al., 2014). Porcentajes reportados de proteínas en *S. obliquus*, incubada con efluente cervecero a diferentes tiempos de residencia en reactores tipo columnas de burbujeo, fueron entre 29 y 40% en valor medio (Ferreira et al., 2017, 2019).

La pared celular puede alcanzar entre el 5 y 6% del peso seco total de la biomasa. Sus principales constituyentes son celulosa, hemicelulosa A y B, pectina, proteínas y lípidos en menores concentraciones (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Se encontró para *S. obliquus* concentraciones de carbohidratos totales entre 12 – 23 % para incubación mixo- y heterotrófica en medio de mantenimiento con molasas agregadas (El-Sheekh et al., 2014). Para la misma especie, incubada en efluente cervecero y medio Bristol en un fotobiorreactor tanque de burbujeo, se obtuvieron carbohidratos por el 30% del peso total de biomasa en base seca (Ferreira et al., 2019). Así mismo, Gupta et al. (2017) reportaron 15,4 a 20,0 % de carbohidratos en biomasa de *S. obliquus* incubada mixotróficamente en efluentes clarificados previamente por floculación.

Ante la deficiencia de nitrógeno, los lípidos predominantes en la composición celular pasan de ser parcialmente polares conteniendo nitrógeno, a lípidos no polares como triacilgliceroles (Richmond, 2008). Respecto a la temperatura, a menores valores aumenta el porcentaje de ácidos grasos insaturados (Hodaifa et al., 2010). Altas intensidades de iluminación favorecen la acumulación de lípidos. Debido a la disponibilidad de fotones, la célula no necesita acumular tanta clorofila a y pigmentos accesorios en las membranas tilacoides, permitiendo la mayor acumulación de lípidos en las mismas (Gim et al., 2014). Gour et al. (2016) reportaron porcentajes de lípidos para 21 cepas autóctonas aisladas de *S. quadricauda* de entre 4,1 y 15%. Lutz et al. (2016) reportaron para *S. dimorphus* porcentajes de lípidos en la biomasa de 41 y 53%, cuando se la incubó en BG11 y en efluente cervecero, respectivamente. Existe gran variabilidad en los perfiles de ácidos grasos de las microalgas, principalmente debido a la influencia de numerosos factores que afectan el metabolismo y, por ende, el desarrollo de la distribución molecular, como la iluminación, temperatura, pH y nutrientes disponibles. Esto representa una posibilidad de optimizar la producción de ciertos ácidos grasos de valor nutricional o de aplicación en biodiesel, sin embargo, las condiciones de cultivo requeridas para esta optimización va en detrimento de la velocidad de crecimiento de la biomasa (Shen et al., 2018; Yaakob et al., 2019).

Los contenidos de pigmentos reportados por Hodaifa et al. (2010) fueron entre 0,04 - 0,4 % de clorofila y 0,04 - 0,2 % de carotenoides en cultivo mixotrófico de *S. obliquus* en medio conteniendo efluente de procesamiento de olivas; mientras que para el cultivo fotoautotrófico fueron de 3 - 4 % y 0,2 - 1 %, respectivamente. Halfhide et al. (2014) reportaron valores totales entre 0,8 y 1 % para *S. quadricauda* cultivada en modo mixotrófico en sistemas axénico y no-axénico, respectivamente. Sarat Chandra et al. (2016) encontraron valores de clorofila 2,2 - 3,1 % y de carotenoides 0,63 - 0,86 % en biomasa de *S. obtusus* cultivada fotoautotróficamente en medio de mantenimiento a distintos volúmenes de inyección de dióxido de carbono.

Se ha reportado la influencia del fotoperíodo y de la intensidad lumínica en la proporción de macromoléculas en biomasa de *S. abundans*. El mayor contenido de lípidos, 48%, se encontró a la intensidad lumínica de $40,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras que la concentración fue menor cuando se expuso el cultivo a 27 y $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Al comparar distintos fotoperíodos, el mayor contenido de lípidos se obtuvo en un régimen 16:8 (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad), mientras que los regímenes 24:0 y 8:16 mostraron menor producción de biomasa y con menor contenido lipídico (Rai & Gupta, 2017).

III.1.4. Productividad

Scenedesmus es una de las especies aptas para el cultivo en estanques abiertos u *open-ponds* (Rocha et al., 2019). Algunas productividades de cultivos en gran escala en piletas abiertas se encuentran entre 11 y $30 \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ (Borowitzka & Borowitzka, 1988), para *Scenedesmus* sp. se ha reportado $9,4 \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ (Raeisossadati et al., 2020). Mientras que para un cultivo de *S. acuminatus* en biorreactor tanque agitado de 300 L operativos con aireación, se han encontrado productividades en el rango de 1,03 a $1,21 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, en régimen heterotrófico y utilizando medio de mantenimiento Endo modificado (Jin et al., 2021). En escalas medias de planta piloto, se ha reportado una productividad de $70,9 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de biomasa de *S. dimorphus* incubada con efluente secundario doméstico en un biorreactor de 100 L operativos en modo continuo, con aireación y régimen mixotrófico (Zhang et al., 2015).

A escala laboratorio se encuentran valores muy variables, dependiendo el medio de cultivo y modo trófico. *Scenedesmus* sp. incubada en efluente cervecero (DQO no reportada) mostró una productividad de alrededor de $65 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Yirgu et al., 2021). *S. quadricauda* incubada en efluente de acuicultura con iluminación continua, mostró productividades de 4,8 y $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para sistemas axénico y no-axénico, respectivamente (Halfhide et al., 2014). Para *S. obliquus*

axénica incubada en BG11, suplementado con acetato para los modos mixo- y heterotrófico, se reportaron productividades de biomasa de 92,7 a 366 mg.L⁻¹.d⁻¹ con nitrato, y de 89,4 a 208 mg.L⁻¹.d⁻¹ con deficiencia de nitrato (Shen et al., 2018). Una cepa autóctona de *Scenedesmus* sp. de Lago Ziway, Etiopía; mostró productividades diarias a lo largo de 18 días de incubación en efluente cervecero previamente digerido de entre 20 y 64 mg.L⁻¹.d⁻¹ (Yirgu et al., 2021)

III.1.5. Aplicaciones principales

Existen numerosos reportes de estudios de cepas del género *Scenedesmus* para la producción de lípidos para biodiesel, con resultados prometedores debido a los perfiles de ácidos grasos obtenidos, que cumplen con los distintos estándares del biocombustible. Entre ellos se encuentran: *S. obliquus* en medio de mantenimiento (con y sin suplemento de acetato), con y sin deficiencia de nitrógeno; *S. dimorphus* en medio de mantenimiento BG11 y en efluente cervecero; *S. dimorphus* incubada con efluente secundario doméstico en un biorreactor de 100 L operativos en modo continuo; *S. obtusus* en medio de mantenimiento con suplementación de dióxido de carbono en fotoautotrofia; *Scenedesmus* sp. incubada en efluente municipal diluido con medio BG11, en modo mixotrófico con un fotoperíodo de 18:6 h; una cepa autóctona de *S. obliquus* incubada en medio BG11 con tres fuentes distintas de carbono (glucosa, sacarosa y acetato de sodio) y los tres regímenes de cultivo conocidos (fotoperíodo 12:12 h) (Lutzu et al., 2016; Sarat Chandra et al., 2016; Shen et al., 2018; Song et al., 2021; Tripathi et al., 2019; Zhang et al., 2015). Los ácidos grasos que se requieren mayormente en la composición para biodiesel son los de largo de cadena C16 a C18, sin embargo, el porcentaje requerido de ácido linolénico (C18:3) debe ser menor a 12% como requisito para la aplicación. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados debe ser el menor posible debido a que afectan la estabilidad oxidativa del biodiesel; siendo un requisito que el contenido de moléculas con 4 o más insaturaciones no superen el 1% de la composición total. Es posible lograr perfiles de ácidos grasos de estas características con cepas de *Scenedesmus* (Rai & Gupta, 2017).

Las microalgas se han estudiado, y algunas ya tienen procesos comerciales, para aplicaciones nutricionales. Los ácidos grasos poliinsaturados son lípidos bioactivos esenciales para la salud humana, dado que no se pueden sintetizar completamente y deben ser ingeridos. Los principales representantes de los omega-3 y omega-6 son el ácido α -linolénico y el ácido linoleico, respectivamente (Nicodemou et al., 2022). Las microalgas han demostrado ser un buen alimento en la industria de la acuicultura, debido a su mejor digestibilidad y absorción para los peces,

mejorando la producción de carne diaria y la tasa de supervivencia (Yaakob et al., 2019). El perfil de ácidos grasos óptimo para la nutrición debe ser rico en ácidos grasos poliinsaturados, mientras que para aplicación como biodiesel, el mismo debe componerse en su mayoría de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Rai & Gupta, 2017).

Acoplado al estudio de la aplicación de biodiesel de microalgas, en varios casos también se ha investigado el tratamiento de los efluentes con las microalgas. Los nutrientes contenidos en los efluentes que cuyo consumo o remoción se estudia con mayor énfasis son el nitrógeno y el fósforo. La eficiencia del consumo de estos elementos de un efluente depende de la relación entre sus concentraciones, cuyo óptimo varía en 8 y 45 g N/ g P dependiendo la especie de microalga. En la mayoría de los casos el fósforo se encuentra en defecto, consumiéndose prácticamente en su totalidad (Cuellar-Bermudez et al., 2017). Se han reportado estudios de la remoción de metales de efluentes por *Scenedesmus* sp., así como de algunos fungicidas y herbicidas remanentes en aguas mediante el uso de *S. obliquus* y *quadricauda* (Dahiya et al., 2012), con porcentajes de remoción de Cr, Cu, Pb y Zn de entre 55 – 98%; 70 – 97 %; 50 – 98 % y 70 – 98% respectivamente (Ajayan et al., 2015). Se reportó para un cultivo en gran escala de *S. obliquus* (380 y 530 L) en efluente municipal pretratado, una eficiencia de remoción de nitrógeno superior al 65% (Cuellar-Bermudez et al., 2017). En escalas de laboratorio, se encontró que *S. obliquus* en efluente cervecero sintético de 3635 mg O₂/L de DQO, fue capaz de remover la carga de carbono entre 10 y 70% al cabo de 14 días de incubación en distintas condiciones de aireación e iluminación (Mata et al., 2012). En efluente de la industria de la acuicultura, *S. quadricauda* fue capaz de remover el 99% del contenido de nitrato presente en el medio (Halfhide et al., 2014).

Se ha evaluado el potencial de especies de *Scenedesmus* como bioestimulantes. Para *Scenedesmus* sp. cultivada con efluente de industria porcina, se encontró que su biomasa tratada por ruptura de alta presión tuvo efectos positivos en la germinación de semillas de berro (Navarro-López, Cerón-García, et al., 2020). La biomasa de *S. obliquus* incubada con efluente cervecero, y tratada por hidrólisis y/o ruptura sónica, mostró efectos positivos similares a las fitohormonas auxinas, mejorando el desarrollo de raíces en semillas de soja y cotiledones de pepino (Navarro-López et al., 2020a).

Existen trabajos reportados de especies de *Scenedesmus* incubadas con efluentes de la industria cervecera como *S. obliquus* o *Scenedesmus* sp (Ferreira et al., 2017; Mata et al., 2012; Navarro-López et al., 2020b). Por otro lado, se ha ensayado el cultivo de *S. quadricauda* en efluente de la

industria de porcinos, efluente rico en almidón, efluente de actividades farmacéuticas y efluentes del tratamiento de líquidos de alcantarillado o de cloacas (Gantar et al., 1991; Vanerkar et al., 2015; Wong et al., 2015; Zhao et al., 2012). Si bien los estudios existentes comprueban la capacidad de las especies de *Scenedesmus* de crecer aprovechando nutrientes de los efluentes, las mismas pueden presentar cierto grado de inhibición por el contenido de carbono: Apandi et al. (2019) ha reportado inhibición del crecimiento de *Scenedesmus* sp. al utilizar un efluente sin diluir de DQO promedio 3507 mg O₂/L, observando que el crecimiento fue superior al diluir el mismo; Ajayan et al. (2015) reportaron un comportamiento similar, obteniendo los mejores parámetros de crecimiento de *Scenedesmus* sp. en efluente de curtiembre, de DQO 872 mg O₂/L, diluído al 50%. Existen numerosos estudios de especies de *Scenedesmus* incubadas en medios conteniendo efluentes bajo distintos regímenes de cultivos, sin embargo, no se han encontrado trabajos reportados que utilicen efluentes cerveceros como sustrato para el crecimiento de *S. quadricauda* no axénica.

III.2. Objetivos

Los objetivos planteados para el trabajo con *Scenedesmus quadricauda* fueron los siguientes:

- Determinar los valores óptimos de demanda química de oxígeno y pH del medio de cultivo que maximizan la concentración final de biomasa;
- Con los valores de pH inicial y demanda química de oxígeno determinados; determinar qué componentes del medio de mantenimiento maximizan la concentración final de biomasa;
- Caracterizar el crecimiento de la microalga construyendo la curva y determinando sus parámetros cinéticos;
- Caracterizar la composición bioquímica de la biomasa obtenida;
- Evaluar el escalado en biorreactor del tipo tanque agitado y en frasco Erlenmeyer con agitación orbital.
- Evaluar la potencial aplicación nutricional de los lípidos obtenidos mediante un perfil de ácidos grasos.

III.3. Materiales y métodos

III.3.1. Microalga

Se utilizó una cepa de *Scenedesmus quadricauda*, proveniente del lago Nahuel Huapi (Salomón et al., 2005); gentilmente donada por el Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. El número de identificación del cepario de origen es LMPA41.

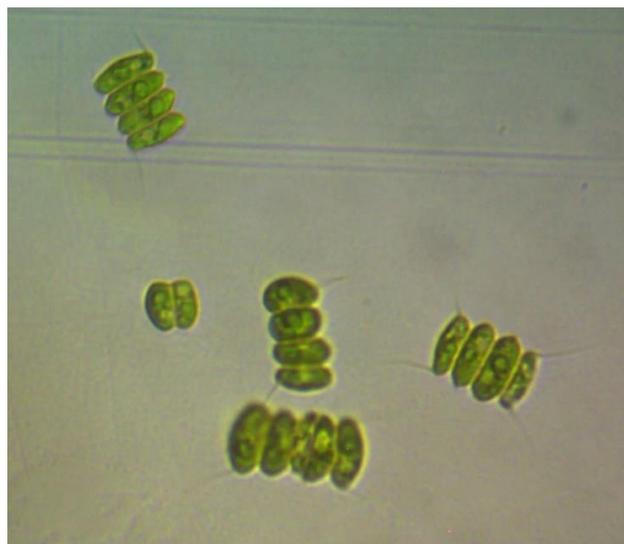


Figura III - 2: imagen microscópica de *S. quadricauda*, tomada de un inóculo conservado en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de UTN-FRBA, en aumento 100x.

III.3.1.1. Mantenimiento

El mantenimiento de la cepa de microalga para el presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires (UTN-FRBA).

Se mantuvieron los cultivos de *Scenedesmus quadricauda* en medio de mantenimiento BG-11 (Stanier et al., 1971). La preparación del medio de mantenimiento y propagación de la microalga se llevó a cabo según se describe en el Capítulo II.3.1.1. Mantenimiento

III.3.2. Efluente cervecero

El efluente cervecero utilizado para este trabajo, proviene de la planta de producción de la cerveza artesanal “Juguetes Perdidos”, ubicada en Caseros, en la provincia de Buenos Aires. Se trata del

líquido remante en la cañería de transporte del mosto hervido al fermentador, recolectado por la purga.

La demanda química de oxígeno y otras características fisicoquímicas del efluente, junto a los métodos analíticos utilizados para su determinación, se encuentran detalladas en el Capítulo II.3.2.

Efluente cervecero

III.3.3. Determinación de las condiciones de cultivo

III.3.3.1. Diseño experimental

Para evaluar los efectos de la concentración de efluente y el valor de pH sobre el crecimiento de la microalga medido por densidad óptica y sobre el crecimiento de los microorganismos del consorcio de la cepa no axénica; se generó un diseño experimental central compuesto con dos variables independientes en cinco niveles, y el punto central del diseño por triplicado. El diseño y los análisis de los resultados, se llevó a cabo con el software *Statgraphics Centurion XV* (V 2.15.06, 2007, USA).

Los rangos de valores de demanda química de oxígeno y de pH a evaluar fueron estimados mediante ensayos preliminares, cuyos resultados no se muestran en el presente trabajo. Las variables de respuesta, o variables dependientes definidas para el análisis fueron, el aumento de la densidad óptica medida a 680 nm respecto al valor del día 0 (ΔDO); y el aumento en el valor decimal del recuento de unidades formadoras de colonia de microorganismos aeróbicos totales, en relación al valor del día 0 (ΔUFC). Se consideró día 0 a la medición realizada inmediatamente luego de la inoculación de los sistemas.

Las variables dependientes se ajustaron por regresión lineal a un polinomio de segundo grado (Ecuación II - 1) por un procedimiento de regresión múltiple, que permitió evaluar los efectos lineales, cuadráticos e interacción de las variables independientes (Apartado II.3.3.1. Diseño experimental).

El análisis de significancia estadística fue realizado por ANOVA seguido de un test de Tukey para un valor de $\alpha = 0,95$; para determinar diferencias significativas. Para determinar la bondad de los ajustes, se consideran satisfactorios aquellos modelos que presentaron valores de R^2_{adj} igual o mayores a 0,95 y valores de Durbin – Watson (DW) mayores a 1. La optimización múltiple de las variables dependientes se realizó mediante la función deseabilidad. Para el ajuste de modelos no

lineales y la optimización se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XV* (Apartado II.3.3.1. Diseño experimental).

III.3.3.2. Preparación de los sistemas

Los sistemas del diseño experimental se prepararon según los valores de pH y DQO indicados en la Tabla III - 1 . La dilución del efluente cervecero se realizó con medio de mantenimiento BG-11; y el pH se ajustó con soluciones de NaOH 1M o HCl 1N según fuera necesario.

Tabla III - 1: Diseño central compuesto con dos variables independientes, pH y DQO, en cinco niveles con el punto central triplicado. Entre paréntesis se muestran los valores codificados según el diseño.

DQO del sistema	pH inicial
3075 (0)	7,2 (0)
3075 (0)	7,2 (0)
3075 (0)	7,2 (0)
3075 (0)	6,5 (-2)
3075 (0)	7,9 (+2)
1650 (-1)	6,8 (-1)
1650 (-1)	7,5 (+1)
4500 (+1)	6,8 (-1)
4500 (+1)	7,5 (-1)
150 (-2)	7,2 (0)
6000 (+2)	7,2 (0)

Se utilizaron 30 mL de volumen de líquido en frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidad. Los frascos y su contenido fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C. Se inocularon los sistemas con 3 mL de suspensión de *Scenedesmus quadricauda*, en medio de mantenimiento agotado, de densidad óptica a 680 nm \approx 2,0. Los sistemas se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente blanca de irradiación de $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, y agitación orbital continua de 100 rpm (Cole Parmer, modelo OS-200, EEUU).

Se tomaron muestras para las determinaciones de densidad óptica a los 6, 13 y 20 días de incubación; mientras que para el recuento de aerobios se realizaron a los 6 y 20 días.

III.3.3.3. Seguimiento de la biomasa y los microorganismos aeróbicos

El crecimiento de la biomasa se siguió por densidad óptica a 680 nm, mientras que el recuento de microorganismos aerobios totales, que forman parte del consorcio de *S. quadricauda*, por recuento siembra en superficie. Las técnicas se describen en el Capítulo II.3.3.3. Seguimiento de la biomasa y de los microorganismos aeróbicos

III.3.4. Caracterización del crecimiento de la biomasa microalgal

En función de los resultados obtenidos en la determinación de las condiciones de cultivo, todas las curvas de crecimiento que se describen a continuación se llevaron a cabo en sistemas con DQO inicial de 3075 mg O₂/L (mediante dilución del efluente) y pH inicial de 7,25; manteniendo la iluminación para todos los ensayos, con el fotoperíodo e intensidad indicados en la sección II.3.3.2. Preparación de los sistemas. También se conservaron los valores de temperatura y velocidad de agitación orbital indicados en dicho apartado. El volumen de líquido utilizado en los sistemas fue 60 mL, colocados dentro de frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Se inocularon los sistemas con 6 mL de suspensión de *Scenedesmus quadricauda*, en medio de mantenimiento agotado, de DO a 680 nm \approx 2,0. El modelado de las curvas se realizó con el modelo de Gompertz modificado, según Capítulo II.3.4.4. Modelado de las curvas de crecimiento

III.3.4.1. Evaluación del diluyente del efluente y pre-adaptación de la cepa

Se realizaron cuatro sistemas, los cuales fueron incubados por 21 días. Se realizaron mediciones de la densidad óptica a 680 nm de longitud de onda para seguir el crecimiento de la biomasa. Los inóculos se incubaron el tiempo suficiente hasta alcanzar una DO a 680 nm \approx 2.

- EF+BG11 C/PA: Efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11, y el inóculo fue incubado en un medio de igual composición a modo de pre-adaptación.
- EF+BG11 S/PA: Efluente cervecero diluido con medio de mantenimiento BG-11, y el inóculo se incubó en medio de mantenimiento.
- EF+Agua C/PA: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, y el inóculo fue incubado en un medio de igual composición a modo de pre-adaptación.
- EF+Agua S/PA: Efluente cervecero diluido con agua desionizada, y el inóculo se incubó en medio de mantenimiento.

III.3.4.2. Evaluación de curvas de crecimiento suplementadas

Se realizaron tres sistemas, los cuales fueron incubados por 24 días. Se siguió el crecimiento de la biomasa como se describe en el apartado II.3.4.2. Seguimiento de la biomasa microalgal durante todo el período de incubación. El efluente fue diluido con agua desionizada y el medio se suplementó como se indica a continuación.

- Sistema 1: $\text{NaNO}_3 = 1500 \text{ mg/L}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 74 \text{ mg/L}$; y solución “B” (citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$).
- Sistema 2: $\text{NaNO}_3 = 750 \text{ mg/L}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 37 \text{ mg/L}$; y solución “B” (citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$).
- Sistema 3: Solución “B” (citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$).

III.3.4.3. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono

Se realizaron los Sistemas 2 y 3 descritos en la sección anterior, con las mismas condiciones de incubación, durante 23 días. Se siguió el crecimiento de la biomasa por determinación de la DO a 680 nm. Adicionalmente, se determinó la concentración final en masa seca de biomasa.

Adicionalmente, se realizó el seguimiento de la DQO remanente en el medio. A lo largo del tiempo de incubación, se procedió a tomar muestras de aproximadamente 1 ml de cultivo para la determinación de la DQO en el medio. Se separó la biomasa por centrifugación a $6700 \times g$ por 5 min y se tomó el sobrenadante para las determinaciones de DQO. Se utilizó el kit HACH® basado en el Standard Method 5220D.

III.3.5. Evaluación del efecto de componentes del medio de mantenimiento

Para evaluar los efectos de la concentración de componentes del medio de mantenimiento BG11 que suplementan el efluente (se omiten fuentes de carbono y fósforo que, en el efluente, se encuentran en cantidad suficiente según Capítulo II.3.2. Efluente cervecero), se realizó un diseño factorial con cinco variables independientes, con un punto medio triplicado para la estimación del error. El diseño y los análisis de los resultados, se llevaron a cabo con el software *Statgraphics Centurion XV* (V 2.15.06, 2007, USA). Las cinco variables analizadas fueron: tres macroelementos, cada uno por separado: nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado y cloruro de calcio dihidratado; una solución compuesta por citrato amónico férrico y EDTA disódico (en adelante llamada “solución B”); y los microelementos, como un conjunto en una única

solución que contiene H_3BO_3 , $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Las concentraciones ensayadas se muestran en la Tabla III - 2. Los sistemas 33 al 35 corresponden al punto central triplicado.

Las variables dependientes se ajustaron por regresión lineal al polinomio indicado en la Ecuación III - 1 por un procedimiento de regresión múltiple, que permite evaluar los efectos lineales e interacción de las variables independientes:

$$\Psi = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 + B_4x_4 + B_5x_5 + B_{12}x_1x_2 + B_{13}x_1x_3 + B_{14}x_1x_4 + B_{15}x_1x_5 + B_{23}x_2x_3 + B_{24}x_2x_4 + B_{25}x_2x_5 + B_{34}x_3x_4 + B_{35}x_3x_5 + B_{45}x_4x_5$$

Ecuación III - 1: Polinomio de ajuste de las variables dependientes.

Donde Ψ es la variable dependiente analizada, x_1, x_2, x_3, x_4 y x_5 representan las cinco variables independientes del diseño factorial, B_0 es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño, B_1, B_2, B_3, B_4 y B_5 son los coeficientes de los términos lineales, y $B_{12}, B_{13}, B_{14}, B_{15}, B_{23}, B_{24}, B_{25}, B_{34}, B_{35}$, y B_{45} , son los coeficientes de interacción entre variables independientes.

Tabla III - 2: Concentraciones de los cinco componentes ensayados como variables independientes, expresadas en mg/L de medio final.

Sistema	Bloque	NaNO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sc. B	Sc. C
1	1	0	74	35,3	6,5	5,3
2	1	1500	0	35,3	6,5	0
3	1	1500	74	35,3	6,5	0
4	1	0	74	0	0	5,3
5	1	0	74	35,3	6,5	0
6	1	1500	0	0	0	5,3
7	1	1500	74	0	6,5	0
8	1	1500	0	0	6,5	5,3
9	1	1500	0	35,3	0	0
10	1	0	0	0	0	5,3
11	1	1500	0	35,3	6,5	5,3
12	1	0	0	0	0	0
13	1	1500	74	35,3	6,5	5,3
14	1	0	0	0	6,5	5,3
15	1	1500	74	0	0	5,3
16	1	1500	74	0	0	0

17	1	1500	74	35,3	0	0
18	1	0	74	0	6,5	5,3
19	1	1500	74	35,3	0	5,3
20	1	1500	0	0	0	0
21	1	0	74	35,3	0	0
22	1	0	0	0	6,5	0
23	1	0	0	35,3	6,5	0
24	1	0	74	35,3	0	5,3
25	1	0	74	0	0	0
26	1	1500	0	35,3	0	5,3
27	1	0	0	35,3	0	5,3
28	1	0	0	35,3	0	0
29	1	1500	74	0	6,5	5,3
30	1	0	0	35,3	6,5	5,3
31	1	0	74	0	6,5	0
32	1	1500	0	0	6,5	0
33	1	750	37	17,65	3,25	2,65
34	1	750	37	17,65	3,25	2,65
35	1	750	37	17,65	3,25	2,65

Las condiciones de incubación fueron las descritas en II.3.3.2. Preparación de los sistemas. El valor de DQO inicial fue de 3075 mg O₂/L y el pH inicial 7,25. Se agregaron los volúmenes necesarios de soluciones de los componentes ensayados, y se completaron los sistemas con agua desionizada hasta completar los 30 mL.

El crecimiento de la biomasa se siguió tomando las muestras a los días 0, 12 y 21 de incubación. Se analizaron los valores de aumento de la densidad óptica y el recuento celular a los 12 y 21 días (referidos al valor inicial del día 0).

III.3.6. Determinación de la composición bioquímica

Se realizó el análisis de la composición bioquímica de los dos sistemas indicados en el apartado III.3.4.3. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono.

La determinación de lípidos se realizó por el método colorimétrico de sulfo-fosfo-vainillina, la concentración de proteínas se determinó según el método colorimétrico de Lowry; y el contenido de carbohidratos se determinó según el método colorimétrico de fenol-sulfúrico. También se

analizaron las concentraciones de pigmentos, clorofila *a* y carotenoides por extracción con acetona y determinación colorimétrica. Los métodos se detallan en el Capítulo II.3.5. Caracterización bioquímica de la biomasa microalgal

III.3.7. Escalado

A partir de los resultados, se seleccionó un sistema (3) que fue escalado en modo de alimentación fed-batch por pulsos, sin recolección de biomasa hasta el tiempo final de incubación.

III.3.7.1. Condiciones de incubación

Se evaluaron para el escalado dos biorreactores distintos: un tanque agitado y un Erlenmeyer de 5 L de capacidad total. El medio de cultivo compuesto de efluente cervecero diluido con agua desionizada fue esterilizado dentro de los recipientes en autoclave durante 20 min a 121°C. Posteriormente se agregó el suplemento de solución “B” concentrada de BG11, compuesto por citrato amónico férrico y EDTA disódico, esterilizado de igual modo, pero por separado. La solución concentrada se adiciona en 1 mL por cada 1 L de medio de cultivo. Los valores de demanda química de oxígeno y pH inicial fueron de 3075 mg O₂/L y 7,25; respectivamente.

En ambos casos se utilizó un volumen de inóculo de *Scenedesmus quadricauda* de un 10% del total, en medio de mantenimiento agotado, de densidad óptica (DO) a 680 nm \approx 2,0.

Se utilizó para el tanque agitado el mismo aireador comercial descrito en Capítulo II.3.6.1. Condiciones de incubación y que se muestra en la Figura II - 19. De igual modo, la agitación utilizada para ambos reactores fue la misma calculada e informada en los apartados II.3.6.1.1. Cálculo de la velocidad de agitación y II.4.4.1. Agitación; dado que la densidad del cultivo de *S. quadricauda* fue igual a la densidad de *C. vulgaris*; y los sistemas en menor escala y los biorreactores fueron los mismos utilizados para ambas cepas; derivando de este modo en los mismos resultados de velocidades de agitación y potencias volumétricas. Por lo tanto, la agitación en el tanque agitado fue de 500 rpm con impulsor tipo hélice marina; y en el Erlenmeyer de 5 L fue tipo orbital a 60 rpm.

III.3.7.2. Alimentación fed-batch pulsada

Se procedió a renovar la alimentación fresca de efluente cervecero y solución de citrato amónico férrico con EDTA esterilizados cada 6 días de incubación, generando de este modo pulsos de alimentación fresca. El proceso se realizó tres veces, a los 6, 12 y 18 días; luego de recolectar las

muestras para determinar el crecimiento de la biomasa. La cosecha de la biomasa para determinación de la composición bioquímica se realizó sólo al final de la incubación de 24 días.

El volumen inicial en los sistemas fue de 0,99 L, con DQO de 3075 mg O₂/L. Se consideró un consumo de DQO de 70% en 6 días en base a los resultados del apartado III.4.5. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono Se calculó el volumen a adicionar en cada etapa de efluente cervecero sin diluir (se utilizó un lote con 37500 mg O₂/L), de modo que la DQO luego de la adición vuelva al valor de 3075 mg O₂/L. Los volúmenes se consideraron aditivos en los cálculos de adición en cada etapa. La solución concentrada de citrato amónico férrico con EDTA disódico se adicionó siempre en 1 mL en cada etapa de adición de alimentación fresca. El volumen final calculado para los sistemas luego de tres adiciones de alimentación fresca fue ≈ 1,1 L.

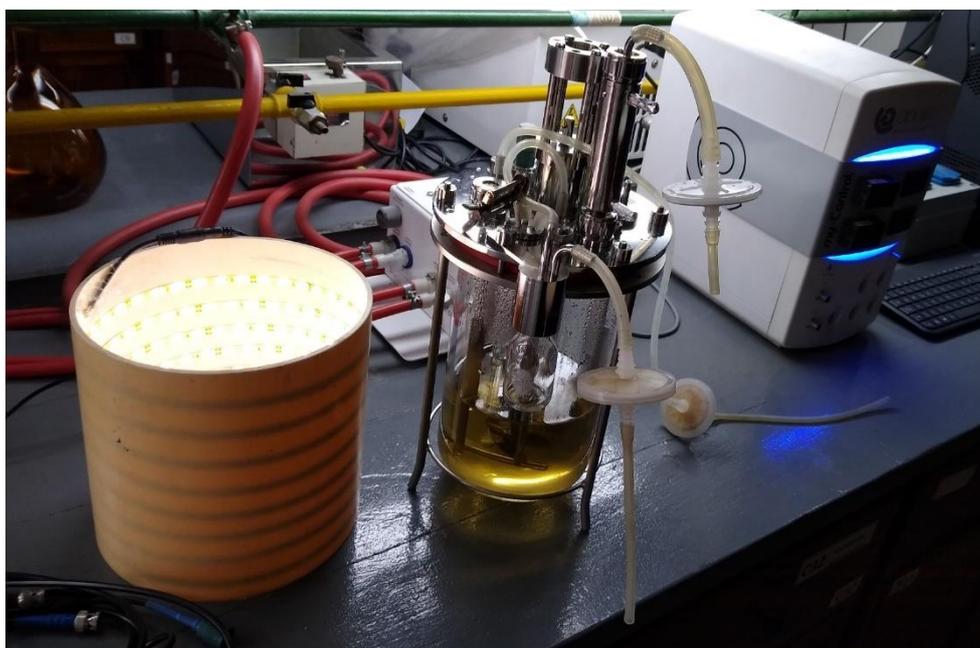


Figura III - 3: Biorreactor tanque agitado esterilizado previo a la inoculación y sistema de iluminación.

III.3.7.3. Seguimiento de la biomasa

Se incubaron los sistemas por 24 días, tomando muestras en el día 0 (momento de inoculación) y cada 6 días, antes de la adición de alimentación fresca; para la determinación de DO a 680 nm y del recuento en cámara de Neubauer. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Se calculó la velocidad específica de crecimiento de cada etapa de 6 días mediante la expresión utilizada por Farooq et al. (2013) y Shashirekha et al. (2016):

$$\mu = \ln(N/N_0) / (t - t_0)$$

Ecuación III - 2: Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial de crecimiento

Donde N/N_0 representa la relación entre el valor medido de biomasa (por DO a 680 nm) en el tiempo t y el valor medido a t_0 (en días).

III.3.7.4. Composición bioquímica

Finalizado el tiempo total de incubación de 24 días, se procedió a tomar muestras para la determinación de concentración de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos (clorofila y carotenoides). Las determinaciones se llevaron a cabo según descrito en Capítulo II.3.5. Caracterización bioquímica de la biomasa microalgal

III.3.7.5. Determinación de demanda química de oxígeno

Finalizado el tiempo total de incubación de 24 días, se procedió a tomar una muestra del cultivo del biorreactor tanque agitado para determinar la DQO al final del cultivo, según se describe en el apartado III.3.4.3. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono

III.3.8. Aplicación de la biomasa: perfil de ácidos grasos

La biomasa cosechada del bioreactor y del erlenmeyer fue centrifugada, lavada, liofilizada (Christ Mod Alpha, Osterode am Harz, Alemania) y el polvo de ambos sistemas se mezcló, homogenizó, envasó y envió para análisis al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

Se realizó una determinación de perfil de ácidos grasos según los métodos AOCS Ce 1k-09:2009 e ISO 12966-4:2015, por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de dichos lípidos.

En base a los resultados, se determinaron los índices hipocolesterolémico (HI), aterogénico (AI) y trombogénico (TI), según las expresiones de las Ecuación III - 3 (Aussant et al., 2018), Ecuación

$$\text{III - 4 y TI} = \frac{C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0}}{0,5 \sum MUFA + 3 \sum \Omega_3 + 0,5 \sum \Omega_6 + \frac{\sum \Omega_3}{\sum \Omega_6}}$$

Ecuación III - 5 (Attia et al., 2015), respectivamente.

$$HI = \frac{C18:1 + C18:2 + C18:3 + C20:3 + C:20:4 + C20:5 + C22:4 + C22:6}{C14:0 + C16:0}$$

Ecuación III - 3: Índice hipocolesterolémico

$$AI = \frac{C12:0 + 4 \cdot C14:0 + C16:0}{\sum MUFA + \sum \Omega3 + \sum \Omega6}$$

Ecuación III - 4: Índice aterogénico

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{0,5 \sum MUFA + 3 \sum \Omega3 + 0,5 \sum \Omega6 + \frac{\sum \Omega3}{\sum \Omega6}}$$

Ecuación III - 5: Índice trombogénico

III.4. Resultados y discusión

III.4.1. Determinación de las condiciones de cultivo

Los resultados para las variables dependientes del diseño central a cinco niveles se muestran en la Tabla III - 3: el aumento de la densidad óptica de la biomasa (ΔDO) y el aumento en el logaritmo de UFC de aerobios mesófilos totales (ΔUFC), ambos respecto al día 0 de inoculación.

Tabla III - 3: Diseño central compuesto con dos variables independientes a cinco niveles y un punto central por triplicado.

DQO efluente	pH inicial	ΔDO_{6d-0d}	ΔDO_{13d-0d}	ΔDO_{20d-0d}	ΔUFC_{6d-0d}	ΔUFC_{20d-0d}
3075 (0)	7,2 (0)	1,5 ±0,1	2,9 ±0,3	4,8 ±0,5	1,79 ±0,02	2,7 ±0,6
3075 (0)	7,2 (0)	1,5 ±0,1	2,8 ±0,3	5,2 ±0,1	1,81 ±0,01	2,2 ±0,3
3075 (0)	7,2 (0)	1,44 ±0,03	2,5 ±0,2	5 ±1	1,9 ±0,1	2,5 ±0,1
3075 (0)	6,5 (-2)	1,48 ±0,05	2,69 ±0,03	4,41 ±0,09	1,61 ±0,04	3,3 ±0,5
3075 (0)	7,9 (+2)	1,3 ±0,1	2,5 ±0,5	4,5 ±0,7	3,4 ±0,5	2,6 ±0,2
1650 (-1)	6,8 (-1)	1,12 ±0,04	2,4 ±0,1	4,3 ±0,3	2,8 ±0,3	1,2 ±0,5
1650 (-1)	7,5 (+1)	1,2 ±0,1	2,9 ±0,3	4,8 ±0,5	3,9 ±0,8	1,5 ±0,5
4500 (+1)	6,8 (-1)	1,6 ±0,1	2,19 ±0,07	3,8 ±0,3	3,7 ±0,4	2,8 ±0,7
4500 (+1)	7,5 (+1)	1,52 ±0,03	2,6 ±0,3	4,2 ±0,2	3,7 ±0,8	3,73 ±0,07
150 (-2)	7,2 (0)	0,71 ±0,08	2,1 ±0,3	3,7 ±0,1	1,5 ±0,3	0,5 ±0,1
6000 (+2)	7,2 (0)	1,68 ±0,09	2,1 ±0,3	3,5 ±0,4	4,1 ±0,3	4,1 ±0,3

165	7,9	1,01 ±0,04	-	3,5 ±0,3	<1	<1
1580	6,9	1,53 ±0,04	-	3,9 ±0,2	<1	<1
3075	7,2	1,9 ±0,1	-	5,3 ±0,4	<1	<1

Para todas las concentraciones de efluente cervecero ensayadas, se observó que la microalga continuó aumentando la densidad óptica hasta los 20 días. Por otro lado, los microorganismos aerobios del consorcio de la microalga no mostraron una tendencia clara respecto a los recuentos. Se observó una tendencia a tener menores valores de densidad óptica al final de la incubación (20 días) en los valores extremos de demanda química de oxígeno.

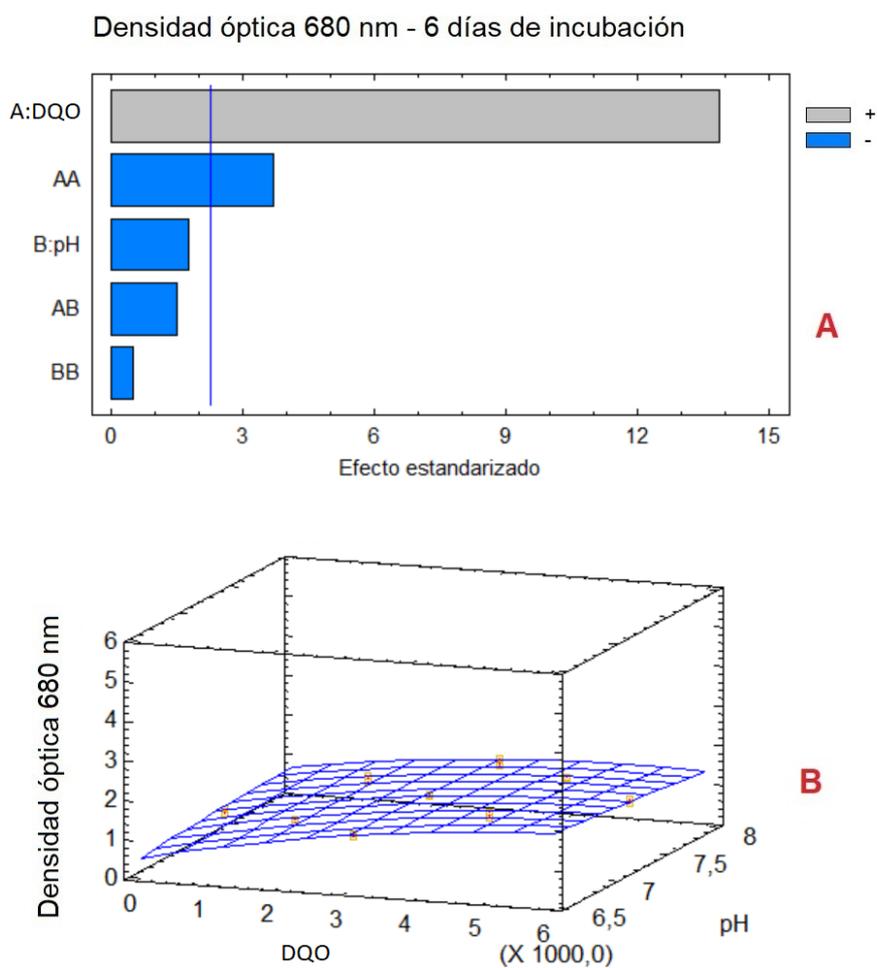


Figura III - 4: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 6 días de incubación.

Se observa en la Figura III - 4 (gráfico A, Diagrama de Pareto) un efecto positivo significativo ($p < 0,05$) de la DQO sobre el crecimiento, medido en densidad óptica, de *S. quadricauda* a los 6 días de incubación, así como también el efecto cuadrático negativo del valor de DQO inicial. Los efectos cuadráticos indican que existe un valor del rango de la variable independiente en el cual la variable dependiente se maximiza, si es cuadrático negativo; o se minimiza, si es cuadrático positivo.

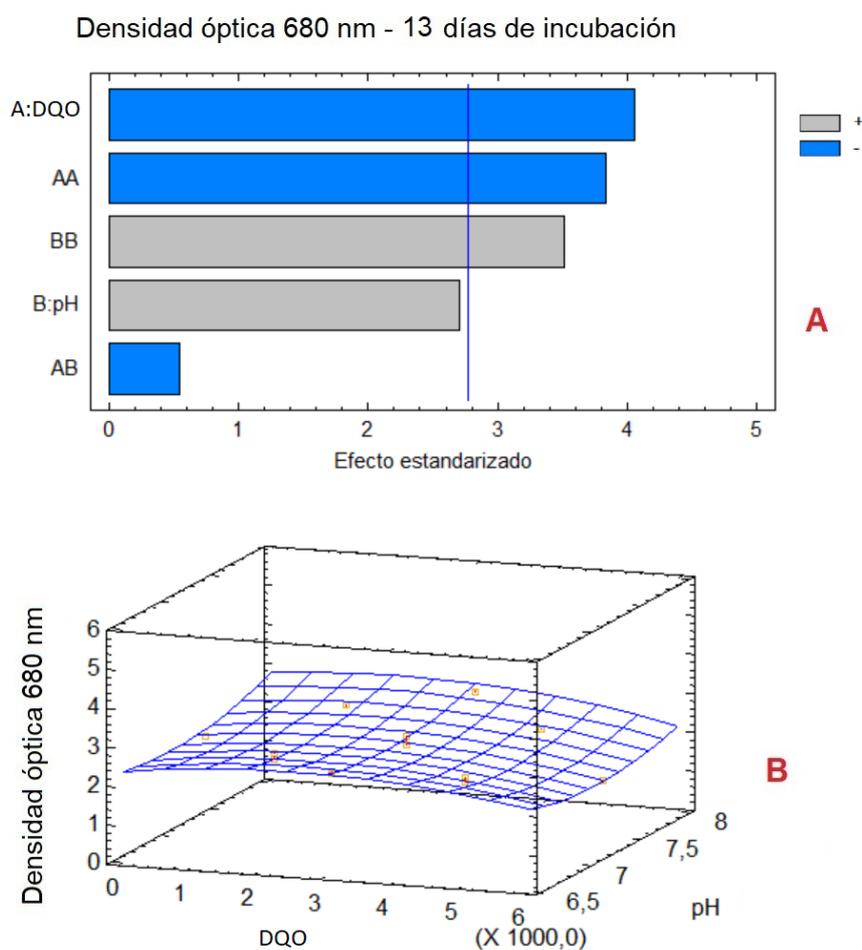


Figura III - 5: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 13 días de incubación.

En la Figura III - 5, elemento A (Diagrama de Pareto) se observa que a los 13 días de incubación se invierte el principal efecto observado en la medición a 6 días. Se mantuvo el efecto cuadrático negativo de la DQO, y aparece como significativo ($p < 0,05$) el efecto cuadrático positivo del pH.

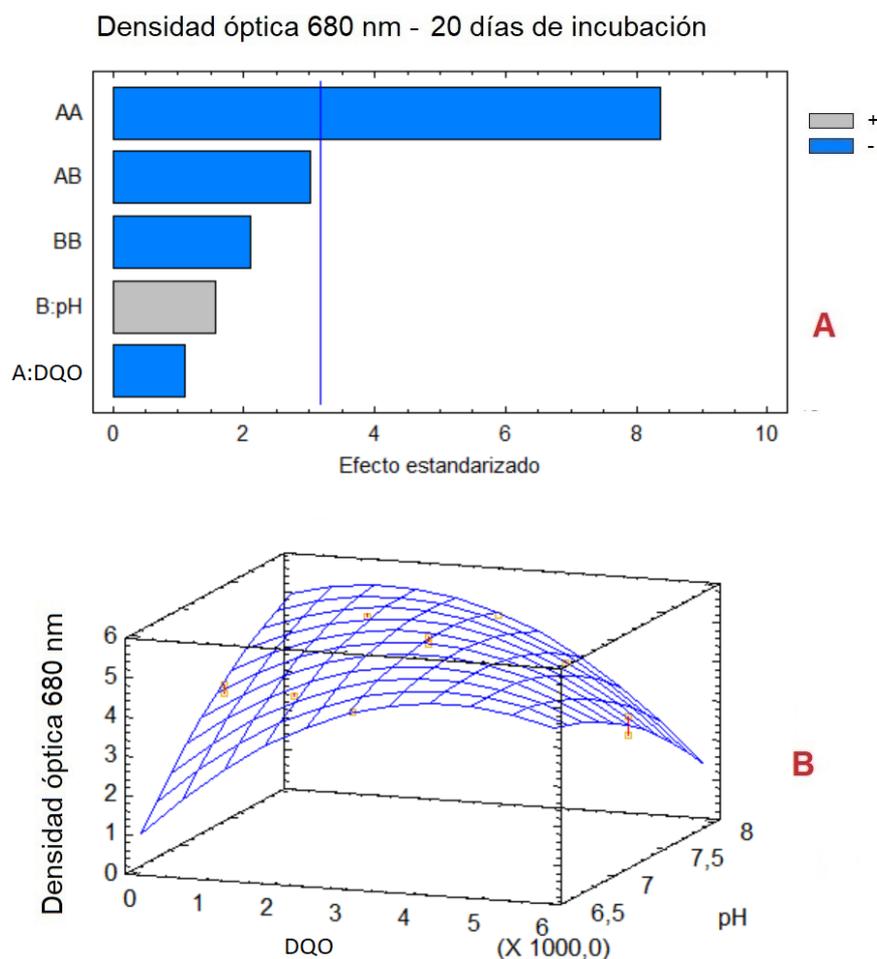


Figura III - 6: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en la densidad óptica (ΔDO), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 20 días de incubación.

Se observa en el diagrama de Pareto de la Figura III - 6 se observa que a los 20 días de incubación se pierden los efectos de variables independientes con la excepción del efecto cuadrático negativo de la DQO, que se mantuvo constante a lo largo de todas las mediciones realizadas durante el cultivo. De manera que, en el rango de DQO ensayado, se observa un valor máximo para la DO.

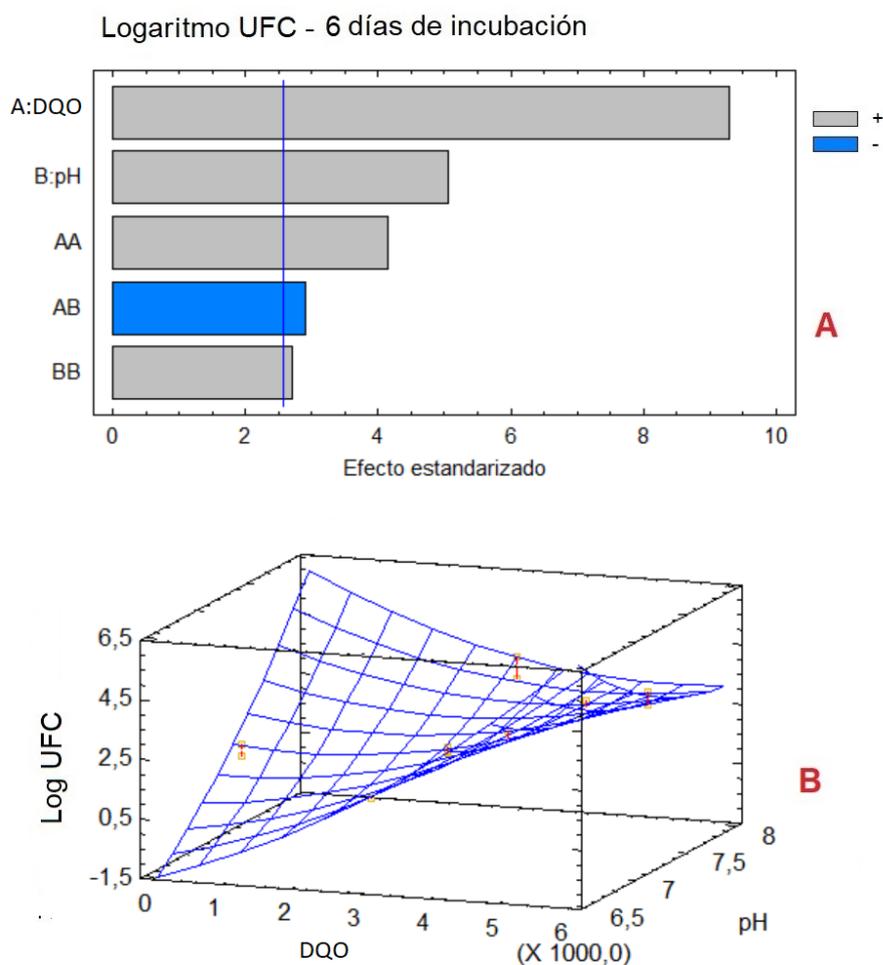


Figura III - 7: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (Δ UFC) luego de 6 días de incubación.

Respecto al comportamiento de los aerobios mesófilos totales, se puede observar en el diagrama de Pareto de la Figura III - 7 que todos los efectos de las variables independientes fueron significativos ($p < 0,05$) a los seis días de incubación: los efectos lineales fueron ambos positivos, al igual que los efectos cuadráticos. La interacción entre pH y DQO iniciales resultó ser antagónica, lo cual significa que, ante el aumento de valor en una de ellas, se invierte el efecto principal de la otra variable se invierte.

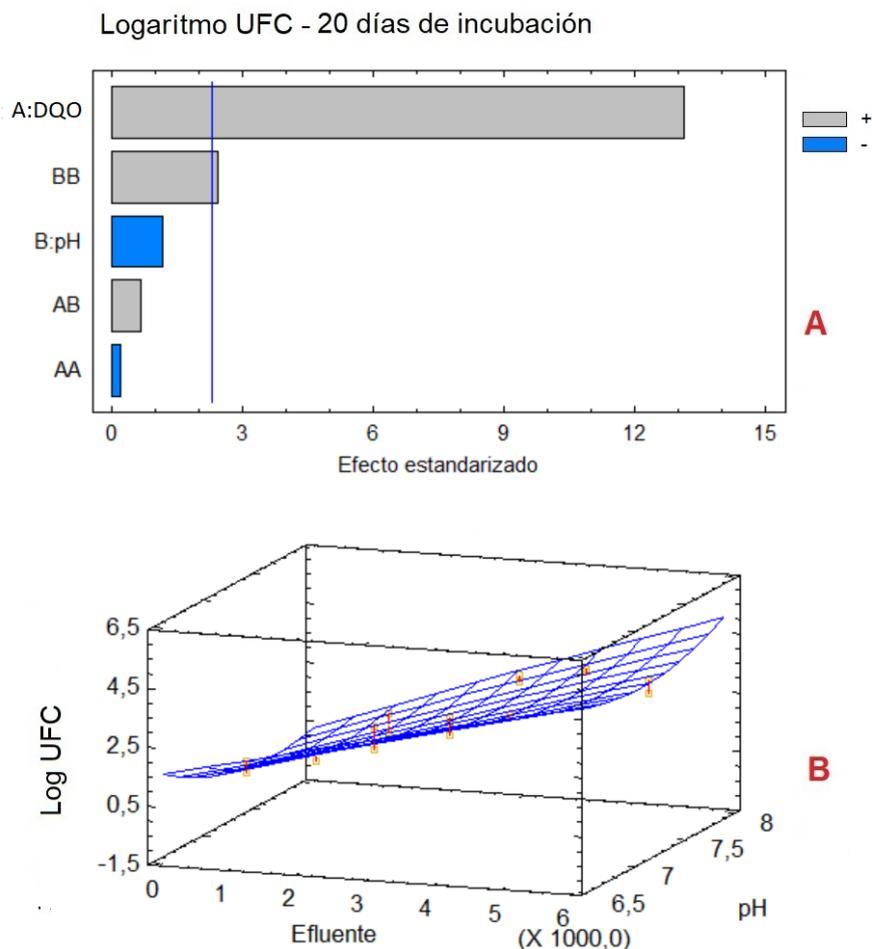


Figura III - 8: Efecto de los valores iniciales de DQO y pH del medio de cultivo en el logaritmo del recuento de UFC de aerobios totales (Δ UFC) luego de 20 días de incubación

Luego de 20 días, sólo se mantienen significativos ($p < 0,05$) para los aerobios el efecto lineal positivo de la DQO y el cuadrático positivo del pH; según se observa en la Figura III - 8.

Se realizaron optimizaciones múltiples de las variables dependientes, mediante la función deseabilidad, que permite optimizar varias variables al mismo tiempo. Se analizaron dos posibles optimizaciones, las cuales se muestran en la Tabla III - 4: un escenario en el cual se maximiza la densidad óptica de la microalga a los 6, 13 y 20 días mientras que se minimiza el recuento de los aerobios mesófilos a los 6 y 20 días, como Optimización Múltiple 1 (Figura III - 9); y otro escenario en el cual se maximiza el crecimiento de la biomasa a los 6, 13 y 20 días, como Optimización Múltiple 2. Las condiciones calculadas por ambas optimizaciones múltiples se volvieron a ensayar para corroborar el modelo, midiendo ambas variables dependientes a los 6 y 20 días, mostrando los resultados en la misma tabla.

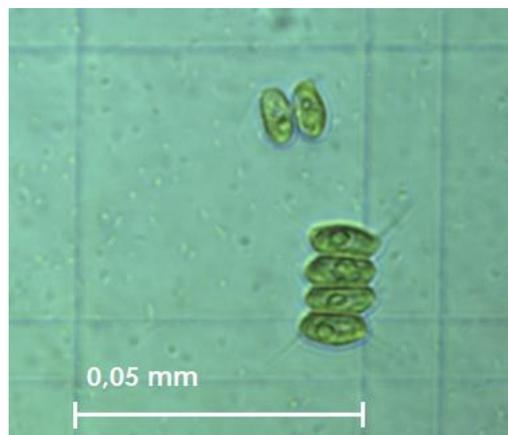


Figura III - 9: Imagen de *S. quadricauda* del sistema con valores iniciales de DQO 1580 mg O₂/L y pH 6,9; a los 13 días de incubación.

Tabla III - 4: Optimización múltiple mediante utilización de la función deseabilidad, se presentan los valores estimados y los valores experimentales (media).

		Variables independientes			Variables dependientes				
		Deseab.	DQO	pH	ΔDO_{6d-0d}	ΔDO_{13d-0d}	ΔDO_{20d-0d}	ΔUFC_{6d-0d}	ΔUFC_{20d-0d}
Optimización múltiple 1	Valor óptimo estimado	0,87	1580	7,1	1,1	2,4	4,7	1,3	1,4
	Valor experim.	-			1,5	-	3,9	<1	<1
Optimización múltiple 2	Valor óptimo estimado	1,00	3075	7,2	1,4	2,4	5,2	-	-
	Valor experim.	-			1,9	-	5,3	-	-

Se observó que en las condiciones calculadas como óptimas, los valores experimentales se encontraron en el orden de los predichos por el modelo. Se observó que la microalga aumenta su densidad óptica durante todo el período de incubación. El aumento en el recuento de aerobios fue menor a una unidad de logaritmo base diez, en ambos sistemas optimizados.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió avanzar en las curvas de crecimiento con los parámetros de la Optimización 2: 3075 mg O₂/L de demanda química de oxígeno y 7,25 de valor de pH inicial; así como fijar el tiempo de incubación en 20 días como mínimo. Se observó que *S.*

quadricauda fue capaz de crecer en un medio conteniendo fuentes de carbono, y controlar el crecimiento de las bacterias del consorcio. Abinandan et al. (2015) reportaron curvas de crecimiento similares para *S. abundans* en sistemas con efluente de molienda de arroz de DQO aprox. 1600 mg O₂/L, con y sin esterilización previa. Halfhide et al. (2014) reportaron que la viabilidad de las bacterias heterotróficas en un cultivo de *Scenedesmus* no axénico con efluente doméstico sintético descendió luego de 72 horas a menos de 30 UFC/100 mL.

Se concluyó a partir de este ensayo que *S. quadricauda* no axénica mostró capacidad de crecimiento en un medio de cultivo conteniendo efluente cervecero, siendo los valores iniciales de concentración de efluente medida en DQO y de pH inicial, que maximizan el aumento de la densidad óptica de la biomasa a todos los tiempos de medición, 3075 mg O₂/L y 7,25; respectivamente. De manera que se seleccionaron estas condiciones para proceder con los siguientes estudios. Por otro lado, se seleccionó el régimen mixotrófico, ya que pruebas preliminares no reportadas en el presente trabajo evidenciaron que la cepa utilizada de *S. quadricauda* no mostró crecimiento satisfactorio en régimen heterotrófico. Esta observación también fue reportada por Zhao et al. (2012).

III.4.2. Evaluación del diluyente del efluente y pre-adaptación de la cepa



Figura III - 10: Sistemas incubados en efluente con diluyente agua y BG11, con inóculos pre-adaptados y sin adaptar; a los 7 días de incubación.

En la Tabla III - 5 se muestran los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz modificado para los cuatro sistemas ensayados, seguidos por determinación de densidad óptica. Se observó que el valor asintótico *C* fue significativamente menor ($p < 0,05$) para el sistema diluido con agua y con

el inóculo pre-adaptado. Respecto a la velocidad específica de crecimiento μ_{max} , se encontró un valor significativamente menor ($p < 0,05$) en el sistema diluido con medio de mantenimiento y con la microalga sin pre-adaptar, respecto a los dos sistemas con agua.

Tabla III - 5: Parámetros cinéticos de ajuste. Letras distintas en la misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre sistemas.

	EF+BG11 C/PA	EF+BG11 S/PA	EF+AGUA C/PA	EF+AGUA S/PA
C	2,0±0,1 ^a	2,1±0,1 ^a	1,55±0,05 ^b	1,86±0,05 ^a
μ_{max} (h ⁻¹)	1,1±0,2 ^{ab}	0,60±0,07 ^a	1,3±0,2 ^b	1,4±0,2 ^b
lag (h)	N/D	N/D	N/D	N/D
$R^2_{Adj}(\%); DW$	89,3; 1,11	92,6; 1,57	94,5; 1,28	96,5; 2,42

En la Figura III - 11; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran las mediciones de DO a 680 nm de las curvas de crecimiento preliminares para evaluar el diluyente del efluente y la pre-adaptación del inóculo.

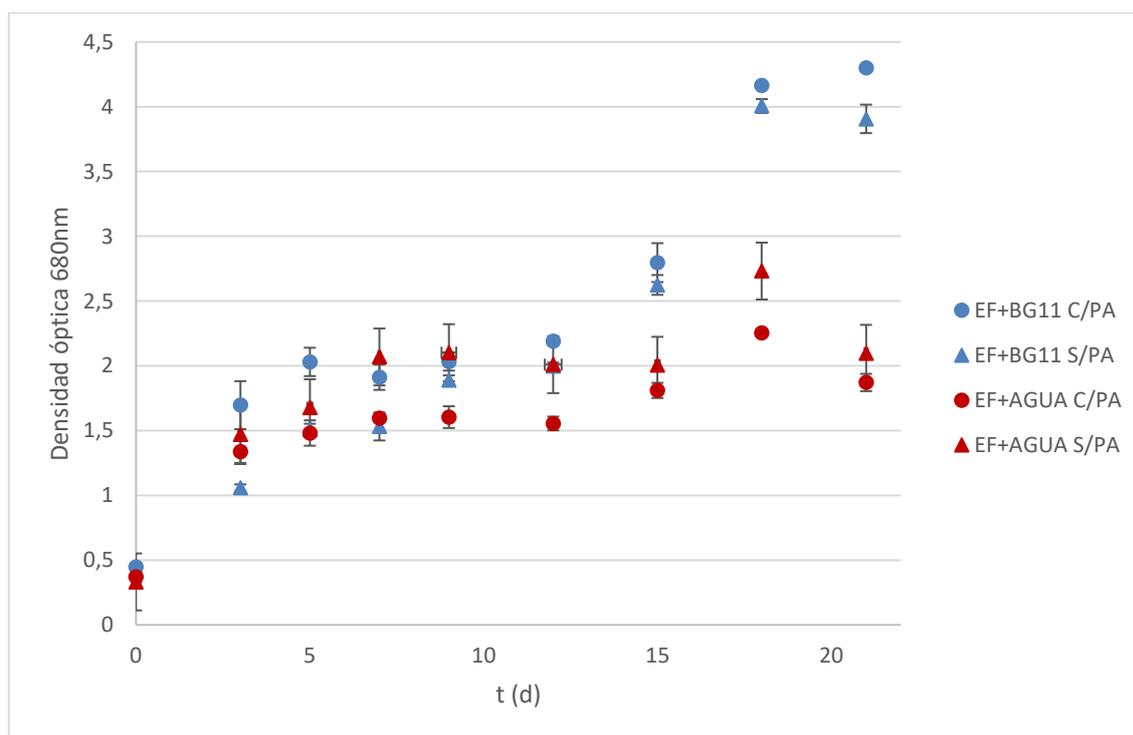


Figura III - 11: Curvas de crecimiento, medido por densidad óptica a 680 nm, de los sistemas con efluente diluido con agua y medio de mantenimiento; y utilizando un inóculo pre-adaptado y sin pre-adaptar.

No se encontró para los sistemas ensayados una ventaja evidente de realizar una pre-adaptación del inóculo. Arriada y Abreu (2014) reportaron un comportamiento similar en *Nannochloropsis*

oculata incubada con efluente de la industria de extracción de petróleo, encontrando que la pre-adaptación al efluente daba un rendimiento general algo menor al de la cepa sin pre-adaptar. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el parámetro *C* del ajuste de Gompertz entre el sistema con agua S/PA y los sistemas diluidos con BG 11, se puede observar en la Figura III - 12: Curvas de crecimiento, medido por recuento celular en cámara de Neubauer, de los sistemas con efluente diluido con agua y medio de mantenimiento; y utilizando un inóculo pre-adaptado y sin pre-adaptar. que los sistemas que utilizaron medio BG11 como diluyente alcanzaron mayores ($p < 0,05$) concentraciones finales que los sistemas que utilizaron agua. Mientras estos dos últimos sistemas mantienen la densidad óptica alrededor del valor de 2 desde el día 7 aproximadamente, los sistemas con BG11 siguen aumentando la densidad óptica hasta alcanzar valores cercanos a 4. En la Figura III - 12 se observa que los sistemas diluidos con agua presentan una disminución del recuento celular, posiblemente debido a una fase de muerte, por lo cual no fue posible ajustar dichas curvas por el modelo de Gompertz modificado.

Se concluyó que la pre-adaptación de *S. quadricauda* no es necesaria para mejorar el crecimiento de la microalga, sin embargo, la suplementación con BG11 mostró una mejora respecto a la dilución con agua. En función de estos resultados, se decidió estudiar cuales fueron los componentes del medio BG11 con mayor influencia, de manera de poder diluir el efluente con agua desionizada suplementando sólo con aquellos componentes del medio de mantenimiento que posean efectos significativos sobre el crecimiento de *S. quadricauda*.

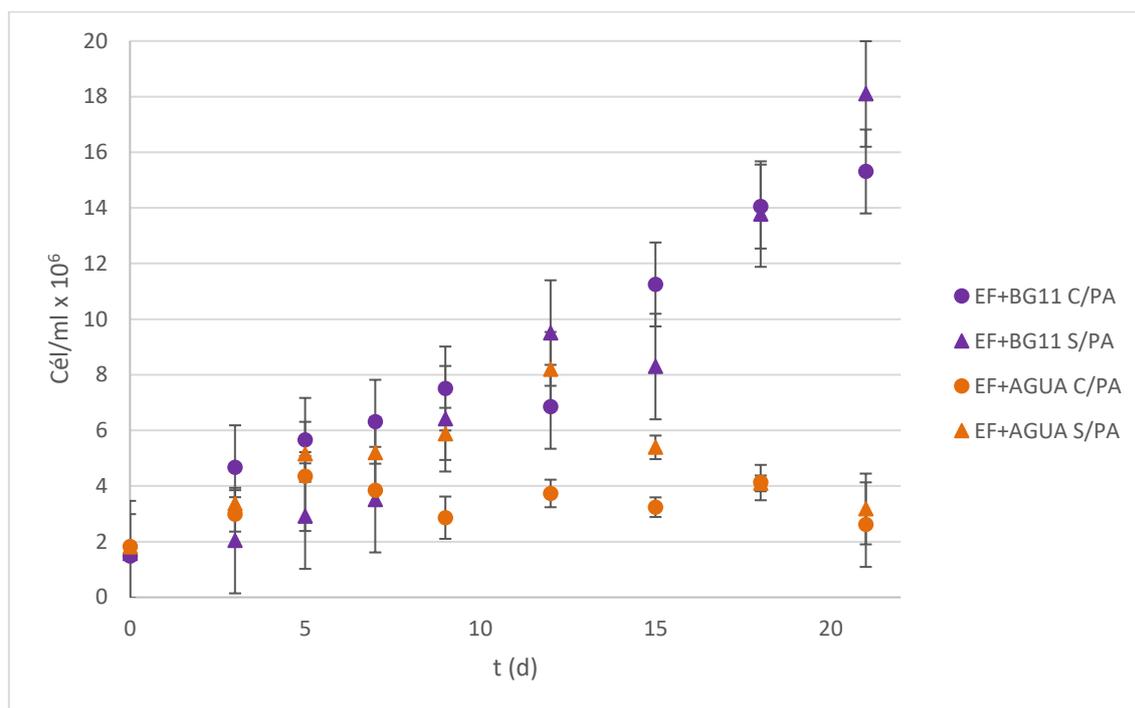


Figura III - 12: Curvas de crecimiento, medido por recuento celular en cámara de Neubauer, de los sistemas con efluente diluido con agua y medio de mantenimiento; y utilizando un inóculo pre-adaptado y sin pre-adaptar.

III.4.3. Evaluación del efecto de componentes del medio de mantenimiento

En base a pruebas preliminares no detalladas en el presente trabajo, que evidenciaron que la cepa utilizada de *S. quadricauda* no muestra crecimiento satisfactorio en régimen heterotrófico; se optó por el régimen mixotrófico. Esta observación también fue reportada por Zhao et al. (2012).

En la Figura III - 14 se muestra el diagrama de Pareto de los efectos de las variables independientes (nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de calcio dihidratado; y soluciones “B” y “C” del medio BG11) sobre el aumento de densidad óptica (respecto a los valores del día 0) medida a los 12 días de incubación. De modo análogo, la Figura III - 15 muestra los efectos para los 21 días.

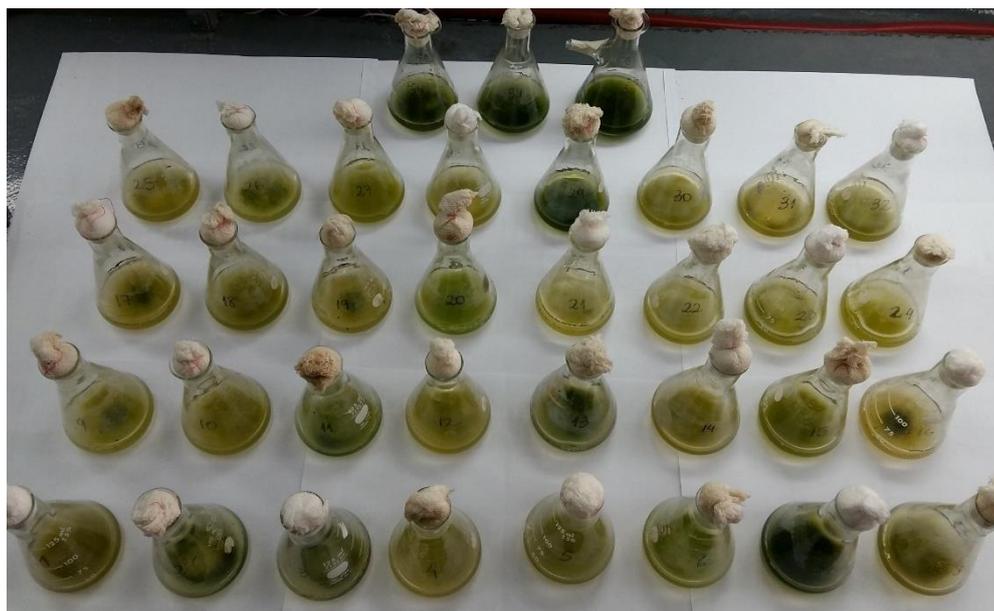


Figura III - 13: Sistemas del diseño factorial a los 12 días de incubación.

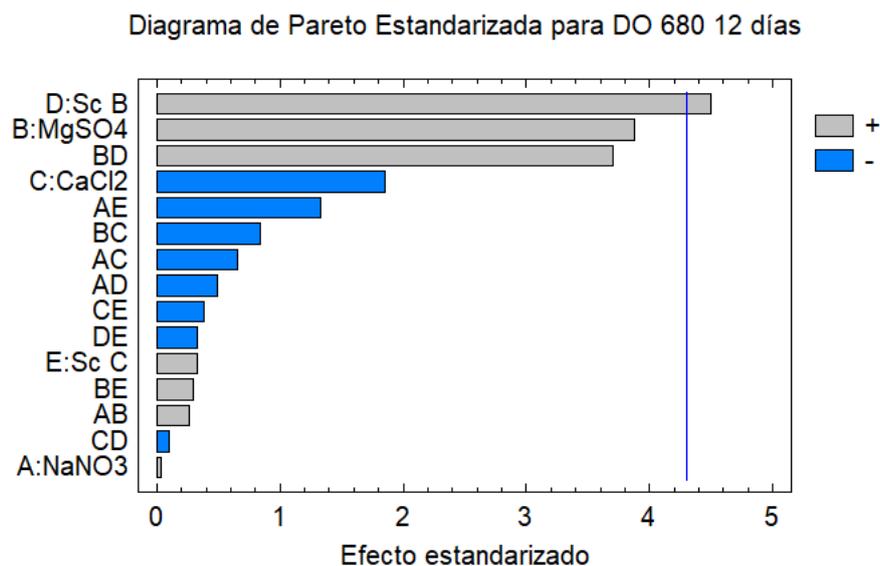


Figura III - 14: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento de la densidad óptica (DO/DO₀), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 12 días de incubación.

Se observó que luego de 12 días de incubación, sólo la solución “B”, que contiene citrato amónico férrico y EDTA disódico, tuvo un efecto significativo positivo sobre el aumento de densidad óptica. Luego de 21 días de incubación, se mantiene el mismo efecto de la solución “B”, y se suman además el efecto positivo del nitrato de sodio y la interacción sinérgica entre estas dos

variables independientes. La interacción sinérgica, o positiva, indica que el aumento en el valor de una de las variables acentúa aún más el efecto principal de la otra.

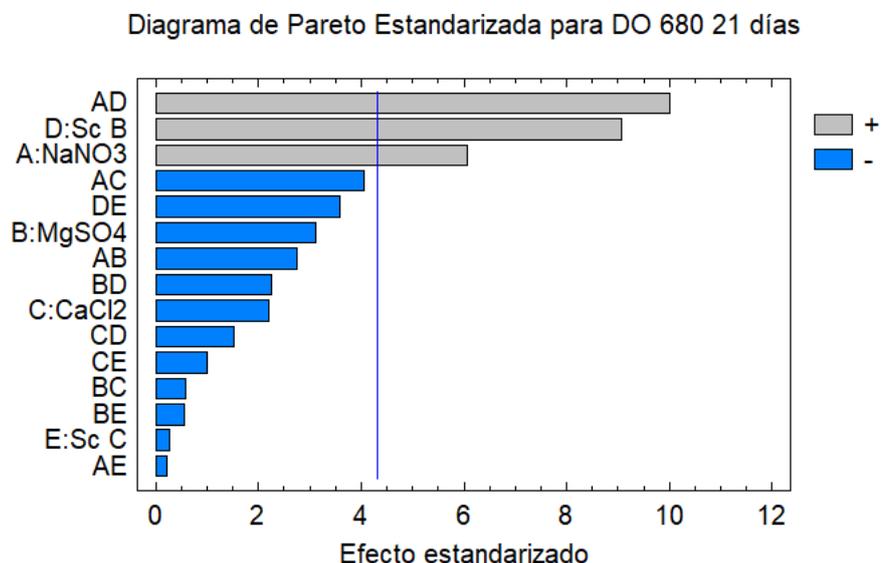


Figura III - 15: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento de la densidad óptica (DO/DO₀), medida a 680 nm, de la biomasa luego de 21 días de incubación.

Las Figura III - 16 y Figura III - 17 muestran los efectos de las variables independientes sobre el aumento en el recuento celular (respecto de los valores iniciales medidos en el día 0) luego de 12 y 21 días de incubación, respectivamente.

Cuando se analiza el crecimiento medido por recuento celular a los 12 días de incubación, se encuentra que tanto la solución “B” como el sulfato de magnesio presentaron efectos positivos significativos, mientras que el cloruro de calcio mostró, al contrario, un efecto negativo. También se encontraron interacciones significativas antagónicas del cloruro de calcio con las siguientes especies: nitrato de sodio y sulfato de magnesio. Sin embargo, la interacción del cloruro de calcio con la solución “B” fue sinérgica.

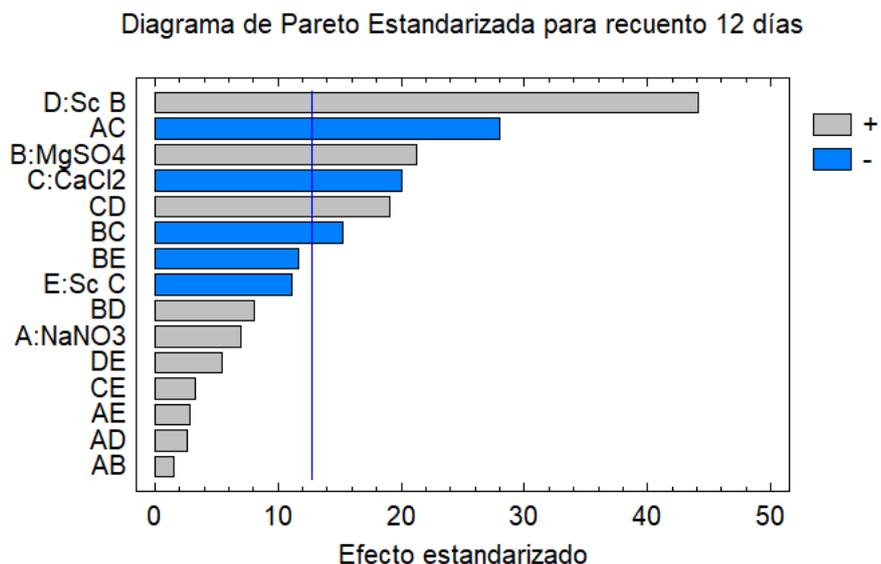


Figura III - 16: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento del recuento celular (N/N_0), en células por mililitro, de la biomasa luego de 12 días de incubación.

Luego de 21 días de incubación, se observa que se mantuvieron los efectos significativos positivo de la solución “B” y antagónico de la interacción entre el nitrato de sodio y el cloruro de calcio.

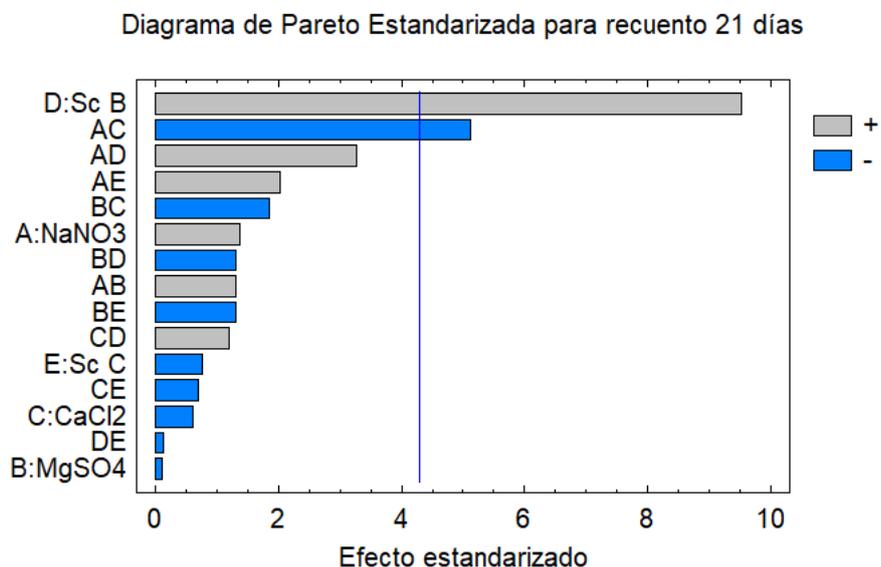


Figura III - 17: Efecto de las concentraciones iniciales de las cinco variables independientes, en el aumento del recuento celular (N/N_0), en células por mililitro, de la biomasa luego de 21 días de incubación.

El nitrógeno es uno de los principales nutrientes requeridos para el crecimiento de microalgas, forma parte de proteínas y del metabolismo de las mismas. Su deficiencia puede llevar a activar

mecanismos secundarios como la acumulación de lípidos. (Sarat Chandra et al., 2016; Xin et al., 2010). El efecto positivo en el crecimiento puede indicar que el nitrógeno contenido en el efluente podría no ser suficiente para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento. El hierro es parte de varias rutas metabólicas de las microalgas, participando en la ruta de síntesis de clorofila y de la fotosíntesis en proteínas de transporte de electrones; y de aquellas de reducción del carbono y del nitrógeno, a amonio en este último caso. Dado que la reducción del nitrógeno requiere una cantidad relevante de energía, la forma que suele promover el crecimiento en las microalgas es el amonio. Se reportó que, en *S. quadricauda*, la disponibilidad de hierro aumentó la concentración de clorofila en más del doble y el consumo de nitrato en aproximadamente seis veces respecto a los cultivos con deficiencia de hierro (Rueler & Ades, 1987). La solución “B” contiene el ion férrico, solubilizado con EDTA, pudiendo tener un efecto positivo en el crecimiento principalmente por la función que tiene este elemento en el rendimiento fotosintético y de aprovechamiento del nitrógeno por reducción. El magnesio forma parte de la síntesis de la clorofila y el proceso fotosintético, y su deficiencia puede generar una disminución en la velocidad específica de crecimiento; sin embargo, se ha reportado para *S. dimorphus* que el aumento de su concentración mejora ligeramente la velocidad de crecimiento, pero aumenta la concentración de lípidos en la biomasa (Esakkimuthu et al., 2016). El efecto positivo sobre el crecimiento indicaría la necesidad de suplementación al medio. El calcio mostró tener un efecto negativo, cuando se observó significativo, sobre el crecimiento de la microalga; así mismo interacciona, en general, antagónicamente con los demás componentes cuyo efecto principal es positivo. Si bien el calcio forma parte del sistema fotosintético y varias rutas metabólicas, y tiene un papel fundamental en la estructura de la membrana y pared celular (Esakkimuthu et al., 2016). Di Caprio et al. (2018a) y Casá et al. (2022), reportaron que el crecimiento de *Scenedesmus* sp. disminuyó para algunas concentraciones de calcio, posiblemente por insolubilización de algunos nutrientes.

Los componentes que mostraron efectos positivos significativos sobre el crecimiento de la microalga fueron nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado y la solución “B”. Se resalta que ésta última, presentó el efecto en todos los análisis realizados. En base a los efectos observados, se decidió avanzar con la evaluación de curvas de crecimiento suplementadas con nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado y la solución “B”.

III.4.4. Evaluación de curvas de crecimiento suplementadas

Se muestran en las Figura III - 18, Figura III - 19 y Figura III - 20 los resultados experimentales obtenidos como puntos; para el Sistema 1 ($\text{NaNO}_3 = 1500 \text{ mg/L}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 74 \text{ mg/L}$; y solución “B”, citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$), el Sistema 2 ($\text{NaNO}_3 = 750 \text{ mg/L}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 37 \text{ mg/L}$; y solución “B”, citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$), y el Sistema 3 (Solución “B”, citrato amónico férrico = $0,0055 \text{ mg/L}$ y EDTA disódico = $0,001 \text{ mg/L}$); mientras que con la línea sólida o de trazos se muestran los correspondientes ajustes al modelo de Gompertz modificado.

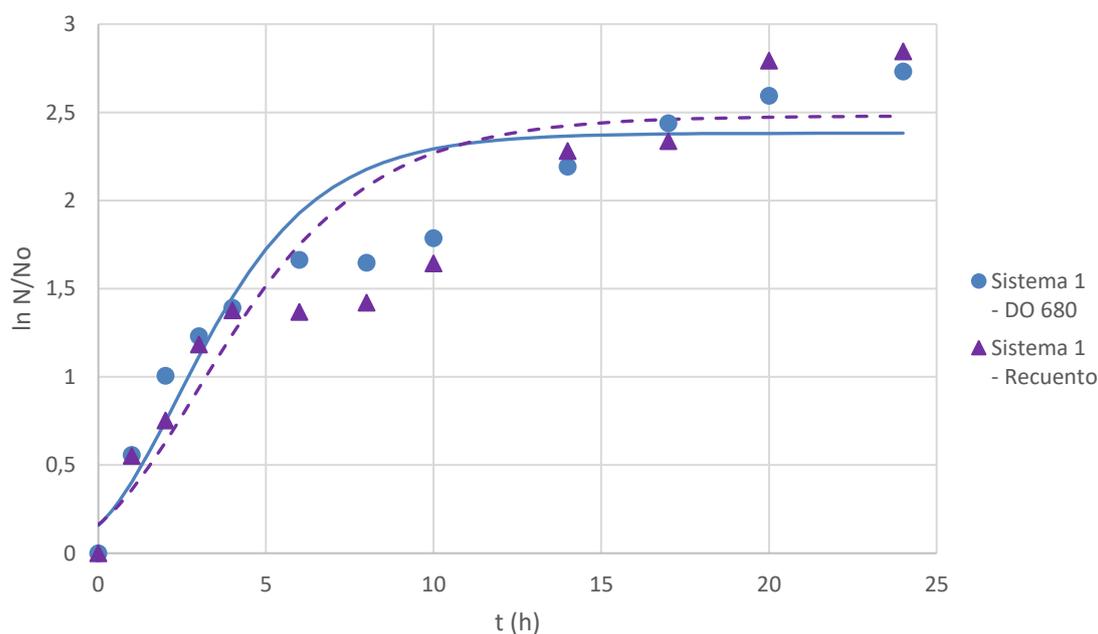


Figura III - 18: Curvas de crecimiento para el Sistema 1, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

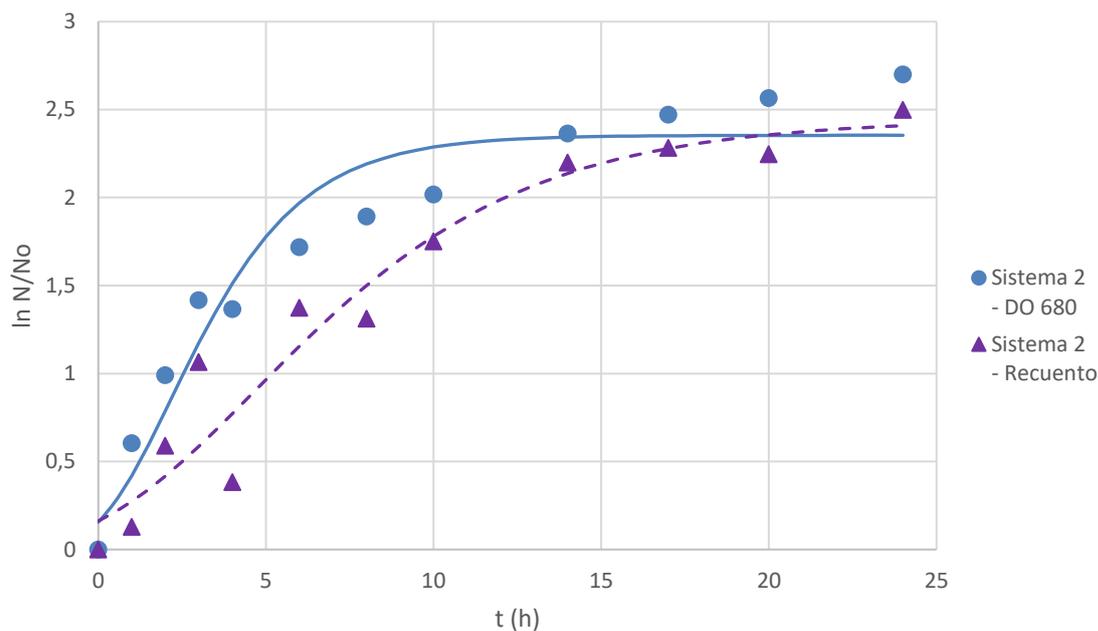


Figura III - 19: Curvas de crecimiento para el Sistema 2, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

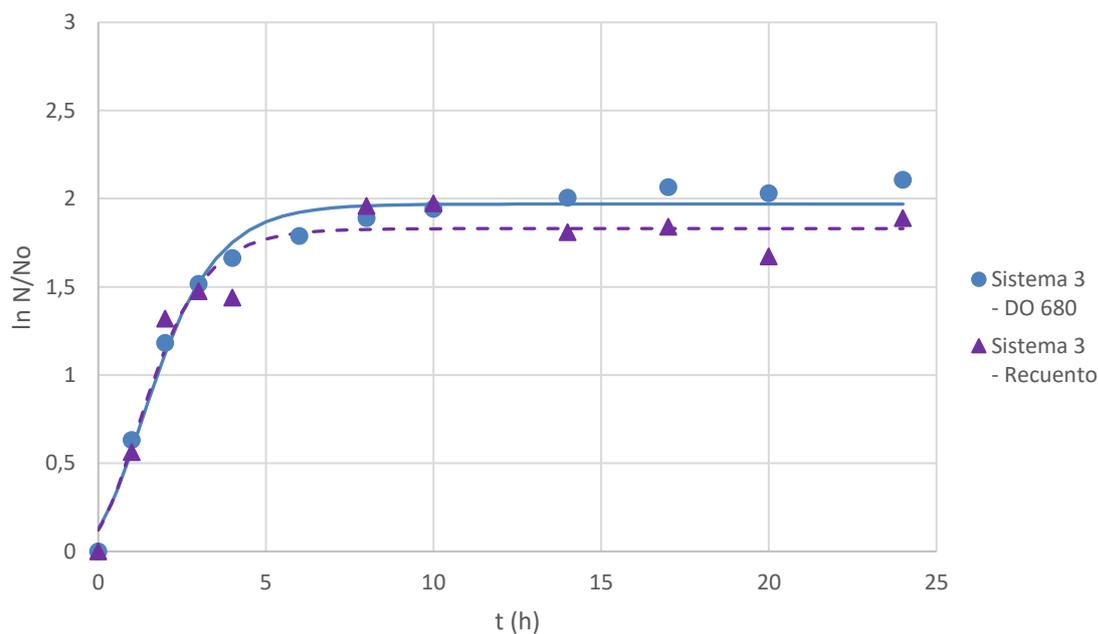


Figura III - 20: Curvas de crecimiento para el Sistema 3, medido por densidad óptica a 680 nm y por recuento celular. Los puntos y triángulos muestran los valores experimentales (valor medio) y las líneas sólida (DO 680) y punteada (Recuento) son el ajuste según la ecuación de Gompertz modificada.

En la Tabla III - 6 se indican para cada sistema los parámetros C y μ_{\max} . No se observó fase *lag*, por lo que se le asignó el valor de "0" para realizar el ajuste. La variable C denota el valor asintótico de la función, el cual se interpreta como el mayor valor alcanzado del logaritmo de la variable dependiente dividido el valor de dicha variable al tiempo inicial y μ_{\max} es el máximo valor alcanzado de la velocidad específica de crecimiento, en d^{-1} .

Tabla III - 6: Variables de ajuste según el modelo de Gompertz modificado. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

		Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Densidad óptica	C	2,4±0,1 ^a	2,4±0,1 ^a	1,97±0,04 ^b
	μ_{\max} (d^{-1})	1,0±0,1 ^a	1,1±0,1 ^a	1,55±0,09 ^c
	<i>lag</i> (d)	N/D	N/D	N/D
	R^2_{Aj} (%); DW	95,3; 1,02	94,2; 1,02	98,5; 1,07
Recuento en Cámara (cel/mL)	C	2,5±0,2 ^a	2,5±0,2 ^a	1,83±0,06 ^b
	μ_{\max} (d^{-1})	0,9±0,1 ^a	0,53±0,06 ^b	1,6±0,2 ^c
	<i>lag</i> (d)	N/D	N/D	N/D
	R^2_{Aj} (%); DW	93,4; 1,54	93,5; 2,78	95,6; 2,21

Se observó que los Sistemas 1 y 2, que contienen el ion magnesio y el ion nitrato, alcanzaron valores de C significativamente mayores ($p < 0,05$). Por otro lado, el Sistema 3 que no contiene estos iones, presentó velocidades específicas de crecimiento mayores (por ambos métodos). En estas curvas de crecimiento presentadas de la Figura III - 18 a la Figura III - 20, no fue observable una disminución del recuento del mismo modo que se evidencia en la Figura III - 12. En todos los sistemas se observó una tendencia a un mayor aumento de la concentración de la biomasa en los primeros días de cultivo, dado que superan la mitad de la concentración final en 5 – 6 días; quedando el restante en el triple de tiempo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los Sistemas 1 y 2. De manera que para los posteriores ensayos se optó por avanzar con el Sistema 2, ya que contiene la mitad de la concentración de sales de nitrato de sodio y sulfato de magnesio heptahidratado y el Sistema 3, solo suplementado con la solución B conteniendo citrato férrico y EDTA.

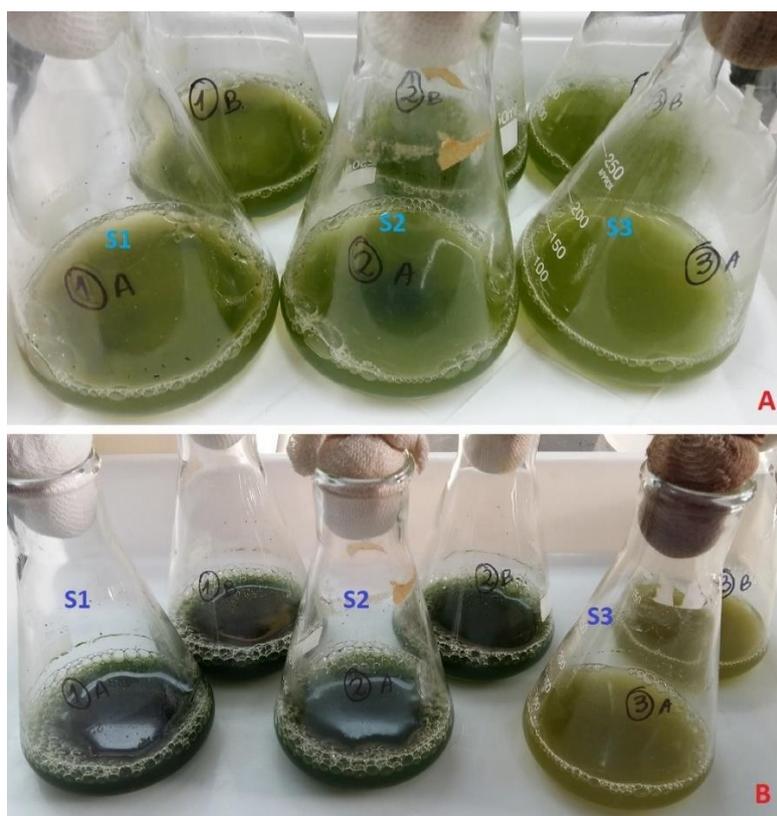


Figura III - 21: Fotos de los sistemas 1, 2 y 3 (S1, S2 y S3, respectivamente) de *S. quadricauda* a los A) 6 días y B) 20 días de incubación.

III.4.5. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono

En la Tabla III - 7 se muestran los parámetros de ajuste por el modelo de Gompertz para las curvas de crecimiento medidas por densidad óptica, así como la concentración final de biomasa alcanzada luego de 23 días de incubación. No se observó presencia de fase de latencia en ninguno de los dos sistemas. Las productividades calculadas fueron 1,7 y 1,3 g.L⁻¹.d⁻¹ para los Sistemas 2 y 3 respectivamente.

Tabla III - 7: Parámetros de ajuste según el modelo de Gompertz modificado y concentración final de biomasa.

	Sistema 2	Sistema 3
C	1,8±0,1 ^a	1,77±0,03 ^a
μ _{max} (d ⁻¹)	1,4±0,2 ^a	2,2±0,4 ^a
lag (d)	N/D	N/D
R ² _{Aj} (%); DW	94,6; 1,05	98,9; 1,28

Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

En la Figura III - 22 se muestran en conjunto los resultados de la medición de la DO de la biomasa y de la determinación de la DQO del medio de cultivo a lo largo de los 23 días. Las concentraciones finales de biomasa determinadas fueron 1,23 g/L para el Sistema 2 y 0,737 g/L para el Sistema 3. Puede observarse que durante los primeros 6 días de incubación, se consume aproximadamente en promedio el 70 % de la DQO en el medio del cultivo, mientras que durante los 17 días restantes el valor sólo disminuye en alrededor de un 12% adicional. De modo similar, el aumento de la DO de la biomasa durante los primeros 6 días de incubación fue por encima de 1,5 para ambos sistemas, mientras que en los 17 días restantes se observó un aumento de aproximadamente 1,9 para el Sistema 2 y de 0,6 para el Sistema 3. Ambos sistemas aumentan su biomasa de modo similar, mientras consumen la mayor parte del carbono disponible. Yang et al. (2000) reportaron que los mecanismos de consumo de carbono orgánico y el de fotosíntesis no funcionan en forma completamente independiente, si no que la capacidad fotosintética de la microalga analizada disminuyó en presencia de glucosa en el medio. Luego de los seis días, cuando el consumo de carbono se reduce, se observa que el Sistema 3 entra en una fase estacionaria, mientras que el Sistema 2 sigue creciendo, aunque a una velocidad aparente, para esta segunda etapa, menor que la mostrada en los primeros días. Posiblemente esta diferencia de comportamiento se deba a la disponibilidad de iones magnesio y nitrato que tiene el Sistema 2 que le permiten llevar a cabo fotosíntesis, mientras que el Sistema 3 encuentra deficiencia de los mismos. En la Figura III - 21 B se observa como el Sistema 2 presenta un color verde más oscuro, característico de aquellos sistemas que desarrollan mayor concentración de clorofila. Pancha et al. (2014) reportaron el mismo cambio de color ante la deficiencia de nitrógeno en el medio.

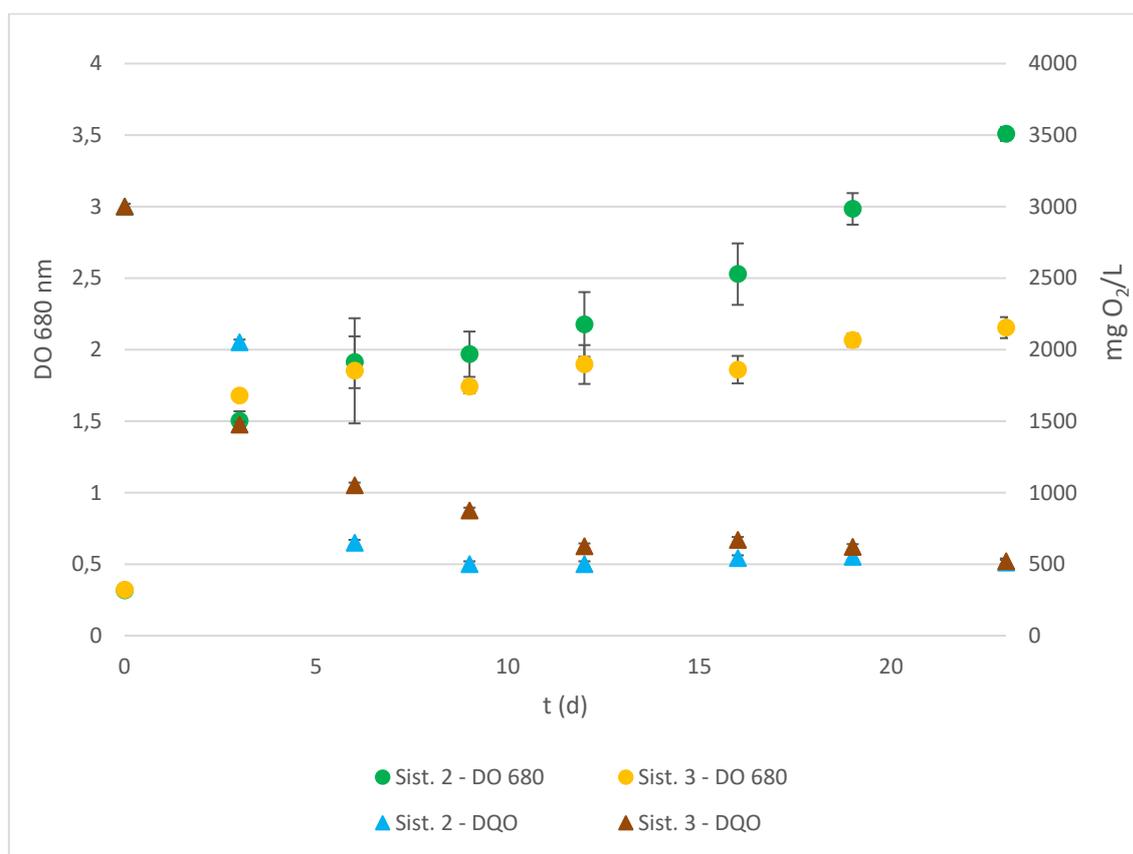


Figura III - 22: Crecimiento de la biomasa medida por densidad óptica a 680 nm (eje vertical izquierdo) y demanda química de oxígeno del medio de cultivo en mg O₂/mL (eje vertical derecho), de los Sistemas 2 y 3.

Se ha reportado que la capacidad de remoción de DQO de especies de *Scenedesmus* puede alcanzar el 66,8% para efluente cervecero sintético (Mata et al., 2012), aproximadamente 80% para efluente de molienda de azúcar (Shashirekha et al., 2016) y entre 65 y 80% para *S. quadricauda* incubada en efluente doméstico (Han et al., 2015). Álvarez-Díaz et al. (2015) reportaron concentraciones finales de biomasa de *S. obliquus* luego de 25 días de incubación con efluente doméstico de tratamiento secundario entre 0,81 y 1,2 g/L; Mata et al. (2012) reportaron concentraciones entre 0,60 y 0,70 g/L de *S. obliquus* luego de 5 a 6 días de incubación en efluente cervecero sintético.

Resulta de interés analizar el comportamiento de los sistemas en los primeros 6 días. Las concentraciones de biomasa obtenidas en este día de medición para los Sistemas 2 y 3 fueron 0,65 y 0,63 g.L⁻¹; obteniendo productividades hasta este punto de 0,92 y 1,4 g.L⁻¹.d⁻¹ respectivamente. La productividad del Sistema 3 calculada hasta 6 días de cultivo es muy similar a la calculada para el Sistema 2 luego de 23 días. Teniendo en cuenta este análisis, se concluye que el Sistema 3

resulta más conveniente dado que requiere de menor suplementación, alcanzando la máxima productividad en pocos días de incubación.

III.4.6. Composición bioquímica

III.4.6.1. Determinación de concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos

En la Figura III - 23 se muestran los contenidos, expresados en porcentaje de masa de analito por masa de biomasa en base seca, de lípidos, carbohidratos y proteínas. Las concentraciones de biomasa fueron 1,2 y 0,74 g.L⁻¹ en base seca para los Sistemas 2 y 3 respectivamente. En general, el contenido de lípidos desarrollado se encuentra entre 30 y 40% bs; el de proteínas 27 a 37% y el de carbohidratos 5 a 10%. El Sistema 2, que contiene suplementación con nitrato, tiene un contenido de proteínas significativamente mayor ($p < 0,05$), mientras que los lípidos y carbohidratos están en concentraciones significativamente mayores en el Sistema 3.

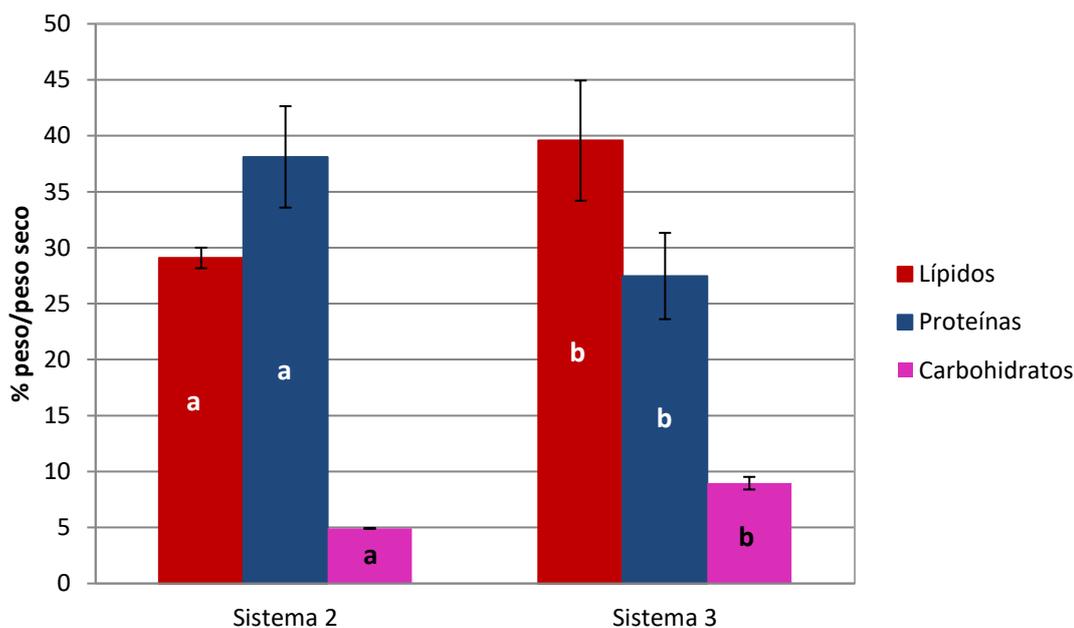


Figura III - 23: Concentración de lípidos, proteínas y carbohidratos, expresadas en porcentaje de peso de biomolécula por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo metabolito.

Se han reportado contenidos de lípidos de 25,4% para *Scenedesmus* sp. en medio BG11 con efluente urbano sintético (Wang et al., 2016); valores entre 31,7 y 49,0% para varios sistemas de *S. obliquus* luego de 25 días de incubación con efluente doméstico de tratamiento secundario con distintos regímenes de aireación, iluminación y salinidad (Álvarez-Díaz et al., 2015); y un

promedio de 32% para *Scenedesmus* sp. en medio con efluente de prensado de olivas diluido con BG11 o con agua y suplementos de macronutrientes (Di Caprio et al., 2015). Respecto al contenido de proteínas, se reportaron porcentajes en base seca de entre 31,1 y 36,5% para *S. quadricauda* incubada en medio BG11 y en efluente doméstico (Han et al., 2015); un contenido de 55,4% en *S. obliquus* incubada en efluente de molienda de azúcar (Shashirekha et al., 2016). Algunos reportes de contenido de carbohidratos son 30,8% en *S. obliquus* incubada en efluente de molienda de azúcar (Shashirekha et al., 2016); alrededor de 7% para *S. quadricauda* axénica y no axénica incubada en efluente de acuicultura (Halfhide et al., 2014).

Pancha et al. (2014) reportaron que la deficiencia de nitrógeno en el medio deriva en un detrimento del contenido de proteínas, pero también en la reducción del contenido proteico de un mismo cultivo, pudiendo suceder que las proteínas son canibalizadas ante la necesidad de nitrógeno. También indicaron que, ante la deficiencia de nutrientes y otras condiciones de estrés, el flujo del carbono en las microalgas cambia hacia la producción de compuestos de alto almacenamiento energético, como lípidos y carbohidratos, compitiendo entre sí por la síntesis. La falta de nitrógeno dio lugar a un incremento del contenido de estos compuestos en la biomasa analizada. Zhang et al. (2021) reportaron un aumento del contenido de lípidos cuando de incubó *S. dimorphus* con efluente de producción de ácido láctico, en deficiencia de nitrógeno del medio. También encontró que tanto la ausencia como las altas concentraciones de ion magnesio llevan a la acumulación de lípidos, aunque altas concentraciones de este ion no limitan la biomasa total alcanzada.

Retomando la discusión del apartado III.4.5. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono si bien la productividad general es mayor en el Sistema 2, el Sistema 3 tiene tendencia a mostrar mayor productividad a los 6 días de incubación, que es el período de tiempo necesario para consumir alrededor del 70% del carbono disponible (medido como DQO). Así mismo, el Sistema 3 presenta un contenido significativamente mayor de lípidos, debido a la posible deficiencia de nitrógeno asimilable. Dado que la aplicación que se buscó para la biomasa obtenida es utilizar los aceites producidos, se decidió escalar el Sistema 3, en modo fed-batch por pulsos, reponiendo las fuentes de carbono (efluente) y nutrientes indispensables (citrato amónico férrico).

III.4.6.2. Determinación de concentración de pigmentos

Se encontraron contenidos de clorofila *a* de 0,50 y 0,12% y de carotenoides de 0,25 y 0,089% para los Sistemas 2 y 3 respectivamente. En la Figura III - 24 se observan graficados junto a su desvío

estándar. El contenido de pigmentos encontrado en el Sistema 2 fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el Sistema 3.

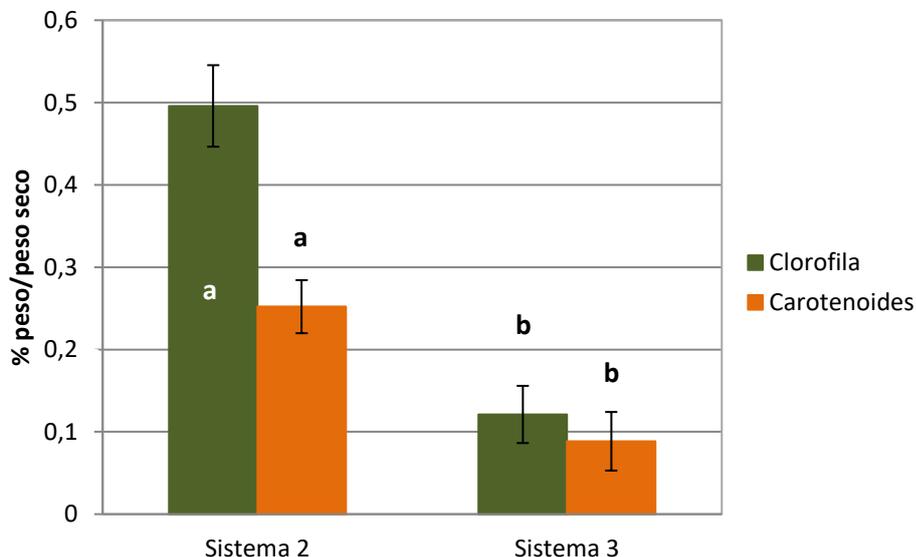


Figura III - 24: Concentración de clorofila a y carotenoides, expresadas en porcentaje de peso de pigmento por peso de seco de biomasa. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar; letras distintas denotan diferencias significativas entre sistemas ($p < 0,05$).

Se ha reportado que la deficiencia de nitrato en el medio de cultivo de *Scenedesmus* sp. llevó a la reducción significativa del contenido de pigmentos en la biomasa, que también fue observable en la pérdida de color verde del cultivo. Así mismo, la relación entre carotenoides y clorofila aumentó; lo cual podría ser un mecanismo de protección ante el estrés oxidativo y ante la falta del nitrógeno necesario para sintetizar clorofila (Pancha et al., 2014). Algunos de los contenidos de clorofila *a* reportados en bibliografía son 0,043 a 0,38% para *S. obliquus* en efluente de extracción de aceite de oliva al 5% v/v (Hodaifa et al., 2010); porcentaje en peso seco \approx 0,22% para *S. obliquus* incubada en efluente de molienda de azúcar (Shashirekha et al., 2016) y valores entre 0,07 a 0,10% para *S. quadricauda* axénica y no axénica incubada en efluente de acuicultura (Halfhide et al., 2014). Respecto a carotenoides, se han encontrado reportes de valores entre 0,04 y 0,21% para *S. obliquus* en efluente de extracción de aceite de oliva al 5% v/v (Hodaifa et al., 2010).

Si bien la productividad general es mayor en el Sistema 2, el Sistema 3 tiene tendencia a mostrar mayor productividad a los 6 días de incubación, que es el período de tiempo necesario para consumir alrededor del 70% del carbono disponible (como DQO). Así mismo, el Sistema 3 presenta un contenido significativamente mayor de lípidos, debido a la posible deficiencia de

nitrógeno asimilable. De manera que resulta interesante estudiar la microalga obtenida por este proceso para la generación de aceites. De este modo, se decidió escalar el Sistema 3, en modo fed-batch, reponiendo las fuentes de carbono (efluente) y nutrientes indispensables (citrato amónico férrico, junto al EDTA disódico).

III.4.7. Escalado

De los sistemas evaluados en los puntos III.3.4.3. Curvas de crecimiento y seguimiento del consumo de carbono y III.3.6. Determinación de la composición bioquímica, se procedió a escalar el Sistema 3, en modo de alimentación pulsada fed-batch, utilizando un Erlenmeyer de 5 L en agitación orbital, o un tanque agitado de 3 L. El criterio utilizado para determinar los pulsos de alimentación fue el de agregar la cantidad de medio fresco necesario para reponer la DQO inicial en períodos de 6 días, ya que es donde se observó el máximo crecimiento y consumo de nutrientes (Figura III - 22). En la Figura III - 25 se muestra el tanque agitado y su correspondiente sistema de iluminación.



Figura III - 25: Biorreactor tanque agitado con cultivo de *S. quadricauda*. Imágenes tomadas durante la incubación y toma de muestras.

III.4.7.1. Seguimiento de la biomasa

Las concentraciones finales de biomasa, en base seca, obtenidas fueron 1,68 y 0,887 g/L para los biorreactores tanque agitado y Erlenmeyer 5 L respectivamente. En las Figura III - 26 y Figura III - 27 se muestran las mediciones de la biomasa cada seis días durante los 24 días de incubación, por densidad óptica y por recuento en cámara.

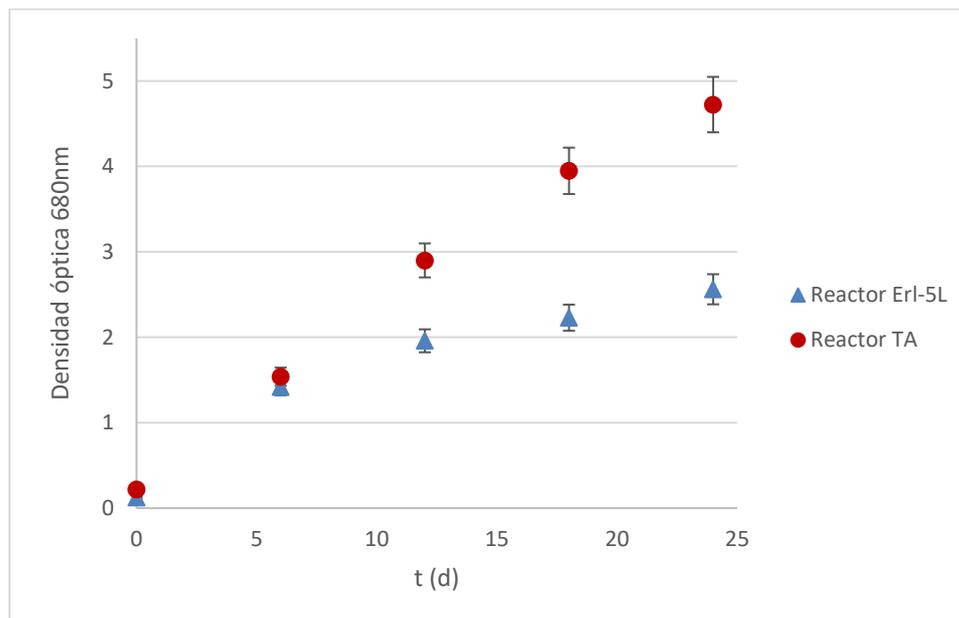


Figura III - 26: Seguimiento de la biomasa en los biorreactores por densidad óptica a 680 nm. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar del método.

Se puede observar que el sistema en el biorreactor tanque agitado mostró mejor crecimiento que el sistema en el frasco Erlenmeyer de 5 L de capacidad. Del mismo modo que se discutió esta diferencia para *C. vulgaris* en el Capítulo II.4.4.2. Curvas de crecimiento, posiblemente la agitación y burbujeo del tanque agitado mejora el acceso a los nutrientes y mejora el nivel de oxígeno disuelto. En el régimen mixotrófico, si bien ocurre el proceso fotosintético, para el consumo de fuentes de carbono es necesario también consumir oxígeno (Yang et al., 2000). Más aún, las microalgas en suspensión podrían tener mejor acceso a la incidencia de luz con un mezclador más eficiente, como el del tanque agitado.

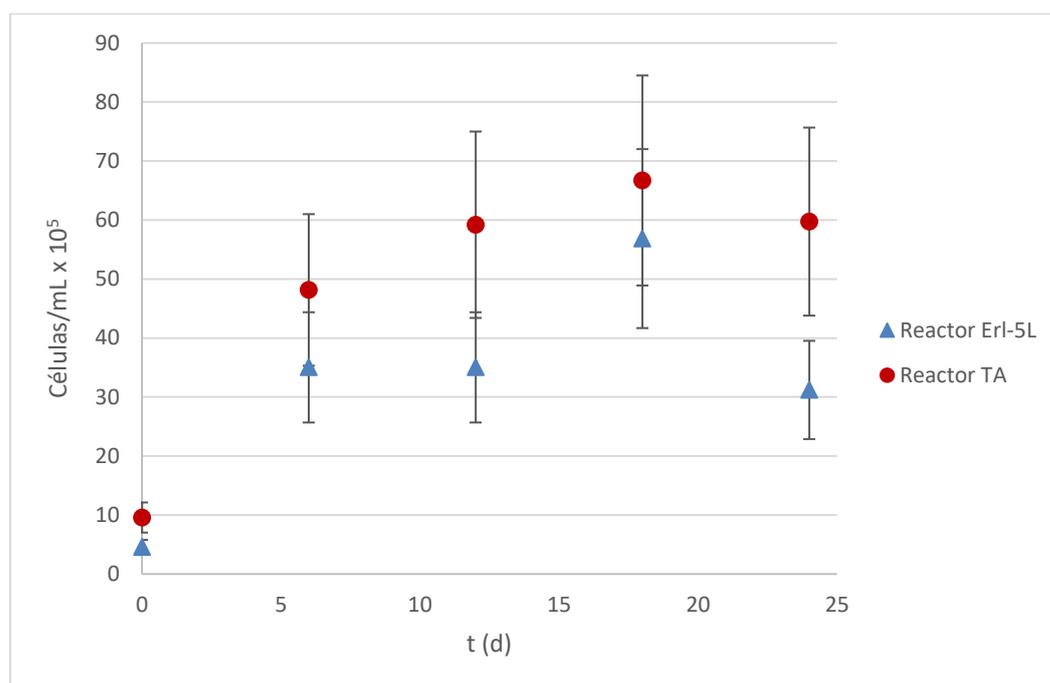


Figura III - 27: Seguimiento de la biomasa en los biorreactores por recuento en cámara de Neubauer. Las barras muestran la media \pm el desvío estándar del método.

Si bien los sistemas en menor escala se realizaron en cultivo batch, y el escalado se realizó en fed-batch por pulsos; se puede comparar el valor de velocidad específica de crecimiento calculada según la Ecuación III - 2 para el Sistema 3 en menor escala, así como su densidad óptica y recuento celular, a los 6 días de incubación; tiempo al cual los sistemas escalados aún no han tenido reposición de alimentación fresca. Para el Sistema 3 en Erlenmeyer de 250 mL se obtuvo un aumento de la DO 680 nm (respecto al valor de inoculación al día 0) a los 6 días de 1,53; un aumento del recuento celular de $3,11 \cdot 10^6$ células/mL; y una μ de $0,292 \text{ d}^{-1}$. Para el mismo Sistema 3, incubado hasta el día 6 en el reactor tanque agitado y en el Erlenmeyer de 5 L de capacidad, el aumento de la DO fue 1,32 y 1,30; el aumento del recuento celular $3,86 \cdot 10^6$ y $3,05 \cdot 10^6$ células/mL; y la μ fue $0,324$ y $0,406 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Los valores para las tres variables calculadas para los tres sistemas de cultivo se encuentran en valores similares en todos los casos.

Se observa en la Tabla III - 8 que, para ambos biorreactores, la velocidad específica de crecimiento y el aumento en la concentración de biomasa de cada etapa de seis días tienden a disminuir con el avance de los días. Una posible explicación es la acumulación de compuestos con efectos inhibitorios o biocidas al ir alimentando con efluente fresco, del mismo modo que reporta Di

Caprio et al. (2018b) en el cultivo fed-batch de *Scenedesmus* sp. con efluente de prensado de olivas.

Tabla III - 8: Velocidades específicas de crecimiento y concentraciones máximas de biomasa de cada etapa de seis días del cultivo fed-batch por pulsos.

Etapa	Biorreactor Erlenmeyer 5L		Biorreactor Tanque Agitado	
	μ (d ⁻¹)	Conc. máxima (g/L)	μ (d ⁻¹)	Conc. máxima (g/L)
0 - 6 días	0,41	0,48	0,32	0,48
6 - 12 días	0,054	0,20	0,11	0,50
12 - 18 días	0,022	0,099	0,051	0,39
18 - 24 días	0,023	0,12	0,030	0,29

Se encontró que fue posible escalar satisfactoriamente el cultivo *S. quadricauda* en régimen fed-batch por pulsos, logrando mejores parámetros cinéticos con el biorreactor tanque agitado; y por lo tanto, logrando hasta duplicar la concentración final de biomasa alcanzada.

III.4.7.2. Composición bioquímica

Finalizado el tiempo total de incubación de 24 días, se procedió a tomar muestras para la determinación de concentración de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos (clorofila y carotenoides).

En la Tabla III - 9 se muestran los valores de porcentaje en peso de biomoléculas y pigmentos para los dos sistemas escalados, y el sistema sin escalar que fue incubado con la misma composición inicial de medio de cultivo, en todos los casos al final del tiempo total de incubación. El sistema sin escalar fue sometido a un régimen completamente batch.

Tabla III - 9: Porcentaje en peso base seca de lípidos, proteínas, carbohidratos, clorofila y carotenoides contenidos en la biomasa. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas para cada metabolito ($p < 0,05$).

% peso / peso seco de biomasa	Lípidos	Proteínas	Carbohidratos	Clorofila <i>a</i>	Carotenoides
Reactor TA	27,1±2,3 ^a	32,4±4,2 ^a	4,17±0,15 ^a	0,186±0,036 ^a	0,103±0,027 ^a
Reactor Erlenmeyer 5L	26,9±2,2 ^a	33,7±4,4 ^a	5,64±0,20 ^b	0,063±0,012 ^b	0,060±0,016 ^a
Sistema 3 (Erl. 250 mL)	39,6±5,4 ^b	27,5±3,9 ^a	8,96±0,56 ^c	0,121±0,035 ^{ab}	0,086±0,036 ^a

Se observaron cantidades significativamente ($p < 0,05$) menores de lípidos y carbohidratos, y una tendencia a mayor contenido de proteínas, en los sistemas con régimen fed-batch por pulsos. Respecto a los pigmentos, se observó que el biorreactor Erlenmeyer 5 L mostró un contenido significativamente menor de clorofila *a* que el biorreactor tanque agitado, sin embargo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de carotenoides. La menor concentración de lípidos y carbohidratos en los sistemas con alimentación fed-batch podrían indicar que este tipo de alimentación reduce el estrés celular por falta de nutrientes, dado que éste es una de las causas de aumento de la concentración de estas biomoléculas como sistema de supervivencia (Pancha et al., 2014).

Sarat Chandra et al. (2016) encontraron que el contenido de lípidos en *S. obtusus* en un medio formulado con acetato como fuente de carbono pudo ascender a 26,8%. Msanne et al. (2020) reportaron porcentajes en base seca de lípidos de 27% para *S. quadricauda* en efluente cervecero y para *S. obliquus* en efluente de industria avícola y 26,5% para *S. Obliquus* en efluente de planta municipal. (Zhang et al., 2021) reportaron porcentajes entre 25 y 34% de lípidos para distintos sistemas de efluente de producción de ácido láctico con distintas sales suplementadas del medio BG11, para *S. dimorphus*. Msanne et al. (2020) reportaron porcentajes en bs de proteínas entre 19 y 28,5% para *S. Obliquus* en efluente de planta municipal y 54,5% para un consorcio conteniendo *Scenedesmus* sp. con efluente de planta de tratamiento municipal diluido al 10-15%; así como porcentajes (bs) de carbohidratos de $\approx 9\%$ para un consorcio conteniendo *Scenedesmus* sp. con efluente de planta de tratamiento municipal diluido al 10-15%. (Rai & Gupta, 2017) reportaron contenidos de hidratos de carbono entre 17 y 30% para *S. abundans* en diferentes medios de cultivo.

A partir de los resultados obtenidos, se pudo calcular la productividad global de lípidos luego del total del período de incubación, obteniendo valores de $57,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para el sistema en el biorreactor tanque agitado; de $30,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para el sistema en el biorreactor Erlenmeyer de 5 L; y de $24,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para el sistema en menor escala (Erlenmeyer de 250 mL).

El escalado de *S. quadricauda* permitió mejorar la productividad de lípidos, posiblemente mediante la reducción del estrés por falta de nutrientes; sin afectar significativamente los porcentajes de proteínas y pigmentos.

III.4.7.3. Determinación de demanda química de oxígeno

Finalizado el tiempo total de incubación de 24 días, se procedió a tomar muestras del cultivo en el biorreactor tanque agitado para la determinación de la DQO en el medio agotado.

Si bien la DQO inicial fue de 3075 mg O₂/mL, y cada 6 días se volvió a ajustar al mismo valor, la cantidad total de carbono adicionada al sistema, medida en DQO, fue de \approx 9313 mg O₂/mL. El valor final medido fue de 3445 ± 20 mg O₂/mL. El carbono total consumido durante el período completo de incubación fue de \approx 5868 mg O₂/mL. Esto representa un aumento del 236% en la cantidad de carbono aprovechado del medio de cultivo en comparación al Sistema 3 en menor escala y en modo batch, cuya cantidad de carbono total consumida en todo el período de cultivo, medida como DQO, fue de 2480 mg O₂/mL. Por lo tanto, el régimen fed-batch por pulsos aplicado durante el escalado, permite aprovechar una mayor cantidad de carbono con cada cultivo.

III.4.8. Aplicación de la biomasa: perfil de ácidos grasos

En la Tabla III - 10 se muestran los resultados de la determinación del perfil de ácidos grasos, expresados en gramos de ácidos grasos por cada 100 g de ésteres metílicos. Se observó que el 54,9% de los ácidos grasos son insaturados (al menos un doble enlace); del restante aproximadamente la mitad son saturados y otra mitad no identificados (Figura III - 28). Los ácidos no identificados podrían ser ácidos insaturados de cadena más larga a los analizados, los cuales no pueden ser determinados por el método disponible (Clapper, 2009); posiblemente porque las microalgas poseen una diversificación de ácidos grasos mayor en comparación con plantas superiores (de Souza et al., 2020). La relación en peso de ácidos poliinsaturados respecto a los saturados (P/S) fue 1,25.

Maltsev & Maltseva (2021) reportaron que los principales ácidos grasos que produce la clase *Chlorophyceae*, en la cual se encuentra *Scenedesmus*, son C16:0, C16:4, C18:1, C18:2, C18:3. Rai & Gupta (2017) reportaron 26,8% de ácidos grasos monoinsaturados y 25,2% de poliinsaturados en lípidos extraídos de *S. abundans* cultivada en medio Fogg's. Zhang et al. (2021) encontraron para *S. dimorphus* porcentajes de ácidos grasos saturados de 31,6 y 28,6% cuando se incubó en medio BG11 y en efluente sintético similar al de la producción biotecnológica de ácido láctico, respectivamente. Para esta misma microalga en el efluente sintético, encontró también 53,8% de ácidos grasos monoinsaturados y de 17,1% poliinsaturados.

Tabla III - 10: determinación de ácidos grasos, resultados expresados en gramos de ácido graso por cada 100 gramos de ésteres metílicos.

Ácidos Grasos	% m/m	Nombre
C6:0	1,0	Ácido hexanoico
C13:0	1,5	Ácido tridecanoico
C16:0	17,3	Ácido palmítico
C16:1 (7Z)	2,3	Ácido palmitoleico (7-cis)
C16:1 (9Z)	0,9	Ácido palmitoleico (9-cis)
C18:0	1,7	Ácido esteárico
C18:1 (11Z)	2,9	Ácido 11-octadecenoico
C18:1 (9Z)	21,0	Ácido oleico
C18:2 (9Z,12Z)	7,8	Ácido linoleico
C18:3 (9Z,12Z,15Z)	18,0	Ácido α -linolénico
C20:0	0,4	Ácido eicosanoico
C20:1 (11Z)	0,5	Ácido 11-eicosenoico
C20:2 (11Z,14Z)	1,5	Ácido eicosadienoico
No identificados	23,4	-

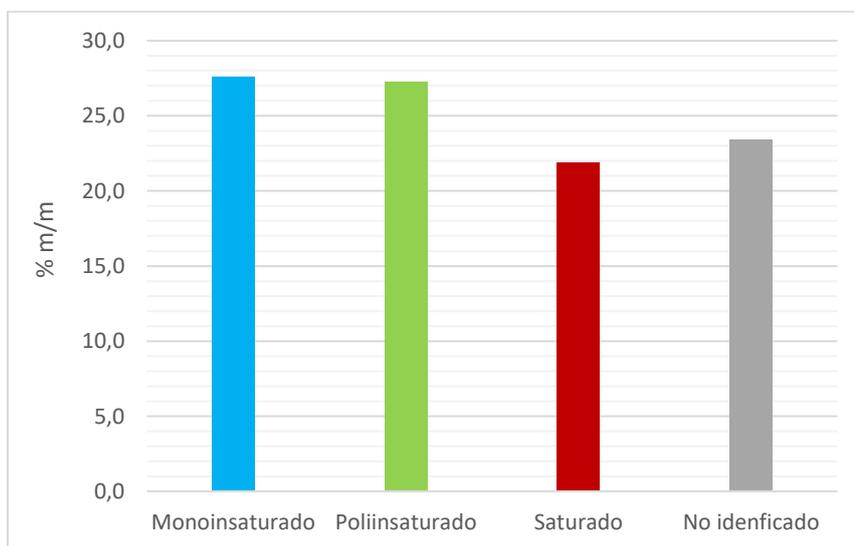


Figura III - 28: Porcentaje de ácidos grasos por grupo de saturación en los lípidos de *S. quadricauda*.

Comparando el perfil de ácidos grasos de la biomasa cultivada en el presente trabajo con aceites vegetales de consumo habitual, se encontró que contiene un porcentaje similar de ácidos grasos

saturados al de aceite de maíz ($25,1 \pm 1,8$ %), aceite de maní ($19,20 \pm 0,37$ %) y aceite de canola ($17,40 \pm 0,67$ %); el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados fue similar al aceite de maíz ($26,8 \pm 1,2$ %), aceite de palma ($22,5 \pm 2,2$ %), aceite de girasol ($31,5 \pm 4,5$ %), aceite de soja ($28,5 \pm 1,2$ %) y aceite de canola ($23,2 \pm 2,9$ %); y el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados se asemeja al del aceite de canola ($30,7 \pm 1,7$ %) y aceite de maní ($20,7 \pm 2,9$ %). La relación P/S de los lípidos de *S. quadricauda* se encontró en el mismo orden que dicha relación para aceite de maíz 1,91; aceite de maní 1,4 y aceite de canola 3,2. Los aceites con menor proporción de ácidos grasos saturados son más recomendados para el consumo humano, y el valor mínimo recomendado de esta relación es 0,4 (Kostik et al., 2013; Popova et al., 2016). De un análisis de numerosos tipos subproductos del refinado de aceites vegetales de consumo humano, los cuales se utilizan en formulaciones para alimentación animal, se reportaron un contenido de ácidos grasos saturados de $23,0 \pm 10,6$ y $59,8 \pm 25,7$ % y un contenido de ácidos grasos monoinsaturados (*cis*) de $43,4 \pm 15,7$ y $33,2 \pm 22,4$ %, respectivamente. Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, se reportó un contenido de ácidos Ω -3 de $1,4 \pm 1,0$ y $0,3 \pm 0,3$ %; y un contenido de ácidos Ω -6 $32,2 \pm 18,1$ y $6,7 \pm 3,4$ %, respectivamente (Varona et al., 2021). Los lípidos de *S. quadricauda* contuvieron 18,0 % de ácidos Ω -3 y 9,3 % de ácidos Ω -6. El contenido de Ω -3 de los lípidos de *S. quadricauda* supera ampliamente al reportado en los subproductos que se utilizan para formular productos de alimentación animal; mientras que el contenido de Ω -6 se encuentra dentro del rango de los dos tipos de subproductos de refinado de aceite informado por Varona et al. (2021). La baja concentración de Ω -3 tiene consecuencias perjudiciales en la salud humana, por lo cual una estrategia para atacar este problema es la obtención de productos cárnicos, avícolas y de acuicultura con alto contenido de este tipo de ácidos grasos; lo cual se logra a través de una alimentación animal rica en los mismos (Maltsev & Maltseva, 2021).

Los índices hipocolesterolémico (HI), aterogénico (AI) y trombogénico (TI) son relaciones entre ácidos grasos insaturados y saturados específicos, que tienen efectos positivos y negativos sobre la salud, respectivamente. El HI relaciona ácidos grasos que favorecen la disminución del nivel de colesterol con ácidos grasos que tienen el efecto de aumentarlo. El AI relaciona ácidos grasos que promueven la adhesión de grasas en las paredes del sistema circulatorio con aquellos que tienen el efecto opuesto. El TI muestra la relación entre ácidos grasos que promueven y mitigan el riesgo de formación de trombos (Fernández et al., 2007; Garaffo et al., 2011; Aussant et al., 2018). Los valores de HI, AI y TI del perfil de ácidos grasos de la biomasa de *S. quadricauda*, fueron 2,8; 0,32 y 0,26; respectivamente. Aussant et al. (2018) reportaron valores de HI para ocho especies de

microalgas distintas de entre 0,60 y 2,4; a mayor valor HI, mayor es el beneficio nutricional. Valores por encima de 2,5 son muy favorables (Fernández et al., 2007). Respecto a los índices AI y TI, el valor recomendado para una dieta saludable en humanos es menor a 0,5 (Popova et al., 2016). Vale la pena destacar que aproximadamente 23,4% m/m de los ácidos grasos no pudieron ser identificados (Tabla III - 10), por lo tanto, no fueron tenidos en cuenta para el cálculo de los índices. De manera que se espera que estos índices puedan arrojar mejores valores que los aquí obtenidos.

Por lo expuesto anteriormente, se concluye que los lípidos extraídos de la biomasa de *S. quadricauda* presentan un perfil de alto valor nutricional, por lo cual tendrían el potencial de aplicarse a la nutrición humana y animal.

III.5. Conclusiones

En el presente capítulo se demostró que es posible cultivar *Scenedesmus quadricauda* no axénica en un medio de cultivo que contiene efluente cervecero. La microalga aumentó su densidad óptica a lo largo de 6, 13 y 20 días al mismo tiempo que fue capaz de controlar el crecimiento de la población de aerobios acompañante. Del análisis de las mediciones realizadas a los 6 días se observó que la concentración inicial de efluente cervecero, expresada en DQO, tuvo un efecto lineal positivo y un efecto cuadrático negativo significativo en la densidad óptica de la biomasa; mientras que tanto el pH como la DQO tuvieron efectos significativos sobre el crecimiento de aerobios, lineales y cuadráticos positivos, así como interacción antagónica entre ellas. Luego de 13 días, el efecto lineal de la DQO sobre la biomasa se invirtió, siendo negativo, mientras que se mantuvo el efecto cuadrático; y apareció el efecto significativo cuadrático positivo del pH. A final de la incubación, luego de 20 días, el único efecto significativo sobre la DO de la biomasa que se mantuvo fue el cuadrático negativo de la DQO del efluente; mientras que para el crecimiento de aerobios el efecto lineal de la DQO inicial fue positivo y el cuadrático del pH fue positivo. De las optimizaciones múltiples realizadas y corroboradas sobre el diseño, se optó por continuar con los valores de DQO inicial de 3075 mg O₂/mL y un pH inicial de 7,25 para la incubación, ya que estas condiciones maximizaron la densidad óptica en todos los intervalos estudiados.

De la evaluación del diluyente del efluente y de la pre-adaptación de la microalga se concluyó que es necesario suplementar el agua desionizada utilizada para diluir el efluente, dado que los sistemas sin suplementos evidenciaron una fase de muerte cuando se siguió el crecimiento por recuento celular. Por otro lado, la pre-adaptación de la cepa no tuvo un efecto positivo en el crecimiento de

la microalga. Se observó en los parámetros cinéticos que el sistema diluido con agua y preadaptado un valor de C significativamente menor; mientras que la velocidad específica fue significativamente mayor en los sistemas diluidos con agua respecto al sistema con BG11 sin preadaptar. La fase de latencia no pudo ser determinada mediante ajuste al modelo de Gompertz modificado. Las curvas de crecimiento medidas por recuento celular en cámara de Neubauer no pudieron ser ajustadas para todos los sistemas mediante dicho modelo; debido a la aparición de una fase de muerte en los sistemas diluidos con agua.

A partir de los resultados observados en los ensayos de evaluación de los efectos de algunos de los componentes del medio de mantenimiento BG-11, y las posteriores curvas de crecimiento, se concluyó que suplementación del medio a base de efluente cervecero y agua destilada con la solución “B” de citrato amónico férrico y EDTA (Sistema 3), así como la adición de nitrato de sodio y sulfato de magnesio heptahidratado (Sistema 2), retrasa la fase de muerte en *S. quadricauda*. Por otro lado, no resultó en un beneficio adicional la suplementación con cloruro de calcio y los otros micronutrientes del medio de mantenimiento BG11.

Fue posible seguir simultáneamente el crecimiento de la biomasa, por densidad óptica, y el consumo de carbono, por medición de la DQO, para los Sistemas 2 y 3; obteniendo valores de velocidad de crecimiento de 1,4 y 2,2 d^{-1} , respectivamente. No se observó presencia de fase de latencia en ninguno de los dos sistemas. Las productividades calculadas fueron 1,7 y 1,3 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para los Sistemas 2 y 3 respectivamente. En los primeros 6 días de incubación se consumió alrededor del 70% de la carga de carbono en el medio de cultivo, medida en DQO. Durante el tiempo restante de incubación, el porcentaje de consumo se incrementa aproximadamente en 12% adicional. Durante los días de mayor consumo de carbono, se observó que ambos sistemas presentaron un comportamiento similar en sus curvas de crecimiento. Durante el tiempo restante de incubación, se observó que el sistema que contenía iones magnesio y nitrato continuó aumentando su biomasa mientras que el Sistema 3 ingresó en una etapa mayormente estacionaria. Los resultados de productividad a los 6 días de incubación fueron de 0,92 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para el Sistema 2 y de 1,4 $g.L^{-1}.d^{-1}$ para el Sistema 3.

Se encontraron porcentajes de proteínas, lípidos y carbohidratos de 38,1; 29,1 y 4,92% en el Sistema 2 y de 27,5; 39,6 y 8,96% en el Sistema 3, respectivamente. El Sistema 3 presentó contenidos significativamente mayores de lípidos y carbohidratos; y significativamente menor de proteínas. Respecto a la determinación de pigmentos, el contenido encontrado en el Sistema 2 fue

significativamente mayor que en el Sistema 3; presentando valores de 0,496 y 0,121% para clorofila *a*; y 0,252 y 0,0886% para carotenoides, respectivamente.

El Sistema 3 se pudo escalar satisfactoriamente en un biorreactor tanque agitado de 3 L de capacidad nominal y en un biorreactor frasco Erlenmeyer de 5 L de capacidad nominal, en un régimen fed-batch por pulsos. El medio a base de efluente cervecero previamente esterilizado, se repuso como alimentación fresca, cada 6 días, en cantidad necesaria para retornar a las concentraciones iniciales de carbono y catión hierro (III) del día 0 de incubación. El período total analizado fue de 24 días. El sistema en el biorreactor tanque agitado mostró un mejor crecimiento, obteniendo mayores valores de densidad óptica a medida que avanzó el tiempo de incubación, y una tendencia similar, aunque menos marcada, en el recuento celular. Las concentraciones finales de biomasa, en base peso seco, obtenidas fueron 1,68 y 0,887 g/L para los biorreactores tanque agitado y Erlenmeyer 5 L respectivamente. La comparación de parámetros cinéticos con el sistema en menor escala de llevó a cabo luego de 6 días de incubación, antes de la primera alimentación fresca, encontrando que tanto la velocidad específica de crecimiento (exponencial) como los aumentos en la densidad óptica a 680nm y en el recuento celular mostraron valores similares.

En la caracterización bioquímica de la biomasa cosechada luego de 24 días de incubación se encontró que el contenido de proteínas en ambos biorreactores no tuvo diferencias significativas entre sí, ni cuando se comparó con el sistema en menor escala. Este último, presentó un contenido de lípidos y carbohidratos significativamente mayor que el de los dos sistemas escalados; los cuales presentaron a su vez diferencias entre sí para hidratos de carbono (siendo el sistema en el tanque agitado el de menor contenido), pero no para lípidos. Se resalta que la productividad global de lípidos calculada (al final del período total de incubación en todos los sistemas) en base a los resultados obtenidos fue de 57,5 mg.L⁻¹.d⁻¹ para el sistema en el biorreactor tanque agitado; de 30,6 mg.L⁻¹.d⁻¹ para el sistema en el biorreactor Erlenmeyer de 5 L; y de 24,2 mg.L⁻¹.d⁻¹ para el sistema en menor escala (Erlenmeyer de 250 mL); duplicando así la misma para el sistema escalado en el tanque agitado. El sistema incubado en el biorreactor tanque agitado fue capaz de consumir carbono proveniente del efluente en más de 200% respecto al sistema en menor escala.

Los lípidos de la biomasa presentaron un perfil nutricional adecuado, tanto para alimentación humana como animal. Más de la mitad de los ácidos grasos fueron insaturados; y la relación p/p encontrada de ácidos grasos poliinsaturados respecto a saturados fue de 1,25. Los índices

hipocolesterolémico, aterogénico y trombogénico del perfil de ácidos grasos determinado para la biomasa de *S. quadricauda* cumplieron y mejoraron los valores recomendados.

Por último, se concluye que el efluente cervecero resultó una fuente de nutrientes adecuada para el crecimiento de *S. quadricauda* y la producción de biomasa para potencial obtención de lípidos con un perfil de ácidos grasos adecuado para nutrición.

III.6. Bibliografía

Abinandan, S., Bhattacharya, R., & Shanthakumar, S. (2015). Efficacy of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans* for Nutrient Removal in Rice Mill Effluent (Paddy Soaked Water). *International Journal of Phytoremediation*, 17(4), 377–381. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.910167>

Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 907–916. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.989313>

Akgül, F., Kizilkaya, İ. T., Akgül, R., & Erduğan, H. (2017). Morphological and Molecular Characterization of *Scenedesmus*-Like Species from Ergene River Basin (Thrace, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(3), 609–619.

Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M. C., & Perales, J. A. (2015). Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. *Bioresource Technology*, 181, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.018>

Anand, J., & Arumugam, M. (2015). Enhanced lipid accumulation and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Bioresource Technology*, 188, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.097>

Anand, V., Kashyap, M., Samadhiya, K., Ghosh, A., & Kiran, B. (2019). Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? *Biomass and Bioenergy*, 127, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.05.021>

Apandi, N., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Gani, P., Ibrahim, A., & Kassim, A. H. M. (2019). *Scenedesmus* Biomass Productivity and Nutrient Removal from Wet Market Wastewater, A Bio-kinetic Study. *Waste and Biomass Valorization*, 10(10), 2783–2800. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0313-y>

Arriada, A. de A., & Abreu, P. C. O. V. de. (2014). *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: An alternative for massive microalgae biomass production. <https://doi.org/10.5419/bjpg2014-0011>

Attia, Y. A., Al-Harhi, M. A., Korish, M. A., & Shiboob, M. M. (2015). Fatty acid and cholesterol profiles and hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of table eggs in the retail market. *Lipids in Health and Disease*, 14(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0133-z>

Aussant, J., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2018). Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5279–5297. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9001-x>

- Borowitzka, M. A., & Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press.
- Casá, N. E., Lois-Milevicich, J., Alvarez, P., Mateucci, R., & de Escalada Pla, M. (2022). *Chlorella vulgaris* cultivation using ricotta cheese whey as substrate for biomass production. *Journal of Applied Phycology*, *34*(2), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02685-3>
- Clapper, G. M. (2009). *AOCS Ce 1k-09 Direct Methylation of Lipids for the Determination of Total Fat, Saturated, cis- Monounsaturated, cis-Polyunsaturated and trans Fatty Acids by Gas Chromatography*. Association of American Feed Control Officials. https://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Regulatory/Committees/Lab-Methods-and-Services/Methods/fat_analysis_aocs.pdf
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aleman-Nava, G. S., Chandra, R., Garcia-Perez, J. S., Contreras-Angulo, J. R., Markou, G., Muylaert, K., Rittmann, B. E., & Parra-Saldivar, R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, *24*, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.018>
- Dahiya, A., Todd, J. H., & McInnis, A. (2012). Wastewater Treatment Integrated with Algae Production for Biofuel. En R. Gordon & J. Seckbach (Eds.), *The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology* (pp. 447–466). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1_24
- de Souza, R. A. S., Saldanha-Corrêa, F. M. P., Gallego, A. G., & Neto, A. M. P. (2020). Semi-quantitative determination of ash element content for freeze-dried, defatted, sulfated and pyrolysed biomass of *Scenedesmus* sp. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01699-8>
- Di Caprio, F., Altimari, P., & Pagnanelli, F. (2015). Integrated biomass production and biodegradation of olive mill wastewater by cultivation of *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, *9*, 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.007>
- Di Caprio, F., Altimari, P., & Pagnanelli, F. (2018a). Effect of Ca²⁺ concentration on *Scenedesmus* sp. Growth in heterotrophic and photoautotrophic cultivation. *New Biotechnology*, *40*, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.003>
- Di Caprio, F., Altimari, P., & Pagnanelli, F. (2018b). Integrated microalgae biomass production and olive mill wastewater biodegradation: Optimization of the wastewater supply strategy. *Chemical Engineering Journal*, *349*, 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.084>
- El-Sheekh, M. M., Bedaiwy, M. Y., Osman, M. E., & Ismail, M. M. (2014). Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Obliquus*. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*, *2*(2), 20–28.
- Esakkimuthu, S., Krishnamurthy, V., Govindarajan, R., & Swaminathan, K. (2016). Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy*, *88*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.019>
- Farooq, W., Lee, Y.-C., Ryu, B.-G., Kim, B.-H., Kim, H.-S., Choi, Y.-E., & Yang, J.-W. (2013). Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. Strains by simultaneous treatment of brewery wastewater and maximizing lipid productivity. *Bioresource Technology*, *132*, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.034>
-

- Fernández, M., Ordóñez, J. A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., & Hoz, L. de la. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, *101*(1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006>
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Ferreira, A. F., Tavares, M. L. A., Vladic, J., Vidović, S., Cvetkovic, D., Melkonyan, L., Avetisova, G., Goginyan, V., & Gouveia, L. (2019). Scenedesmus obliquus microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *13*(5), 1169–1186. <https://doi.org/10.1002/bbb.2032>
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A. S. S., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., Reis, A., & Gouveia, L. (2017). Scenedesmus obliquus mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, *165*, 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.232>
- Gantar, M., Obreht, Z., & Dalmacija, B. (1991). Nutrient removal and algal succession during the growth of Spirulina platensis and Scenedesmus quadricauda on swine wastewater. *Bioresource Technology*, *36*(2), 167–171. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90175-J](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90175-J)
- Garaffo, M. A., Vassallo-Agius, R., Nengas, Y., Lembo, E., Rando, R., Maisano, R., Dugo, G., & Giuffrida, D. (2011). Fatty Acids Profile, Atherogenic (IA) and Thrombogenic (IT) Health Lipid Indices, of Raw Roe of Blue Fin Tuna (Thunnus thynnus L.) and Their Salted Product “Bottarga”. Scientific Research Publishing. <http://www.scirp.org/Journal/Paperabs.aspx?paperid=7235>
- Gim, G. H., Kim, J. K., Kim, H. S., Kathiravan, M. N., Yang, H., Jeong, S.-H., & Kim, S. W. (2014). Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(2), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0920-8>
- Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., & Kant, A. (2016). Characterization and Screening of Native Scenedesmus sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock. *PLoS ONE*, *11*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155321>
- Gupta, S. K., Ansari, F. A., Nasr, M., Rawat, I., Nayunigari, M. K., & Bux, F. (2017). Cultivation of Chlorella sorokiniana and Scenedesmus obliquus in wastewater: Fuzzy intelligence for evaluation of growth parameters and metabolites extraction. *Journal of Cleaner Production*, *147*, 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.144>
- Halfhide, T., Åkerstrøm, A., Lekang, O. I., Gislerød, H. R., & Ergas, S. J. (2014). Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Research*, *6*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.009>
- Han, L., Pei, H., Hu, W., Jiang, L., Ma, G., Zhang, S., & Han, F. (2015). Integrated campus sewage treatment and biomass production by Scenedesmus quadricauda SDEC-13. *Bioresource Technology*, *175*, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.100>
- Hodaifa, G., Martínez, M. E., & Sánchez, S. (2010). Influence of temperature on growth of Scenedesmus obliquus in diluted olive mill wastewater as culture medium. *Engineering in Life Sciences*, *10*(3), 257–264. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000005>
- Jin, H., Chuai, W., Li, K., Hou, G., Wu, M., Chen, J., Wang, H., Jia, J., Han, D., & Hu, Q. (2021). Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green alga Chlorella sorokiniana for biomass production. *Biotechnology and Bioengineering*, *118*(10), 4138–4151. <https://doi.org/10.1002/bit.27890>

- Kamalanathan, M., Chaisutyakorn, P., Gleadow, R., & Beardall, J. (2018). A comparison of photoautotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth for biomass production by the green alga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Phycologia*, *57*(3), 309–317. <https://doi.org/10.2216/17-82.1>
- Kamalanathan, M., Dao, L. H. T., Chaisutyakorn, P., Gleadow, R., & Beardall, J. (2017). Photosynthetic physiology of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) under photoautotrophic and molasses-based heterotrophic and mixotrophic conditions. *Phycologia*, *56*(6), 666–674. <https://doi.org/10.2216/17-45.1>
- Kostik, V., Memeti, S., & Bauer, B. (2013). Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, *4*, 112–116.
- Lutzu, G. A., Zhang, W., & Liu, T. (2016). Feasibility of using brewery wastewater for biodiesel production and nutrient removal by *Scenedesmus dimorphus*. *Environmental Technology*, *37*(12), 1568–1581. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1121292>
- Maltsev, Y., & Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *20*(2), 515–547. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>
- Mata, T. M., Melo, A. C., Simões, M., & Caetano, N. S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, *107*, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109>
- Mohd Udaiyappan, A. F., Hasan, H. A., Takriff, M. S., Sheikh Abdullah, S. R., Mohd Yasin, N. H., & Ji, B. (2021). Cultivation and application of *Scenedesmus* sp. Strain UKM9 in palm oil mill effluent treatment for enhanced nutrient removal. *Journal of Cleaner Production*, *294*, 126295. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126295>
- Msanne, J., Polle, J., & Starckenburg, S. (2020). An assessment of heterotrophy and mixotrophy in *Scenedesmus* and its utilization in wastewater treatment. *Algal Research*, *48*, 101911. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101911>
- Navarro-López, E., Cerón-García, M. del C., López-Rodríguez, M., Acién-Fernández, F. G., & Molina-Grima, E. (2020a). Biostimulants obtained after pilot-scale high-pressure homogenization of *Scenedesmus* sp. Grown in pig manure. *Algal Research*, *52*, 102123. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102123>
- Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Acién, F. G., & Gouveia, L. (2020b). Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, *25*(3), 664. <https://doi.org/10.3390/molecules25030664>
- Nicodemou, A., Kallis, M., Agapiou, A., Markidou, A., & Koutinas, M. (2022). The Effect of Trophic Modes on Biomass and Lipid Production of Five Microalgal Strains. *Water*, *14*(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/w14020240>
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, *156*, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Popova, T., Ignatova, M., Petkov, E., & Stanišić, N. (2016). Difference in fatty acid composition and related nutritional indices of meat between two lines of slow-growing chickens slaughtered at different ages. *Archives Animal Breeding*, *59*(3), 319–327. <https://doi.org/10.5194/aab-59-319-2016>
-

- Raeisossadati, M., Moheimani, N. R., & Parlevliet, D. (2020). Red luminescent solar concentrators to enhance *Scenedesmus* sp. Biomass productivity. *Algal Research*, *45*, 101771. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101771>
- Rai, M. P., & Gupta, S. (2017). Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management*, *141*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.018>
- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Rocha, D. N., Martins, M. A., Soares, J., Vaz, M. G. M. V., de Oliveira Leite, M., Covell, L., & Mendes, L. B. B. (2019). Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, *289*, 121644. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121644>
- Rueler, J. G., & Ades, D. R. (1987). The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *SCENEDESMUS QUADRICAUDA* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, *23*(3), 452–457. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb02531.x>
- Salomón, R., Albarracín, I., & Pío, G. (2005). *Sensibilidad de Chlorella vulgaris y Scenedesmus quadricauda a la Cipermetrina. Fase preliminar*. Servicio de Toxicología del Sanatorio de Niños. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Sensibilidad+de+Chlorella+vulgaris+y+Scenedesmus+quadricauda+a+la+Cipermetrina.+Fase+preliminar&author=Ruth+Salom%C3%B3n&publication_year=2005
- Sarat Chandra, T., Deepak, R. S., Maneesh Kumar, M., Mukherji, S., Chauhan, V. S., Sarada, R., & Mudliar, S. N. (2016). Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology*, *207*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.044>
- Shashirekha, V., Sivakumar, M., & Seshadri, S. (2016). Effective C–N–P ratio for growth and nutrient removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* in sugar mill effluent. *Energy, Ecology and Environment*, *1*(5), 283–295. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0040-9>
- Shen, X.-F., Hu, H., Ma, L.-L., Lam, P. K. S., Yan, S.-K., Zhou, S.-B., & Zeng, R. J. (2018). FAMES production from *Scenedesmus obliquus* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures under different nitrogen conditions. *Environmental Science: Water Research & Technology*, *4*(3), 461–468. <https://doi.org/10.1039/C7EW00470B>
- Song, Y., Wang, X., Cui, H., Ji, C., Xue, J., Jia, X., Ma, R., & Li, R. (2021). Enhancing growth and oil accumulation of a palmitoleic acid-rich *Scenedesmus obliquus* in mixotrophic cultivation with acetate and its potential for ammonium-containing wastewater purification and biodiesel production. *Journal of Environmental Management*, *297*, 113273. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113273>
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, *35*(2), 171–205.
- Trainor, F. R. (1996). Reproduction in *Scenedesmus*. *ALGAE*, *11*(2), 183–201.
- Tripathi, R., Gupta, A., & Thakur, I. S. (2019). An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. *Renewable Energy*, *135*, 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.056>

- Vanerkar, A. P., Fulke, A. B., Lokhande, S. K., Giripunje, M. D., & Satyanarayan, S. (2015). Recycling and treatment of herbal pharmaceutical wastewater using *Scenedesmus quadricauda*. *Current Science*, *108*(5), 979–983.
- Varona, E., Tres, A., Rafecas, M., Vichi, S., Barroeta, A. C., & Guardiola, F. (2021). Composition and Nutritional Value of Acid Oils and Fatty Acid Distillates Used in Animal Feeding. *Animals*, *11*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/ani11010196>
- Wang, Z., Yao, X., Miao, M., Chen, Q., Kong, Q., Shang, D., Yu, J., & Fu, X. (2016). Effects of urban wastewater dilution on growth and biochemical properties of *Scenedesmus* sp. *Desalination and Water Treatment*, *57*(60), 29363–29370. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1186572>
- Wong, Y. k., Yung, K. k. l., Tsang, Y. f., Xia, Y., Wang, L., & Ho, K. c. (2015). *Scenedesmus quadricauda* for Nutrient Removal and Lipid Production in Wastewater. *Water Environment Research*, *87*(12), 2037–2044. <https://doi.org/10.2175/106143015X14362865227193>
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5494–5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Tiew, A., & Kassim, A. H. M. (2019). Optimising of *Scenedesmus* sp. Biomass production in chicken slaughterhouse wastewater using response surface methodology and potential utilisation as fish feeds. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(12), 12089–12108. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04633-0>
- Yang, C., Hua, Q., & Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *6*(2), 87–102. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)
- Yirgu, Z., Leta, S., Hussen, A., Khan, M. M., & Aragaw, T. (2021). Optimization of microwave-assisted carbohydrate extraction from indigenous *Scenedesmus* sp. Grown in brewery effluent using response surface methodology. *Heliyon*, *7*(5), e07115. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07115>
- Zhang, C., Wu, D.-J., & Zhong, C.-Q. (2021). Cultivating *Scenedesmus dimorphus* in lactic acid wastewater for cost-effective biodiesel production. *Science of The Total Environment*, *792*, 148428. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148428>
- Zhang, S. S., Liu, H., Fan, J. F., & Yu, H. (2015). Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* with domestic secondary effluent and energy evaluation for biodiesel production. *Environmental Technology*, *36*(7), 929–936. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.966769>
- Zhao, G., Yu, J., Jiang, F., Zhang, X., & Tan, T. (2012). The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. *Bioresource Technology*, *114*, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.129>

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

IV.1. Conclusiones generales

Como conclusiones generales se puede resaltar que:

- *C. vulgaris* creció satisfactoriamente en un medio de cultivo a base de efluente cervecero con mayor concentración de DQO que *S. quadricauda*.
- Ambas cepas se adaptaron rápidamente al medio conteniendo carbono, dado que no presentaron fase de latencia.
- Ambas cepas no axénicas pudieron crecer satisfactoriamente en consorcio con sus microorganismos acompañantes.
- *C. vulgaris* mostró una velocidad específica de crecimiento mayor, dado que alcanzó su concentración máxima de biomasa en aproximadamente 2 días, mientras que *S. quadricauda* tardó al menos 6 días en alcanzar la fase estacionaria.
- *C. vulgaris* pudo crecer en régimen de cultivo heterotrófico, mientras que *S. quadricauda* requirió de un fotoperíodo de 12 horas.
- *C. vulgaris* no requirió de suplementación en el medio de cultivo, mientras que para *S. quadricauda* fue necesaria la adición de citrato amónico férrico solubilizado con EDTA disódico.
- Respecto a los sistemas escalados: para *C. vulgaris* la concentración final de biomasa obtenida fue 1,08 y 0,85 g/L para el biorreactor tanque agitado y el Erlenmeyer de 5L, respectivamente, luego de 72 horas de incubación. Para *S. quadricauda* las concentraciones finales de biomasa, en base seca, obtenidas fueron 1,68 y 0,887 g/L para los biorreactores tanque agitado y Erlenmeyer 5L respectivamente, luego de 24 días de incubación.
- Para ambas microalgas, el sistema escalado en el biorreactor tanque agitado con burbujeo permitió un mejor crecimiento que el sistema en el Erlenmeyer de 5 L con agitación orbital.
- Ambas microalgas requirieron de un tipo de agitación axial mediante una hélice tipo marina debido a su tendencia a sedimentar. Esta característica resulta relevante para la separación de la biomasa posterior a la cosecha.
- Respecto a la composición bioquímica, *C. vulgaris* presentó 31-33% de proteínas, 27 – 37 % de lípidos y 7,8 – 14 % de carbohidratos (en régimen heterotrófico y batch); mientras

que *S. quadricauda* desarrolló 32 – 34% de proteínas, 27 % de lípidos y 4,2 – 5,6 % de carbohidratos (en régimen mixotrófico y fed-batch por pulsos). La composición química es muy similar en cuanto a contenidos macromoléculas.

- El contenido de pigmentos encontrado en *C. vulgaris* fue 0,23 – 0,42% de clorofila a y 0,14 – 0,25 % de carotenoides; mientras que en *S. quadricauda* fue 0,06 – 0,19 % y 0,06 – 0,10%, respectivamente. Los porcentajes de pigmentos son mayores en *Chlorella*, a pesar del modo de cultivo heterotrófico.
- La biomasa de *C. vulgaris* se pudo aplicar como bioestimulante de crecimiento vegetal, mostrando especial eficiencia en la promoción del desarrollo de raíces de semillas y cotiledones (efecto similar a auxinas), siendo la performance similar a un producto comercial a base de microalgas.
- Para la biomasa de *S. quadricauda* se pudo caracterizar el correspondiente perfil lipídico, y se pudo concluir que el mismo tiene una composición similar a aceites vegetales de consumo humano y productos nutricionales de consumo animal, así como relaciones ácidos grasos insaturados respecto a saturados beneficiosas para la salud.
- Los nutrientes presentes en el efluente cervecero pudieron ser convertidos, al menos en parte, en biomasa microalgal con potencial utilización como productos comerciales.

IV.2. Recomendaciones

Del presente trabajo se identificaron las siguientes consideraciones para el futuro:

- Evaluar el potencial cultivo en serie de *C. vulgaris* y *S. quadricauda*, de modo de aprovechar el alto contenido de carbono para el crecimiento de *Chlorella*, la cual tolera valores más altos de DQO. Una vez que la DQO ha disminuído, se cosecharía la biomasa y el medio se utilizaría entonces para cultivar *Scenedesmus*. Se debería estudiar el impacto del consumo de nutrientes distintos del carbono por parte de *C. vulgaris* en la disponibilidad a continuación para *S. quadricauda*, así como la necesidad de esterilización intermedia.
- Ensayar el efluente sin esterilizar, y sin congelado previo para almacenamiento; de modo de reducir operaciones unitarias del proceso y, por ende, el costo. Luego, corroborar la inocuidad del producto obtenido dependiendo del tipo de aplicación a la que se destine la biomasa.

- Para las aplicaciones propuestas en el presente trabajo no fue necesario la caracterización microbiológica del consorcio acompañante de las cepas no-axénicas. Sin embargo, para aplicaciones de la biomasa directa en nutrición humana o animal, sería necesario realizar este estudio.

ANEXO I: Difusión de los resultados de la tesis

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados y difundidos en la revista internacional, libros de trabajos completos y resúmenes, y eventos científicos enunciados a continuación. Otra parte de los resultados, se encuentra en proceso de redacción para la producción de dos artículos científicos.

Publicaciones en revistas internacionales:

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

Publicaciones en libros de trabajos completos:

- Lois Milevicich J., Álvarez P., Mateucci R., Casá N., de Escalada Pla M., Busto V., Gutiérrez M.C. "Producción de *Chlorella vulgaris* utilizando un efluente cervecero como sustrato". Congreso latinoamericano de ingeniería y ciencias aplicadas. Argentina, abril de 2018. ISBN: 978-987-46333-1-6 (págs. 787-793).

Publicaciones en libros de resúmenes:

- Lois Milevicich J., Casá N., Mateucci R., Álvarez P., Gutiérrez M.C., de Escalada Pla M. “Utilización de un subproducto cervecero para el cultivo de *S. quadricauda* y obtención de ácidos grasos de biomasa microalgal”. Segundo Taller de Biotecnología Aplicada a la Tecnología de Alimentos. Argentina, octubre de 2022. ISBN 978-987-1978-59-5 (pág. 46).
- J. Lois-Milevicich, N. Casá, P. Alvarez, R. Mateucci, V. Busto, M. de Escalada Pla. “Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en medio de cultivo preparado a base de efluente cervecero”. 5to. Congreso Argentino de Ingeniería y 3er. Congreso Latinoamericano de Ingeniería. Argentina, octubre de 2021. ISBN 978-987-88-1872-6 (pág. 478).
- Lois Milevicich J., Álvarez P., Argumedo Moix M., Mateucci R., Casá N., Gutiérrez M.C., de Escalada Pla M. “Escalado de la producción de *Chlorella vulgaris* utilizando un subproducto de la industria cervecera artesanal como sustrato”. Primer Taller de

Biología Aplicada a la Tecnología de Alimentos. Argentina, julio de 2019. ISBN 978-987-1978-50-2 (pág. 41).

- Lois Milevicich J., Álvarez P., Mateucci R., de Escalada Pla M., Busto V. "Influencia de la concentración de un efluente cervecero y del pH en la producción de biomasa de *Chlorella* sp". IV Simposio argentino de procesos biotecnológicos. Argentina, diciembre de 2016. ISBN: 978-987-558-428-0 (págs. 236-237).

Difusión en eventos científico-tecnológicos:

- J. Lois-Milevicich, P. Álvarez, R. Mateucci, N. Casá, V. Busto, M. C. Gutierrez, A. Giulietti, M. de Escalada Plá. "Evaluation of the growth kinetics of *Scenedesmus quadricauda* cultivated in brewery wastewater". AlgaEurope 2019 Conference. Francia, diciembre de 2019.
- Lois Milevicich J., Álvarez P., Mateucci R., Casá N., de Escalada Pla M., Busto V., Gutiérrez M.C. "Influencia de la concentración de un efluente cervecero y del pH inicial en el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda*". 1º Congreso Latinoamericano de Ingeniería de Procesos y Productos. Argentina, octubre de 2018.
- Lois Milevicich J., Álvarez P., Mateucci R., Casá N., de Escalada Pla M., Busto V. "Estudio de la composición bioquímica de *Chlorella vulgaris* cultivada en efluente cervecero". VI Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Perú, octubre de 2017.