

UNVIERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

CULTIVO DE MICROALGAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES URBANAS Y PARA LA OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO: β -1,3-GLUCANO Y ASTAXANTINA

Lic. Josefina Schmuck

Directora de tesis: Dra. Ana María Gagneten
Co-directora de tesis: Dra. Silvia Raquel Hernández

Lugar de realización: Laboratorio de Ecotoxicología – Departamento de Ciencias Naturales – Facultad de Humanidades y Ciencias – Universidad Nacional del Litoral

Agradecimientos

La realización de esta tesis fue posible gracias al acompañamiento de numerosas personas e instituciones que marcaron mi formación académica y personal. En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional del Litoral, institución que me formó a lo largo de mi trayectoria académica y que continúa demostrando el valor fundamental de la universidad pública como ámbito de acceso al conocimiento, formación crítica y producción científica comprometida con la sociedad.

Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, sede del Doctorado en Ciencias Biológicas, por su acompañamiento institucional brindado durante todo el proceso. En particular, al Dr. Sergio Guerrero, mi consejero de estudios, por su predisposición y ayuda en etapas clave del trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca doctoral que permitió llevar adelante este trabajo y alcanzar esta instancia de formación.

A la Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC-UNL) y, en particular, al Laboratorio de Ecotoxicología, mi lugar de trabajo durante el desarrollo de esta tesis, agradezco profundamente por haberme abierto sus puertas, por el espacio de aprendizaje y crecimiento ofrecido, y por el compromiso cotidiano de quienes lo integran. También, agradezco al Laboratorio de Sensores y Biosensores (FBCB-UNL), donde inicié mi formación en investigación desde mis años como estudiante de grado y donde realicé parte del trabajo experimental de este doctorado, constituyendo un espacio clave en mi crecimiento académico.

A mis directoras, Ana María y Silvia, agradezco el acompañamiento sostenido a lo largo de este camino, brindado siempre con calidez y paciencia, las discusiones constructivas y las sugerencias que enriquecieron este trabajo, así como su compromiso constante con mi formación académica.

El trabajo cotidiano no habría sido posible sin el apoyo del equipo del Laboratorio de Ecotoxicología. A Luciana, por su compromiso, su permanente disposición y acompañamiento a lo largo de este proceso; a Vanesa, por su generosidad y ayuda constante, su calidez y el trabajo compartido en diversas tareas experimentales; y a Ulises, por haber sido quien me abrió las puertas del laboratorio y me acompañó, con mucha paciencia y generosidad, desde los primeros pasos en el cultivo de microalgas, compartiendo aprendizajes tanto en lo científico como en lo humano. A Wanda, agradezco su buena predisposición, la ayuda brindada siempre que la necesité y los momentos compartidos en el laboratorio. A Natalí y Lucía, mis compañeras y amigas en

este largo recorrido, gracias por la contención y la complicidad, el compartir cotidiano de este proceso, que fue tan valioso gracias a ambas.

A Fernando y Mauro, gracias por su predisposición y voluntad para ayudarme cuando lo necesité.

Agradezco también a quienes realizaron aportes específicos que contribuyeron al desarrollo de esta tesis. En particular, a Ignacio Niizawa, por su colaboración en mediciones clave para este trabajo y su predisposición para ayudarme en la interpretación de los resultados, y al SECEGRIN por la realización de los análisis de microscopía electrónica de transmisión.

Fuera del ámbito académico, agradezco profundamente a mis amigas de toda la vida por acompañarme y por el apoyo de siempre.

A mi familia, por estar presentes, incentivar me a hacer lo que me gusta, y acompañarme de manera incondicional.

Finalmente, a Cami, gracias por estar a mi lado, por el apoyo y la paciencia de siempre, y por acompañarme a lo largo de todo este proceso, ayudándome a sostenerlo con amor y tranquilidad, especialmente en los momentos de mayor cansancio y desafío.

Aportes Científico-Tecnológicos

Schmuck, J., Reno, U., Márquez, V. E., Regaldo, L., Hernández, S. R., & Gagneten, A. M. (2025). *Chlorella vulgaris*-mediated Bioremediation and Valorization of Urban Wastewater, from a circular economy approach. *Journal of Applied Phycology*, 37(3), 1795-1813. <https://doi.org/10.1007/s10811-025-03511-2>

Schmuck, J., Reno, U., Regaldo, L., Romero, N., Polla, W., & Gagneten, A. M. (2025). Current progress and challenges of municipal wastewater phycoremediation and microalgae-based biorefinery. En M. P. Shah & A. Sarkar (Eds.), *Bio Refinery of Wastewater Treatment* (pp. 19-42). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95670-3.00011-3>

Índice

Agradecimientos.....	1
Aportes Científico-Tecnológicos	3
Índice	4
Abreviaturas y símbolos	7
Resumen	10
Abstract.....	14
Introducción.....	17
Problema ambiental asociado a las aguas residuales urbanas (ARU).....	17
Compuestos fenólicos (CF) en ARU: relevancia ambiental.....	19
Sistemas convencionales de tratamiento de ARU y limitaciones	20
Tratamiento terciario de aguas residuales basado en microalgas	23
Fundamentos y mecanismos.....	24
Microalgas como fuente de compuestos de interés biotecnológico	25
Potencial de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Euglena gracilis</i>	26
Enfoque de evaluación toxicológica para reutilización de ARU.....	27
Objetivos del trabajo	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
Capítulo 1: Caracterización de ARU y desarrollo de una herramienta analítica alternativa.....	30
1.1 Introducción	30
1.1.1 Planta de Tratamiento de ARU de San Justo (PTSJ)	30
1.1.2 Marco normativo provincial	33
1.1.3 Riesgos ambientales	34
1.1.4 Compuestos fenólicos: relevancia y detección analítica.....	36
1.2 Objetivos	39
1.3 Materiales y métodos	39
1.3.1 Materiales y reactivos.....	39
1.3.2 Régimen de muestreo y recolección de muestras	41
1.3.3 Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las ARU	41
1.3.4 Eficiencia de tratamiento de la PTSJ.....	43
1.3.5 Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF	43
1.4 Resultados.....	48
1.4.1 Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las ARU	48
1.4.2 Eficiencia de tratamiento de la PTSJ.....	51
1.4.3 Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF	55

1.5	Discusión	72
1.5.1	Caracterización de las ARU y desempeño del sistema lagunar de la PTSJ	72
1.5.2	Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF	77
Capítulo 2: Biorremediación de ARU con <i>Chlorella vulgaris</i> y obtención de moléculas de interés biotecnológico		85
2.1	Introducción	85
2.1.1	Morfología y fisiología celular de <i>C. vulgaris</i>	85
2.1.2	Composición bioquímica y potencial biotecnológico	86
2.1.3	Metabolismo autotófico y mixotrófico de <i>C. vulgaris</i>	89
2.1.4	Biorremediación de aguas residuales con <i>C. vulgaris</i>	90
2.2	Objetivos	91
2.3	Materiales y métodos	92
2.3.1	Materiales y reactivos	92
2.3.2	Cepa de microalga y condiciones de cultivo stock.....	92
2.3.3	Recolección y caracterización de ARU	93
2.3.4	Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en ARU: ensayos preliminares	93
2.3.5	Ensayo de biorremediación de ARU con <i>C. vulgaris</i>	96
2.3.6	Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de <i>C. vulgaris</i>	97
2.3.6.1	Evaluación preliminar de acumulación de astaxantina.....	98
2.3.7	Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas	99
2.3.8	Análisis estadísticos	100
2.4	Resultados	101
2.4.1	Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en ARU: ensayos preliminares	101
2.4.2	Ensayo de biorremediación de ARU con <i>C. vulgaris</i>	113
2.4.3	Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de <i>C. vulgaris</i>	118
2.4.3.1	Evaluación preliminar de acumulación de astaxantina.....	120
2.4.4	Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas	122
2.5	Discusión	124
2.5.1	Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en ARU: ensayos preliminares	124
2.5.2	Ensayo de biorremediación de ARU con <i>C. vulgaris</i>	129
2.5.3	Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de <i>C. vulgaris</i>	135
2.5.4	Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas	140
Capítulo 3: Biorremediación de ARU con <i>Euglena gracilis</i> y obtención de β -1,3-glucano.....		144
3.1	Introducción	144

3.1.1 Morfología y organización celular de <i>E. gracilis</i>	144
3.1.2 Fisiología y metabolismo	145
3.1.3 Composición bioquímica y potencial biotecnológico	146
3.1.3.1 β -1,3-glucano de reserva en <i>E. gracilis</i> : paramilon	147
3.1.4 Biorremediación de aguas residuales con <i>E. gracilis</i>	149
3.2 Objetivos	150
3.3 Materiales y métodos	151
3.3.1 Materiales y reactivos	151
3.3.2 Cepa de microalga y condiciones de cultivo stock.....	151
3.3.3 Recolección y caracterización de ARU	152
3.3.4 Crecimiento de <i>E. gracilis</i> en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal	152
3.3.5 Ensayo de biorremediación de ARU con <i>E. gracilis</i>	155
3.3.6 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon en la biomasa de <i>E.</i> <i>gracilis</i>	156
3.3.7 Bioensayo de fitotoxicidad aguda de las ARU tratadas	156
3.3.8 Análisis estadísticos	157
3.4 Resultados	157
3.4.1 Crecimiento de <i>E. gracilis</i> en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal	157
3.4.2 Ensayo de biorremediación de ARU con <i>E.gracilis</i>	171
3.4.3 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon en la biomasa de <i>E.</i> <i>gracilis</i>	177
3.4.4 Bioensayo de fitotoxicidad aguda de las ARU tratadas	179
3.5 Discusión	181
3.5.1 Crecimiento de <i>E. gracilis</i> en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal	181
3.5.2 Ensayo de biorremediación de ARU con <i>E. gracilis</i>	189
3.5.3 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon	194
3.5.4 Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas	197
Conclusiones	200
Bibliografía.....	204
Material suplementario.....	250

Abreviaturas y símbolos

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AGS: ácidos grasos saturados

ARD: aguas residuales domésticas

ARU: aguas residuales urbanas

ARU-T: aguas residuales urbanas tratadas

BF6: buffer fosfato de potasio

BPA: bisfenol A

C&M: Cramer & Myers

CAT: catalasa

CC: cámara de cloración

CCD: *central composite design*, diseño compuesto central

CF: compuestos fenólicos

Cl-a: clorofila-a

Cl-b: clorofila-b

CR: *chlorophylls ratio*, relación de clorofilas

CuNP: nanopartículas de cobre

CV: *cyclic voltammetry*, voltametría cíclica

DBO: demanda biológica de oxígeno

DET: *direct electron transfer*, transferencia directa de electrones

DPV: *differential pulse voltammetry*, voltametría de pulso diferencial

DQO: demanda química de oxígeno

DT: *doubling time*, tiempo de duplicación

E%: eficiencia de remoción

EC: efluente crudo

ERO: especies reactivas de oxígeno

FD: factor de dilución

GC: *gas chromatography*, cromatografía de gases

GI: *germination index*, índice de germinación

GST: glutatión-S-transferasa

HPLC: *high-performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución

HQ: hidroquinona

I%: inhibición del crecimiento

IB: índice de biodegradabilidad

IC: corriente de pico catódica

Inv: invierno

LA: lagunas anaeróbicas

LACC: *laccase*, lacasa

LD: límite de detección

LFP: lagunas facultativas primarias

LFS: lagunas facultativas secundarias

MDA: malondialdehído

MET: *mediated electron transfer*, transferencia de electrones mediada

Met-TYR: met-tirosinasa

NP: nanopartículas

OD: oxígeno disuelto

ODS: Objetivos del Desarrollo Sostenible

Oxy-TYR: oxi-tirosinasa

PAB: *paraxonemal body*, cuerpo paraxonemal

PAG: perfil de ácidos grasos

PC1: primer componente principal

PC2: segundo componente principal

PCA: *principal component analysis*, análisis de componentes principales

PDDA: cloruro de polidialildimetilamonio

PEG: polietilenglicol

PG: propilenglicol

PI: *pigment index*, índice de pigmentos

PTSJ: Planta de Tratamiento de aguas residuales urbanas de San Justo

PV: primavera-verano

RRG: *relative radicle growth*, crecimiento relativo de la radícula

RSG: *relative seed germination*, germinación relativa de las semillas

RSM: *response surface methodology*, metodología de superficie de respuesta

SDT: sólidos disueltos totales

SMX: sulfametoxazol

CIP: ciprofloxacina

SPE: *screen-printed electrodes*, electrodos serigrafiados

SST: sólidos suspendidos totales

TAG: triacilglicéridos

TEM: *Transmission Electron Microscopy*, microscopía electrónica de transmisión

TYR: *tyrosinase*, tirosinasa

UDP-glucosa: uridina difosfato glucosa

Δ IC: corriente neta

μ : tasa de crecimiento específico

Resumen

La gestión de las aguas residuales urbanas (ARU) constituye un desafío prioritario para la protección de la salud pública y de los ecosistemas acuáticos, particularmente en regiones donde los sistemas de saneamiento presentan desempeños variables o insuficientes. En Argentina, aproximadamente el 70 % de los efluentes recolectados no recibe un tratamiento adecuado previo a su descarga, predominando tecnologías extensivas basadas en lagunas de estabilización. En este contexto, y bajo un enfoque de economía circular, el tratamiento terciario mediante microalgas surge como una alternativa de doble potencial: mejorar la calidad de efluentes tratados por sistemas convencionales y valorizar la biomasa generada mediante la recuperación de compuestos de interés biotecnológico. En paralelo, el desarrollo de herramientas analíticas accesibles resulta clave para el monitoreo ambiental y la toma de decisiones operativas.

En esta tesis se caracterizaron ARU provenientes de la Planta de Tratamiento de San Justo (Santa Fe, Argentina; PTSJ), evaluando el efluente crudo y el efluente a la salida del sistema lagunar previo a la cloración, durante dos períodos estacionales (invierno y primavera-verano) y a lo largo de dos años, en relación con el cumplimiento del marco normativo local. Asimismo, se desarrollaron ensayos de biorremediación mediante microalgas a escala de laboratorio, implementando dos sistemas independientes, uno con *Chlorella vulgaris* y otro con *Euglena gracilis*. Estas fueron seleccionadas por su capacidad de crecimiento en medios complejos con disponibilidad de sustratos orgánicos, su flexibilidad metabólica y su potencial para acumular metabolitos de valor.

En ambos sistemas se realizaron ensayos preliminares de exposición a cinco concentraciones crecientes de ARU (10-100 % v/v), diluidas en medios de cultivo de referencia para cada microalga, con el fin de definir la concentración de ARU de trabajo. En esta etapa se cuantificaron variables de crecimiento y fisiología algal (densidad, tasa de crecimiento, biovolumen, pigmentos y proteínas) y biomarcadores de estrés oxidativo (catalasa, glutatión-S-transferasa y malondialdehído). Además, para *E. gracilis* se incluyó la cuantificación de paramilon (β -1,3-glucano). Los resultados se integraron mediante análisis de componentes principales (PCA) para identificar patrones de respuesta asociados a las características del efluente. Posteriormente, con la concentración de ARU previamente seleccionada, se ejecutaron los ensayos de biorremediación, evaluando la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), nutrientes inorgánicos (amonio, nitrato, nitrito y fósforo) y coliformes totales y fecales, junto con la caracterización bioquímica de la

biomasa: proteínas, carbohidratos totales, lípidos, perfil de ácidos grasos y astaxantina en *C. vulgaris*; carbohidratos totales y paramilon en *E. gracilis*.

La caracterización de las ARU de la PTSJ mostró que, si bien la mayoría de los parámetros físicoquímicos y bacteriológicos disminuyeron a lo largo del tren de lagunas, se mantuvieron incumplimientos normativos, particularmente para la DQO, que permaneció por encima de los límites en todos los períodos evaluados. Las remociones promedio de DBO y sulfuros se hallaron entre 77-83 % y 93-98 %, respectivamente, mientras que la reducción de DQO fue moderada (48-72 %). Los nutrientes presentaron remociones variables (nulas en algunos casos), con eficiencias globales bajas (14-54 % para amonio y 17-53 % para fósforo); para nitrato y nitrito se observaron incrementos asociados a procesos de nitrificación.

Por otro lado, se incorporó un bioensayo de fitotoxicidad aguda con *Lactuca sativa* para analizar la aptitud de las ARU tratadas (ARU-T) obtenidas en cada sistema algal para un potencial reúso agrícola. En forma complementaria, se desarrolló un biosensor enzimático electroquímico para la detección de compuestos fenólicos, orientado al monitoreo ambiental de efluentes cloacales, maximizando la sensibilidad analítica en rangos compatibles con límites regulatorios vigentes para fenoles.

El biosensor enzimático optimizado se basó en tirosinasa inmovilizada con agentes estabilizantes y poliméricos sobre electrodos serigrafados modificados con nanopartículas de cobre. Se seleccionó hidroquinona como sustrato fenólico modelo, obteniéndose una respuesta analítica diferenciable del blanco en el rango de 10-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un límite de detección preliminar de 5,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, un orden de magnitud inferior al límite normativo vigente para fenoles en efluentes cloacales (50 $\mu\text{g L}^{-1}$), lo que sugiere la factibilidad del enfoque como base para etapas posteriores de validación y aplicación en el monitoreo ambiental.

En el sistema con *C. vulgaris*, el cultivo en 100% de ARU estimuló el crecimiento algal, acompañado por un refuerzo de mecanismos antioxidantes y fotoprotectores. En el ensayo de biorremediación, a los 4 días se alcanzaron remociones superiores al 97 % de nitrógeno y fósforo, reducciones del 39 % de DQO y del 73 % de DBO, y remociones de coliformes totales y fecales superiores al 99%, alcanzándose valores normados para parámetros que inicialmente excedían límites (DQO, fósforo y coliformes). Tiempos de cultivo más prolongado evidenciaron incrementos relativos de DQO y DBO, lo que indica la importancia de optimizar el tiempo de residencia. La biomasa producida presentó un incremento del contenido lipídico (1,9 veces respecto del control con medio sintético), con elevadas proporciones de ácidos grasos, principalmente oleico (21,7 %) y poliinsaturados (38,3 %) incluyendo omega-3 y omega-6, con aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria, nutracéutica y

farmacéutica. No se detectó astaxantina en la biomasa, aunque se sugirió la presencia de otros carotenoides, destacándose la necesidad de explorar estrategias específicas de estrés para inducir astaxantina o profundizar el estudio de otros carotenoides de relevancia biotecnológica.

En el sistema con *E. gracilis*, las exposiciones preliminares a 80 y 100 % de ARU promovieron un incremento del contenido de paramilon de hasta 3 veces respecto del cultivo control; sin embargo, el cultivo en 100 % de ARU se asoció a efectos adversos sobre el crecimiento y la fisiología algal, lo que determinó la selección de 80 % de ARU como condición de trabajo. En el ensayo de biorremediación (10 días), el sistema mostró un desempeño de remoción más moderado que *C. vulgaris*, presentando reducciones de materia orgánica de 43 % para DBO y 21 % para DQO, remociones variables de nutrientes (99 % para amonio, 43 % para nitrato, 27 % para nitrito, y 34 % para fósforo) y elevadas remociones bacteriológicas (coliformes totales: 96-98 %; coliformes fecales: 99 %). La biomasa presentó un elevado contenido de carbohidratos totales (31-34 %) y el paramilon representó 64-67 % de los carbohidratos, superior al control, en donde el paramilon representó 43-50 % de los carbohidratos totales, evidenciando un direccionamiento metabólico hacia la acumulación del β -1,3-glucano, compuesto de interés para aplicaciones nutraceuticas, biomédicas y en desarrollo de biomateriales.

Los bioensayos con *L. sativa* evidenciaron respuestas contrastantes entre ambos sistemas: las ARU-T provenientes del cultivo con *C. vulgaris* mostraron efectos moderados sobre el crecimiento radicular, dependientes del tiempo de cultivo y la dilución de las ARU-T, aun cuando los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos cumplieron mayoritariamente con estándares internacionales de referencia para reúso agrícola. En contraste, las ARU-T tratadas con el sistema basado en *E. gracilis* presentaron índices de fitotoxicidad compatibles con toxicidad nula o muy baja, aunque sin cumplir con todos los criterios fisicoquímicos recomendados. Estos resultados sugieren que la mayor remoción de nutrientes en el sistema basado en *C. vulgaris* y su mayor disponibilidad residual en el sistema con *E. gracilis* pudieron influir en la respuesta vegetal, sin descartar la incidencia de contaminantes específicos.

En conjunto, esta tesis demuestra que las ARU tratadas mediante sistemas convencionales pueden integrarse en esquemas de tratamiento terciario algal con beneficios simultáneos en la mejora de la calidad del efluente y la valorización de la biomasa. Los resultados evidencian perfiles funcionales diferenciados entre *C. vulgaris* y *E. gracilis*, por lo que la selección de la especie y las condiciones de cultivo debe definirse en función del objetivo prioritario. En este marco, la incorporación de bioensayos con *L. sativa* permitió evaluar la aptitud biológica de las aguas residuales tratadas para su potencial reúso agrícola, como una aproximación complementaria, que

debería integrarse con análisis microbiológicos más específicos para una evaluación sanitaria completa. Finalmente, el biosensor enzimático constituye una herramienta analítica complementaria que, por su sensibilidad preliminar compatible con umbrales regulatorios, podría contribuir a futuras etapas de monitoreo ambiental y control operativo. En síntesis, el trabajo aporta bases experimentales y criterios de diseño para el desarrollo de estrategias integradas de tratamiento terciario, reúso del agua y valorización de biomasa, orientadas al avance hacia esquemas de economía circular en la gestión sostenible de ARU.

Abstract

Urban wastewater (UWW) management is a priority challenge for protecting public health and aquatic ecosystems, particularly in regions where sanitation systems perform inconsistently or inadequately. In Argentina, approximately 70% of collected effluents do not receive adequate treatment before discharge, with extensive stabilization ponds-based technologies predominating. In this context, and within a circular economy framework, tertiary treatment using microalgae emerges as a dual-potential alternative: improving the quality of effluents treated by conventional systems and valorizing the generated biomass by recovering compounds of biotechnological interest. Simultaneously, the development of accessible analytical tools is key for environmental monitoring and operational decision-making.

This thesis characterized UWW from San Justo Treatment Plant (Santa Fe, Argentina; SJTP), evaluating the raw effluent and the effluent at the lagoon system outlet prior to chlorination, during two seasonal periods (winter and spring-summer) and over two years, in relation to compliance with local regulations. Additionally, laboratory-scale bioremediation assays were conducted independently with *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, selected for their ability to grow under organic-rich conditions, their metabolic flexibility, and their potential to accumulate valuable metabolites.

In both systems, preliminary exposure assays were performed with five increasing concentrations of UWW (10-100% v/v), diluted in reference culture media for each microalga, to determine the optimal working concentration. In this stage, algal growth and physiology variables (density, growth rate, biovolume, pigments, and proteins) and oxidative stress biomarkers (catalase, glutathione S-transferase, and malondialdehyde) were quantified; in *E. gracilis*, paramylon (β -1,3-glucan) quantification was also included. The results were integrated using principal component analysis (PCA) to identify response patterns associated with effluent characteristics. Subsequently, bioremediation assays were conducted at the selected concentration, assessing reductions in biological oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD), inorganic nutrients (ammonium, nitrate, nitrite, and phosphorus), and total and fecal coliforms, along with the biochemical characterization of the biomass: proteins, total carbohydrates, lipids, fatty acid profile, and astaxanthin in *C. vulgaris*; and total carbohydrates and paramylon (β -1,3-glucan) in *E. gracilis*. In addition, an acute phytotoxicity bioassay using *Lactuca sativa* was incorporated to analyze the suitability of the treated wastewater from each algal system for potential agricultural reuse. As a complementary approach, an electrochemical enzymatic biosensor was developed for the detection of phenolic compounds, designed for environmental monitoring of UWWs, with the aim of

maximizing analytical sensitivity within ranges compatible with current regulatory limits for phenols.

Characterization of the UWW from the SJTP indicated that, despite improvements in most physicochemical and bacteriological parameters along the lagoon system, the effluent failed to meet regulatory standards, mainly due to COD concentrations remaining above permissible limits throughout all evaluated periods. Average BOD and sulfide removals were found to be between 77-83% and 93-98%, respectively, while the COD reduction was moderate (48-72%). Nutrient removal rates varied (zero in some cases), with low overall efficiencies (14–54% for ammonium and 17–53% for phosphorus). Increases in nitrate and nitrite were observed, associated with nitrification processes.

The optimized enzymatic biosensor employed tyrosinase in solution, stabilized with polymeric agents and immobilized onto screen printed electrodes modified with copper nanoparticles. Hydroquinone was selected as a model phenolic substrate, providing a clear analytical response above the blank over the range of 10–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ and a preliminary detection limit of 5.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, approximately one order of magnitude below the current regulatory limit for phenols in UWW (50 $\mu\text{g L}^{-1}$). These results support the feasibility of the proposed approach for subsequent validation and application in environmental monitoring.

Cultivation of *C. vulgaris* in undiluted UWW (100%) stimulated algal growth, together with an enhancement of antioxidant and photoprotective mechanisms. During the bioremediation assays, within 4 days, removals exceeding 97% of nitrogen and phosphorus were achieved, alongside reductions of 39% in COD and 73% in BOD, as well as removals of total and fecal coliforms exceeding 99%, reaching in compliance with regulatory standards for parameters that initially exceeded permissible limits (COD, phosphorus, and coliforms). Extended cultivation periods led to relative increases in COD and BOD, indicating the importance of optimizing residence time. The resulting biomass exhibited an increase in lipid content (1.9-fold compared to the synthetic medium control), with high proportions of fatty acids, mainly oleic (21.7%) and polyunsaturated (38.3%), including omega-3 and omega-6, highlighting its potential for applications in the food, nutraceutical, and pharmaceutical industries. Astaxanthin was not detected in the biomass; however, the presence of other carotenoids was inferred, emphasizing the need to explore targeted stress strategies to induce astaxanthin production or to further investigate other carotenoids of biotechnological relevance.

Cultivation of *E. gracilis* under preliminary exposures to 80 and 100% UWW resulted in up to threefold increase in paramylon compared to the control culture; however, growth in 100% UWW was associated with adverse effects on algal growth and physiology performance, leading to the selection of 80% UWW as the working condition. During the

10-day bioremediation assays, the system exhibited a more moderate removal performance than *C. vulgaris*, with organic matter reductions of 43% for BOD and 21% for COD, variable nutrient removals efficiencies (99% for ammonium, 43% for nitrate, 27% for nitrite, and 34% for phosphorus), and high bacteriological removals (total coliforms: 96-98%; fecal coliforms: 99%). The resulting biomass showed a high total carbohydrate content (31-34%), with paramylon accounting for 64-67% of total carbohydrates, compared to 43-50% in the control culture, indicating a metabolic shift towards β -1,3-glucan accumulation, a compound of interest for nutraceutical, biomedical, and biomaterial development applications.

Bioassays with *L. sativa* revealed contrasting responses between the two systems: the treated UWW derived from the *C. vulgaris* culture showed induced moderate effects on root growth, dependent on cultivation time and dilution, even though the physicochemical and microbiological parameters largely complied with international reference standards for agricultural reuse. In contrast, the treated UWW from the *E. gracilis*-based system exhibited phytotoxicity indices consistent with negligible or very low toxicity, despite not meeting all recommended physicochemical criteria. These findings suggest that the higher nutrient removal achieved by the *C. vulgaris* system and the greater residual nutrient availability in the *E. gracilis* system may have influenced the plant response, without excluding the potential contribution of specific contaminants.

Overall, this thesis demonstrates that conventionally treated UWW can be integrated into algal-based tertiary treatment schemes, providing simultaneous benefits in effluent quality improvement and biomass valorization. The results highlight distinct functional profiles between *C. vulgaris* and *E. gracilis*, indicating that species selection and cultivation conditions should be tailored to the primary objective. Within this context, the inclusion of bioassays with *L. sativa* enabled the assessment of the biological suitability of treated UWW for potential agricultural reuse as a complementary approach, which should be combined with more specific microbiological analyses to achieve a comprehensive health risk evaluation. Finally, the enzymatic biosensor represents a complementary analytical tool that, owing to its preliminary sensitivity compatible with regulatory thresholds, may support future stages of environmental monitoring and operational control. In summary, this work provides experimental evidence and design criteria for the development of integrated strategies for tertiary treatment, UWW reuse, and biomass valorization, contributing to the advancement of circular economy approaches in the sustainable management of UWW.

Introducción

Problema ambiental asociado a las aguas residuales urbanas (ARU)

El acceso a agua de calidad constituye uno de los pilares fundamentales para el desarrollo humano y el funcionamiento de los ecosistemas, en un planeta donde el recurso hídrico cubre aproximadamente el 71 % de la superficie terrestre (Ortuganti et al., 2022). No obstante, en las últimas décadas, la disponibilidad y calidad de agua se han visto crecientemente comprometidas como consecuencia de la sobreexplotación de los recursos naturales y de procesos intensivos de urbanización e industrialización, que introducen cargas contaminantes de manera continua en los sistemas acuáticos (Schwarzenbach et al., 2010; Saeed et al., 2022).

En este contexto, el crecimiento demográfico y la expansión de los centros urbanos han conducido a un aumento sostenido en la generación de aguas residuales, particularmente de origen doméstico, fenómeno que resulta especialmente crítico en países en desarrollo, donde las infraestructuras de saneamiento suelen ser insuficientes (Ortuganti et al., 2022). A escala global, el Informe Mundial sobre el Desarrollo de los Recursos Hídrico de las Naciones Unidas estimó que alrededor del 80 % de las aguas residuales generadas se vierten sin un tratamiento apropiado, reflejando la magnitud del desafío ambiental y sanitario asociado a su gestión (United Nations, 2017).

Las aguas residuales urbanas (ARU) comprenden principalmente aguas residuales domésticas (ARD), aunque su composición puede verse modificada por aportes comerciales, pluviales y hospitalarios transportados a través de los sistemas de alcantarillado (European Communities, 1991; Kumar et al., 2021). Esta diversidad de orígenes se traduce en una elevada variabilidad espacial y temporal de su composición, influida por patrones de consumo, condiciones socioeconómicas, tecnología doméstica, clima y procesos de infiltración o exfiltración durante el transporte (Henze & Comeau, 2008).

Desde el punto de vista ambiental, las ARU se caracterizan por contener una combinación compleja de materia orgánica biodegradable, nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), metales pesados, compuestos orgánicos y microorganismos potencialmente patógenos (Henze & Comeau, 2008; Arora & Philippidis, 2021). En particular, las elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo, frecuentemente presentes como amonio y ortofosfatos derivados de la degradación de compuestos domésticos como urea, proteínas y polifosfatos, representan un factor crítico debido a su capacidad para promover procesos de eutrofización en los cuerpos de agua receptores (Guldhe et al., 2017; Baldisserotto et al., 2023).

La eutrofización se define como un proceso de enriquecimiento de las masas de agua por nutrientes que estimula la producción primaria y conduce a un aumento del crecimiento algal, pudiendo generar proliferaciones fitoplanctónicas indeseables. Este fenómeno se reconoce como uno de los problemas ambientales más desafiantes a nivel global, ya que se asocia a la pérdida de biodiversidad, alteraciones en la calidad del agua y limitaciones en los usos del recurso hídrico (Guldhe et al., 2017; Ortuganti et al., 2022). Si bien históricamente la agricultura ha sido considerada una fuente relevante de aporte de nutrientes, las aguas residuales provenientes de aglomeraciones urbanas en rápido crecimiento emergen como un contribuyente cada vez más significativo, especialmente en países en desarrollo (van Puijenbroek et al., 2019).

En este contexto, la gestión de ARU y de los nutrientes que contienen adquiere relevancia en el marco de desafíos globales asociados tanto a la protección de recursos hídricos como a la seguridad alimentaria. El nitrógeno y el fósforo, además de su rol ambiental, constituyen nutrientes esenciales e irremplazables para la producción agrícola, lo que plantea la necesidad de enfoques que permitan compatibilizar su control en los efluentes con su aprovechamiento en sistemas productivos. Esta problemática ha sido reconocida a nivel internacional en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, particularmente a través del Objetivo de Desarrollo Sostenible 6 (ODS6: Agua limpia y saneamiento), orientado a garantizar la disponibilidad y gestión sostenible del agua mediante un tratamiento adecuado de los efluentes, y del Objetivo de Desarrollo Sostenible 2 (ODS2: Hambre cero y agricultura sostenible), que promueve sistemas agrícolas eficientes en el uso de los recursos. La articulación entre ambos objetivos pone de manifiesto la importancia de estrategias integradas para la gestión del agua y de los nutrientes (United Nations, 2018; Orner, 2019).

Además de los nutrientes, la presencia de metales pesados y contaminantes orgánicos emergentes plantea riesgos adicionales por su toxicidad, persistencia y potencial de bioacumulación en los ecosistemas acuáticos y en la cadena alimentaria (Henze & Comeau, 2008; Guldhe et al., 2017). A su vez, la materia orgánica presente en las aguas residuales incrementa la demanda de oxígeno, lo que contribuye a la disminución del oxígeno disuelto (OD), afectando severamente a las comunidades acuáticas y su biodiversidad (Akinawo, 2023).

Por su componente cloacal, las ARU constituyen una fuente relevante de microorganismos potencialmente patógenos, cuya descarga sin tratamiento adecuado implica riesgos sanitarios significativos para las poblaciones humanas y los ecosistemas acuáticos (Henze & Comeau, 2008). En consecuencia, el vertido de efluentes insuficientemente tratados se asocia al deterioro de la calidad del agua, a desequilibrios ecológicos y a impactos negativos sobre usos recreativos, productivos y de

abastecimiento, lo que fundamenta la necesidad de implementar estrategias de tratamiento orientadas a la protección ambiental y sanitaria (Núñez, 2013; Reno et al., 2022; Baldisserotto et al., 2023).

Compuestos fenólicos (CF) en ARU: relevancia ambiental

Los compuestos fenólicos (CF) constituyen una familia amplia de sustancias orgánicas caracterizadas por la presencia de uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Estos compuestos presentan particular relevancia ambiental debido a la toxicidad de muchos de sus representantes y, en numerosos casos, a su baja biodegradabilidad, lo que favorece su persistencia en ambientes acuáticos (Alemán García, 2008; Akbulut et al., 2015).

En el contexto de las ARU, los CF pueden incorporarse al sistema cloacal como consecuencia del uso cotidiano de productos domésticos e industriales, tales como detergentes, productos farmacéuticos y cosméticos, así como por la lixiviación de materiales plásticos y resinas. Tras su descarte, estos compuestos alcanzan las plantas de tratamiento, donde su remoción no siempre resulta completa mediante procesos convencionales (Wang et al., 2013; Rodríguez-Delgado et al., 2015).

Numerosos estudios han reportado efectos adversos de distintos CF sobre organismos acuáticos y sobre la salud humana, incluyendo procesos de bioacumulación y toxicidad crónica (Abdullah et al., 2006; Das et al., 2014). Asimismo, los procesos de cloración aplicados a aguas que contienen fenoles pueden dar lugar a la formación de clorofenoles, compuestos que presentan una toxicidad superior a la de los compuestos originales, lo que incrementa el riesgo ambiental asociado a su presencia en efluentes tratados (Alemán García, 2008).

La relevancia ambiental de los CF ha motivado la existencia de marcos regulatorios que establecen límites para su descarga en efluentes, así como la necesidad de su monitoreo sistemático en ARU. Si bien la determinación de CF se realiza tradicionalmente mediante técnicas instrumentales de alta sensibilidad, su aplicación rutinaria puede verse limitada por requerimientos operativos y de infraestructura (Othman & Wollenberger, 2020). En este contexto, ha surgido un interés creciente en el desarrollo de estrategias analíticas alternativas que mantengan un desempeño adecuado, pero que simplifiquen la operación y reduzcan los requerimientos de infraestructura y los tiempos de análisis. Entre estas alternativas, los biosensores enzimáticos han sido propuestos para la determinación de contaminantes, presentando ventajas frente a los métodos convencionales, tales como rapidez de respuesta, bajo costo operativo, portabilidad y potencial aplicabilidad para análisis *in situ* (González García & Costa García; Biscay et al., 2014).

En consecuencia, la gestión de ARU requiere tecnologías capaces de reducir carga orgánica, nutrientes, microorganismos y, en ciertos casos, contaminantes orgánicos persistentes, lo que fundamenta la implementación de tratamientos secundarios y terciarios.

Sistemas convencionales de tratamiento de ARU y limitaciones

La gestión adecuada de ARU se consolidó como una necesidad de los centros urbanos con el objetivo de reducir la carga contaminante vertida al ambiente y mitigar impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos y la salud pública (Lofrano & Brown, 2010). Tradicionalmente, el tratamiento de aguas residuales se ha basado en tecnologías intensivas que combinan procesos anaeróbicos y aeróbicos para la remoción de materia orgánica y, en algunos casos, nutrientes, como los sistemas de lodos activados con etapas de nitrificación y desnitrificación. Si bien estas tecnologías pueden alcanzar elevados niveles de depuración, su implementación suele requerir múltiples unidades de tratamiento, recirculaciones internas y un control operativo complejo, lo que se traduce en altos costos de inversión y operación, un consumo energético significativo y la necesidad de personal técnico especializado (Oruganti et al., 2022).

En este contexto, los sistemas lagunares se han consolidado como una de las tecnologías de tratamiento más ampliamente utilizadas, particularmente en regiones donde la disponibilidad de recursos económicos y tecnológicos es limitada (Al-Hashimi & Hussain, 2013). Las lagunas de estabilización corresponden a sistemas de tratamiento biológico extensivo, en los cuales la depuración del efluente ocurre predominantemente a través de procesos naturales mediados por comunidades microbianas. Su adopción se asocia a menores costos de construcción y mantenimiento en localidades con restricciones de infraestructura y recursos (Al-Hashimi & Hussain, 2013; Acuña et al., 2017). Desde el punto de vista ecológico y funcional, los sistemas lagunares integran consorcios complejos de bacterias y microalgas que interactúan de manera dinámica, utilizando los componentes fisicoquímicos presentes en las ARU como fuente de energía y nutrientes. Como resultado de estas interacciones, las lagunas pueden comportarse como ecosistemas artificiales, en los cuales se establece una sucesión de comunidades microbianas y planctónicas que incluye bacterias heterótrofas, ciliados, microalgas y cianobacterias (Nomdedu, 2018; Regaldo et al., 2020; Gimenez et al., 2022). Se ha propuesto que estos grupos funcionales presentan analogías con los observados en ecosistemas acuáticos naturales, aunque bajo condiciones controladas por el diseño y la operación del sistema de tratamiento (O'Farrell et al., 2019; Frau et al., 2022).

En los trenes de lagunas, las lagunas anaeróbicas suelen ubicarse como la primera unidad de tratamiento, recibiendo elevadas cargas orgánicas por unidad volumen. Bajo estas condiciones, las tasas de consumo de oxígeno superan las de producción, estableciéndose un ambiente reductor favorable para la conversión anaerobia de la materia orgánica. Este proceso comprende una fase de acidogénesis, caracterizada por licuefacción y formación de ácidos orgánicos, seguida por una fase metanogénica, en la cual dichos ácidos se transforman principalmente en metano y dióxido de carbono (von Sperling, 2007). Estas características hacen que las lagunas anaeróbicas resulten particularmente adecuadas para el tratamiento de aguas residuales crudas con tiempos de retención relativamente cortos (Al-Hashimi & Hussain, 2013). Posteriormente, en las lagunas facultativas, la fracción soluble y finalmente particulada de la materia orgánica se estabiliza predominantemente mediante respiración aeróbica en la columna de agua, mientras que una parte de la fracción sedimenta y es digerida anaeróbicamente en el fondo. El oxígeno requerido para la oxidación aeróbica es suministrado principalmente por la fotosíntesis algal, estableciéndose una relación de simbiosis con las bacterias, que utilizan el oxígeno producido para sostener la degradación de materia orgánica (von Sperling, 2007; Moustafa et al., 2023). En algunos sistemas, los trenes de lagunas pueden incluir lagunas aireadas, en las cuales el oxígeno se suministra mediante aireadores mecánicos en lugar de depender exclusivamente de la fotosíntesis. Esta configuración permite reducir la superficie requerida para el tratamiento, a costa de un incremento en el consumo energético y en los costos operativos (von Sperling, 2007).

Además de la estabilización de la materia orgánica, en los sistemas lagunares se produce una atenuación progresiva de bacterias, virus, quistes de protozoos y huevos de helmintos a lo largo del tren de lagunas. Sin embargo, la mayor parte de la eliminación de microorganismos patógenos ocurre en las lagunas de maduración, diseñadas específicamente para este fin. En estas unidades predominan condiciones ambientales adversas para dichos organismos, tales como elevada radiación UV, valores elevados de pH y OD, temperaturas inferiores a las del tracto intestinal humano, limitación de nutrientes, y depredación por otros organismos, lo que permite alcanzar niveles elevados de remoción de coliformes, utilizados habitualmente como indicadores de contaminación fecal (von Sperling, 2007; Lee et al., 2022).

En relación con la dinámica de nutrientes en los trenes de laguna, pueden ocurrir distintos procesos que contribuyen a la reducción de las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el efluente. Entre ellos se incluyen la asimilación por parte de la biomasa algal y los procesos de nitrificación y desnitrificación en el caso del nitrógeno (Al-Hashimi & Hussain, 2013; Renuka et al., 2013). Asimismo, se han descrito mecanismos fisicoquímicos, como la volatilización del nitrógeno en forma de amoníaco gaseoso y la

precipitación de fosfatos. Durante las horas de máxima irradiación solar y mayor actividad fotosintética, el pH del medio puede alcanzar valores cercanos o superiores a 9, condición que favorece la conversión de amonio a amoníaco libre y la precipitación de fosfatos, lo que contribuye a la reducción de las concentraciones de nitrógeno y fósforo disuelto (Cai et al., 2013; Foladori et al., 2018).

Como consecuencia de estas características, aun cuando las ARU sean sometidas a tratamiento secundario mediante sistemas lagunares, u otras tecnologías convencionales, el efluente resultante puede no presentar una composición ambientalmente aceptable para su descarga continua en cuerpos de agua receptores (Marchello et al., 2015). En este marco, la evaluación del efluente tratado adquiere un rol central para estimar el grado de estabilización alcanzado y el potencial impacto de vertido.

Para dicha evaluación se emplean parámetros globales como la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO), que permiten caracterizar la fracción biodegradable y la carga orgánica total oxidable del efluente, respectivamente (Lima et al., 2020; Sonone et al., 2021). Asimismo, la evaluación del riesgo sanitario asociado al componente cloacal del efluente incluye el monitoreo de indicadores bacteriológicos. Los coliformes se utilizan ampliamente como indicadores de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos transmitidos por el agua, como bacterias, virus y parásitos (Lee et al., 2022). Si bien los métodos de desinfección convencionales, como la cloración o la radiación UV, pueden reducir la carga microbiana, implican costos elevados y requerimientos energéticos (Bhatt et al., 2023).

Como referencia técnica, von Sperling (2007), en un manual técnico que integra fundamentos teóricos y criterios de diseño, presenta rangos orientativos que describen órdenes de magnitud de remoción asociados a distintos esquemas de sistemas lagunares. En este marco, se indican remociones del orden de 75-85 % para la DBO, 65-80 % para la DQO y superiores al 90 % para coliformes, particularmente en configuraciones que incluyen lagunas de maduración. En contraste, las remociones asociadas al nitrógeno y fósforo muestran una mayor variabilidad y dependencia de la estructura del sistema, con valores generalmente inferiores al 60 % para nitrógeno y comprendidos entre 35 y 50 % para el fósforo.

Finalmente, con el objetivo de prevenir la eutrofización y minimizar los impactos ambientales y sanitarios asociados al vertido de efluentes, se han establecido marcos regulatorios que fijan límites para parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. En la provincia de Santa Fe, Argentina, la descarga de efluentes cloacales se encuentra regulada por la Ley N° 11.220 y su Anexo B, que establece valores máximos admisibles para DBO, DQO, sólidos suspendidos totales (SST), sulfuros, amonio, fósforo, metales

fenoles y bacterias coliformes, entre otros parámetros (Gobierno de la Provincia de Santa Fe, 1994).

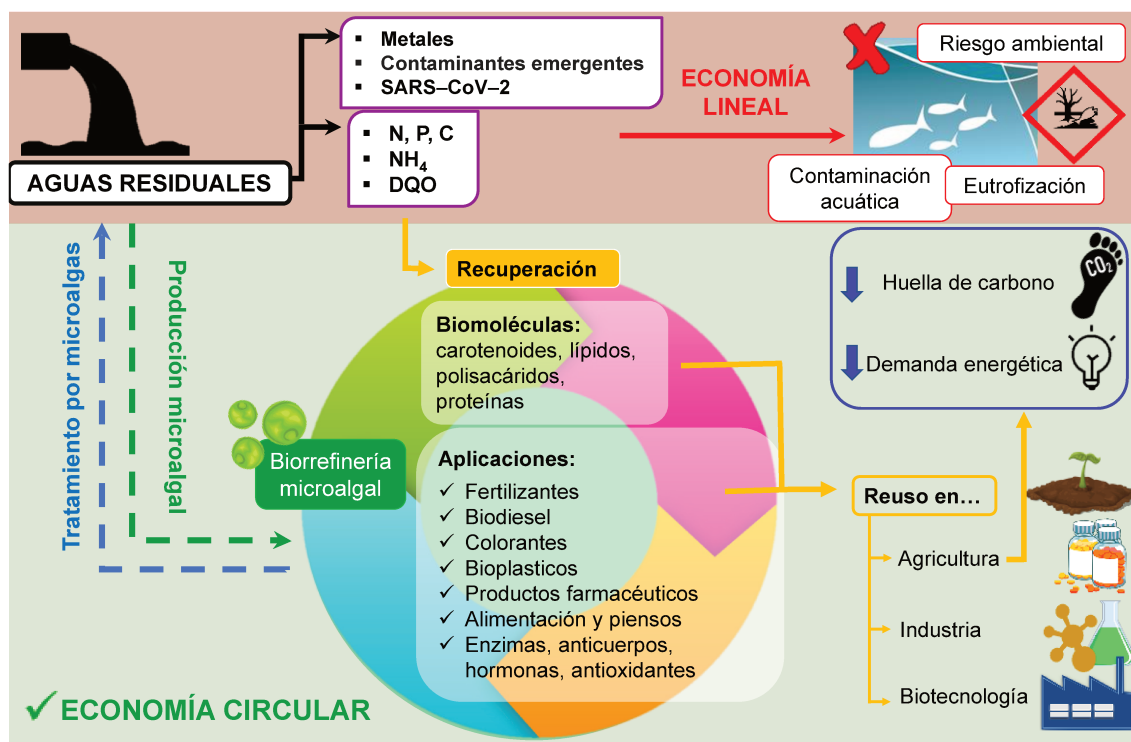


Figura 1: Integración del tratamiento terciario de aguas residuales urbanas (ARU) con microalgas y la recuperación de recursos bajo un enfoque de economía circular. Adaptado de Schmuck et al. (2025).

Tratamiento terciario de aguas residuales basado en microalgas

La Figura 1 presenta un esquema conceptual de la integración del tratamiento terciario de ARU mediante microalgas y la recuperación de recursos en un enfoque de economía circular. En contextos en los que el efluente tratado no ha alcanzado los objetivos de remoción o reducción de contaminantes, se justifica la incorporación de tratamientos complementarios. Diversos estudios han señalado que el empleo de microalgas constituye una alternativa sostenible y de bajo costo para el tratamiento terciario o avanzado de aguas residuales, particularmente orientada a la reducción de nutrientes, con la posibilidad de recuperar recursos y generar biomasa con potencial valor agregado. Esta estrategia adquiere especial relevancia en contextos donde la infraestructura disponible se limita a tratamientos primarios y/o secundarios, con desempeño insuficiente en la eliminación de nitrógeno y fósforo (D'Imporzano et al., 2017; Bhalamurugan et al., 2018; Oruganti et al., 2022; Moondra et al., 2022).

En el marco de estrategias de biorremediación, la ficorremediación se define como el uso de microalgas y macroalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes, con la ventaja adicional de generar biomasa susceptible de aprovechamiento (Prajapati et al., 2013). Las microalgas constituyen un grupo amplio y polifilético de microorganismos fotosintéticos, incluyendo cianobacterias procariotas y microalgas eucariotas, capaces de producir oxígeno y biomasa a partir de energía luminosa, dióxido de carbono y nutrientes inorgánicos, y presentan una amplia distribución en ambientes acuáticos continentales y marinos (Abreu et al., 2022; Oruganti et al., 2022).

Fundamentos y mecanismos

La aplicabilidad de microalgas al tratamiento de efluentes se sustenta, en parte, en su flexibilidad metabólica. Si bien el crecimiento fotoautotrófico es el modo más asociado al cultivo algal, numerosas especies pueden utilizar carbono orgánico mediante heterotrofia o adoptar crecimiento mixotrófico, combinando simultáneamente fuentes de energía y carbono inorgánico y orgánico. Esta plasticidad metabólica confiere ventajas competitivas en matrices complejas y variables como las ARU (D'Imporzano et al., 2017; Grubišić et al., 2024).

Desde el punto de vista económico, el uso de aguas residuales como medio de cultivo permite reducir significativamente los costos asociados a medios sintéticos, dado que estas matrices aportan macronutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), micronutrientes y carbono orgánico potencialmente biodisponible (D'Imporzano et al., 2017; Guldhe et al., 2017; Vieira Costa et al., 2021). Sin embargo, la complejidad de las ARU implica también la posible presencia de compuestos inhibitorios o tóxicos, tales como agentes químicos de uso doméstico, pesticidas, hormonas y metales, capaces de comprometer el crecimiento y la eficiencia de remoción, lo que refuerza la importancia de seleccionar especies de microalgas adecuadas a las condiciones locales del efluente (Guldhe et al., 2017; Pacheco et al., 2021; Tan et al., 2022).

El tratamiento terciario con microalgas se orienta principalmente a la reducción de nitrógeno y fósforo. El nitrógeno es uno de los nutrientes más relevantes para el crecimiento algal, dado que constituye un componente esencial de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila. En sistemas basados en microalgas, los mecanismos de eliminación de nitrógeno incluyen, además de la volatilización como amoníaco y de los procesos microbianos como la nitrificación, la asimilación por la biomasa algal (Cai et al., 2013; Foladori et al., 2018; Ren et al., 2019). La asimilación requiere que el nitrógeno se encuentre en forma de nitrato, nitrito o amonio; en los dos primeros casos, el nitrato y el nitrito deben reducirse enzimáticamente antes de su

incorporación a aminoácidos, a través de la acción secuencial de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Posteriormente el nitrógeno reducido se incorpora a los aminoácidos mediante condensación con glutamato. En cambio, el amonio puede incorporarse con menor costo energético, lo que explica su frecuente preferencia como fuente de nitrógeno por parte de las microalgas (Cai et al., 2013).

Respecto del fósforo, se ha descrito su papel central en el metabolismo energético, la fotosíntesis y la síntesis de biomoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas. Las microalgas emplean preferentemente ortofosfato, cuya incorporación involucra transporte activo mediado por fosforilación (Fal et al., 2021). Asimismo, pueden exhibir una “absorción de lujo”, almacenando el exceso de fósforo como cuerpos de polifosfato en condiciones ambientales desfavorables (Singh et al., 2018). De manera complementaria, pueden operar mecanismos fisicoquímicos de precipitación de fosfatos a pH elevado y condiciones oxidantes, contribuyendo a la disminución del fósforo disuelto (Cai et al., 2013).

Respecto de la materia orgánica, el desempeño del tratamiento puede depender del tipo de efluente y del modo trófico dominante del cultivo. En efluentes con disponibilidad de carbono orgánico, el crecimiento mixotrófico puede verse favorecido, lo que puede influir en la dinámica de la DQO y la DBO, por consumo de carbono orgánico y por liberación de compuestos asociados a la biomasa, según especie y condición (D'Imporzano et al., 2017; Guldhe et al., 2017; Lima et al., 2022).

Adicionalmente, la literatura describe que, en matrices no axénicas, características de las aguas residuales, la presencia bacteriana puede ejercer efectos tanto inhibitorios como facilitadores sobre el crecimiento algal (Mahapatra et al., 2013). Asimismo, se ha propuesto que sistemas basados en microalgas pueden contribuir a la reducción de bacterias patógenas por efectos combinados de la radiación luminosa, el incremento de OD, el aumento de pH y mecanismos adicionales, como competencia por nutrientes y depredación (Delanka-Pedige et al., 2019; Kumar et al., 2021).

Microalgas como fuente de compuestos de interés biotecnológico

La biomasa algal ha adquirido creciente relevancia en el contexto de la bioeconomía debido a la diversidad de aplicaciones potenciales asociadas a su composición química. En este marco, la industria de las microalgas presenta un valor de mercado global en expansión, con proyecciones que lo sitúan en torno a los 1.395 millones de dólares para el año 2030, impulsado por su uso en sectores como la alimentación animal y humana, los nutracéuticos, la industria farmacéutica y cosmética, la producción de biocombustibles y biomateriales y los servicios de biorremediación (Data Bridge Market Research, 2022; Shitanaka et al., 2024).

El cultivo de microalgas en aguas residuales permite articular una doble función: la remoción de contaminantes del efluente y la generación de biomasa con potencial valor agregado. Numerosos estudios han reportado que la composición bioquímica de la biomasa obtenida puede variar significativamente en función de la composición del efluente, las condiciones del cultivo y la especie empleada (D'Imporzano et al., 2017; Guldhe et al., 2017; de Cassia Soares Brandão et al., 2023).

En los últimos años, una parte sustancial de la investigación se ha orientado a la acumulación de lípidos con fines energéticos, particularmente la producción de biodiesel, mientras que otras fracciones de interés permanecen comparativamente menos exploradas (de Cassia Soares Brandão et al., 2023), lo que ha motivado el creciente interés por enfoques más integrales que contemplen la obtención de múltiples productos y coproductos, en consonancia con los principios de la economía circular.

Entre los principales componentes de interés biotecnológico se destacan las proteínas, los carbohidratos y los lípidos, estos últimos relevantes por su perfil de ácidos grasos (PAG), que pueden incluir proporciones variables de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los cuales se destacan por sus diversas propiedades nutricionales y funcionales (D'Imporzano et al., 2017; Lima et al., 2020; Conde et al., 2021; de Cassia Soares Brandão et al., 2023). Asimismo, las microalgas son reconocidas como una fuente importante de carotenoides, entre los cuales el β -caroteno, la astaxantina y la luteína presentan los valores de mercado más elevados, con aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Sun et al., 2018a; Singh et al., 2019; Tan et al., 2022).

Potencial de *Chlorella vulgaris* y *Euglena gracilis*

Tanto la composición de la biomasa algal producida como el desempeño en sistemas de tratamiento, en términos de eficiencia de remoción de nutrientes y capacidad de adaptación a las aguas residuales, varían ampliamente entre especies y cepas de microalgas (Bhatnagar et al., 2011; Kube et al., 2018; Odjadjare et al., 2018; Song et al., 2022). En este contexto, la evaluación del comportamiento de especies representativas permite explorar el potencial de las microalgas tanto para la biorremediación como para la obtención de compuestos de interés biotecnológico.

Entre las microalgas más estudiadas, especies del género *Chlorella* han sido ampliamente aplicadas para el tratamiento de efluentes debido a su elevada tasa de crecimiento, tolerancia a condiciones ambientales adversas y eficiencia de eliminación de nutrientes (Evans et al., 2017; Eida et al., 2018; Oberholster et al., 2021; Arrojo et al., 2022; Bhat et al., 2023). En particular, *Chlorella vulgaris* ha sido utilizada como organismo modelo en numerosos estudios, donde se han analizado de manera conjunta

la remoción de contaminantes y la acumulación de componentes bioquímicos como proteínas, carbohidratos y lípidos, así como el PAG de la biomasa producida (Pantami et al., 2020; Fal et al., 2021; Pacheco et al., 2021; Oraby et al., 2023). Asimismo, se ha reportado la capacidad de ciertas especies de *Chlorella* para acumular carotenoides, incluida la astaxantina, principalmente bajo condiciones de estrés lumínico y nutricional en medios de cultivo sintético; sin embargo, la evidencia sobre su acumulación en cultivos mixotróficos desarrollados en aguas residuales es aún limitada (Sun et al., 2008; Kendirlioglu & Cetin, 2017; Zhang et al., 2017; Mao et al., 2018; Yadav et al., 2020).

Por otro lado, las microalgas del género *Euglena* han suscitado interés por su notable versatilidad metabólica y su capacidad para reorganizar su metabolismo en función de la disponibilidad de sustratos orgánicos de diversa naturaleza química (Gulk et al., 2023). *Euglena gracilis*, una de las especies más estudiadas del género, puede crecer bajo condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas, y tolerar amplios rangos de pH y condiciones de oxigenación variables (Feregrino Mondragon, 2019; Gissibl et al., 2019; Muchut, 2020; Nezbyrtycka et al., 2022). Aunque existen estudios que evalúan su desempeño en la remoción de contaminantes, mayormente de nutrientes, a partir de aguas residuales, estos son comparativamente escasos en relación con otras microalgas (Mahapatra et al., 2013; Jutidamrongphan et al., 2015; Rubiyatno et al., 2021).

Un aspecto distintivo de *E. gracilis* es su capacidad para acumular paramilon, un β -1,3-glucano de reserva con potenciales aplicaciones nutraceuticas y biomédicas (Levine et al., 2013; Russo et al., 2017; Nakashima et al., 2017), cuyas proporciones pueden variar significativamente según las condiciones de cultivo (Suzuki et al., 2018; Hasan et al., 2019; Muchut, 2020; Casas-Arrojo et al., 2022). No obstante, la mayoría de los estudios disponibles se basan en cultivos desarrollados en medios sintéticos, siendo limitada la información de aborda simultáneamente el crecimiento de *E. gracilis* en aguas residuales, su desempeño en la biorremediación y la acumulación de paramilon en la biomasa. Esta escasez de estudios integrales pone de manifiesto una brecha de conocimiento que el presente trabajo busca abordar.

Enfoque de evaluación toxicológica para reutilización de ARU

En el marco del tratamiento de aguas residuales, la evaluación de la calidad del efluente tratado mediante ensayos de toxicidad constituye una herramienta complementaria a los análisis fisicoquímicos y microbiológicos tradicionales. Estos ensayos permiten integrar los efectos combinados de los contaminantes presentes y estimar riesgos ambientales potenciales asociados a su vertido o reutilización. Dentro del paradigma de la economía circular, el reúso de efluentes tratados para riego agrícola

se ha propuesto como una estrategia orientada a optimizar el uso del recurso hídrico y contribuir a la producción sostenible de cultivos (de Cassia Soares Brandão et al., 2023).

Diversos organismos internacionales han desarrollado guías y recomendaciones a fin de establecer criterios de calidad para la reutilización de aguas residuales tratadas en riego agrícola. Estas directrices, elaboradas por entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y agencias regulatorias nacionales e internacionales, establecen valores de referencia para parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, que se emplean para evaluar la aptitud del efluente tratado para su uso en diferentes tipos de cultivos.

Entre las herramientas disponibles, los bioensayos de fitotoxicidad basados en semillas se destacan por su simplicidad, bajo costo y elevada sensibilidad. Estos ensayos permiten detectar efectos adversos sobre la germinación y el desarrollo temprano de plántulas, etapas críticas del desarrollo vegetal y determinantes para el establecimiento de los cultivos (Mañas & De Las Heras, 2018). Entre las especies empleadas, *Lactuca sativa* (lechuga) se ha consolidado como un organismo modelo ampliamente utilizado en ensayos de toxicidad aguda debido a su rápido ciclo de germinación y a su sensibilidad frente a una amplia variedad de contaminantes presentes en matrices acuosas (Pentreath et al. 2015; Chan-Keb et al., 2021).

Estudios han demostrado la utilidad de *L. sativa* como indicador de toxicidad en efluentes de distinto origen (Borba et al., 2008; Palácio et al., 2012). En este sentido, la evaluación de la respuesta de *L. sativa* frente a efluentes tratados con microalgas constituye un enfoque pertinente para estimar el potencial de reúso del agua, integrando criterios de calidad ambiental y protección de los sistemas productivos.

Objetivos del trabajo

Objetivo general

Evaluar la potencialidad del uso de *Chlorella vulgaris* y *Euglena gracilis* en sistemas de tratamiento aplicados a ARU con fines de biorremediación y obtención de moléculas de interés biotecnológico.

Objetivos específicos

Caracterizar física, química y microbiológicamente los ARU generadas en la ciudad de San Justo (Santa Fe), evaluando su variabilidad estacional y su adecuación a los marcos regulatorios vigentes.

Desarrollar una herramienta analítica alternativa para la detección de CF en las ARU.

Cultivar las microalgas a escala de laboratorio y determinar las condiciones fisiológicas de crecimiento mediante densidad celular, biomasa, biovolumen, pigmentos fotosintéticos y biomarcadores de estrés oxidativo

Controlar los parámetros fisiológicos de las microalgas expuestas a distintas concentraciones de las ARU.

Evaluar la eficiencia de remoción de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en sistemas de tratamientos basados en las microalgas.

Evaluar la presencia y concentración de moléculas de interés biotecnológico: astaxantina y/o β -1,3-glucano en *C. vulgaris* y *E. gracilis*.

Capítulo 1: Caracterización de ARU y desarrollo de una herramienta analítica alternativa

1.1 Introducción

El crecimiento demográfico y la expansión urbana tiene un impacto directo en la generación de aguas residuales, lo que intensifica los riesgos para la salud pública y el ambiente cuando la infraestructura de saneamiento y tratamiento resultan escasos o ineficientes. Las ARU constituyen una de las principales vías de ingreso de contaminantes físicos, químicos y biológicos a los cuerpos de agua receptores (Acuña et al., 2017; Ortega-Blas et al., 2025).

En Argentina, un informe elaborado por la Dirección Nacional de Agua Potable y Saneamiento (DNAPyS) en convenio con el Banco de Desarrollo de América Latina y el Caribe (CAF) reportó que el 63,1% de las zonas urbanas dispone de recolección de aguas residuales y, que, de ese volumen recolectado, sólo el 27,6% recibe tratamiento adecuado previo a la descarga; además, los sistemas lagunares representan aproximadamente el 61 % de las tecnologías empleadas para el tratamiento (DNAPyS, 2023). Entre el número reducido de complejos urbanos que tratan sus ARU, se encuentra la ciudad de San Justo (provincia de Santa Fe, Argentina) que cuenta con una Planta de Tratamiento de ARU (PTSJ) basada en un sistema de lagunas de estabilización con desinfección final.

Este capítulo aborda, por un lado, la caracterización fisicoquímica y bacteriológica del efluente asociado a la PTSJ y, por el otro, el desarrollo de una estrategia analítica alternativa orientada a la detección de CF, en consonancia con límites normativos vigentes en la provincia de Santa Fe. En particular, la interpretación de la calidad del efluente y de la eficiencia del tratamiento se apoya en esta normativa, contribuyendo a una evaluación del desempeño del sistema y de los riesgos asociados al vuelco.

1.1.1 Planta de Tratamiento de ARU de San Justo (PTSJ)

En la localidad de San Justo, las ARU generadas por el ejido urbano son tratadas mediante un sistema de lagunas de estabilización dispuesto en etapas: dos lagunas anaeróbicas (LA), dos lagunas facultativas primarias (LFP), dos lagunas facultativas secundarias (LFS) y una cámara de cloración (CC). Posteriormente, el efluente tratado es conducido hacia un canal de descarga que desemboca en el río Salado.

La PTSJ se localiza a 2 km del área urbana, en la zona de radicación de industrias potencialmente peligrosas, según el código urbano local (Ordenanza N° 2037/06). La planta presta servicio a una población de aproximadamente 25.000 habitantes y procesa

un caudal del orden de $135 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. En la Figura 2 se presenta la localización geográfica de la región de estudio y en la Figura 3 una imagen satelital de la PTSJ.

En términos generales, el objetivo de las lagunas de estabilización es retener el efluente durante un tiempo suficiente para favorecer la reducción de la carga orgánica y de otros componentes. En este sentido, diversos componentes fisicoquímicos presentes en las ARU pueden ser empleados como nutrientes por grupos de microorganismos, que cumplen un rol central en los procesos de degradación (von Sperling, 2007).

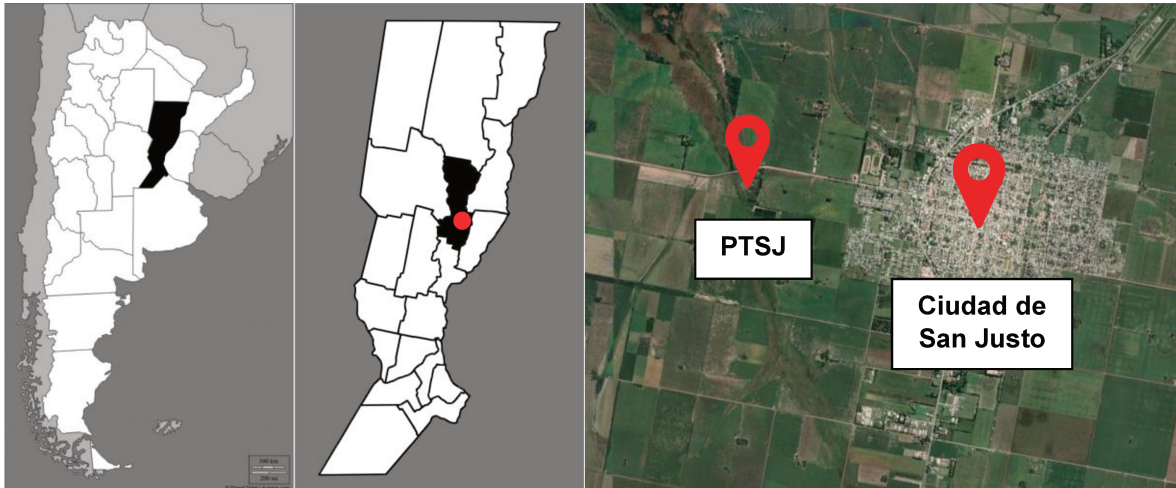


Figura 2: Localización geográfica del área de estudio. De izquierda a derecha: ubicación de la provincia de Santa Fe dentro del territorio argentino; localización de la ciudad de San Justo, en la Provincia de Santa Fe; imagen satelital de la ciudad de San Justo y su entorno, donde se señalan la ubicación de la Planta de Tratamiento de aguas residuales (PTSJ) y el área urbana.

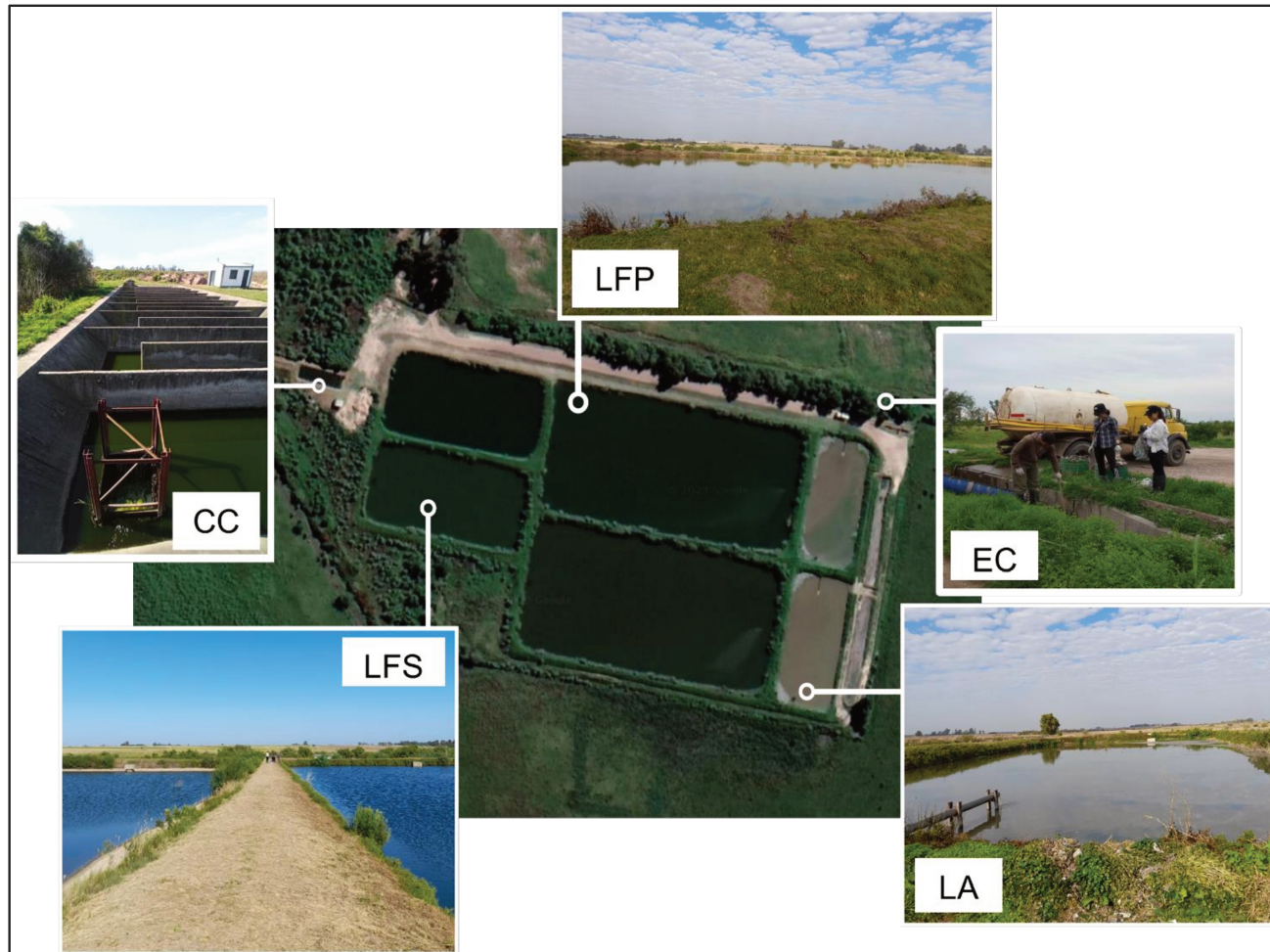


Figura 3: Imagen satelital de la Planta de Tratamiento de San Justo (Santa Fe) y fotografías representativas de sus distintas etapas. EC = Ingreso del efluente crudo; LA = Lagunas anaerobias; LFP = Lagunas facultativas primarias; LFS = Lagunas facultativas secundarias; CC = Cámara de cloración. Las muestras se tomaron en EC y en el punto de unión de las LFS, previo al ingreso a la CC.

La eficiencia de remoción de contaminantes en plantas de tratamiento puede variar en función de condiciones operativas, de la variabilidad del efluente de ingreso y de factores climáticos y estacionales. De este modo, resulta pertinente caracterizar el efluente en puntos representativos del proceso y evaluar su desempeño respecto de parámetros empleados en el monitoreo ambiental. En este capítulo se analiza la calidad del efluente al ingreso a la planta (efluente crudo, EC) y a la salida del sistema de LFS, previo al ingreso a la CC, considerando muestreos realizados en períodos contrastantes de temperatura y precipitaciones.

1.1.2 Marco normativo provincial

La provincia de Santa Fe cuenta con un marco regulatorio específico para la descarga de efluentes cloacales, establecido en la Ley N° 11.220 de Prestación y Regulación de Servicios Sanitarios (Gobierno de la provincia de Santa Fe, 1994). Su Anexo B fija límites para parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, incluyendo DBO, DQO, SST, nutrientes, metales, fenoles, así como bacterias coliformes totales y fecales, entre otros.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los límites obligatorios aplicables a parámetros considerados en este capítulo. En particular, el Anexo B incluye a los fenoles con un límite obligatorio de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) y un límite sin tratamiento de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 1: Parámetros legislados para la descarga de efluentes cloacales en la provincia de Santa Fe, según la Ley N° 11.220 (Anexo B) (Gobierno de la provincia de Santa Fe, 1994).

Parámetro	Límite obligatorio
Temperatura	45 °C
pH	7,5 < pH < 8,5
Cadmio	0,1 mg L ⁻¹ Cd
Cromo	0,2 mg L ⁻¹ Cr
Plomo	0,5 mg L ⁻¹ Pb
Arsénico	0,5 mg L ⁻¹ As
Mercurio	0,005 mg L ⁻¹ Hg
Fenoles	0,05 mg L ⁻¹ C ₆ H ₅ OH
DQO	125 mg L ⁻¹ O ₂
DBO	50 mg L ⁻¹ O ₂
Sulfuros	1 mg L ⁻¹
SST	60 mg L ⁻¹
Amonio	25 mg L ⁻¹ N
Fósforo	2 mg L ⁻¹ P
Bacterias coliformes totales	5x10 ³ NMP 100 mL ⁻¹
Bacterias coliformes fecales	1x10 ³ NMP 100 mL ⁻¹

1.1.3 Riesgos ambientales

Las ARU constituyen una matriz ambiental compleja cuya composición refleja, en gran medida, el comportamiento, el tipo de consumo y el estilo de vida de la población, así como las condiciones locales de gestión y regulación. Incluyen principalmente materia orgánica biodegradable, nutrientes, detergentes, aceites y grasas, microorganismos potencialmente patógenos y, en ciertos contextos, metales y compuestos orgánicos de preocupación ambiental (Henze & Comeau, 2008; Arora et al., 2020). En consecuencia, su descarga sin tratamiento o con tratamiento insuficiente puede generar deterioro de la calidad del agua, desequilibrios en ecosistemas acuáticos y riesgos para la salud humana, entre otros efectos adversos reportados para cuerpos receptores expuestos a efluentes complejos (Rajasulochana & Preethy, 2016; Reno et al., 2022; Baldisserotto et al., 2023).

El tratamiento de efluentes urbanos tiene el objetivo de evitar daños a abastecimientos públicos, privados e industriales, prevenir perjuicios a actividades piscícolas, minimizar impactos sobre la agricultura y evitar la desvalorización de la tierra, además de reducir los impactos sobre los ecosistemas (Nuñez, 2013).

La materia orgánica presente en las ARU puede afectar el equilibrio de los ecosistemas receptores al incrementar la demanda de oxígeno, con potencial disminución del OD y efectos sobre comunidades acuáticas (Akinnawo, 2023). Por ello, dos parámetros globales se consideran centrales en el monitoreo: DBO, que representa la fracción biodegradable, y DQO, que aproxima la carga orgánica total oxidable (Lima et al., 2020; Sonone et al., 2021). Como complemento, el Índice de biodegradabilidad ($IB = DBO/DQO$) permite relacionar la fracción biodegradable respecto de la carga total y constituye un indicador útil para inferir cambios en la naturaleza del efluente a lo largo del tratamiento (Bedoya Pérez et al., 2014). En este capítulo, se utiliza el IB para evaluar la evolución del efluente desde el ingreso hacia el efluente tratado en LFS.

Por su parte, el nitrógeno y fósforo pueden estar presentes en las ARU en formas inorgánicas, mayoritariamente como amonio y ortofosfatos (Baldisserotto et al., 2023; Ortega-Blas et al., 2025). La descarga de efluentes con concentraciones elevadas de nutrientes en cuerpos receptores se asocia a procesos de eutrofización, proliferaciones algales, eutrofización y otros desequilibrios ecológicos, con pérdida de calidad del agua y riesgos derivados; además, estos compuestos pueden representar un desafío operativo para el tratamiento (Cai et al., 2013; Guldhe et al., 2017).

Las ARU también pueden contener elementos potencialmente tóxicos como arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, zinc, entre otros metales. Aunque algunos pueden actuar como micronutrientes a bajas concentraciones, pueden resultar tóxicos si están presentes en niveles elevados. Además, presentan un potencial de bioacumulación en la biota acuática y de transferencia a través de tramas tróficas, con consecuencias adversas para la fauna y los seres humanos (Guldhe et al., 2017; Sonone et al., 2021; Chai et al., 2021). Asimismo, ciertos metales pesados poseen efectos genotóxicos y carcinogénicos, además de causar alteraciones renales y hepáticas (Oruganti et al., 2022). La presencia de metales en las aguas residuales puede influir, además, en las posibilidades de reutilización del efluente (Henze & Comeau, 2008)

Finalmente, debido a su componente cloacal, la ARU contienen microorganismos patógenos potencialmente peligrosos para la salud humana, por lo cual los indicadores bacteriológicos (coliformes totales y fecales) forman parte del control regulatorio (Guldhe et al., 2017; Sonone et al., 2021). En el caso de la PTSJ, el proceso contempla una etapa final de cloración. Sin embargo, para caracterizar el desempeño del sistema biológico de lagunas, el muestreo considerado en este capítulo incluye el efluente tratado previo al ingreso a la CC.

En síntesis, la evaluación integral de la calidad del efluente urbano y del desempeño del tratamiento requiere considerar parámetros de carga orgánica, nutrientes,

sustancias potencialmente tóxicas e indicadores bacteriológicos. No obstante, la normativa incluye además contaminantes orgánicos específicos cuya vigilancia puede requerir herramientas analíticas complementarias; entre ellos, se destacan los CF, por su relevancia toxicológica y su regulación explícita. Sobre esta base, este capítulo desarrolla la caracterización de las ARU de la PTSJ y la eficiencia de remoción entre EC y LFS en distintos períodos estacionales, y, a continuación, aborda la relevancia de los CF y las estrategias analíticas disponibles para su determinación.

1.1.4 Compuestos fenólicos: relevancia y detección analítica

Se han documentado diversos efectos adversos de los CF sobre organismos acuáticos y sobre la salud humana, dado que pueden ser absorbidos a través de la piel, las mucosas y el tracto respiratorio. Se han descrito efectos tóxicos sobre órganos como hígado, riñones y pulmones, así como procesos de bioacumulación en peces, con potencial transferencia a lo largo de las tramas tróficas (Abdullah et al., 2006; Das et al., 2014).

El posible ingreso de los CF en las ARU, asociado al descarte de productos de uso cotidiano elaborados con estos compuestos, refuerza la necesidad de monitoreo sistemático (Wang et al., 2013; Rodriguez-Delgado et al., 2015), particularmente en presencia de marcos regulatorios específicos. En este sentido, la provincia de Santa Fe establece valores límites para fenoles en la descarga de efluentes cloacales, según lo dispuesto en la normativa vigente (sección 1.1.2).

Los métodos analíticos convencionales de determinación de CF incluyen metodologías de elevada sensibilidad, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), así como técnicas espectrofotométricas, quimioluminiscentes y electroforéticas (Ahmad et al., 2016; Othman & Wollenberger, 2020). Su aplicación rutinaria presenta limitaciones asociadas al alto costo, el consumo de solventes, los largos tiempos de análisis, la necesidad de equipamiento especializado y personal entrenado, así como la escasa aplicabilidad para mediciones *in situ*. En consecuencia, existe un interés creciente en el desarrollo de estrategias alternativas que mantengan un desempeño analítico adecuado, pero que simplifiquen la operación y reduzcan los requerimientos de infraestructura y los tiempos de análisis (Akbulut et al., 2015).

Métodos alternativos de detección analítica

Los biosensores constituyen dispositivos analíticos que integran un elemento de reconocimiento biológico, denominado biorreceptor, en contacto con un transductor

fisicoquímico, capaz de convertir la interacción analito-biorreceptor en una señal medible, generalmente eléctrica en el caso de los biosensores electroquímicos. La selectividad del dispositivo se encuentra determinada principalmente por el componente biológico, mientras que el transductor condiciona la eficiencia de la conversión y el procesamiento de la señal (Peña García, 2004; Carinelli, 2011).

Los biosensores enzimáticos, en los cuales una enzima actúa como biorreceptor, han sido ampliamente reportados como herramientas analíticas para la determinación de CF, debido a la capacidad catalítica de enzimas oxidativas que reconocen sustratos fenólicos en estado reducido. Entre las oxidorreductasas, se destacan la tirosinasa (TYR) y la lacasa (LACC), ambas empleadas como biorreceptores en biosensores electroquímicos para la cuantificación de fenoles y derivados (Portaccio et al., 2010; Wu et al., 2012, 2019; Pan et al., 2015; Fu et al., 2018; Wee et al., 2019). Estas enzimas catalizan la oxidación de CF hacia especies quinona, las cuales son electroactivas y pueden reducirse nuevamente en la superficie del electrodo a potenciales relativamente bajos. Este mecanismo permite registrar una señal de corriente relacionada con la concentración del analito y, al mismo tiempo, minimiza la contribución de especies interferentes que se oxidan o reducen a potenciales más extremos (Alcaraz et al., 2013; Zhou et al., 2014; Kurbanoglu et al., 2017).

Los biosensores enzimáticos presentan ciertas ventajas frente a los métodos convencionales, tales tiempos más cortos de análisis, menores costos y potencial aplicabilidad para análisis *in situ*. Estas características se ven reforzadas cuando se emplean electrodos serigrafados comerciales (*screen-printed-electrodes*, SPE) como transductores, debido a su versatilidad de diseño, posibilidad de producción en masa y facilidad para modificar su superficie (González-García & Costa-García, 2010; Biscay et al., 2014; Othman & Wollenberger, 2020).

Modificación de biosensores enzimáticos

Para el desarrollo y la evaluación analítica de un biosensor enzimático se debe seleccionar un CF modelo que permita establecer condiciones de trabajo reproducibles y evaluar el desempeño del dispositivo, en términos de señal frente al blanco, estabilidad de los potenciales y corrientes de respuesta. Este enfoque facilita la optimización del sistema previo a su aplicación a matrices reales más complejas. Para el desarrollo electroquímico del presente capítulo se priorizó un sustrato modelo que generara una señal reproducible en condiciones de lectura por voltametría de pulso diferencial (DPV) a potenciales moderados y con baja contribución capacitiva, posibilitando evaluar un desempeño del biosensor en rangos de concentración del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Los nanomateriales han sido ampliamente incorporados al diseño de los biosensores debido a su elevada relación superficie/volumen, buena biocompatibilidad, estabilidad química y capacidad para promover cinéticas de transferencia electrónica más rápidas entre el electrodo y el sitio activo de la enzima (Zhu et al., 2007; Ansari & Husain, 2012; Chawla et al., 2012). Se ha reportado que las nanopartículas (NP) metálicas favorecen la inmovilización de biomoléculas y aumentan la corriente de respuesta, contribuyendo a una mejora en la sensibilidad del biosensor. Las NP de cobre (CuNP) y sus óxidos se han estudiado debido a su elevada conductividad eléctrica, bajo costo en relación con otros metales, y su buena biocompatibilidad. Diversos trabajos han reportado que los nanomateriales basados en cobre incrementan la señal analítica del biosensor electroquímico y favorecen la transferencia electrónica (Chawla et al., 2011; Fu et al., 2018; Pino et al., 2016; Elisma et al., 2019).

Por otro lado, un desafío en los biosensores enzimáticos es la estabilidad operativa del biorreceptor y su retención en la interfaz electródica (Laranjo et al., 2019). La inmovilización enzimática y el microambiente generado por la matriz pueden impactar sobre la actividad catalítica, la difusión del sustrato y la resistencia a la transferencia de carga. Se ha propuesto el uso de matrices poliméricas y recubrimientos como estrategia para estabilizar las enzimas y mejorar el desempeño analítico del biosensor (Iyer & Ananthanarayan, 2008; Sánchez-Ramírez et al., 2014). Asimismo, se han ensayado diversos polímeros y aditivos, entre ellos, el polietilenglicol (PEG) y el propilenglicol (PG) se utilizan como humectantes y estabilizantes y han demostrado no alterar la estructura nativa de enzimas y, en algunos casos, mejorar su estabilidad y actividad catalítica mediante interacciones no específicas como enlaces de hidrógeno (Kokufuta & Nishimura., 1991; Akbulut et al., 2015; Ahmad et al., 2016). El cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA) ha sido empleado, por su carácter policatiónico, para favorecer la adsorción electrostática de enzimas con punto isoeléctrico apropiado para favorecer su interacción, incrementando la cantidad de biomolécula inmovilizada y mejorando las propiedades analíticas del biosensor (Wang et al., 2008; Kochana et al., 2015). Por su parte, el carbopol, un polímero aniónico con elevada capacidad de absorción de agua, ha sido utilizado como matriz para la encapsulación de la enzima, contribuyendo a mejorar su estabilidad (Luo et al., 2018). Finalmente, el Nafion®, un polímero perfluorado con excelente estabilidad química y conductividad protónica, ha sido ampliamente empleado como capa protectora final en biosensores enzimáticos, con el fin de evitar la lixiviación de la enzima y reducir interferencias, sin comprometer la difusión de sustratos fenólicos de bajo peso molecular (Litescu et al., 2010; Zakil et al., 2016; Liu et al., 2019).

En conjunto, estos antecedentes sustentan el desarrollo de biosensores enzimáticos electroquímicos basados en SPE modificados con NP y matrices poliméricas, orientados a la detección sensible de CF, para ser posteriormente aplicados en matrices complejas, como las ARU.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Caracterizar integralmente las ARU generadas en la ciudad de San Justo (Santa Fe, Argentina) y desarrollar una herramienta analítica alternativa basada en un biosensor enzimático para la detección de CF de interés ambiental.

1.2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar física, química y bacteriológicamente las ARU de la ciudad de San Justo (Santa Fe), evaluando su variabilidad estacional y la eficiencia de remoción del sistema de tratamiento.

Analizar la presencia y los niveles de los parámetros regulados y potencialmente tóxicos en las ARU, en el marco de la normativa provincial vigente.

Desarrollar un biosensor enzimático electroquímico basado en electrodos serigrafiados, mediante una estrategia de modificación superficial capa por capa que incorpore NP y matrices poliméricas.

Evaluar comparativamente distintas configuraciones del biosensor en función de su respuesta electroquímica frente a un CF modelo.

Estimar de manera preliminar la sensibilidad del biosensor desarrollado en rangos de concentración relevantes desde el punto de vista normativo.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Materiales y reactivos

El equipamiento empleado para la caracterización de las ARU incluyó una balanza analítica (SHINKO DENSHI CO., Ltd., modelo HT224R), un pH-metro (Jenco, modelo pH-Vision 6071), un equipo multiparamétrico (YSI Professional Plus), un espectrofotómetro UV-Visible (Dlab, modelo SP-UV1000), un vórtex (Dlab, modelo MX-S) una plancha calefactora (Thorbell, modelo MP2550) y una estufa (MARNE, modelo 343).

Los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron comercialmente de Sigma-Aldrich o Merck. Todas las soluciones y buffers se prepararon con agua Milli-Q.

Para el desarrollo del biosensor, realizado en el Laboratorio de Sensores y Biosensores (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL), los principales reactivos empleados incluyeron enzimas (Sigma-Aldrich): TYR (actividad específica $85,03 \text{ U mg}^{-1}$) y LACC (actividad específica $0,023 \text{ U mg}^{-1}$); un copolímero de ácido perfluorosulfónico (Nafion®, Sigma); agentes poliméricos: mezcla de PEG y PG (Alcon, concentración stock de la mezcla: 0,4% PEG y 0,3% PG) y una combinación de PDDA (Aldrich; concentración stock: 20 % m/v) con carbopol 940 (Max Vision SRL; concentración stock: 0,2% m/v); y CuNP, provistas por Nanotek S.A., obtenidas por síntesis química mediante reducción con borohidruro de sodio y suministradas en suspensión stock estabilizada con dietilamina, a una concentración de 40.000 mg L^{-1} .

La caracterización óptica de las CuNP se realizó mediante espectroscopía UV-Visible utilizando el espectrofotómetro Dlab SP-UV1000, mientras que la caracterización morfológica se efectuó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleando un microscopio JEOL JEM-2100 Plus, con una resolución espacial máxima de 0,19 nm, perteneciente al Servicio Centralizado de Grandes Instrumentos (SECEGRIN, CONICET, Santa Fe).

Para la construcción de los biosensores se emplearon electrodos serigrafados comerciales de grafito (SPE; Dropsens, código DS C110). Previo a su uso, los SPE se sometieron a un pretratamiento electroquímico adaptado de Sá et al. (2020), el cual consistió en la aplicación de un potencial fijo de 1 V durante 120 s en presencia de buffer de trabajo (BF6: buffer fosfato de potasio 50 mM, KCl 100 mM, pH 6,00) y, posteriormente, tras la renovación del electrolito, el procedimiento se repitió durante 60 segundos adicionales.

La modificación de los SPE se realizó mediante una estrategia de deposición capa por capa de las soluciones correspondientes sobre el electrodo de trabajo, estrategia ampliamente utilizada para la modificación de biosensores enzimáticos (Brett, 2018). Las mediciones electroquímicas se realizaron con un analizador voltamétrico BAS (modelo Epsilon), utilizando voltametría cíclica (CV) y DPV, frente a un electrodo de pseudoreferencia Ag/AgCl. En las mediciones de CV se aplicaron barridos de potencial entre 800 y -800 mV, mientras que para las DPV se emplearon barridos entre 300 y -300 mV.

Para el procesamiento de datos, elaboración de gráficos y análisis estadísticos se utilizaron los programas SigmaPlot versión 12.0 y OriginPro versión 9. El análisis de las imágenes obtenidas por TEM se realizó mediante el software ImageJ versión 1.54d.

Finalmente, las técnicas de diseño experimental y el análisis de superficies de respuesta se llevaron a cabo con el software Design-Expert 7.0.

1.3.2 Régimen de muestreo y recolección de muestras

Se realizaron 12 muestreos distribuidos en dos períodos contrastantes en cuanto a temperatura y régimen de precipitaciones: primavera-verano (PV) e invierno (Inv), durante los años 2021 a 2023. En cada período se efectuó un muestreo mensual durante tres meses para el monitoreo fisicoquímico y bacteriológico de las ARU: noviembre, diciembre y febrero (período PV) y junio, julio y agosto (período Inv).

Se recolectaron muestras en dos puntos de la PTSJ: i) el EC, en el ingreso a la planta, y ii) el efluente tratado por el sistema de lagunas, en el punto de confluencia de las dos LFS, previo al ingreso a la CC. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su tratamiento o análisis.

1.3.3 Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las ARU

En las muestras de EC y de LFS se analizaron los siguientes parámetros según metodologías estandarizadas: DQO ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$), método 410.1 (APHA, 1975); DBO a 5 días (DBO_5 , $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$), método 405.1 (APHA, 1980); sulfuros (mg L^{-1}); SST; mg L^{-1} - 105°C); nitrato ($\text{mg L}^{-1} \text{N}$), método 4500- NO_3^- -H; nitrito ($\text{mg L}^{-1} \text{N}$), método 4500- NO_2^- -B; amonio ($\text{mg L}^{-1} \text{N}$), método 4500- NH_3 -F; y fósforo ($\text{mg L}^{-1} \text{P}$), método 4500-P-E (APHA, 2017); bacterias coliformes totales y fecales ($\text{NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) (APHA, 2017).

En las muestras de EC, además, se determinaron, también mediante metodologías estandarizadas: cadmio ($\text{mg L}^{-1} \text{Cd}$), cromo ($\text{mg L}^{-1} \text{Cr}$) y plomo ($\text{mg L}^{-1} \text{Pb}$), método 3111 (APHA, 2017); arsénico ($\text{mg L}^{-1} \text{As}$), método 3114B (APHA, 2017); y mercurio ($\text{mg L}^{-1} \text{Hg}$), método 3112B (APHA, 2017).

Las determinaciones de DQO, DBO_5 , sulfuros, SST y coliformes totales y fecales fueron realizadas por Masterquim S.H. Las muestras destinadas a la determinación de metales pesados y arsénico fueron sometidas a digestión ácida en nuestro laboratorio (Laboratorio de Ecotoxicología, FHUC) según el método 200.2 de la Environmental Protection Agency (US EPA, 1994), para su posterior análisis por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo PE 8000), realizado en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL-CONICET).

Por último, los análisis de nitrato, nitrito, amonio y fósforo, tanto para la caracterización del efluente como para el desarrollo de los ensayos descritos en los capítulos siguientes, se realizaron en nuestro laboratorio mediante métodos colorimétricos (APHA, 2017), utilizando un espectrofotómetro Dlab SP-UV1000 UV Visible (200-1000 nm).

La determinación de nitrato se basa en su reducción con sulfato de hidracina y posterior diazotación con sulfanilamida y acoplamiento con un compuesto amino, dando lugar a la formación de un producto coloreado. A 1 mL de muestra se le adicionaron 198 μL de NaOH 0,80 M, se agitó con vórtex, y luego se agregaron 253 μL de reactivo reductor (preparado con sulfato de hidracina 3,84 mM, sulfato de cobre 143 mM y sulfato de zinc 0,32 mM). Después de 30 minutos se añadieron sulfanilamida 72,6 mM (en mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$ 3:1) y N-(1-naftil)-etilendiamina 3,86 mM. Tras 10 minutos se registró la absorbancia a 525 nm. La curva de calibrado se efectuó con soluciones patrón de KNO_3 , previamente secado en estufa durante 24 h. El valor obtenido corresponde a la suma de nitrato y nitrito, por lo que para discriminar el nitrato se restó el valor de nitrito obtenido en la misma muestra.

El nitrito se determinó mediante la formación de un colorante azoico rojizo producido a un pH 2,0-2,5 por la combinación de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina. A 1 mL de muestra se le agregaron 100 μL de la solución de sulfanilamida 72,6 mM, se agitó con vórtex, y luego de 10 minutos se adicionaron 100 μL de N-(1-naftil)-etilendiamina 3,86 mM. Luego de 2 minutos se midió la absorbancia a 525 nm. Para este análisis, se utilizó una curva de calibrado de NaNO_2 .

El amonio se determinó mediante su reacción con fenol e hipoclorito en medio alcalino, con formación de azul de indofenol. A 1,5 mL de muestra se le agregaron 30 μL de solución de fenol 532 mM (preparada con nitroferriicianuro de sodio 0,85 mM) y 30 μL de hipoclorito de sodio 36,6 mM (preparado con hidróxido de sodio 625 mM). Se incubó a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), bajo luz tenue, durante una hora, y luego se registró la absorbancia a 630 nm. La curva de calibrado se realizó con NH_4Cl , previamente secado en estufa.

Finalmente, se determinó el fósforo reactivo soluble por el método del ácido ascórbico. Brevemente, el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, que es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, el cual se determina colorimétricamente a 880 nm. Para ello, se preparó un reactivo combinado mezclando 2,5 mL de H_2SO_4 5 N, 0,25 mL de tartrato de antimonio y potasio 8,2 mM, 0,75 mL molibdato amónico 34,4 mM y 1,5 mL de ácido ascórbico 100 mM. A 1,5 mL de muestra se le agregaron 150 μL del reactivo combinado y, tras 10 minutos se registró la absorbancia. La curva de calibrado se realizó con KH_2PO_4 .

1.3.4 Eficiencia de tratamiento de la PTSJ

Los parámetros determinados en las ARU se compararon con los límites obligatorios establecidos por la Ley N° 11.220 de Prestación y Regulación de Servicios Sanitarios para la descarga de efluentes cloacales (Gobierno de la Provincia de Santa Fe, 1994). Para evaluar la eficiencia de la PTSJ en la reducción de los parámetros monitoreados en los dos puntos de muestreo (EC y LFS), se calculó la remoción (E%) entre estos puntos según Khalifa et al. (2020):

$$E (\%) = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

donde: C = concentración del contaminante de salida; C_0 = concentración del contaminante de entrada.

Adicionalmente, se calculó el IB (IB = DBO/DQO), que expresa la proporción relativa de la materia orgánica potencialmente biodegradable del efluente respecto de su carga orgánica total. De modo general, se aplica la siguiente clasificación de efluentes según valor obtenido del índice: IB > 0,33 corresponde a un efluente de alta biodegradabilidad; 0,20 < IB < 0,33 a un efluente de biodegradabilidad media; IB < 0,20 a un efluente de baja biodegradabilidad (Bouknana et al., 2014; Chatoui et al., 2016).

1.3.5 Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF

El desarrollo del biosensor se orientó a maximizar la sensibilidad analítica. En las etapas iniciales, se emplearon concentraciones elevadas del analito con el objetivo de caracterizar el comportamiento electroquímico del sistema y establecer condiciones experimentales adecuadas, mientras que en etapas posteriores se evaluó su desempeño en rangos de concentración menores, y compatibles con los límites normativos vigentes para fenoles.

Selección de enzima y sustrato fenólico modelo

Se evaluaron las respuestas electroquímicas de las enzimas TYR y LACC inmovilizadas individualmente por adsorción directa sobre SPE y recubiertas con una membrana protectora de Nafion®. Como sustrato inicial se empleó catecol a una concentración de 1 mM, en BF6. Las mediciones electroquímicas se realizaron mediante DPV, en un rango de potencial comprendido entre 300 mV y -300 mV.

Para cada enzima se ensayaron, por triplicado, diferentes niveles de actividad: 1, 10, 50 y 100 U de TYR; y 0,0018, 0,0024, 0,024 y 0,05 U de LACC. Para ello, se depositaron 3 µL de la solución enzimática correspondiente sobre el electrodo de trabajo de cada SPE y, posteriormente, 3 µL de solución de Nafion® al 0,5% m/v (preparada en etanol

absoluto). Entre cada deposición, el electrodo se dejó secar a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

A partir de este ensayo se seleccionó, para cada enzima, el nivel de actividad que presentó mejor desempeño considerando la intensidad de la señal y la repetibilidad entre SPE preparados de forma independiente, junto con la estabilidad física del recubrimiento. Los biosensores preparados bajo las condiciones seleccionadas fueron posteriormente evaluados frente a catecol en el rango de 1 a 1000 μM , con el fin de comparar sus respuestas frente a diferentes concentraciones del sustrato y definir la enzima a emplear en etapas posteriores.

Posteriormente, se prepararon biosensores empleando la enzima seleccionada para evaluar distintos sustratos fenólicos. Se ensayaron fenol, catecol e hidroquinona (HQ) en un rango de concentraciones comprendidos entre 10 μM y 1000 μM , en BF6, utilizando la DPV como técnica electroquímica de detección (300 a -300 mV). La selección del sustrato modelo consideró la obtención de una señal analítica apreciable respecto del blanco, así como la estabilidad de los potenciales de reducción y del nivel de corriente capacitiva asociado.

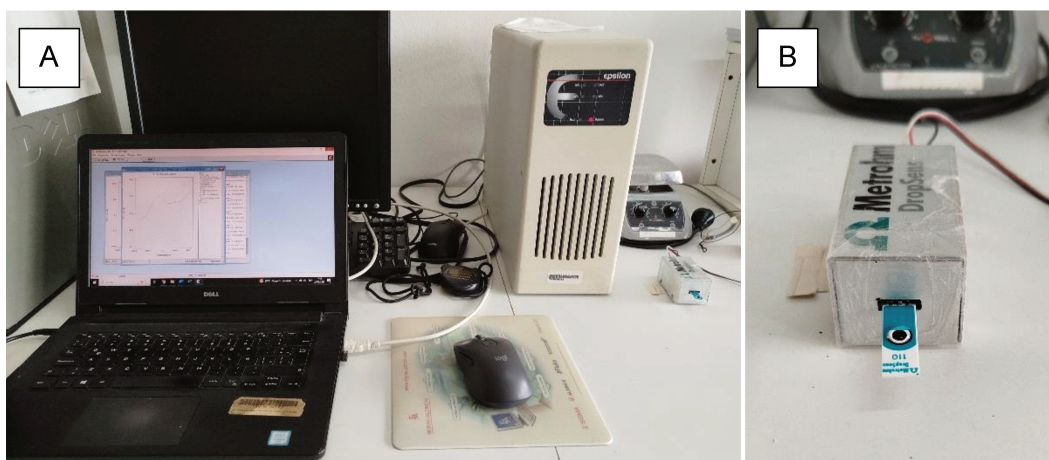


Figura 4: Montaje experimental utilizado para la evaluación electroquímica de los biosensores. Fig. A: Analizador voltamétrico BAS operando voltametría de pulso diferencial (DPV). Fig. B: Electrodo serigrafiado (SPE) conectado al equipo de medición.

Evaluación de la carga enzimática y estabilidad temporal

Con el sustrato seleccionado, se realizó un ensayo exploratorio para ajustar la carga enzimática del biosensor. Se evaluaron biosensores SPE-TYR-Naf con actividades de TYR comprendidas entre 25 y 200 U, frente a HQ 100 μM en BF6. La respuesta electroquímica se registró mediante DPV (300 a -300 mV), realizando mediciones sucesivas cada minuto durante un período total de quince minutos.

A partir de los valores de corriente de reducción obtenidos, se calculó la tasa de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$), como pendiente local, estimada en distintos tiempos (2, 5, 10 y 15 min) con el fin de describir la evolución temporal de la señal electroquímica.

Modificación del biosensor con nanopartículas de cobre (CuNP) Caracterización óptica y morfológica de las CuNP

Se realizó la caracterización óptica de las CuNP mediante espectroscopía UV-Visible con el objetivo de confirmar su formación y evaluar la presencia de una banda de absorción característica en la región visible. Para ello, a partir de la suspensión stock de CuNP se prepararon diluciones seriadas en agua Milli-Q, obteniéndose suspensiones con concentraciones comprendidas entre aproximadamente 10 y 600 mg L^{-1} .

Los espectros de absorbancia se registraron en el rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm, se utilizaron cubetas de cuarzo y se empleó el solvente de dilución como blanco.

Adicionalmente, se efectuó una caracterización morfológica de las NP mediante TEM. A partir de las micrografías obtenidas, se determinó el tamaño de las partículas mediante análisis digital de imágenes empleando el software ImageJ. Se midió el diámetro equivalente de un total de 200 CuNP distribuidas en distintas regiones de las imágenes.

Incorporación de las CuNP en el biosensor

Con el objetivo de evaluar el efecto de la incorporación de CuNP sobre la respuesta electroquímica del biosensor enzimático y seleccionar una concentración adecuada para los estudios posteriores, se realizaron ensayos preliminares empleando suspensiones de CuNP de 50 y 100 mg L^{-1} . Para ello, los SPE fueron modificados mediante deposición secuencial de 3 μL de suspensión de CuNP de concentración correspondiente, seguida de 3 μL de solución de TYR (25 U en BF6, actividad final sobre electrodo = 75 U) y 3 μL de Nafion® (0,5% m/v en etanol), dejando secar a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) entre cada etapa. De este modo, se obtuvieron los biosensores B1 (CuNP100-TYR-Naf) y B2 (CuNP50-TYR-Naf). La caracterización electroquímica cualitativa de estos biosensores se realizó mediante CV, empleando un barrido de potencial entre 800 y -800 mV, en presencia de HQ 100 μM en BF6, con el fin de evaluar el comportamiento redox del sistema.

Posteriormente se prepararon nuevos biosensores con el objetivo de determinar la concentración óptima de CuNP para la detección analítica. Se ensayaron concentraciones de CuNP de 12, 5 y 3 mg L^{-1} , obteniéndose los biosensores B3

(CuNP12-TYR-Naf), B4 (CuNP5-TYR-Naf) y B5 (CuNP3-TYR-Naf). Asimismo, se preparó un biosensor enzimático control sin CuNP (B6 = SPE-TYR-Naf). La evaluación analítica de estos biosensores se llevó a cabo mediante DPV, en un rango de potencial comprendido entre 300 y -300 mV, utilizando HQ como sustrato modelo en BF6 a una concentración de 2,3 μM (equivalente a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$). Se realizaron mediciones sucesivas durante 15 minutos, con el fin de comparar la intensidad de la señal analítica y su evolución temporal para las distintas concentraciones de CuNP ensayadas, considerando además un nivel de corriente capacitiva asociado aceptable.

Uso de agentes poliméricos para la inmovilización de tirosinasa

Con el objetivo de evaluar el efecto de incorporar agentes poliméricos a la solución enzimática como estrategia para proporcionar una matriz más favorable para la TYR y mejorar su desempeño electroquímico, y con el fin de identificar el agente con mayor potencial para ser incluido como factor en el posterior diseño experimental, se ensayaron dos formulaciones: i) PEG/PG y ii) una combinación de PDDA con carbopol.

Las formulaciones se incorporaron a la solución de TYR previamente a su deposición sobre el electrodo, y los biosensores se construyeron de manera análoga a los ensayos previos, mediante deposición capa por capa y secado a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) entre etapas. De esta manera, se obtuvieron los biosensores B7 (CuNP3-PEG/PG/TYR-Naf) y B8 (CuNP3-PDDA/carb/TYR-Naf). Las concentraciones finales de los agentes poliméricos en la solución con la enzima fueron 0,1% / 0,075% (PEG/PG) y 2% / 0,05% (PDDA/carbopol), mientras la enzima se mantuvo en su nivel de actividad 75 U final por electrodo.

La respuesta electroquímica se registró por DPV (300 a -300 mV) frente a HQ en BF6 a una concentración de 2,3 μM (equivalente a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$), realizando mediciones sucesivas durante un período de 15 min, de modo de poder comparar la intensidad de la señal analítica y su evolución temporal para las dos formulaciones ensayadas.

Optimización del biosensor

Con el objetivo de definir la formulación final del biosensor y maximizar la respuesta electroquímica, se aplicó un diseño experimental basado en metodologías de superficie de respuesta (RSM) utilizando el software Design-Expert 7.0. La variable de respuesta primaria se definió como la intensidad de la corriente de pico catódica (IC) obtenida por DPV frente a HQ en BF6, registrada a los 5 min.

Se empleó un diseño compuesto central (CCD) del tipo *face-centered* (con $\alpha = 1$). Con el fin de reducir el número de corridas experimentales y el consumo de SPE, se trabajó con un CCD fraccionado. El diseño final consistió en 16 corridas experimentales

distribuidas en dos bloques, correspondientes a dos jornadas experimentales. Se evaluaron 3 factores a 3 niveles: A = concentración de Nafion® (desde 0,1 a 0,5% m/v en etanol), B = actividad de TYR (desde 65 a 85 U por electrodo) y C = factor dilución (FD) de PEG/PG (desde 0,17 a 0,25) incorporada a la solución enzimática. La concentración del PEG/PG se expresó como FD de la solución stock (0,4% / 0,3%) con el fin de facilitar la preparación de las corridas experimentales; los niveles evaluados correspondieron a las diluciones que dieron lugar a las concentraciones finales comprendidas entre 0,07% / 0,05% y 0,1% / 0,075% PEG/PG.

Durante el diseño se mantuvieron constantes las restantes condiciones de preparación del biosensor y de medición: modificación del SPE con CuNP (3 mg L⁻¹), concentración del sustrato (HQ 2,3 µM), y parámetros de DPV (300 a -300 mV). Para cada corrida experimental se realizaron registros sucesivos por DPV hasta 5 min, utilizando la IC a 5 min como respuesta para el ajuste del modelo.

Los resultados se ajustaron a un modelo cuadrático y se evaluó la significancia estadística del modelo, la falta de ajuste y los términos individuales mediante ANOVA, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$.



Figura 5: Disposición de los biosensores preparados correspondientes a las corridas del diseño experimental de optimización, organizadas en dos bloques experimentales.

Ensayo de verificación y caracterización analítica preliminar del biosensor

La condición óptima propuesta por el diseño experimental se evaluó mediante un ensayo de verificación, con el objetivo de corroborar la respuesta del biosensor bajo dichas condiciones. Para ello, se prepararon biosensores empleando la formulación óptima: Nafion® 0,44% (m/v, en etanol), TYR 82,02 U por electrodo, y FD = 0,23 de PEG/PG, equivalente a una concentración final de 0,09%/0,07% PEG/PG incorporada en la solución enzimática.

Se registró la respuesta electroquímica mediante DPV en BF6 (blanco) y en presencia de HQ a distintas concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$; $n = 3$): 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000. Para cada concentración se registraron mediciones sucesivas entre 1 y 5 min, registrándose la IC. Con el fin de aislar la contribución atribuible al sustrato respecto de la señal basal del sistema inmovilizado, se definió la corriente neta (ΔIC) como la diferencia entre la señal en presencia de sustrato (HQ) y la correspondiente al blanco (BF6). Adicionalmente, la evolución temporal de la señal se describió mediante la tasa de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$).

Finalmente, se realizó una estimación preliminar del límite de detección (LD) a partir de la dispersión del blanco y de la ecuación de calibración. En primera instancia, se calculó la desviación estándar de blanco; luego, se estimó la señal mínima detectable según:

$$\text{LD} = 3\sigma_{\text{blanco}} \quad (2)$$

donde: σ_{blanco} = desvío estándar del ensayo blanco.

Posteriormente, dicha señal se transformó a concentración empleando la ecuación del ajuste lineal de ΔIC en función del logaritmo de la concentración de HQ ($\log_{10} [\text{HQ}]$).

1.4 Resultados

1.4.1 Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las ARU

En la Tabla 2 se presenta la caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de ARU de la PTSJ, expresada como valores promedio por período de muestreos, así como también el IB calculado para cada período. En el material suplementario se detallan los resultados individuales obtenidos en cada muestreo (Tablas S1 y S2).

Entre los parámetros monitoreados, aquellos regulados por la Ley N° 11.220 de la provincia de Santa Fe son DQO, DBO_5 , sulfuros, SST, amonio, fósforo y bacterias coliformes totales y fecales (ver Tabla 1 de Introducción). Todos estos parámetros tendieron a disminuir entre los dos puntos de la planta (EC y LFS) en la mayoría de los muestreos efectuados. No obstante, la DQO se mantuvo por encima de límite normativo en todos los períodos analizados, tanto en EC como en LFS. En contraste, la DBO_5 y los sulfuros excedieron los valores permitidos en EC, pero en LFS se hallaron sistemáticamente por debajo del límite establecido. Los SST presentaron un comportamiento similar durante el primer año de muestreo; sin embargo, en el segundo

año se evidenció un incremento desde EC hacia LFS, lo que sugiere una pérdida de eficiencia del sistema, aunque sólo en invierno se superó el límite obligatorio.

En cuanto a los nutrientes, tanto el amonio como el fósforo mostraron incumplimientos variables respecto a la normativa. El amonio presentó comportamientos contrastantes entre los dos años de estudio: en el primero superó el límite obligatorio en invierno en los dos puntos de la planta, mientras que en primavera-verano se mantuvo por debajo del umbral tanto en EC como en LFS; en el segundo año se observó un patrón inverso con respecto a los periodos estacionales. Por su parte, el fósforo superó el valor permitido en todos los periodos de muestreo, excepto en el invierno de 2022.

Los parámetros bacteriológicos superaron en todos los casos los niveles máximos establecidos por la Ley; sin embargo, se debe considerar que las muestras de efluente fueron recolectadas previo a su ingreso a la CC, donde estos parámetros serían corregidos.

Finalmente, en la Tabla 3 se presentan las concentraciones de metales pesados y arsénico medidas en el EC. De todos los elementos analizados, sólo se detectó arsénico, el cual no superó en ningún muestreo el límite obligatorio establecido por la norma vigente ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos de las aguas residuales urbanas en los dos puntos de muestreo: efluente crudo (EC) y efluente tratado, de lagunas facultativas secundarias (LFS). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). Inv = Invierno; PV = Primavera-verano; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; IB = Índice de biodegradabilidad; SST = Sólidos suspendidos totales; LD = Límite de detección.

Parámetros	Período de muestreo							
	Inv 2021		PV 2021/2022		Inv 2022		PV 2022/2023	
	EC	LFS	EC	LFS	EC	LFS	EC	LFS
pH	7,5 \pm 0,4	7,6 \pm 0,1	7,7 \pm 0,2	7,7 \pm 0,1	7,9 \pm 0,3	7,9 \pm 0,2	7,6 \pm 0,3	8,0 \pm 0,5
DQO (mg L ⁻¹)	1055 \pm 1122 ^a	155 \pm 5 ^a	421 \pm 185 ^a	191 \pm 5 ^a	450 \pm 99 ^a	187 \pm 16 ^a	428 \pm 99 ^a	183 \pm 32 ^a
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	533 \pm 596 ^a	43 \pm 2	190 \pm 80 ^a	38 \pm 10	196 \pm 68 ^a	37 \pm 2	196 \pm 48 ^a	34 \pm 13
IB	0,48 \pm 0,03	0,27 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,20 \pm 0,05	0,43 \pm 0,07	0,20 \pm 0,01	0,46 \pm 0,02	0,18 \pm 0,05
Sulfuros (mg L ⁻¹)	3 \pm 3 ^a	< LD (0,02)	2 \pm 1 ^a	< LD (0,02)	1,3 \pm 0,3 ^a	< LD (0,02)	3 \pm 4 ^a	< LD (0,02)
SST (mg L ⁻¹)	420 \pm 610 ^a	44 \pm 5	86 \pm 41 ^a	44 \pm 28	93 \pm 10 ^a	94 \pm 62 ^a	40 \pm 27	57 \pm 23
Nitrato (mg L ⁻¹ N)	3,0 \pm 0,7	5 \pm 1	< LD (0,41)	15 \pm 11	< LD (0,41)	19 \pm 20	< LD (0,41)	103 \pm 65
Nitrito (mg L ⁻¹ N)	0,025*	0,02 \pm 0,01	< LD (0,01)	5 \pm 2	< LD (0,01)	0,9 \pm 0,6	< LD (0,01)	4 \pm 4
Amonio (mg L ⁻¹ N)	65 \pm 9 ^a	40 \pm 5 ^a	11 \pm 8	13 \pm 8	21 \pm 20	10 \pm 8	81 \pm 39 ^a	44 \pm 45 ^a
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	4 \pm 2 ^a	4 \pm 2 ^a	3 \pm 2 ^a	3 \pm 3 ^a	4,0 \pm 0,5 ^a	1,7 \pm 0,4	2,6 \pm 0,7 ^a	2,1 \pm 0,8 ^a
Bacterias								
coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	3x10 ⁷ \pm 2x10 ^{7a}	2x10 ⁶ \pm 1x10 ^{6a}	3x10 ⁷ \pm 1x10 ^{7a}	2x10 ⁵ \pm 2x10 ^{5a}	1,8x10 ⁷ \pm 0,6x10 ^{7a}	3x10 ⁵ \pm 2x10 ^{5a}	7x10 ⁷ \pm 4x10 ^{7a}	6x10 ⁴ \pm 2x10 ^{4a}
Bacterias								
coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	1,1x10 ⁷ \pm 0,7x10 ^{7a}	9x10 ⁴ \pm 1x10 ^{4a}	1,2x10 ⁷ \pm 0,9x10 ^{7a}	2x10 ⁴ \pm 2x10 ^{4a}	8x10 ⁶ \pm 3x10 ^{6a}	4x10 ⁴ \pm 3x10 ^{4a}	5x10 ⁷ \pm 5x10 ^{7a}	2x10 ⁴ \pm 2x10 ^{4a}

^a Valor que excede el límite normativo establecido para descargas cloacales por la Ley N° 11.220 de la provincia de Santa Fe.

* En dos de los tres muestreos la concentración fue < LD (0,01 mg L⁻¹), mientras que en el restante se determinó un valor de 0,025 mg L⁻¹.

Tabla 3: Concentración de metales pesados y arsénico en el efluente crudo de la Planta de Tratamiento de San Justo (Santa Fe). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). Inv = Invierno; PV = Primavera-verano; LC = Límite de cuantificación.

Parámetro	Período de muestreo			
	Inv 2021	PV 2021/2022	Inv 2022	PV 2022/2023
Cadmio (mg L ⁻¹)	< LC (0,2)	< LC (0,2)	< LC (0,2)	< LC (0,2)
Cromo (mg L ⁻¹)	< LC (0,2)	< LC (0,2)	< LC (0,2)	< LC (0,2)
Plomo (mg L ⁻¹)	< LC (0,25)	< LC (0,25)	< LC (0,25)	< LC (0,25)
Arsénico (mg L ⁻¹)	0,022 \pm 0,008	0,015*	0,013 \pm 0,003	0,015*
Mercurio (mg L ⁻¹)	< LC (0,002)	< LC (0,002)	< LC (0,002)	< LC (0,002)

* El valor corresponde al promedio de tres determinaciones coincidentes; el desvío estándar fue nulo dentro de la precisión del método.

1.4.2 Eficiencia de tratamiento de la PTSJ

En la Figura 6 se presenta la evolución del grado de biodegradabilidad de las ARU de la PTSJ, durante los períodos de muestreo estudiados. El efluente que ingresa a la planta presentó valores de IB superiores a 0,33, correspondientes a un alto nivel de biodegradabilidad; mientras que el efluente tratado por el sistema de lagunas mostró valores de IB entre 0,18 y 0,27, los que corresponden a una biodegradabilidad media o baja. Esto indicó alta biodegradabilidad al inicio del tratamiento, y reducción progresiva de la carga orgánica susceptible a ser biodegradada a lo largo del tratamiento.

En la Tabla 4 se detallan las eficiencias de remoción de los parámetros monitoreados que mostraron una tendencia global a la disminución entre EC y LFS, expresadas como valores promedio por período de muestreo. Las concentraciones de nitrato y nitrito aumentaron desde EC hacia LFS en todos los muestreos, por lo que su eficiencia global se consideró nula y no se incluyó en esta tabla. En el material suplementario se detalla la eficiencia de remoción individual de todos los parámetros monitoreados en cada muestreo (Tabla S3). Luego en la Figura 7 se representan gráficamente los resultados resumidos en la Tabla 4.

En términos generales, la remoción de los parámetros fisicoquímicos fue mayor en Inv que en PV, mientras que para los parámetros bacteriológicos se observó el patrón inverso, no obstante, estos últimos mantuvieron en todos los casos eficiencias elevadas y estables, superiores al 91%.

Las remociones de DBO₅ y sulfuros, superiores al 77%, resultaron efectivas para alcanzar concentraciones finales por debajo de los umbrales legislados. En el caso de la DQO, la reducción fue moderada (entre 48 % y 72%), y no permitió alcanzar el límite obligatorio en el efluente LFS. En cuanto a los SST, los valores previamente señalados

respecto del cumplimiento de la Ley, se reflejaron en los bajos porcentajes de remoción, particularmente en el segundo año, donde se evidenció un desempeño reducido de la planta.

Por último, los nutrientes también variaron a lo largo de los períodos de muestreo, con remociones nulas en algunos casos, lo que se tradujo en eficiencias globales bajas, particularmente en PV, con excepción del amonio en el período de 2022/2023. Cabe destacar que el tratamiento en CC no modifica estos parámetros, por lo que el efluente se descarga en el cuerpo receptor con concentraciones elevadas de amonio y fósforo, en la mayoría de los períodos analizados.

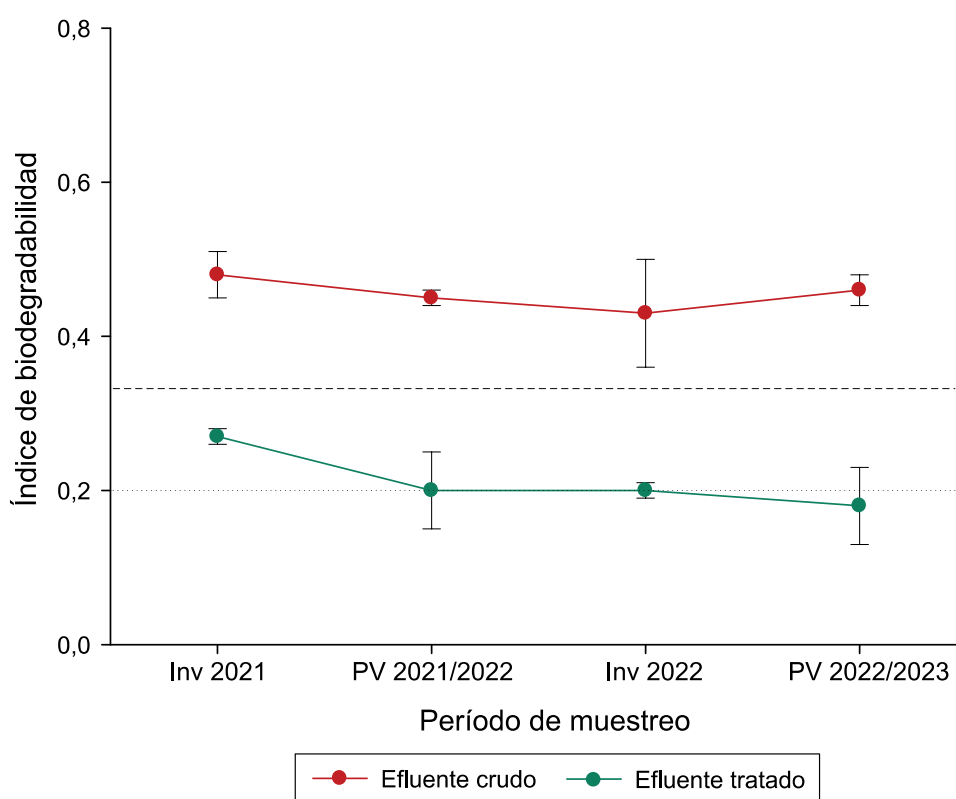


Figura 6: Evolución del índice de biodegradabilidad (IB) de las aguas residuales durante los períodos de muestreo en la Planta de Tratamiento de San Justo. Efluente crudo: ingreso a la planta; efluente tratado: posterior al sistema de lagunas y previo al ingreso a la cámara de cloración. La línea gris punteada indica IB = 0,20 (límite entre baja y media biodegradabilidad) y la línea gris de trazos cortos indica IB = 0,33 (límite entre media y alta biodegradabilidad). Barras de error: desviación estándar de n = 3. Inv = Invierno; PV = Primavera-verano.

Tabla 4: Eficiencias de remoción (%) de los parámetros monitoreados entre el efluente crudo y el efluente tratado, en lagunas facultativas secundarias, previo a la cloración. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). Inv = Invierno; PV = Primavera-verano; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; SST = Sólidos suspendidos totales.

Parámetros	Período de muestreo			
	Inv 2021	PV 2021/2022	Inv 2022	PV 2022/2023
DQO	72 \pm 20	48 \pm 22	57 \pm 12	56 \pm 13
DBO ₅	83 \pm 12	77 \pm 13	79 \pm 10	82 \pm 9
Sulfuros	97 \pm 2	98,7 \pm 0,7	98,4 \pm 0,4	93 \pm 11
SST	56 \pm 35	51 \pm 26	24 \pm 23	2 \pm 4
Amonio	39 \pm 3	14 \pm 15	37 \pm 32	54 \pm 27
Fósforo	30 \pm 28	17 \pm 29	57 \pm 12	23 \pm 12
Bacterias coliformes totales	91 \pm 11	99,4 \pm 0,6	98 \pm 2	99,9 \pm 0
Bacterias coliformes fecales	98 \pm 2	99,6 \pm 0,5	99,3 \pm 0,7	99,9 \pm 0

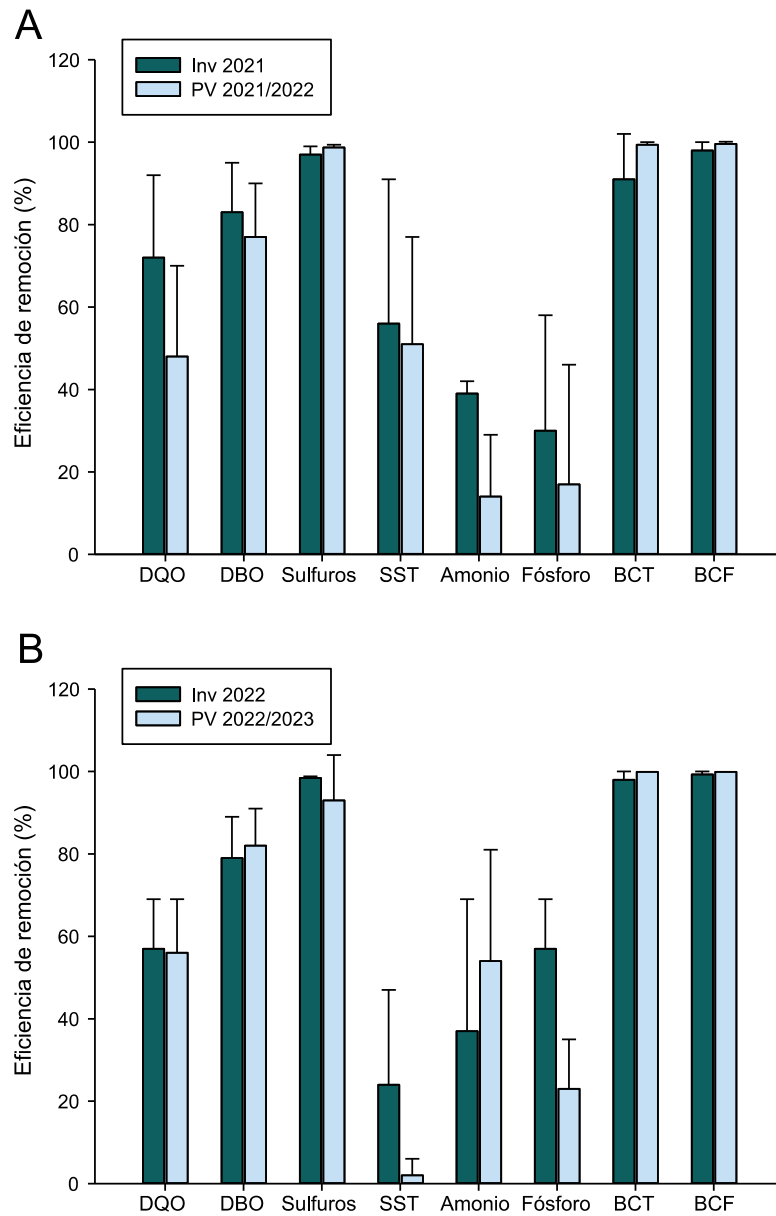


Figura 7: Eficiencias de remoción (%) de los parámetros monitoreados entre el efluente crudo y el efluente tratado, de lagunas facultativas secundarias, previo a la cloración, durante el primer (Fig. A) y segundo año de muestreo (Fig. B). Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Inv = Invierno; PV = Primavera-verano; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; SST = Sólidos suspendidos totales; BCT = Bacterias coliformes totales; BCF = Bacterias coliformes fecales.

1.4.3 Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF

Selección de enzima y sustrato fenólico modelo

En la Figura 8A y B se graficaron las intensidades de corriente de respuesta obtenidas en presencia de 1 mM de catecol por los biosensores SPE-TYR-Naf y SPE-LACC-Naf, en función de la actividad enzimática inmovilizada. En SPE-TYR-Naf, se observó un aumento en la corriente de respuesta al aumentar la actividad enzimática, con una tendencia a la saturación en los niveles de actividad más elevados, compatible con un proceso catalítico limitado por la disponibilidad del sustrato o por fenómenos de transporte dentro de la película formada. En función de estos resultados, se seleccionó el nivel de 50 U de TYR para los ensayos posteriores.

En contraste, en SPE-LACC-Naf se observó una disminución de la corriente al aumentar la actividad enzimática, alcanzando las mayores señales a actividades más bajas (0,0018 y 0,0024 U). Además, se evidenció macroscópicamente desprendimiento del recubrimiento, fenómeno que se acentuó al aumentar la carga enzimática. Por ello, se seleccionó el nivel de 0,0018 U de LACC para los ensayos posteriores.

En la Figura 8C se presentan voltamogramas representativos obtenidos con los biosensores en presencia de catecol a concentraciones de 100 y 1000 μM y en la Tabla 5 se resumen las corrientes de respuesta promedio obtenidas. Para 1000 μM de catecol no se observaron diferencias significativas entre los biosensores ($t(4) = 1,612$, $p = 0,182$), mientras que la respuesta obtenida frente a 100 μM fue significativamente mayor con el biosensor basado en TYR ($t(4) = 3,509$, $p = 0,025$). En los niveles inferiores de catecol (1 y 10 μM) no se detectaron diferencias de señal entre los ensayos blancos y los ensayos con sustrato, en ninguno de los biosensores.

En función de estos resultados, se seleccionó la TYR como elemento de reconocimiento biológico para el desarrollo del biosensor, debido a que presentó mejor desempeño a concentraciones moderadas del sustrato y respuestas más consistentes entre los ensayos.

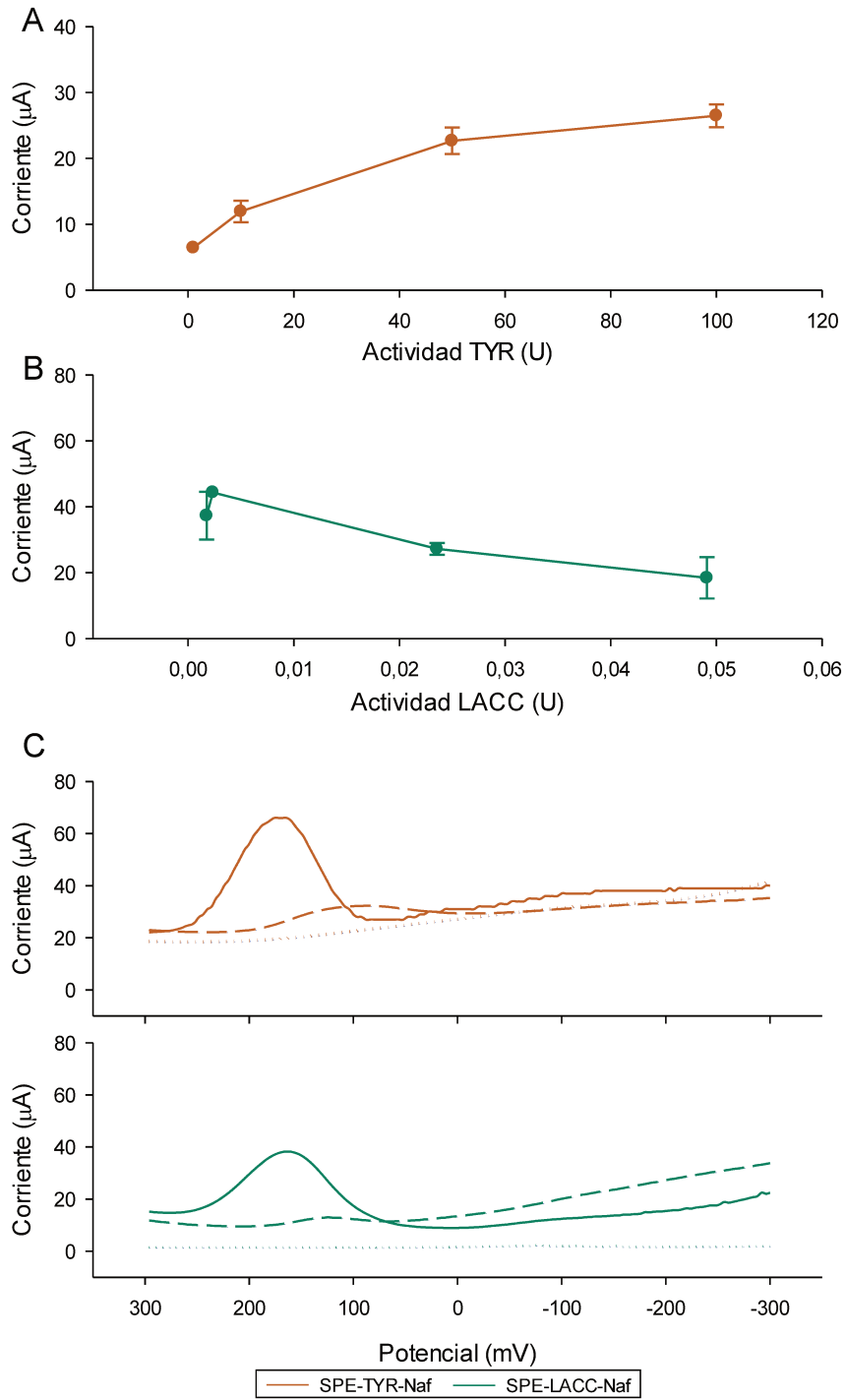


Figura 8: Respuestas de corriente de pico catódica (reducción) obtenidas con biosensores enzimáticos basados en tirosinasa (SPE-TYR-Naf) y lacasa (SPE-LACC-Naf). Fig. A y B: Intensidades de corriente de respuesta en función de los niveles de actividad enzimática, en presencia de 1 mM de catecol. Fig. C: Voltamogramas de pulso diferencial representativos obtenidos con los biosensores SPE-TYR-Naf y SPE-LACC-Naf frente al catecol. La línea continua corresponde a 1000 μM , la línea discontinua a 100 μM y la línea punteada al ensayo blanco.

Tabla 5: Corrientes de respuesta y potenciales de reducción obtenidos con biosensores enzimáticos basados en tirosinasa (SPE-TYR-Naf) y lacasa (SPE-LACC-Naf) frente a diferentes concentraciones de catecol. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3).

Biosensor enzimático	Sustrato (μM)	Potencial de reducción (mV)	Respuesta (μA)
SPE-TYR-Naf	100	88 ± 8	$5,4 \pm 0,3^a$
	1000	140 ± 32	36 ± 10
SPE-LACC-Naf	100	156 ± 25	3 ± 1^b
	1000	165 ± 10	$26,3 \pm 2,8$

Los valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 9 se exponen los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con los biosensores SPE-TYR-Naf frente a los distintos sustratos fenólicos ensayados: fenol, catecol e HQ. En la Tabla 6 se resumen las intensidades de corriente y los potenciales de reducción correspondientes a las concentraciones en las que se obtuvo una señal apreciable con respecto al ensayo blanco.

El fenol mostró una respuesta limitada y sólo fue detectado en la concentración más elevada ensayada (1000 μM), con una señal de baja intensidad. En contraste, el biosensor presentó respuestas de mayor magnitud para el catecol y la HQ. En presencia de catecol, se registraron las mayores intensidades de corriente, particularmente a 1000 μM ; no obstante, la señal obtenida a la menor concentración de sustrato (10 μM) no presentó diferencias apreciables con respecto al ensayo blanco. Además, los voltamogramas mostraron un mayor desplazamiento del potencial de reducción hacia valores más positivos y una contribución capacitiva más pronunciada, especialmente en la concentración más elevada.

Por su parte, la HQ presentó señales de menor intensidad, en comparación con el catecol, pero mostró una respuesta apreciable a 10 μM . Asimismo, los potenciales de pico registrados para este sustrato fueron sistemáticamente inferiores y más estables en todo el rango de concentraciones ensayado, indicando que la reducción del producto oxidado ocurría a potenciales más bajos. En cuanto a la contribución capacitiva asociada a la mayor concentración, esta resultó menos pronunciada que en el catecol.

Estos resultados sugieren que, si bien el catecol produjo corrientes de respuesta de mayor magnitud, la HQ presentó un comportamiento electroquímico más favorable en términos de estabilidad del potencial de reducción y de menor contribución capacitiva, adecuadas para el desarrollo posterior del biosensor. De este modo, se seleccionó la HQ como sustrato modelo de compuesto fenólico para los estudios siguientes.

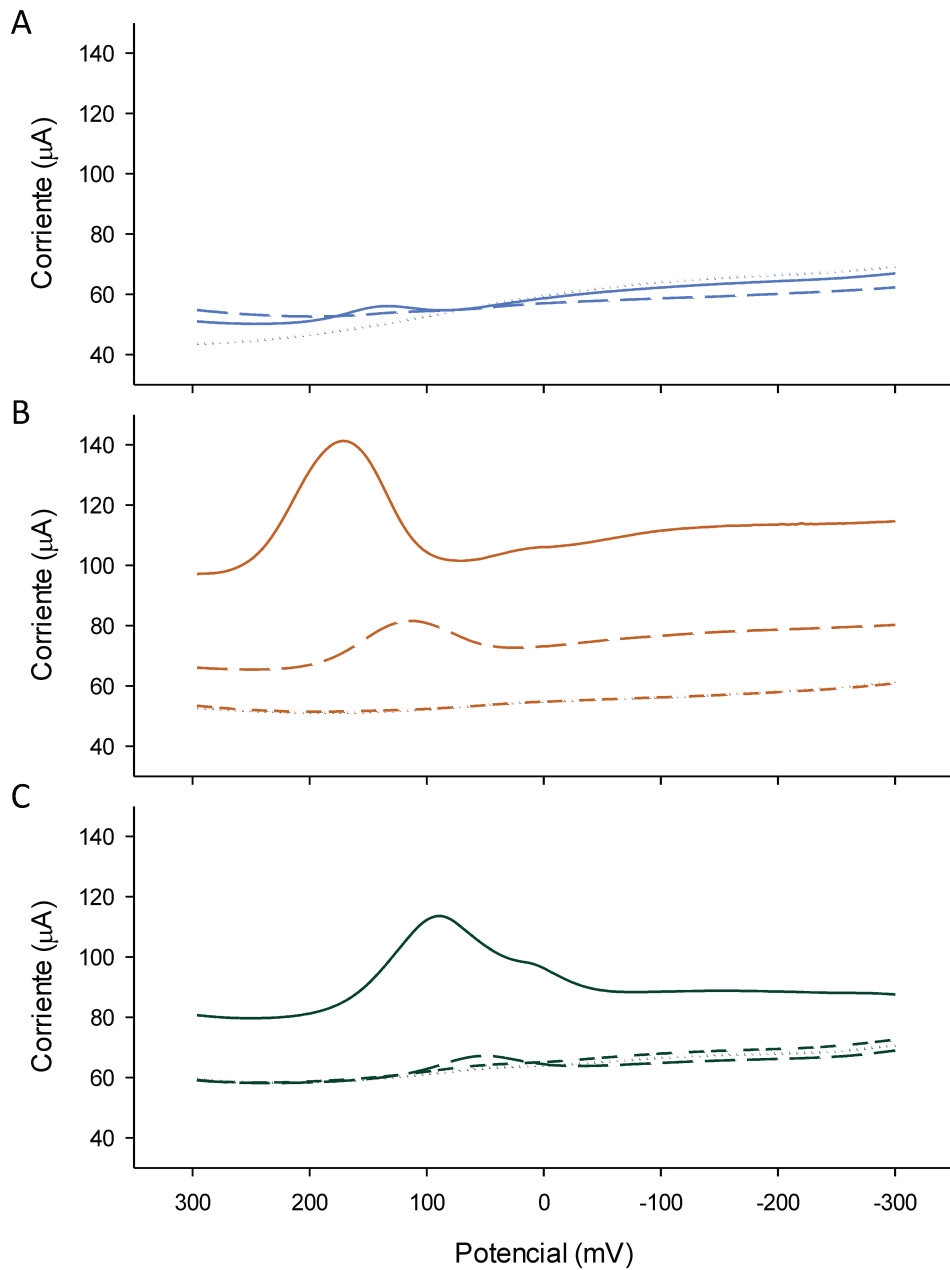


Figura 9: Voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con biosensores SPE-TYR-Naf frente a fenol (Fig. A), catecol (Fig. B) e hidroquinona (HQ) (Fig. C) a diferentes concentraciones. La línea continua corresponde a 1000 μM , la línea discontinua a 100 μM , la línea de trazos cortos a 10 μM y la línea punteada al ensayo blanco.

Tabla 6: Corrientes de respuesta y potenciales de reducción obtenidos con biosensores SPE-TYR-Naf frente a distintos sustratos fenólicos: fenol, catecol e hidroquinona (HQ).

Sustrato	Concentración (μM)	Potencial de reducción (mV)	Respuesta (μA)
Fenol	10	ND	ND
	100	ND	ND
	1000	132	2,9
Catecol	10	ND	ND
	100	112	10,1
	1000	172	37,8
HQ	10	55	0,9
	100	55	5,6
	1000	88	31,1

ND = Señal no apreciable respecto del blanco.

Evaluación de la carga enzimática y estabilidad temporal

Se ensayaron diferentes niveles de actividad de TYR (25 a 200 U) en la construcción de los biosensores SPE-TYR-Naf con el sustrato seleccionado HQ. En la Figura 10 puede visualizarse la evolución de la corriente de respuesta registrada en presencia de HQ durante quince minutos, a partir de mediciones sucesivas por DPV. La Tabla S4 del material suplementario detalla las intensidades de corriente medidas en cada minuto, para cada nivel de actividad, mientras que la Tabla 7 presenta las tasas de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$) calculada a los 2, 5, 10 y 15 minutos.

En cuanto a la intensidad de corriente de reducción, se observó una tendencia similar a la registrada en el ensayo preliminar con catecol, caracterizada por la presencia de un nivel de actividad intermedio que maximiza la respuesta electroquímica, mientras que, a niveles de actividad más elevados, la corriente no se incrementó, sugiriendo una posible saturación del sistema. En estas condiciones, el biosensor preparado con 75 U de TYR presentó las mayores corrientes de respuesta de manera sostenida a lo largo del período evaluado.

Respecto de las tasas de variación de la corriente, se evidenció en general una disminución progresiva con el tiempo. El biosensor preparado con 75 U presentó los valores más elevados de este parámetro al inicio del ensayo, y, posteriormente, mantuvo valores comparables o superiores a los correspondientes a los demás niveles de actividad. De este modo, este biosensor mantuvo la intensidad de corriente más elevada, sin comprometer la tasa de variación de la respuesta a lo largo del período evaluado, en comparación con los demás niveles de actividad. Por estas razones, se

adoptó este nivel de actividad como condición para la construcción de los biosensores en los ensayos posteriores.

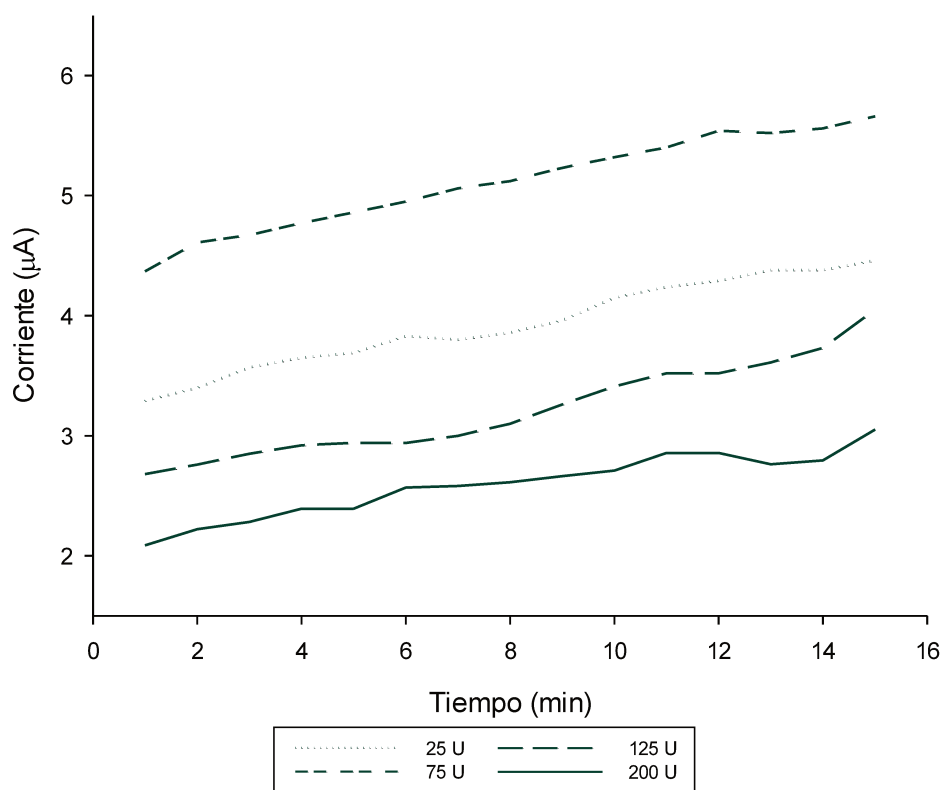


Figura 10: Evolución de la corriente de reducción obtenida con biosensores SPE-TYR-Naf frente a hidroquinona (HQ) ($100 \mu\text{M}$) durante 15 minutos, empleando diferentes cargas de tirosinasa (25, 75, 125 y 200 U).

Tabla 7: Tasas de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$) calculadas en distintos tiempos (2, 5, 10 y 15 min) para biosensores SPE-TYR-Naf preparados con distintas cargas de tirosinasa (25 a 200 U).

Tiempo (min)	Actividad de TYR			
	25 U	75 U	125 U	200 U
2	0,11	0,24	0,08	0,13
5	0,11	0,11	0,07	0,08
10	0,08	0,10	0,07	0,07
15	0,08	0,09	0,09	0,06

Modificación del biosensor con CuNP

Caracterización óptica y morfológica de las CuNP

En la Figura 11 se muestran los espectros UV-Visible de las suspensiones de CuNP a distintas concentraciones, representados en el intervalo espectral de interés para la observación de la banda de absorción. Las suspensiones de mayor concentración evidenciaron la presencia de una banda ancha de absorción en la región visible, característica de CuNP en suspensión, localizada en el rango aproximado de 630-650 nm. Al disminuir la concentración de CuNP, la intensidad de dicha banda decreció progresivamente, lo cual es consistente con una disminución de la fracción de NP ópticamente activas en suspensión.

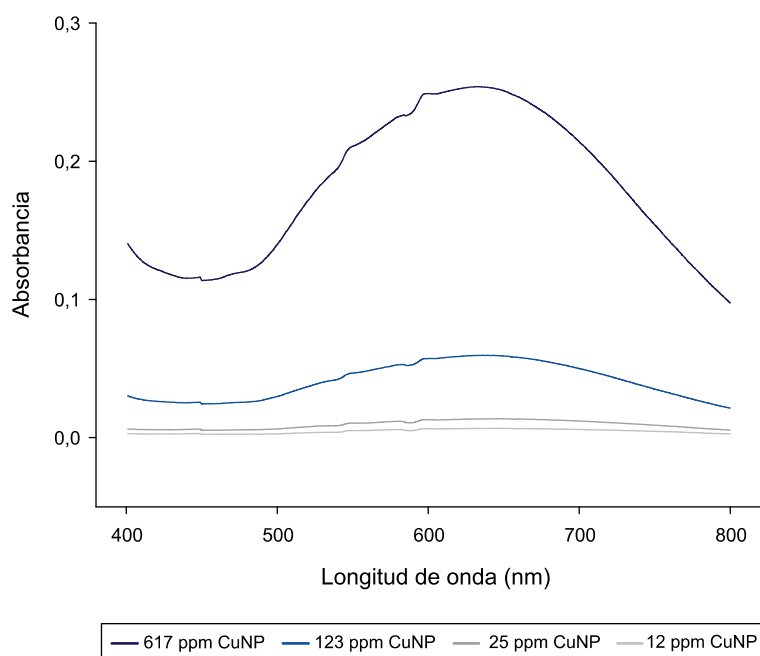


Figura 11: Espectros UV-Visible de suspensiones de nanopartículas de cobre (CuNP) a distintas concentraciones, registrados en el rango de 400-800 nm.

En la Tabla 8 se muestran los valores de longitud de onda correspondientes al máximo de absorción ($\lambda_{m\acute{a}x}$) y las absorbancias máximas correspondiente registrada, para cada concentración de CuNP ensayada.

Tabla 8: Resumen de datos obtenidos en el estudio espectroscópico de las nanopartículas de cobre (CuNP): longitud de onda correspondiente al máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) y absorbancia máxima.

Concentración CuNP (mg L ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Absorbancia	Observación
617	633	0,2539	Pico definido
123	636	0,0596	Pico ancho pero definido
25	649	0,0138	Pico débil
12	649	0,0068	No detectable visualmente

En cuanto a la caracterización morfológica, las micrografías de TEM de la suspensión de CuNP permitieron observar la presencia de NP aproximadamente esféricas, distribuidas de manera relativamente homogénea sobre el soporte. Las partículas exhibieron un buen contraste respecto del fondo, lo que permitió su identificación y medición individual.

La medición de 200 partículas evidenció que los diámetros se encontraron comprendidos en un rango de 2,0-8,3 nm. El diámetro promedio obtenido fue $4,2 \pm 1,1$ nm y el coeficiente de variación calculado (26,7%) indicó una dispersión moderada de los tamaños. En la Figura 12 se presenta el histograma de distribución de tamaños, en el cual se observa que la mayor frecuencia de partículas se concentra entre aproximadamente 3 y 5 nm, mientras que la presencia de partículas de mayor tamaño es minoritaria. Esta distribución relativamente ancha de tamaños resulta consistente con la banda de absorción ancha observada previamente en los espectros UV-Vis. Luego, en la Figura 13 se presentan micrografías representativas de la suspensión de CuNP.

En conjunto, estos resultados confirman la formación de CuNP y su estabilidad óptica en suspensión, así como su tamaño nanométrico, con dimensiones promedio del orden de pocos nanómetros, aportando evidencia para su posterior utilización como material para modificar los electrodos.

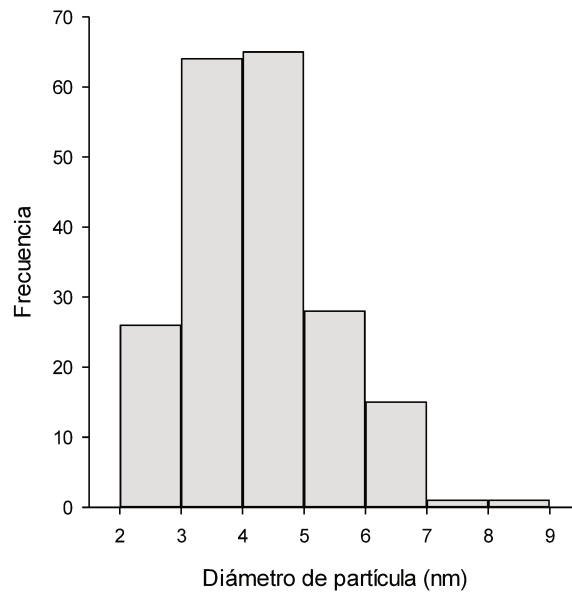


Figura 12: Histograma de distribución de tamaños de las nanopartículas de cobre (CuNP) determinado a partir de la medición de 200 partículas.

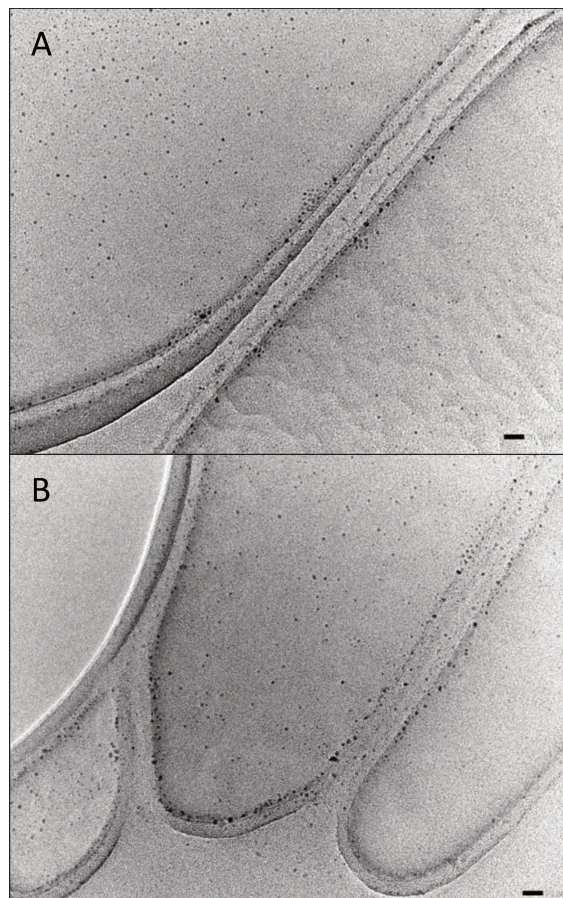


Figura 13: Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una suspensión de nanopartículas de cobre (CuNP). Barra de escala = 20 nm.

Incorporación de las CuNP en el biosensor

En la Figura 14 se presentan los voltamogramas cíclicos correspondientes a los biosensores B1 y B2, modificados con CuNP 100 y 50 mg L⁻¹, respectivamente, registrados tanto en presencia de BF6 (línea verde) como de 100 μM de HQ (línea amarilla). Adicionalmente, se incluyeron los voltamogramas correspondientes al electrodo SPE previo a su modificación, frente a BF6 (línea gris).

Mientras los SPE sin modificar presentan un comportamiento predominantemente capacitivo, los biosensores modificados, en BF6, presentan un leve incremento de la corriente y una modificación de la forma del voltamograma, lo que puede atribuirse a la presencia de la película formada por CuNP, TYR y Nafion®. Luego, en presencia de HQ, los biosensores evidencian una cupla redox atribuible al par HQ/quinona con señales catódicas y anódicas, confirmando la electroactividad del sustrato y la accesibilidad de este a la superficie electródica modificada.

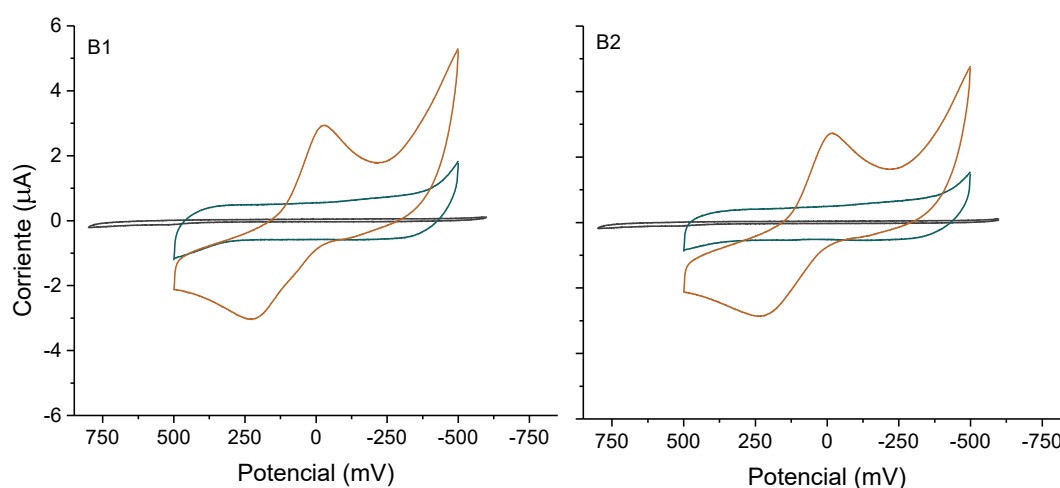


Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtenidos con los SPE sin modificar en presencia de BF6 (línea gris) y de los biosensores enzimáticos modificados B1 y B2 en presencia de BF6 (línea verde) y de hidroquinona (HQ) (línea amarilla). B1 = CuNP100-TYR-Naf; B2 = CuNP50-TYR-Naf.

En la Figura 15 se presenta la evolución temporal de las corrientes de pico medidas mediante DPV para los biosensores B3, B4, B5 y B6, y en la Tabla S5 del material suplementario se detallan todas las mediciones realizadas a lo largo del período evaluado, junto con las tasas de variación de la corriente calculadas para distintos intervalos de tiempo. En todos los biosensores se observó una disminución progresiva de la tasa de variación con el tiempo, de modo que en el intervalo inicial se obtuvieron los valores más elevados de este parámetro. En particular, el minuto 5 se identificó como

un tiempo de lectura adecuado, al corresponder con las mayores tasas de incremento de la señal y una respuesta ya claramente diferente al blanco.

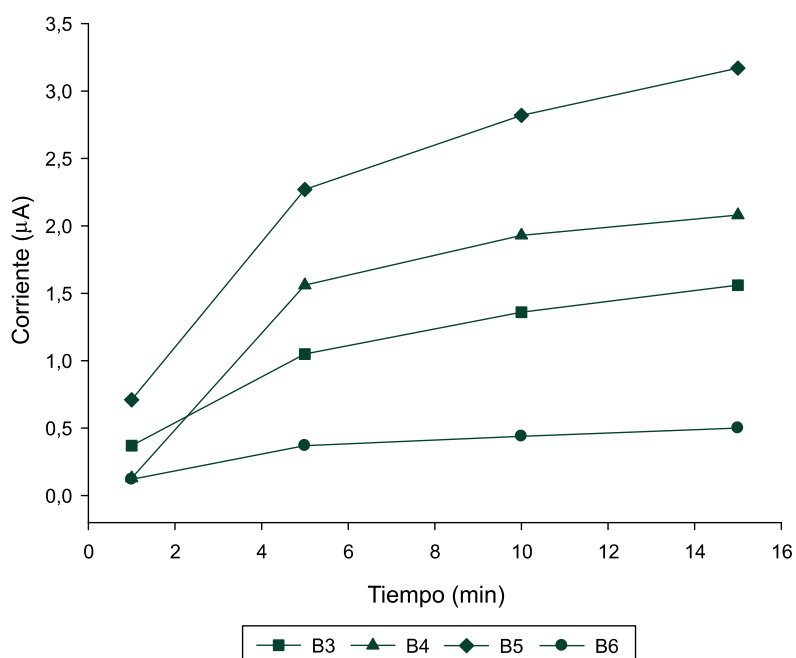


Figura 15: Evolución temporal de la corriente de pico catódica registrada por voltametría de pulso diferencial (DPV) para biosensores SPE-TYR-Naf modificados con distintas concentraciones de nanopartículas (CuNP) frente a hidroquinona (HQ) 2,3 μM ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) en BF6. B3 = CuNP12-TYR-Naf; B4 = CuNP5-TYR-Naf; B5 = CuNP3-TYR-Naf; B6 = SPE-TYR-Naf.

Adicionalmente, en la Figura S1, de material suplementario, se presentan los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con cada biosensor en los minutos 1, 5 y 15. Los biosensores modificados con CuNP no evidenciaron un patrón claro de variación de la contribución de la corriente capacitiva en función de la concentración de las NP, mientras que el biosensor B6 presentó menores corrientes totales, consistentes con su menor respuesta electroquímica.

En la Tabla 9 se resumen las intensidades de corriente de respuesta y los potenciales de reducción registrados a los 5 min para los distintos biosensores. El biosensor control (B6, sin CuNP) presentó las menores corrientes de reducción, confirmando que la incorporación de las NP mejoró la respuesta electroquímica.

Se observó que tanto las intensidades de corriente como las tasas de variación de la señal siguieron el mismo orden decreciente entre los biosensores: $B5 > B4 > B3 > B6$. En particular, la respuesta frente a HQ aumentó al disminuir la concentración de CuNP depositada sobre el SPE. En cuanto al potencial de reducción, se registraron valores

ligeramente más positivos para la mayor concentración de CuNP, mientras que en los restantes biosensores los potenciales se mantuvieron comprendidos entre 85 y 98 mV, sin evidenciar un patrón definido.

En función de estos resultados se seleccionó la concentración de 3 mg L⁻¹ (B5) para continuar con el desarrollo del biosensor.

Tabla 9: Intensidades de corriente de reducción y potenciales de pico registrados a los 5 min con biosensores modificados con nanopartículas de cobre (CuNP) frente a hidroquinona (HQ) 2,3 μM (250 μg L⁻¹). B3 = CuNP12-TYR-Naf; B4 = CuNP5-TYR-Naf; B5 = CuNP3-TYR-Naf; B6 = SPE-TYR-Naf.

Biosensor	Tiempo (min)	Potencial de reducción (mV)	Respuesta (μA)
B3	5	100	1,05
B4	5	85	1,56
B5	5	85	2,27
B6	5	98	0,37

Uso de agentes poliméricos para la inmovilización de tirosinasa

En la Figura 16 se presentan los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con biosensores SPE-CuNP-TYR-Naf preparados incorporando los agentes poliméricos a la solución enzimática de TYR: B7 (mezcla PEG/PG) y B8 (combinación PDDA/carbopol), frente a HQ 2,3 μM (250 μg L⁻¹). Se observó una respuesta electroquímica de mayor magnitud para el biosensor B7 en comparación con la formulación alternativa ensayada (B8), evidenciando un efecto favorable del agente polimérico incorporado sobre el desempeño del biosensor.

En el biosensor B7, la corriente de pico catódica aumentó progresivamente durante el período evaluado, registrando corrientes de 1,72 μA al primer minuto, 4,49 μA al minuto 5 y 5,85 μA al finalizar la medición (15 min). Por su parte, el B8 mostró señales de menor intensidad en todos los tiempos analizados, con corrientes de 0,35 μA (1 min), 1,29 μA (5 min) y 1,57 (15 min), sugiriendo que la incorporación de PDDA/carbopol resultó en una inmovilización de la enzima más restrictiva o en la formación de un microambiente menos favorable para su actividad catalítica.

En cuanto a los potenciales de reducción, ambos biosensores presentaron valores similares entre sí, y concordantes con los registrados para los biosensores preparados en la etapa previa, manteniéndose en torno a 80 mV.

Por último, el biosensor modificado con la formulación PEG/PG (B7) exhibió una contribución capacitiva apreciable, tal como se observa en la Figura 16; no obstante, la

mejora obtenida en la señal analítica motivó la selección de este agente polimérico para ser incluido como factor en el diseño experimental posterior.

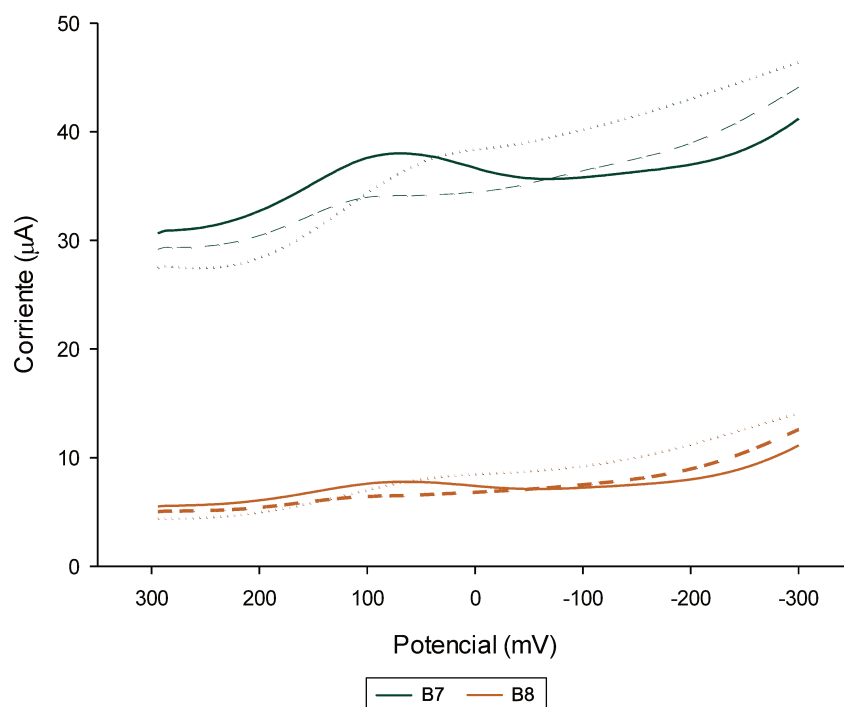


Figura 16: Voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con biosensores B7 y B8 frente a hidroquinona (HQ) 2,3 μM ($250 \mu\text{g L}^{-1}$). La línea punteada corresponde al ensayo blanco (BF6), la línea de trazos cortos a la medición a 1 min y la línea continua a la medición a los 5 min. B7 = CuNP3-PEG/PG/TYR-Naf; B8 = CuNP3-PDDA/carb/TYR-Naf.

Optimización del biosensor

En el material suplementario se presenta la tabla completa de corridas propuesta por el CCD junto con los valores de IC obtenidos experimentalmente (Tabla S6). Los resultados se ajustaron a un modelo cuadrático ($p = 0,0482$) sin evidenciar falta de ajuste significativa ($p = 0,5526$), lo que indicó que el modelo describió adecuadamente la variabilidad de la IC de reducción dentro del rango experimental evaluado.

El ANOVA evidenció un comportamiento no lineal de la respuesta; los términos cuadráticos asociados a la actividad enzimática (B^2 , $p = 0,0146$) y al factor de dilución del agente polimérico (C^2 , $p = 0,0123$) fueron estadísticamente significativos, lo que justificó la utilización de un RSM. El modelo final en función de los factores codificados se expone a continuación:

$$IC = 6,04 + 0,58xA + 0,14xB + 0,39xC + 0,76xAB + 0,16xAC + 0,54xBC + 0,33xA^2 - 0,63xB^2 - 0,66xC^2$$

En la Figura 17 se presentan las gráficas de superficie respuesta obtenidas a partir del modelo. Cada gráfica representa la variación de la IC en función de dos factores, mientras el tercero se mantiene fijo, y permite identificar la región de respuesta máxima indicada en color rojo. La Fig. 17A muestra que la IC aumentó al incrementarse la concentración de Nafion® hacia la zona alta del rango evaluado, entre 0,4 y 0,5%, mientras que, respecto de la actividad de TYR, la IC presentó un máximo en valores intermedios-altos del rango evaluado, sin incrementarse hacia el límite superior del mismo (correspondiente a 85 U). En la Fig. 17B puede observarse un máximo definido en función de los factores B y C, lo que resulta coherente con la significancia de los términos cuadráticos asociados. Por último, la Fig. 17C evidencia nuevamente el efecto positivo del incremento de Nafion®, y sugiere que valores intermedios del factor C se corresponden con la respuesta máxima, con tendencia a aplanarse hacia el extremo superior del rango evaluado.

La optimización del modelo considerando todos los factores dentro de los rangos evaluados y maximizando la respuesta (IC), permitió identificar una región óptima caracterizada por los siguientes valores: 0,44% m/v de Nafion®, 82,02 U de TYR y un factor de dilución de 0,23 para el agente polimérico PEG/PG, equivalente a una concentración final de 0,09% / 0,07% PEG/PG. Bajo estas condiciones, la respuesta predicha por el modelo fue $IC = 7,76 \mu A$, con una deseabilidad de 0,917.

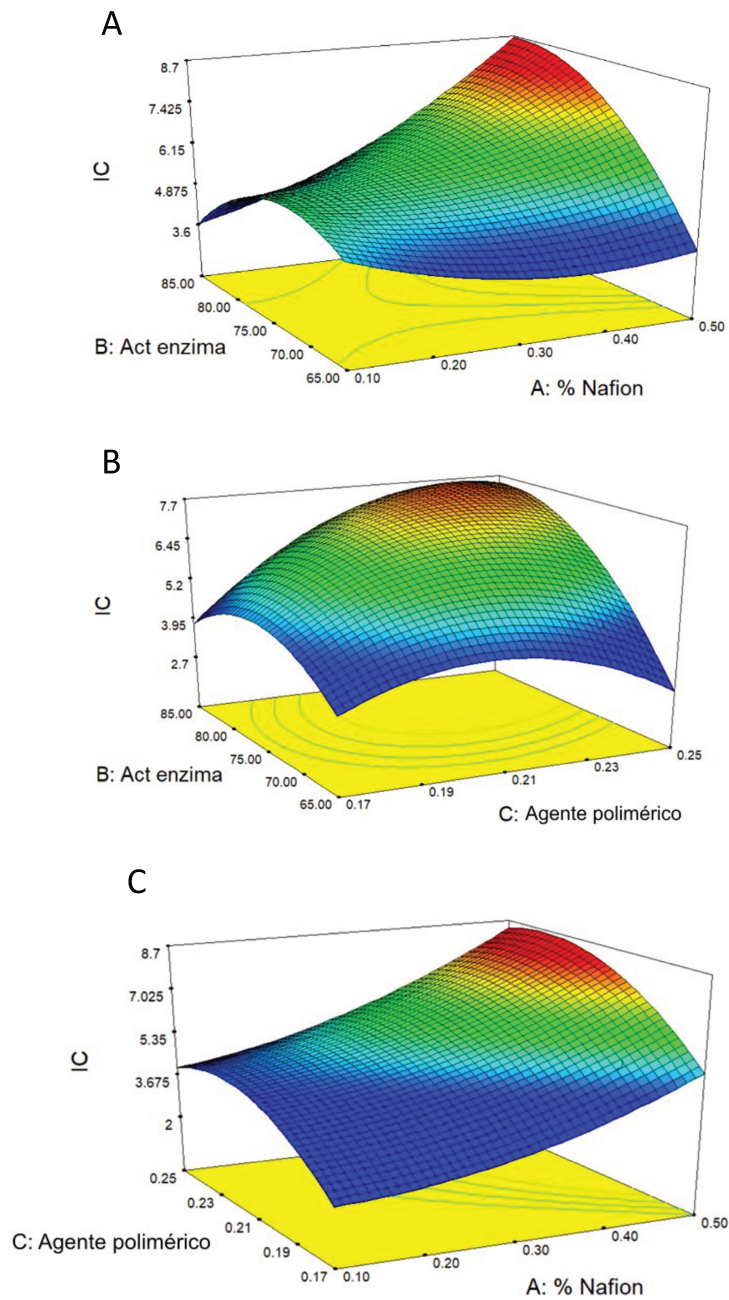


Figura 17: Gráficas de superficie respuesta obtenidas a partir del diseño experimental (Design-Expert 7.0), que representan la intensidad de corriente de pico catódica (IC) en función dos factores, manteniendo el tercero fijo. Fig. A: IC en función de la actividad de tirosinasa (TYR) y la concentración de Nafion®. Fig. B: IC en función de la actividad de TYR y factor de dilución (FD) del agente polimérico. Fig. C: IC en función del FD del agente polimérico y la concentración de Nafion®.

Ensayo de verificación y caracterización analítica preliminar

El biosensor preparado con la formulación óptima presentó una señal basal en BF6 (blanco), que puede atribuirse a la matriz polimérica y a la superficie modificada. Por esta razón, además de reportar la corriente registrada en presencia de HQ, se empleó la ΔIC para cuantificar el incremento de la señal atribuible al sustrato.

En la Tabla 10 se presentan los valores de IC a los 5 min y la señal neta ΔIC para cada concentración de sustrato ensayada, junto con su transformación logarítmica, y la tasa de variación de la corriente, a 5 min. Luego, en la Figura 18 se muestran voltamogramas de pulso diferencial representativos registrados en BF6 (blanco) y en presencia de distintas concentraciones de HQ.

El rango de concentraciones ensayado se definió considerando el límite normativo de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido para fenoles en la provincia de Santa Fe, de modo de evaluar el desempeño del biosensor en torno a dicho umbral regulatorio. En este rango evaluado, la corriente medida a 5 min aumentó con la concentración de HQ, desde $6,85 \mu\text{A}$ ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) hasta $9,39 \mu\text{A}$ ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$). Considerando un blanco a 5 min de $4,94 \mu\text{A}$, la señal neta aumentó desde $1,91 \mu\text{A}$ ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) hasta $4,45 \mu\text{A}$ ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 10: Ensayo de verificación de la condición óptima: concentración de hidroquinona (HQ), corriente de pico catódica (IC) y corriente neta (ΔIC) a 5 min, y tasa de variación de la corriente.

HQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$\log_{10} [\text{HQ}]$	IC	ΔIC	Tasa de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$)
10	1	6,85	1,91	0,48
25	1,4	7,65	2,71	0,34
50	1,7	8,18	3,24	0,29
100	2	8,36	3,42	0,19
250	2,4	8,79	3,85	0,26
500	2,7	9,13	4,19	0,24
1000	3	9,39	4,45	0,20

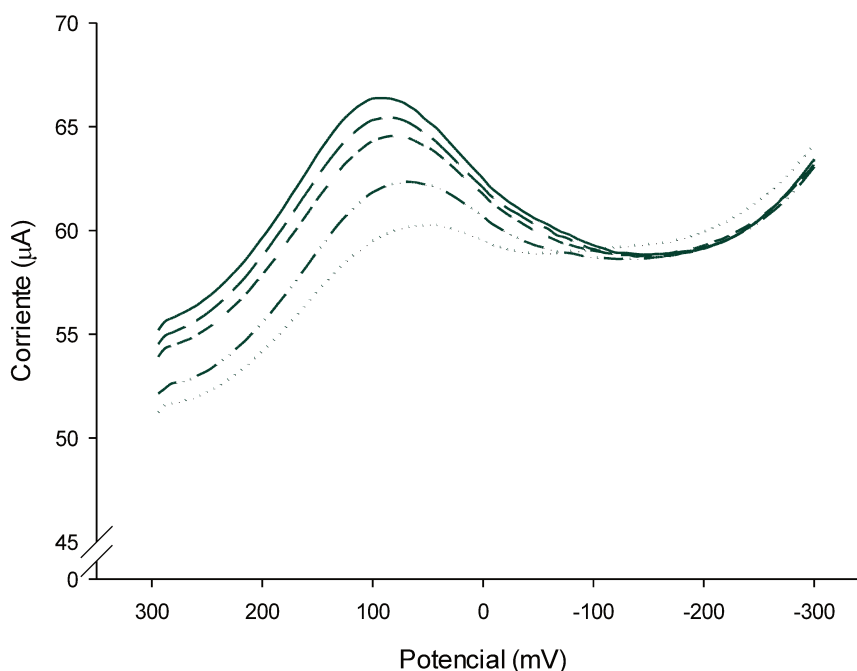


Figura 18: Voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con biosensores preparados bajo la condición óptima, registrados en BF6 (blanco) y en presencia de hidroquinona (HQ). Se muestran las curvas correspondientes al ensayo blanco (línea punteada) y a mediciones realizadas en presencia de HQ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (línea de trazos y puntos), $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (línea de trazos cortos), $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (línea de trazos largos) y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (línea continua).

En cuanto a la corriente obtenida en presencia de la concentración de HQ empleada en el diseño experimental ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), se obtuvo un valor de IC (5 min) = $8,79 \mu\text{A}$. Este valor, si bien es levemente mayor (aproximadamente un 13%), es del mismo orden que la respuesta predicha por el modelo (IC = $7,76 \mu\text{A}$). Esta comparación se interpreta como una confirmación preliminar del desempeño del biosensor bajo la formulación óptima, sugiriéndose la conveniencia de incorporar réplicas para cuantificar la variabilidad experimental en esta etapa.

Posteriormente, el análisis de la tasa de variación de la corriente entre 1 y 5 min arrojó valores comprendidos entre $0,19$ y $0,48 \mu\text{A min}^{-1}$. La mayor tasa se observó a la concentración más baja de HQ evaluada ($10 \mu\text{g L}^{-1}$); sin embargo, al aumentar la concentración no se evidenció una relación sistemática de la tasa de variación de la corriente y la concentración de HQ, sino una dispersión de los valores entre las distintas concentraciones de sustrato.

Por su parte, la relación entre la IC y la concentración de HQ no fue lineal en todo el intervalo estudiado. Al considerar ΔIC se observó que el incremento de la corriente fue mayor a bajas concentraciones de HQ y progresivamente menor a concentraciones más elevadas. En este contexto, la relación entre ΔIC y la concentración se describió

adecuadamente mediante un ajuste lineal de ΔIC en función de la transformación logarítmica de la concentración de sustrato ($\log_{10} [HQ]$), cuya representación se incluye en el material suplementario (Figura S2). El ajuste obtenido se detalla a continuación:

$$\Delta IC (\mu A) = (1,207 \pm 0,096)\log_{10}[HQ] + (0,948 \pm 0,204)$$

$$R^2 = 0,9695$$

Este ajuste se empleó para describir la respuesta del biosensor en el rango de concentraciones evaluado.

Posteriormente, con fines exploratorios, se realizó una estimación preliminar del LD a partir de la dispersión del blanco ($\sigma = 0,6$) y del ajuste ΔIC vs $\log_{10} [HQ]$. La señal mínima estimada fue $1,80 \mu A$, correspondiente, a partir de la ecuación de ajuste, a $5,1 \mu g L^{-1}$. Debido a que este valor se encuentra por debajo del menor nivel ensayado ($10 \mu g L^{-1}$) y a partir de un número limitado de réplicas, se reporta como estimación preliminar, sujeta a confirmación mediante réplicas adicionales del blanco y de la curva de calibración. No obstante, el valor estimado resulta un orden de magnitud inferior al límite normativo vigente para la descarga de efluentes cloacales en la región, lo que sugiere que el biosensor desarrollado presenta una sensibilidad compatible con dicho umbral regulatorio y podría constituir una base adecuada para etapas subsiguientes de validación analítica orientadas a aplicaciones de monitoreo ambiental.

1.5 Discusión

1.5.1 Caracterización de las ARU y desempeño del sistema lagunar de la PTSJ

Los sistemas de lagunas de estabilización constituyen tecnologías de tratamiento biológico extensivo que se sustentan en procesos naturales de depuración mediados por comunidades microbianas y, en el caso de las unidades facultativas, por la interacción simbiótica entre bacterias y microalgas (von Sperling, 2007). Los microorganismos transforman y mineralizan la materia orgánica hacia productos finales como dióxido de carbono y agua, incorporando parte del carbono y la energía en biomasa y metabolitos intermedios durante la biorremediación (Alvarez et al., 2017).

En sistemas lagunares con configuración anaerobia-facultativa, como el que conforma la PTSJ, se esperan remociones del orden de 75-85% para DBO, 65-80% para DQO, 70-80% para SST, mientras que la remoción de nutrientes tiende a ser limitada (<50% para amonio y <35% para fósforo). En contraste, la remoción esperada de coliformes se ubica entre 90 y 99% (von Sperling, 2007). En este marco, el desempeño observado en la PTSJ se alinea con lo esperado para DBO y coliformes,

mientras que se observan limitaciones para DQO y SST, y, en el caso de los nutrientes, éstos constituyen una limitación inherente al propio sistema. Dado que el desempeño de las lagunas depende fuertemente de las condiciones ambientales, la interpretación de los resultados considera dos períodos estacionales contrastantes (Inv y PV), tal como se describió en la metodología.

Mientras que en las lagunas anaeróbicas la conversión de la materia orgánica se produce en un ambiente reductor, en las lagunas facultativas la materia orgánica soluble y finamente particulada se estabiliza predominantemente por respiración aeróbica en la columna de agua. Adicionalmente, parte de la fracción orgánica particulada sedimenta y se digiere anaeróticamente en el fondo. Por otro lado, los sulfuros presentes en el afluente o generados en microambientes anaerobios internos pueden oxidarse en la capa superior aeróbica por procesos químicos y bioquímicos, contribuyendo a la disminución de sus concentraciones hacia el final del tratamiento facultativo (von Sperling, 2007; Al-Hashimi & Hussain, 2013). En la PTSJ, en todos los períodos evaluados, los sulfuros disminuyeron desde valores que excedían el umbral normativo en EC hacia concentraciones inferiores al LD en LFS, con eficiencias entre 93 % y 98,7%.

Como fue mencionado previamente, las microalgas contribuyen al tratamiento por absorción y transformación de contaminantes y por provisión de oxígeno, reduciendo la necesidad de aireación artificial en comparación con tecnologías más intensivas. Como consecuencia, el efluente de las lagunas facultativas suele presentar coloración verdosa, concentraciones elevadas de OD y de sólidos en suspensión dominados por la biomasa algal (Al-Hashimi & Hussain, 2013).

Por su parte, los SST en la PTSJ presentaron una remoción moderada durante el primer año de monitoreo, mientras que en el segundo año se observó una reducción de eficiencia, incluso incrementos de SST hacia LFS en algunos muestreos. Este comportamiento contrasta con remociones reportadas para sistemas de lagunas anaerobias-facultativas (70-80%), y sugiere una limitación operacional durante el período evaluado. Sin embargo, en lagunas facultativas no aireadas, los sólidos del efluente consisten predominantemente en algas, lo que explica que puedan observarse SST elevados aun cuando la conversión de materia orgánica sea adecuada (von Sperling, 2007; Al-Hashimi & Hussain, 2013).

Remoción de carga orgánica y atenuación bacteriológica

En la PTSJ, el EC ingresó con un IB promedio cercano a 0,46, lo cual indica predominio de fracción biodegradable y, por lo tanto, factibilidad de tratamiento mediante procesos biológicos (Bedoya Pérez et al., 2014). A lo largo del tratamiento, la DBO₅

disminuyó de manera consistente entre EC y LFS, con eficiencias superiores a 77% y concentraciones finales compatibles con el cumplimiento normativo. En contraste, la DQO mostró remociones moderadas (48-72%) y se mantuvo por encima del límite normativo en el efluente tratado. Esta discrepancia entre las remociones de DBO₅ y DQO es coherente con el carácter integrador de DQO, que incluye fracciones orgánicas de baja biodegradabilidad y productos microbianos solubles refractarios generados durante el tratamiento biológico (Xie et al., 2016). En concordancia, el IB descendió en LFS a valores comprendidos entre 0,18 y 0,27, reflejando una reducción progresiva de la fracción biodegradable.

Los indicadores bacteriológicos mostraron disminuciones notables entre EC y LFS, con eficiencias globales superiores a 91% en todos los períodos, evidenciando que el sistema lagunar aporta de manera sustantiva a la reducción bacteriana.

La atenuación de patógenos constituye uno de los objetivos de las lagunas de estabilización, y se produce por condiciones ambientales adversas para bacterias y virus, tales como radiación solar, temperatura, pH, escasez de alimento, depredación y compuestos tóxicos, mientras que quistes y huevos se atenúan principalmente por sedimentación (von Sperling, 2007). En la PTSJ, el incumplimiento normativo de coliformes en LFS debe interpretarse considerando que el muestreo se realizó previo a la CC, diseñada específicamente para la desinfección final del efluente.

En las lagunas de estabilización las variables ambientales como radiación solar, temperatura y viento, afectarán a los procesos de fotosíntesis, a las tasas de descomposición bacteriana, así como a la mezcla y reaireación, incidiendo en el balance del OD. En la PTSJ se observó un mejor rendimiento en la remoción bacteriológica en PV respecto del Inv, lo que resulta coherente con el rol de la temperatura y la radiación solar en el proceso de inactivación bacteriana en las lagunas. Por otro lado, aunque se esperaría que el período de menores temperaturas sea crítico para la velocidad de las reacciones bioquímicas, en la PTSJ los períodos de Inv mostraron un mejor desempeño fisicoquímico respecto de la PV. Se ha demostrado que en períodos más cálidos la digestión anaeróbica de lodos puede liberar subproductos solubles no estabilizados que reingresan a la masa líquida, introduciendo una nueva carga, lo que explica por qué los períodos de mayor temperatura no siempre coinciden con el mejor rendimiento fisicoquímico global, de manera que el comportamiento real del sistema dependerá de la dinámica algal, la carga orgánica y la recirculación de subproductos desde lodos del fondo (Abdel-Razik, 1991; von Sperling, 2007).

Nutrientes: limitaciones del sistema y alternativas de tratamiento

El amonio presentó remociones globales bajas a moderadas y un cumplimiento normativo variable según el período evaluado. En lagunas de estabilización, los mecanismos de eliminación del nitrógeno incluyen la volatilización de amoníaco, asimilación por algas, nitrificación-desnitrificación y sedimentación de nitrógeno orgánico particulado (Foladori et al., 2018; Ren et al., 2019). En particular, la volatilización requiere la presencia de amoníaco libre, favorecida por pH elevados (Beltrán-Rocha et al., 2017). En este estudio, el pH medido en EC y LFS se mantuvo por debajo de 9, lo que sugiere que la volatilización no fue el mecanismo dominante, aunque no se cuenta con mediciones de pH por laguna individual. No obstante, se ha informado que, en climas cálidos, la liberación de amoníaco puede acelerarse incluso a pH inferiores a 9 en sistemas con elevada actividad algal (Cai et al., 2013), por lo que la contribución de este mecanismo no puede descartarse completamente en los períodos más cálidos evaluados.

Adicionalmente, los incrementos en las concentraciones de nitrato y nitrito a lo largo del tratamiento son compatibles con la ocurrencia de nitrificación en zonas oxigenadas del sistema (Al-Hashimi & Hussain, 2013). También la asimilación algal constituye otra vía relevante de conversión de nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico celular, siendo frecuente la preferencia por amonio (Renuka et al., 2013).

Respecto del fósforo, la PTSJ mostró incumplimiento normativo en la mayoría de los períodos evaluados y remociones globales bajas, con excepciones puntuales. En lagunas de estabilización, los principales mecanismos de remoción de fósforo incluyen la asimilación por la biomasa y la precipitación de fosfatos bajo condiciones de pH elevado. Sin embargo, la precipitación significativa de fosfatos requiere de pH superior a 9, y puede depender también de condiciones oxidantes, por lo que la remoción de fósforo en lagunas suele ser restringida cuando el pH no alcanza valores elevados de forma sostenida (Cai et al., 2013). Considerando que el pH medido en este estudio no supera $8,0 \pm 0,5$ en los puntos de EC y LFS; la remoción limitada de fósforo resulta consistente con la ausencia de condiciones fisicoquímicas favorables y, desde una perspectiva ambiental, la persistencia del nitrógeno y fósforo en el efluente tratado implica un potencial aporte de nutrientes al cuerpo receptor (Lima et al., 2020).

Osmani et al. (2023) reportaron eficiencias elevadas en una planta de sistema basal de lagunas, pero incluyendo filtros percoladores y manejo de lodos, de modo que alcanzaron 86% de remoción de DQO y 78% para amonio, aunque para fósforo también resultó limitante ($E\% = 50\%$). Por su parte, Al-Hashimi & Hussain (2013), también evaluaron un sistema lagunar para tratamiento de ARU, reportando que la inclusión de etapas complementarias de filtración (como filtros de arena) y sistemas de aireación

obtuvo resultados beneficiosos en la reducción de SST y de la coloración verdosa asociada, y también observaron mejoras en la remoción de DBO y DQO, por la eliminación de algunos componentes orgánicos restantes.

Sin embargo, los sistemas tradicionales pueden ser ineficientes para la remoción de nitrógeno y fósforo, y modificaciones del tratamiento, tales como la incorporación de aireación forzada, pueden aumentar significativamente los costos, especialmente en instalaciones antiguas (Lima et al., 2020). En este contexto, estrategias basadas en microalgas han sido propuestas como una alternativa sostenible y económica para el tratamiento avanzado o terciario con recuperación de nutrientes y producción de biomasa de valor añadido (Bhalamurugan et al., 2018; Moondra et al., 2022).

En conjunto, los resultados muestran que la PTSJ presenta un desempeño robusto en la reducción de materia orgánica biodegradable, los sulfuros y las bacterias coliformes. En contraste, los resultados indicaron la persistencia de fracciones orgánicas refractarias o de baja biodegradabilidad en el efluente tratado, mientras que los nutrientes inorgánicos, aunque presentaron comportamientos variables, en términos generales no mostraron rendimientos óptimos de remoción. Estos patrones son compatibles con el comportamiento esperado en sistemas de lagunas en serie, en los cuales se favorece la estabilización de la fracción biodegradable y atenuación bacteriológica, mientras que la remoción completa de determinados nutrientes suele requerir la inclusión de operaciones adicionales de mayor complejidad. Asimismo, se ha indicado que efluentes secundarios suelen considerarse adecuados para el cultivo de microalgas por su menor carga orgánica y reducción de compuestos potencialmente tóxicos; no obstante, en función del esquema del tratamiento aplicado, puede requerirse la suplementación de nutrientes para optimizar la productividad de biomasa (Guldhe et al., 2017). En contraste, los efluentes de la PTSJ obtenidos luego del tratamiento secundario presentaron niveles considerables de estos nutrientes, lo que sugiere un potencial de aprovechamiento, sin necesidad de suplementación adicional, en esquemas de tratamiento terciario algal orientados a la recuperación de biomasa y su reutilización con distintos fines.

Posteriormente, en el presente capítulo se abordó el desarrollo y la evaluación preliminar de un biosensor enzimático orientado a la detección de CF, como aproximación complementaria a las técnicas analíticas convencionales de caracterización de las ARU, en concordancia con el objetivo general de caracterización del efluente.

1.5.2 Desarrollo de biosensor enzimático para detección de CF

Desempeño electroquímico del biosensor enzimático

En una etapa inicial del desarrollo del biosensor se evaluó comparativamente el desempeño electroquímico de dos oxidorreductasas ampliamente reportadas para la detección de CF: la TYR y la LACC (Portaccio et al., 2010; Wu et al., 2012, 2019; Pan et al., 2015; Fu et al., 2018; Wee et al., 2019), empleando catecol como sustrato y manteniendo constantes las condiciones de inmovilización, el tipo de electrodo y la técnica de detección electroquímica, por DPV. Este abordaje, de carácter exploratorio, se orientó a seleccionar el biorreceptor más adecuado para el sistema propuesto, priorizando criterios electroanalíticos prácticos tales como intensidad de señal, estabilidad del recubrimiento y reproducibilidad.

Ambas enzimas presentan mecanismos catalíticos diferentes. La TYR cataliza la oxidación de o-difenoles a o-quinonas y, en el caso de monofenoles, su hidroxilación seguida de oxidación, mientras que la LACC oxida diversos CF mediante transferencias monoeléctricas acopladas a la reducción del oxígeno molecular (Portaccio et al., 2013; Yashas et al., 2018; Salvo-Comino et al., 2020). Bajo las condiciones evaluadas, el biosensor SPE-LACC-Naf mostró un desempeño inferior frente a catecol en comparación con el biosensor basado en TYR.

Este resultado puede interpretarse, en primer lugar, en términos de los requerimientos intrínsecos de la LACC y del microambiente generado en la interfaz electrodo-enzima por la estrategia de inmovilización empleada (Kadam et al., 2022). Se ha señalado que, en biosensores de LACC, el método de inmovilización y el soporte utilizado son determinantes para alcanzar un rendimiento catalítico adecuado; en particular, la adsorción puede presentar limitaciones asociadas a una unión débil y al desprendimiento parcial de la enzima, afectando la respuesta electroquímica (Gu et al., 2021; Peshkov et al., 2025). En este ensayo se observó macroscópicamente desprendimiento del recubrimiento al aumentar la carga enzimática, lo que probablemente redujo la fracción de enzima efectivamente retenida y activa sobre el SPE. Asimismo, se ha señalado que, en sistemas basados en inmovilización por adsorción, el incremento de la carga enzimática puede conducir a una sobrecarga del recubrimiento y a un aumento restricciones difusionales, traduciéndose en una disminución de la señal electroquímica (Dodevska et al., 2025). En este contexto, si bien el Nafion® ha sido ampliamente reportado como una capa protectora eficaz en biosensores enzimáticos (Litescu et al., 2010; Zakil et al., 2016; Liu et al., 2019), en las condiciones evaluadas en este trabajo su incorporación no resultó compatible con el desempeño del biosensor basado en LACC, lo que puede haber sido causado por un

incremento adicional de las resistencias difusionales y de transferencia electrónica impuestas por las características del recubrimiento (Ahmad et al., 2016). Desde el punto de vista mecanístico, la LACC es una oxidasa multicobre en la que el cobre tipo 1 (T1) actúa como primer centro aceptor de electrones provenientes del sustrato, constituyendo un sitio determinante de la eficiencia catalítica (Yaropolov et al., 1994; Solomon et al., 1996). En sistemas electroquímicos, la eficiencia del proceso depende de la transferencia electrónica inicial desde el sustrato al centro T1, y de la posibilidad de intercambio electrónico entre el T1 y el electrodo. Para que la LACC inmovilizada opere mediante transferencia directa de electrones (DET) se requiere de una orientación adecuada de la enzima y una distancia corta entre el sitio T1 y la superficie conductora; estas condiciones pueden no alcanzarse en arquitecturas simples, limitando la señal registrada (Yaropolov et al., 1994; Gu et al., 2021; Peshkov et al., 2025). En escenarios en que el DET no es factible, se ha descrito la transferencia de electrones mediada (MET), en la cual un mediador redox facilita el intercambio electrónico y reduce la dependencia de la orientación; esta estrategia se ha empleado para mejorar sensibilidad y estabilidad de biosensores basados en LACC (Le Goff et al., 2015; Peshkov et al., 2025).

En conjunto, se sugiere que el menor desempeño observado con LACC no invalida su potencial como biorreceptor, sino que refleja mayores exigencias de diseño en la interfaz electrodo-enzima. Bajo las condiciones ensayadas, la TYR mostró un comportamiento más robusto y reproducible frente al catecol, lo que fundamentó su selección para el desarrollo posterior del biosensor.

Selección del sustrato fenólico modelo y consideraciones electroanalíticas

Posteriormente, se evaluó el desempeño del biosensor electroquímico basado en TYR frente a distintos CF mediante DPV. Los resultados mostraron diferencias entre fenol, catecol e HQ, tanto en intensidad de corriente como en estabilidad del potencial de pico, lo cual puede interpretarse en función del mecanismo catalítico de la enzima.

La TYR cataliza la oxidación de o-difenoles a o-quinonas (actividad oxidasa) y la conversión de monofenoles a o-difenoles y posterior oxidación (actividad monooxigenasa) (Fairhead & Thony-Meyer, 2012). La enzima puede existir en distintos estados redox del centro activo: la forma met-tirosinasa (met-TYR) es el estado basal mayoritario y presenta actividad limitada frente a monofenoles, mientras que la especie oxi-tirosinasa (oxy-TYR) constituye la forma catalíticamente competente para la oxidación de sustratos fenólicos. En este marco, la menor respuesta obtenida para el fenol es consistente con el comportamiento reportado para monofenoles en sistemas

con TYR, donde se presentan períodos de latencia asociados al predominio de la forma met-TYR. En contraste, los o-difenoles como el catecol se oxidan de manera más eficiente, lo que explica la mayor intensidad de señal registrada (Ramsden & Riley, 2014). Este comportamiento ha sido respaldado por estudios cinéticos que describieron un inicio inmediato y una conversión eficiente para sustratos difenólicos, mientras que los monofenoles exhibieron retardos vinculados al estado funcional de la enzima (Fairhead & Thony-Meyer, 2012).

Asimismo, el catecol presentó la mayor respuesta de corriente, coherente con su rol como sustrato directo de la TYR en su actividad oxidasa. No obstante, se ha reportado que el catecol también puede inducir procesos de inactivación irreversible de la TYR mediante el mecanismo Quinonox, en el cual el sustrato, además de participar en la reacción catalítica, promueve modificaciones irreversibles del centro activo, que conducen a la pérdida de actividad enzimática y afectan la estabilidad operativa del sistema en aplicaciones analíticas (Stratford et al., 2012).

En el caso de la HQ, la respuesta fue menor que la observada para catecol, pero con potenciales de pico más bajos y mayor estabilidad de la señal a menores concentraciones. Se ha demostrado que la TYR puede hidroxilar la HQ a 2-hidroxiidroquinona a través de la forma oxi-TYR, aunque la expresión de esta actividad depende del estado funcional de la enzima (García-Molina et al., 2014). En ausencia de co-sustratos fenólicos capaces de activar el ciclo catalítico, la HQ no promueve de manera eficiente la actividad de la enzima nativa; sin embargo, se ha reportado que la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio puede favorecer la conversión de met-TYR a una forma catalíticamente competente, habilitando rutas de transformación mediadas por TYR (Ramsden & Riley, 2014; García-Molina et al., 2014). De manera complementaria, se ha descrito que la HQ puede oxidarse químicamente por oxígeno molecular en solución acuosa, con formación de especies quinónicas y generación concomitante de peróxido de hidrógeno, proceso posible en sistemas abiertos en contacto con aire (Sella & Shabat, 2013). Estas transformaciones resultan relevantes electroquímicamente, dado que el par HQ/quinona constituye un sistema redox ampliamente estudiado, cuyo comportamiento depende del pH y del entorno químico (Guin et al., 2011). En consecuencia, la señal catódica observada podría deberse a la reducción electroquímica de especies quinónicas presentes o generadas en el sistema, y no puede descartarse que procesos de oxidación química y activación enzimática coexistan y contribuyan conjuntamente a la respuesta

La comparación entre HQ y catecol evidencia diferencias relevantes desde el punto de vista electroanalítico. Mientras que el catecol alimenta directamente la vía oxidasa de la TYR y genera corrientes de mayor intensidad, la HQ exhibe una respuesta más

moderada pero más estable, con potenciales de reducción bien definidos y desplazados hacia valores más bajos, y menor contribución capacitiva relativa. La obtención de picos a potenciales bajos es ventajosa porque reduce la contribución de interferentes electroactivos y atenúa procesos indeseados como la polimerización de especies quinónicas y el ensuciamiento del electrodo, fenómenos favorecidos a potenciales más elevados (Rajesh et al., 2004; Kurbanoglu et al., 2016).

En conjunto, estas características sustentaron la selección de HQ como CF modelo para la optimización del biosensor, priorizando estabilidad de la señal y robustez analítica en rangos de concentración compatibles con niveles regulatorios. Sobre esta base, el ensayo posterior de ajuste de carga enzimática del biosensor en presencia de HQ mostró una respuesta máxima a niveles intermedios de actividad, mientras que niveles más elevados condujeron a saturación. Este comportamiento es consistente con la respuesta de biosensores con exceso de carga enzimática, la cual puede aumentar barreras difusionales o bloquear parcialmente la superficie electródica, comprometiendo la señal analítica y la estabilidad operativa (Dodevska et al., 2025). En consecuencia, se mantuvo una carga intermedia (75 U) para continuar con los estudios y avanzar hacia la optimización del recubrimiento.

Formulación del biosensor y evaluación integrada del desempeño

Dado el potencial de las CuNP para mejorar la transferencia electrónica y la respuesta analítica en biosensores electroquímicos (Elisma et al., 2019), se evaluó la formación y las características de las CuNP sintetizadas mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas.

Las NP metálicas exhiben bandas de absorción en la región visible asociadas a la resonancia del plasmón superficial localizado, originada por la oscilación colectiva de electrones de conducción. Este fenómeno se utiliza como herramienta para la detección y caracterización preliminar de NP mediante espectrofotometría UV-Visible (Dang et al., 2011). En el caso de las CuNP, la posición y la forma de la banda plasmónica depende de factores como el tamaño, la distribución de tamaños, el método de síntesis y el entorno químico (Dhas et al., 1998; Blosi et al., 2011).

En el presente trabajo, las CuNP exhibieron máximos de absorción entre 633 y 649 nm, valores compatibles con los reportados para CuNP obtenidas por métodos químicos (Dhas et al., 1998; Khanna et al., 2007; Guzmán Duxtán et al., 2020). La amplitud de la banda plasmónica, asociada a distribuciones de tamaño relativamente amplias (Dhas et al., 1998; Khanna et al., 2007) resultó coherente con los resultados de TEM, que evidenciaron partículas aproximadamente esféricas con diámetros comprendidos entre 2 y 8,3 nm. Estudios previos reportaron CuNP esféricas de tamaño reducido (1-5 nm),

destacando que este tamaño confirió una alta relación superficie-volumen, con impacto favorable en las propiedades catalíticas (Phul et al., 2018). En conjunto, la concordancia entre las técnicas de caracterización confirma la obtención de CuNP adecuadas para su incorporación como componente nanométrico en el biosensor.

La incorporación de CuNP en el biosensor enzimático basado en TYR produjo una mejora de la respuesta electroquímica frente a HQ respecto del biosensor control sin nanomaterial (B6). Los biosensores modificados con CuNP (B2, B3, B4 y B5) presentaron corrientes de reducción superiores, lo que evidenció el rol de las CuNP como modificadores de la interfaz electrodo-enzima.

Este resultado es coherente con antecedentes que mostraron que nanomateriales basados en cobre podían aumentar la electroactividad del biosensor y favorecer la transferencia electrónica en la interfaz del electrodo (Chawla et al., 2011; Pino et al., 2016; Fu et al., 2018). En este sentido, Pino et al. (2016) demostraron que incluso concentraciones muy bajas de NP (del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$) depositadas sobre electrodos SPE fueron suficientes para modificar de manera significativa la respuesta electroquímica del sistema.

En este trabajo, los voltamogramas cíclicos obtenidos para los biosensores modificados con CuNP en presencia de HQ evidenciaron la aparición de una cupla redox atribuible al sistema HQ/quinona, con picos catódico y anódico en potenciales cercanos a -30 mV y 60 mV (vs. Pseudo-ref. Ag/AgCl), respectivamente, en consistencia con lo informado para el mismo par redox por Fu et al. (2018), en biosensores modificados con materiales conductores basados en cobre.

Cabe destacar que la respuesta electroquímica no mostró una dependencia proporcional con la cantidad de CuNP incorporada. Bajo las condiciones evaluadas, el biosensor modificado con la menor concentración del nanomaterial (B5 = CuNP3-TYR-Naf) presentó la mayor corriente de reducción, mientras que concentraciones más elevadas de CuNP condujeron a respuestas menores, patrón que también fue observado por Ahmad et al. (2016) en biosensores SPE modificados con NP de dióxido de zirconio (ZrO_2), optando por seleccionar una concentración reducida que permita la obtención de una señal apreciable.

En conjunto, estos resultados indican que la incorporación de CuNP constituye una estrategia efectiva para potenciar la respuesta electroquímica del biosensor basado en TYR; sin embargo, el efecto depende de la cantidad del nanomaterial depositada. La obtención de una respuesta máxima a bajas concentraciones de CuNP sustenta la selección de B5 como plataforma para los estudios posteriores.

Por otro lado, la inmovilización de enzimas constituye una etapa crítica en el desarrollo de biosensores electroquímicos, dado que condiciona la accesibilidad del

sustrato al centro activo y la eficiencia de los procesos de transferencia electrónica en la interfaz electrodo-enzima. En el caso de la TYR, se ha reportado que su limitada estabilidad operativa exige el diseño de matrices de inmovilización adecuadas que permitan preservar la conformación catalíticamente activa y minimizar procesos de desnaturalización o pérdida de la actividad durante el uso del biosensor (Laranjo et al., 2019; Bounegru & Apretrei, 2023).

En este contexto, el empleo de polímeros y aditivos se ha propuesto como una estrategia de “ingeniería del medio”, orientada a modular el microambiente de la enzima mediante interacciones no covalentes. Desde el punto de vista fisicoquímico, estos aditivos pueden alterar el entorno inmediato de la proteína, por ejemplo, modificando su grado de hidratación o el equilibrio de interacciones con el disolvente, sin recurrir necesariamente a enlaces covalentes que puedan comprometer la actividad catalítica (Iyer & Ananthanarayan, 2008; Braham et al., 2021). No obstante, la bibliografía coincide en que no existe una matriz universalmente óptima, y que el efecto de los polímeros depende tanto de su naturaleza fisicoquímica como del tipo de enzima y de las condiciones de inmovilización empleadas (Muronetz et al., 2022; Bounegru & Apretrei, 2023).

Bajo este marco, se evaluó el efecto de dos formulaciones poliméricas sobre la respuesta electroquímica del biosensor basado en TYR: una mezcla de PEG y PG (PEG/PG), y una matriz compuesta por el polielectrolito PDDA combinado con el polímero aniónico carbopol. Ambos sistemas fueron seleccionados por el previo uso en estrategias de inmovilización enzimática y por presentar características fisicoquímicas diferenciadas, particularmente en términos de carga y del tipo de interacciones que establecen con la enzima y el recubrimiento (Iyer & Ananthanarayan, 2008; Chao et al., 2017; Muronetz et al., 2022)

Los resultados experimentales mostraron que el biosensor modificado con PEG/PG presentó corrientes de reducción mayores frente a HQ que el biosensor preparado con PDDA-carbopol, manteniéndose potenciales de pico similares en ambos casos. Este comportamiento indica que la formulación polimérica afectó principalmente la magnitud de la señal electroanalítica, sin modificar de manera apreciable el potencial del proceso redox involucrado. La mayor respuesta observada con PEG/PG es consistente con el rol reportado de polioles y polímeros neutros en la estabilización de enzimas, lo que se ha atribuido a la formación de redes de enlaces de hidrógeno que favorecen la hidratación local y la flexibilidad del microambiente enzimático, contribuyendo a la conservación de la actividad catalítica (Iyer & Ananthanarayan, 2008; Ahmad et al., 2016; Hervás-Pérez et al., 2026).

Aunque en el presente trabajo no se evaluaron propiedades estructurales del recubrimiento, como la porosidad, la respuesta obtenida con PEG/PG sugiere un comportamiento del film menos restrictivo desde el punto de vista de la accesibilidad del sustrato y de los procesos interfaciales. En contraste, la menor señal registrada para el sistema basado en PDDA-carbopol puede atribuirse a la formación de un recubrimiento polimérico más denso, en el cual las interacciones electrostáticas fuertes favorecen la inmovilización de la enzima, pero pueden introducir restricciones al transporte de masa y reducir la accesibilidad efectiva del sustrato al sitio activo (Rajesh et al., 2004; Muronetz et al., 2022). Este fenómeno ha sido descrito para matrices polielectrolíticas y se ha reflejado experimentalmente mediante en parámetros cinéticos que evidencian una menor disponibilidad efectiva de sustrato para la enzima inmovilizada, como lo reportado por Chao et al. (2017) para LACC inmovilizada sobre soportes funcionalizados con PDDA. Asimismo, debe considerarse que recubrimientos más densos o de mayor espesor pueden afectar la transferencia electrónica interfacial, contribuyendo a una disminución de la corriente registrada aun cuando la enzima se encuentre eficientemente inmovilizada (Ahmad et al., 2016; Hervás-Pérez et al., 2026).

En función de estos resultados, la formulación basada en PEG/PG fue seleccionada como agente polimérico para las etapas posteriores del desarrollo del biosensor. A continuación, se avanzó hacia una etapa de optimización multivariable, en la que se evaluaron de manera conjunta la concentración de PEG/PG incorporada a la solución enzimática, la actividad de TYR y la concentración de Nafion®, mediante un diseño experimental orientado a maximizar la respuesta electroquímica del sistema.

La aplicación del diseño permitió identificar una combinación de factores óptima dentro del espacio experimental considerado, la cual fue posteriormente validada mediante un ensayo de verificación experimental, confirmando la reproducibilidad de la respuesta obtenida.

Los resultados obtenidos en la etapa de verificación y caracterización analítica preliminar indicaron que el biosensor enzimático desarrollado presentó una sensibilidad compatible con la detección de CF en rangos de concentración relevantes desde el punto de vista regulatorio. En particular, la estimación preliminar del LD de $5,1 \mu\text{g L}^{-1}$ se ubica por debajo del umbral normativo vigente de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para la descarga de fenoles en la provincia de Santa Fe (Ley N° 11.220). Si bien este valor fue calculado a partir de un número limitado de réplicas y se reporta de manera exploratoria, la respuesta electroquímica obtenida fue reproducible, diferenciable del blanco y coherente con el comportamiento esperado para sistemas enzimáticos basados en TYR inmovilizada, lo que respalda la validez del enfoque adoptado en esta etapa inicial de desarrollo.

En el rango de concentraciones de HQ evaluado, la corriente medida a los 5 min mostró un incremento general con la concentración del sustrato, aunque sin mantener una relación estrictamente lineal. El análisis de la tasa de variación de la corriente no presentó una tendencia sistemática con la concentración de HQ, sino una dispersión de los valores, particularmente a concentraciones más elevadas. Este comportamiento podría atribuirse tanto a efectos de saturación de la respuesta del biosensor como a procesos inhibitorios asociados a límites difusionales del sustrato y de los productos enzimáticos, como ha sido reportado para sistemas basados en TYR (Stratford et al., 2012).

En términos comparativos, los LD reportados en la bibliografía para biosensores basados en TYR abarcan un rango amplio, desde valores del orden de ng L^{-1} hasta decenas de $\mu\text{g L}^{-1}$, dependiendo del diseño del biosensor, la estrategia de inmovilización y el sustrato empleado (Nurul Karim & Lee, 2013; Han et al., 2015; Wang et al., 2016; Laranjo et al., 2019; Achi et al., 2020; Gomes et al., 2021). En este contexto, Gomes et al. (2021) desarrollaron un biosensor con TYR y nanotubos de carbono para la detección de HQ, destacando la necesidad de aplicar una corrección de señal de fondo para aislar la contribución atribuible al analito, estrategia que resulta conceptualmente consistente a la adoptada en el presente trabajo. Si bien el LD reportado por dichos autores es inferior al aquí estimado, el desempeño alcanzado en esta tesis resulta adecuado para su aplicación en el contexto específico del monitoreo de ARU.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el biosensor enzimático desarrollado alcanza un desempeño analítico compatible con los objetivos planteados para este capítulo. La caracterización realizada permitió establecer condiciones óptimas de formulación y operación, así como verificar que la sensibilidad alcanzada fue suficiente para avanzar hacia etapas posteriores de validación analítica. En trabajos futuros será necesario incorporar réplicas sistemáticas, evaluar repetibilidad, estudiar interferencias propias de las matrices ambientales complejas y aplicar el dispositivo a muestras reales de ARU. No obstante, el desempeño alcanzado en esta etapa preliminar sienta una base experimental sólida para el desarrollo de una herramienta potencialmente aplicable al monitoreo ambiental de CF regulados.

Capítulo 2: Biorremediación de ARU con *Chlorella vulgaris* y obtención de moléculas de interés biotecnológico

2.1 Introducción

2.1.1 Morfología y fisiología celular de *C. vulgaris*

La microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) es una especie eucariota de alga verde caracterizada por su elevada eficiencia fotosintética (Safi et al., 2014). Sus células presentan morfología esférica, con un diámetro de 2-10 μm (Vander Wiel et al., 2017), delimitadas externamente por una pared celular rígida constituida por una capa externa de pectosa y una interna de celulosa. A lo largo del ciclo celular, el grosor de la pared aumenta progresivamente de 2 a 21 nm, y durante la maduración se forma una capa microfibrilar compuesta por glucosamina que le confiere mayor rigidez. La pared incluye diversos polisacáridos que pueden contener azúcares como ramnosa, galactosa o arabinosa. Tanto el grosor como la composición de la pared celular pueden variar en función de la cepa, el estado fisiológico y las condiciones de cultivo (Yamamoto et al., 2004; Weber et al., 2022).

El citoplasma, conformado por agua, proteínas y minerales, alberga los principales orgánulos celulares, entre ellos un núcleo de reducido tamaño, mitocondrias, vacuolas, aparato de Golgi, y un único cloroplasto. Este último, delimitado por una doble membrana, contiene tilacoides y gránulos de almidón, y constituye el sitio primordial de síntesis de pigmentos y lípidos. Bajo condiciones de estrés se incrementa la acumulación de glóbulos lipídicos tanto en el citoplasma como en el cloroplasto (Figura 19). Entre las condiciones de estrés asociadas a esta respuesta se encuentran la elevada salinidad (Pancha et al., 2015), intensidad lumínica (Mandotra et al., 2016), temperatura y la privación de nutrientes (Paliwal et al., 2017).

Chlorella vulgaris es una célula inmóvil que se reproduce asexualmente por autosporulación, con una capacidad de duplicación poblacional cercana a las 24 horas en condiciones óptimas (Safi et al., 2014; Coronado-Reyes et al., 2022).

En medios de crecimiento estándar, *C. vulgaris* se encuentra aislada o formando colonias de hasta 64 células, lo que genera un entorno favorable para su proliferación (Coronado-Reyes et al., 2022). Es una especie con relevancia ecológica por ser representativa del fitoplancton de lagos y lagunas de aguas continentales de distinta extensión y profundidad, aunque también se encuentra en suelos. Su elevado valor nutricional y metabólico ha impulsado su incorporación en la industria alimenticia, cosmética, y nutracéutica, así como en formulaciones con propiedades antiinflamatorias (Silva et al., 2019).

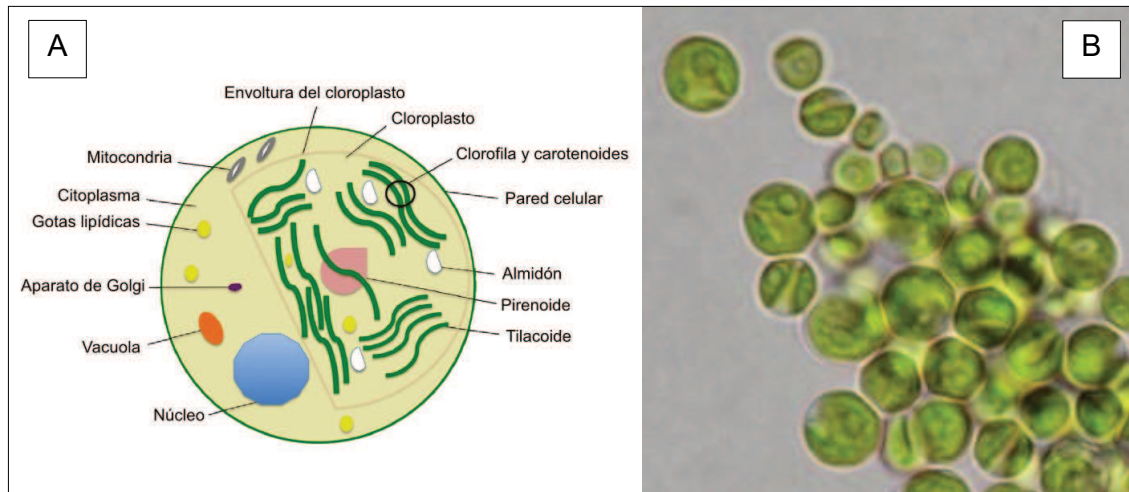


Figura 19: A) Esquema estructural de una célula de *Chlorella vulgaris* que ilustra sus principales orgánulos. Adaptado de Safi et al. (2014). B) Microfotografía de microscopía óptica de *Chlorella vulgaris*, donde se observa la morfología esferoidal y su disposición en agregados celulares. Extraída de Figueroa-Torres et al. (2020).

2.1.2 Composición bioquímica y potencial biotecnológico

Se ha demostrado que las variaciones en las condiciones de cultivo, en los parámetros fisicoquímicos, así como las diferencias entre especies y cepas de microalgas pueden generar modificaciones en su composición bioquímica. Entre los principales metabolitos se hallan las proteínas, los carbohidratos y los lípidos, considerados materia prima fundamental para la industria biotecnológica por su potencial en la producción de diversos productos de origen biológico (de Cassia Soares Brandão et al., 2023).

El interés en *C. vulgaris* radica en su rápido crecimiento, la capacidad de acumular lípidos y la producción de metabolitos bioactivos (Grubišić et al., 2024). Su biomasa contiene entre 42 % y 61 % de proteínas de su peso seco, de las cuales una fracción se asocia a la pared celular, otra corresponde a enzimas intracelulares y el resto cumple funciones metabólicas en diferentes procesos celulares (Coronado-Reyes et al., 2022; Mendes et al., 2024a).

En cuanto a los lípidos, *C. vulgaris* puede acumular entre el 5 y el 40 %, principalmente en forma de triacilglicéridos (TAG) de reserva, fosfolípidos de membrana y glicolípidos. Bajo condiciones de estrés, este valor puede alcanzar hasta el 58 %, con un perfil lipídico favorable para la producción de biodiésel (Safi et al., 2014; Dall'Osto et al., 2019).

Los lípidos polares (estructurales) contienen principalmente AGPI. Dentro de este grupo, los fosfolípidos y esteroides constituyen los componentes principales de las

membranas celulares, las cuales actúan como barreras selectivas de moléculas, además de intervenir en procesos de fusión de membranas. Algunos lípidos polares también participan como intermediarios en las vías de señalización celular y en la respuesta a cambios en los parámetros ambientales. Por su parte, los lípidos de almacenamiento se presentan mayoritariamente en forma de TAG, con predominio de ácidos grasos saturados (AGS) y algunos insaturados (Sajjadi et al., 2018).

Los AGPI poseen funciones biológicas y beneficios para la salud en organismos animales (Lima et al., 2020; de Cassia Soares Brandão et al., 2023). En particular, los AGPI omega-3 actúan como nutrientes esenciales, antioxidantes, y moduladores de procesos antiinflamatorios. La abundancia y el PAG en microalgas pueden variar considerablemente bajo diferentes condiciones de crecimiento (Conde et al., 2021).

En relación con los carbohidratos, estos constituyen entre el 12 % y el 20 % del peso en *C. vulgaris*, y se distribuyen principalmente como almidón de reserva en el cloroplasto, y como celulosa y polisacáridos de la pared celular, entre ellos glucosamina y glucosa-manosa. En menor proporción, la microalga contiene azúcares simples y glucógeno en el citoplasma, que actúan como reservas energéticas accesorias (Grubišić et al., 2024; Mendes et al., 2024a).

La especie también es rica en pigmentos, siendo la clorofila el predominante, que además de su función fotosintética, posee propiedades antioxidantes. Por su parte, los carotenoides constituyen un amplio grupo de tetraterpenoides, entre los que se incluyen compuestos con propiedades beneficiosas para la salud y capacidad preventiva frente al cáncer, degeneración macular y cataratas (Gong & Bassi, 2016; Kumar et al., 2021). Desde el punto de vista químico los carotenoides se caracterizan por una estructura derivada de una cadena poliénica de 40 carbonos, cuyo sistema de dobles enlaces conjugados confiere a estas moléculas propiedades fisicoquímicas distintivas y su capacidad de absorber la luz. Esta cadena puede presentar terminaciones cíclicas y distintos grupos funcionales que contienen oxígeno, lo que da lugar a dos grandes clases de carotenoides: los carotenos, de naturaleza hidrocarbonada, y las xantofilas, que corresponde a derivados oxigenados (Figura 20) (Del Campo et al., 2007; Goswami et al., 2021). En microalgas resulta además útil la distinción funcional entre carotenoides primarios, acoplados al crecimiento y componentes estructurales de los fotosistemas, y carotenoides secundarios, que se acumulan en respuesta a estrés y se localizan frecuentemente en cuerpos lipídicos citoplasmáticos. Estas categorías condicionan tanto su localización subcelular como su regulación metabólica (Cordero et al., 2011). La astaxantina es un ejemplo de carotenoide secundario que se acumula bajo condiciones de estrés y se deposita en estructuras lipídicas citoplasmáticas, aportando fotoprotección y actividad antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno (ERO)

(Lemoine & Schoefs, 2010). En diversas microalgas como *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella salina*, *Neochloris oleoabundans* y *Muriellopsis* sp., se ha potenciado la producción de carotenoides mediante la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo (Shi et al., 2020). Además, se ha demostrado que la síntesis de carotenoides en microalgas se acompaña de la producción de lípidos, lo que ha motivado estudios sobre la co-producción de astaxantina y lípidos como una estrategia para incrementar el valor agregado de los cultivos (Liu et al., 2016).

La astaxantina destaca por su elevado poder antioxidante superior a la de vitamina C, β -caroteno o α -tocoferol, y posee aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética. Se aplica como antiinflamatorio, neuroprotector, en salud ocular y para tratamiento de enfermedades metabólicas (Farrugia et al., 2018; Goswami et al., 2021). Además, la astaxantina ha sido aprobada por organismos reguladores, como la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Comisión Europea, como aditivo alimentario natural en formulaciones para animales y como colorante natural (Brendler & Williamson, 2019; Singh et al., 2019). Su producción a partir de microalgas a escala comercial se encuentra restringida a la especie *Haematococcus pluvialis*, aunque presenta limitaciones debido a su lento crecimiento y baja densidad celular en los cultivos autotróficos (Fernández Cordero, 2013; Niño Castillo et al., 2017). Sin embargo, se ha comprobado la producción de elevados niveles de astaxantina en cultivos heterotróficos y autotróficos bajo deficiencia de nitrógeno en *C. zofingiensis* (Sun et al., 2008; Zhang et al., 2017; Mao et al. 2018), y en *C. vulgaris* se han cuantificado hasta 35,7 mg L⁻¹ de astaxantina (Kendirlioglu & Cetin, 2017). Más recientemente, Yadav et al. (2020) identificaron astaxantina como uno de los carotenoides más abundantes en *C. vulgaris*, alcanzando un 4,6% de su biomasa total.

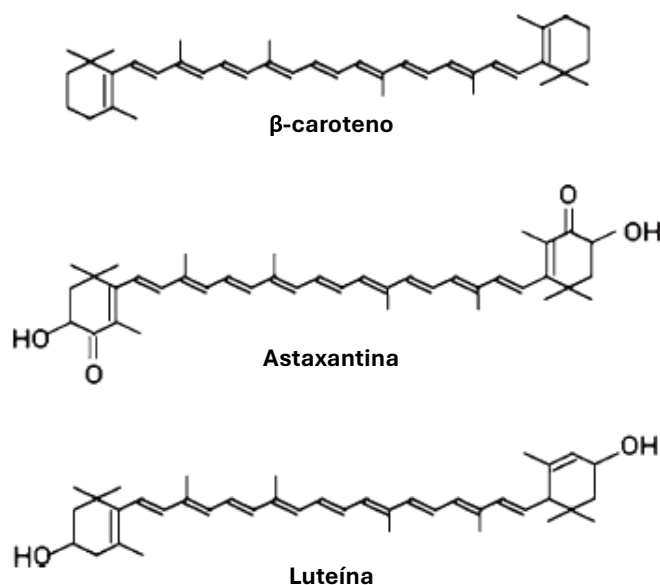


Figura 20: Estructuras químicas representativas de carotenoides presentes en microalgas: β -caroteno (caroteno), astaxantina (xantofila) y luteína (xantofila). Extraído de Del Campo et al. (2007).

2.1.3 Metabolismo autotófico y mixotrófico de *C. vulgaris*

Chlorella vulgaris es una microalga versátil que puede modificar su metabolismo en función de la fuente y concentración de carbono disponible. Dependiendo de los parámetros abióticos, en particular la fuente de carbono, esta microalga puede desarrollarse bajo un metabolismo autotrófico, heterótrofico o mixotrófico (Wang et al., 2014; Pacheco et al., 2021). Esta capacidad de crecer en distintas condiciones constituye una de las principales ventajas de las especies de *Chlorella*, que ha sido aprovechada en la producción de biomasa a gran escala para optimizar los bioprocesos y reducir los costos (Condori et al., 2024; Talaei & Prieto, 2024; Grubišić et al., 2024).

En condiciones mixotróficas, *C. vulgaris* combina las rutas autótrofas y heterótrofas, de modo que realiza fotosíntesis para fijar dióxido de carbono y, simultáneamente, asimila compuestos orgánicos como fuente adicional de carbono y energía (Liang et al., 2009). En consecuencia, las células no dependen exclusivamente de la luz ni del sustrato orgánico para sostener su crecimiento. Este tipo de metabolismo ha demostrado competir favorablemente con los sistemas autótrofos, alcanzando alta productividad de biomasa algal (2 a 5 g L⁻¹) y de lípidos (67 a 144 mg L⁻¹ d⁻¹) (Yeh & Chang, 2012).

Se han empleado diversos compuestos como fuentes de carbono orgánico para *C. vulgaris*, incluyendo monosacáridos (glucosa, galactosa), disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa) y diversos sustratos de bajo costo (Grubišić et al., 2024). Asimismo, diferentes especies de *Chlorella* se han cultivado exitosamente en medios de cultivo que

contenían acetato y butirato (Lacroux et al., 2021), glucosa y maltosa (Kong et al., 2020), bagazo de sorgo dulce (Arora & Philippidis, 2021), entre otros. Sin embargo, la principal limitación del sistema mixotrófico es el precio y disponibilidad de azúcares o compuestos que compiten como materias primas para otros usos, como la producción de alimentos y biocombustibles. En este contexto, se ha evaluado el crecimiento de *Chlorella* en diferentes tipos de aguas residuales, habiéndose demostrado que los nutrientes presentes pueden ser aprovechados eficazmente por las microalgas (Kong et al., 2021; Pacheco et al., 2021).

2.1.4 Biorremediación de aguas residuales con *C. vulgaris*

Se han investigado diversos géneros de microalgas para la remediación de aguas residuales, destacándose *Chlorella* y *Scenedesmus*, con resultados variables en el tratamiento de efluentes primarios, secundarios y terciarios (de Cassia Soares Brandão et al., 2023). Aunque estudios taxonómicos recientes, basados en evidencias morfológicas y moleculares, han propuesto la reasignación de diversas especies previamente incluidas en *Scenedesmus* al género *Tetradasmus* (Turiel et al., 2021; Cho & Lee, 2024), en esta tesis se adopta la denominación empleada en los artículos originales citados, a fin de mantener la consistencia con la literatura consultada.

Como se mencionó previamente, además de remover contaminantes, estas microalgas se han estudiado por su potencial para producir simultáneamente metabolitos de interés biotecnológico (Carneiro et al., 2021). *Chlorella vulgaris* se distingue por su resistencia al estrés biótico y abiótico, manteniendo altos niveles de crecimiento y actividad biosintética incluso bajo condiciones subóptimas, como temperaturas extremas, elevada intensidad lumínica o limitación de nutrientes (Aigner et al., 2020; Mendes et al., 2024b).

Diversos estudios han evaluado el potencial de *C. vulgaris*, y otras especies relacionadas, en la remoción de nutrientes de ARU, provenientes de distintas localidades, reportando reducciones de nitrógeno entre 57 y 97 % y de fosfatos entre 80 y 100 % (Ruiz et al., 2013; Escapa et al., 2015; Álvarez-Díaz et al., 2017; Evans et al., 2017; Ferro et al., 2018). Asimismo, se ha demostrado la eficacia de *Chlorella* en la reducción de contaminantes microbiológicos y orgánicos. Marchello et al. (2015) observaron que consorcios algales dominados por *C. vulgaris* cultivados en efluentes secundarios redujeron drásticamente coliformes totales ($50.000 \text{ UFC mL}^{-1}$) y *Escherichia coli* ($6.000 \text{ UFC mL}^{-1}$) durante las primeras 48 h; asimismo, no se detectaron coliformes totales ni *E. coli* a partir de los días 18 y 11, respectivamente. En cuanto a la reducción de la DQO, se han informado eficiencias variables según el tipo de cultivo y el efluente utilizado. *Chlorella* sp. y *Chlorella sorokiniana* lograron una reducción de 50

% de la DQO en aguas residuales de procesamiento de *Pyropia*, mientras que *C. vulgaris* alcanzó una reducción del 28% en aguas residuales municipales suplementadas con glucosa (Evans et al., 2017; Zheng et al., 2021). Con un mejor desempeño, el consorcio de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. cultivado en ARD diluidas al 75% obtuvo una disminución del 83 % de DQO, alcanzando 1,8 g L⁻¹ de biomasa y elevados contenidos de clorofila, proteínas y lípidos (Silambarasan et al., 2021).

Ruiz et al. (2013) habían demostrado que *C. vulgaris* en ARU pretratadas presentaba la mayor tasa de crecimiento (0,8 día⁻¹), aunque con la menor biomasa (0,7 g L⁻¹), entre las cepas evaluadas, señalando que los efluentes contenían los micronutrientes esenciales para el desarrollo celular. Estudios posteriores reportaron biomazas máximas entre 0,9 g L⁻¹ y 2,7 g L⁻¹ en aguas residuales crudas (Caporgno et al., 2015; Ferro et al., 2019). Por otra parte, *C. vulgaris* cultivada en ARD diluidas al 80 % alcanzó un crecimiento comparable al medio estándar, atribuible a la elevada disponibilidad de nutrientes, mientras que diluciones excesivas no resultaron favorables para su desarrollo (Nam et al., 2017; Tan et al., 2022).

En conjunto, la integración de la producción de biomasa de *C. vulgaris* con el tratamiento de efluentes representa una estrategia prometedora para desarrollar sistemas de cultivo más sostenibles y con menor requerimiento de recursos.

2.2 Objetivos

2.2.1. Objetivo General

Estudiar el potencial del cultivo de *C. vulgaris* para obtener biomasa con fines de: biorremediación de ARU, y obtención de moléculas de interés biotecnológico.

2.2.2. Objetivos Específicos

Cultivar la microalga *C. vulgaris* a escala de laboratorio.

Evaluar las condiciones fisiológicas del cultivo mediante la determinación de densidad celular, biovolumen, producción de pigmentos fotosintéticos y concentración de biomarcadores de estrés oxidativo

Evaluar la capacidad de *C. vulgaris* para biorremediar ARU, mediante la determinación de DBO, DQO, nutrientes y bacterias coliformes (totales y fecales).

Evaluar la presencia y concentración de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa obtenida tras la biorremediación: proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, astaxantina.

Evaluar la fitotoxicidad del efluente tratado mediante un bioensayo agudo con *L. sativa*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Materiales y reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados, incluidos aquellos empleados para la preparación del medio de cultivo algal, las determinaciones analíticas de pigmentos fotosintéticos y biomarcadores, y las extracciones de compuestos de interés biotecnológico, fueron de grado analítico y se adquirieron comercialmente de Sigma-Aldrich, Merck y Cicarelli. Todas las soluciones, buffers y medios de cultivo se prepararon con agua Milli-Q.

El medio de cultivo empleado fue el medio Johnson modificado, el cual fue autoclavado previo a su uso. Su composición por litro de agua fue la siguiente: 0,1 g de $C_2H_3NaO_2$; 0,00133 g de $CaSO_4$; 0,00051 g de $CoCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,00006 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,00244 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,00061 g de H_3BO_3 ; 0,2 g de K_2HPO_4 ; 1,0 g de KNO_3 ; 0,0976 g de $MgSO_4$; 0,000041 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,00189 g de $Na_2.EDTA$; 0,00038 g de $(NH_4)_6Mo_4O_{32} \cdot 4H_2O$; 0,000041 g de $ZnCl_2$ (Borowitzka, 1988).

Todo el material de vidrio fue lavado previo a su uso con ácido nítrico al 10 % v/v durante 72 h, enjuagado con agua Milli-Q y esterilizado en autoclave.

El principal instrumental y equipamiento utilizado para cumplir los objetivos del presente capítulo incluyó una balanza analítica (SHINKO DENSHI CO., Ltd., modelo HT224R), un autoclave automático (Microclave SL9000, Ficoinox), un pH-metro (Jenco, modelo pH-Vision 6071), una centrifuga (Gelec, modelo G142) y una microcentrifuga (MiniSpin, Eppendorf), un espectrofotómetro UV-Visible (Dlab, modelo SP-UV1000), un lector de microplacas ELISA (Diatek, modelo DR-200BN), microscopios ópticos Leica DM 750 y Optika Italy trinocular C-B10+, equipados con cámara de Neubauer para el conteo celular. Asimismo, se utilizaron un baño termostatzado (Arcano HHS4, Pasteur SRL), una estufa de cultivo (MARNE), un equipo multiparamétrico (YSI Professional Plus) y una cámara de incubación para el bioensayo de *L. sativa* (Ingelab, modelo I501PF). Para las mediciones de longitud de la radícula y el hipocótilo de *L. sativa* se empleó un calibrador de fibra de carbono (Crossmaster).

2.3.2 Cepa de microalga y condiciones de cultivo stock

Chlorella vulgaris (cepa LMPA-40), previamente aislada de la costa Atlántica de Chubut, Argentina, se obtuvo de la colección de cultivo de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Groppa et al., 2019). La cepa se mantuvo en el laboratorio

en medio Johnson modificado (Borowitzka, 1988). Los cultivos se desarrollaron en Erlenmeyers de 1 L, bajo iluminación continua con luz blanca fría ($108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Se mantuvo una aireación constante con burbujeo de aire y agitación magnética continua a 100 rpm. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ecotoxicología de FHUC (UNL).

2.3.3 Recolección y caracterización de ARU

Para llevar a cabo todos los ensayos que se desarrollan en las siguientes secciones se recolectaron muestras de ARU de la PTSJ, Santa Fe, caracterizada en el capítulo 1.

Las muestras se colectaron a la salida de las LFS, previo a la CC. La temperatura, el OD, la conductividad específica (SPC) y el pH se midieron *in situ* con un equipo multiparamétrico YSI Professional Plus. La metodología de caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras se detalla en la sección 1.3.3 del capítulo 1.

2.3.4 Crecimiento de *C. vulgaris* en ARU: ensayos preliminares

Evaluación del crecimiento algal

Se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento algal siguiendo las directrices de la Guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, 2011) con el fin de determinar la concentración máxima de ARU en la que *C. vulgaris* podía crecer. La validez del test se estableció bajo el criterio de que, durante el período de prueba, la densidad algal del cultivo control registrara un incremento mínimo de 16 veces respecto a la inicial, en concordancia con lo establecido por la OECD.

Las muestras de ARU se filtraron con una red de fitoplancton de $20 \mu\text{m}$ y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos para eliminar microorganismos planctónicos y partículas sólidas insolubles (Sureshkumar y Thomas, 2019).

Chlorella vulgaris se expuso a cinco concentraciones de ARU (expresadas como % v/v): 10 %, 20 %, 40 %, 80 % y 100 %, diluidas en medio Johnson modificado (Borowitzka, 1988). El control consistió en medio Johnson modificado, sin el agregado de ARU. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en matraces de 250 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL, y una densidad celular inicial de $1 \times 10^4 \text{ cél mL}^{-1}$. Los bioensayos se mantuvieron bajo luz blanca fría continua ($108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

La densidad algal (cél mL^{-1}) se determinó diariamente para cada réplica mediante conteo directo en una cámara de Neubauer, analizando al menos 25 cuadrados para asegurar errores inferiores al 10 % (Venrick, 1978). Posteriormente, se calculó la tasa de crecimiento diaria (μ ; día^{-1} ; ecuación 3) según la OECD (2011).

$$\mu (\text{día}^{-1}) = \frac{\ln x_j - \ln x_i}{j - i} \quad (3)$$

donde: i = tiempo inicial; j = tiempo final; X_i = densidad celular en i ; X_j = densidad celular en j .

A partir de estos valores, se calcularon el tiempo de duplicación (DT) (ecuación 4) y la tasa de inhibición del crecimiento, expresada como porcentaje de inhibición (I %) (ecuación 5), para cada tratamiento (OECD, 2011).

$$DT \text{ (día)} = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (4)$$

$$I \text{ (%) } = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \quad (5)$$

donde: μ_C = valor medio de la tasa de crecimiento específico en el control; μ_T = valor medio de la tasa de crecimiento específico en cada tratamiento.

Además, se determinó el biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$) para el control y cada tratamiento, al inicio y al final del ensayo. Para ello, se asumió una forma esférica de la célula y se calculó el volumen celular (V , ecuación 6) según Hillebrand et al. (1999). Se midieron 25 células por réplica y el biovolumen se estimó mediante la ecuación 7.

$$V(\mu\text{m}^3) = \frac{\pi}{6} \times d^3 \quad (6)$$

$$\text{Biovolumen}(\mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}) = \bar{V} \times \text{densidad celular} \quad (7)$$

donde: d =diámetro celular (μm); \bar{V} = volumen medio de 25 células.

Evaluación del estado fisiológico

Se efectuó un ensayo complementario de inhibición del crecimiento algal (OECD, 2011), siguiendo la misma metodología detallada en la sección 2.4.1 del presente capítulo, para evaluar el estado fisiológico de las microalgas expuestas a distintas concentraciones de ARU. Se determinó la densidad algal (cél mL^{-1}) para cada réplica mediante conteo directo en una cámara de Neubauer. Al final del ensayo se midieron, en cada réplica ($n=3$), los pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$): clorofila-a (cl-a), clorofila-b (cl-b), y carotenoides. Los pigmentos se extrajeron con acetona y luego se determinaron espectrofotométricamente. Brevemente, se filtraron 15 mL de cultivo a través de un filtro de microfibra de vidrio (tamaño de poro $0,7 \mu\text{m}$) y se transfirieron a un tubo de ensayo protegido de la luz con 10 mL de acetona al 90 % (v/v). El filtro se maceró y se mantuvo en refrigeración ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 h. Luego se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se descartó el pellet y, en el sobrenadante, se midió la absorbancia a longitudes de onda de 664, 647, 510, y 480 nm, utilizando un espectrofotómetro Dlab SP-UV1000. Las concentraciones de cl-a y cl-b se calcularon utilizando las fórmulas de Jeffrey y Humphrey (1975) (ecuaciones 8 y 9), mientras que los carotenoides se calcularon según Jeffrey (1968) (ecuación 10). Para el tratamiento de los resultados, los pigmentos se expresaron en relación con la densidad celular correspondiente (pg cél^{-1}).

$$Cl - a (\mu g L^{-1}) = \frac{v \times [(11,93 \times A_{664}) - (1,93 \times A_{647})]}{V} \quad (8)$$

$$C - b (\mu g L^{-1}) = \frac{v \times [(20,36 \times A_{647}) - (5,50 \times A_{664})]}{V} \quad (9)$$

$$Carotenoides (\mu g L^{-1}) = \frac{v \times [(7,6 \times A_{480}) - (1,49 \times A_{510})]}{V} \quad (10)$$

Donde: v = volumen de extracto de acetona (mL); V = volumen de muestra filtrada (L); A_{480} , A_{510} , A_{647} , y A_{664} indican la absorbancia medida a 480, 510, 647, y 664 nm, respectivamente.

Posteriormente, se calcularon índices derivados de los pigmentos fotosintéticos para evaluar posibles alteraciones en el aparato fotosintético de *C. vulgaris* como consecuencia de la exposición al efluente. A continuación, se presentan las fórmulas utilizadas para la relación de clorofilas (CR) y el índice de pigmentos (PI), según Bodnar et al. (2016) (ecuaciones 11 y 12).

$$CR = \frac{Cl-a}{Cl-b} \quad (11)$$

$$PI = \frac{Carotenoides}{Cl-a} \quad (12)$$

Adicionalmente, al finalizar el ensayo, se cosechó la biomasa de cada réplica por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos, con posterior lavado con agua Milli-Q esterilizada. Para los análisis enzimáticos de catalasa (CAT) (μ U/pg proteína) y glutatión-S-transferasa (GST) (μ U/pg proteína), las células fueron resuspendidas y homogeneizadas en una solución buffer de fosfato 50 mM (pH = 7,0) con 1 mM de EDTA para el análisis de CAT, y en solución buffer de fosfato 100 mM (pH = 6,5) con 1 mM de EDTA para GST. Además, se adicionó ácido tricloroacético (5% m/v), como agente facilitador de la extracción.

Las actividades enzimáticas se cuantificaron mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro Dlab SP-UV1000. Para CAT, se monitoreó la disminución de H_2O_2 a 240 nm (Aebi, 1984), utilizando CAT de hígado bovino como estándar. Para GST, se aplicó el método de Habig et al. (1974), que mide la formación del producto de conjugación con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno a 340 nm, empleando GST de hígado equino como estándar. Para expresar los resultados de CAT y GST, se determinaron las proteínas en cada muestra, mediante el método del azul brillante de Coomassie utilizando albúmina de suero bovino como estándar de proteína (Bradford, 1976).

Para la estimación del contenido de malondialdehído (MDA) (μ mol $cél^{-1}$), las microalgas fueron resuspendidas en ácido tricloroacético (20% m/v) y se llevaron a centrifugación nuevamente. Luego el sobrenadante fue mezclado con ácido tiobarbitúrico (0,5% m/v). La mezcla fue calentada a 100 °C durante 10 minutos y, una vez enfriada, se registró la absorbancia a 532 nm (Heath & Packer, 1968). La curva

estándar de MDA se preparó a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como precursor estable, hidrolizado medio ácido (ácido sulfúrico 1% v/v).

2.3.5 Ensayo de biorremediación de ARU con *C. vulgaris*

Tras los ensayos preliminares, se determinó que *C. vulgaris* pudo crecer en un medio de cultivo compuesto por un 100% de ARU. El crecimiento sostenido de la microalga justificó la selección de esta concentración para desarrollar el ensayo de biorremediación a mayor escala. Para ello, las muestras de ARU se filtraron con una red de fitoplancton de 20 μm y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos para eliminar microorganismos planctónicos y partículas sólidas insolubles (Sureshkumar y Thomas, 2019). Se estableció un diseño experimental que incluyó un cultivo autotrófico en medio de cultivo Johnson modificado (Borowitzka, 1988) como control. Los tratamientos se realizaron por triplicado, escalando a Erlenmeyers de 1 L (con volumen de trabajo de 1 L), que fueron inoculados con cultivos de *C. vulgaris* para obtener una densidad inicial de 1×10^5 cél mL⁻¹. Los cultivos se mantuvieron bajo iluminación continua con luz blanca fría ($108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 24 ± 2 °C, con agitación magnética constante a 100 rpm y aireación continua mediante burbujeo de aire.

La densidad algal se determinó diariamente mediante conteo en cámara de Neubauer para cada tratamiento, lo que permitió calcular la tasa de crecimiento diaria (día⁻¹) utilizando la ecuación 3. Con base en el seguimiento del crecimiento algal, se definieron los tiempos de muestreo para los análisis posteriores. En el cultivo control se tomaron muestras en un tiempo intermedio (T1-C: día 4) durante la fase exponencial, y un tiempo final (T2-C: día 12), al inicio de la fase estacionaria. Para los cultivos mixotróficos, en ARU, se seleccionó un tiempo intermedio (T1-M: día 4), con base en la información obtenida del ensayo control, aunque la toma de muestras coincidió con la fase de adaptación. El tiempo final (T2-M: día 8) fue seleccionado como punto de muestreo representativo para evaluar la biomasa en un momento óptimo en el que la microalga hubiera procesado una cantidad significativa de contaminantes, pero aún se encontraba en una fase de crecimiento.

En cada momento de muestreo se analizaron i) la biomasa y su composición, y ii) las concentraciones de pigmentos. La biomasa (expresada en g L⁻¹) se cuantificó filtrando 20 mL de cultivo con un filtro de microfibra de vidrio previamente pesado (tamaño de poro de 0,7 μm), seguido del secado a 60 °C durante 48 h o hasta peso constante (Ratha et al., 2016). Para caracterizar la biomasa de *C. vulgaris*, la misma se cosechó mediante centrifugación (10 minutos, 2500 rpm) en T1 y T2, con posterior lavado con agua Milli-Q estéril.

Para evaluar el estado fisiológico de las microalgas en T1 y T2 se cuantificaron los pigmentos y se calcularon los índices fotosintéticos. Se determinaron: cl-a, cl-b y carotenoides (expresados como pg cél⁻¹) y CR y PI. La metodología se encuentra detallada en la sección 2.3.4 del presente capítulo.

Eficiencia de remoción de compuestos

Para evaluar la remediación de las ARU se analizaron los siguientes parámetros: DQO, DBO₅, nutrientes (nitrato, nitrito, amonio y fósforo) y bacterias coliformes totales y fecales, al inicio del ensayo (T0), y en los tiempos intermedio (T1-M) y final (T2-M), según metodologías estandarizadas (sección 1.3.3 del capítulo 1). Los parámetros determinados se compararon con los límites regulatorios establecidos por la Ley N° 11.220 de Prestación y Regulación de Servicios Sanitarios para la descarga de efluentes cloacales (Gobierno de la Provincia de Santa Fe, 1994), que se muestra en la Tabla 1 del capítulo 1.

La eficiencia de remoción (E%) de cada parámetro se calculó según Khalifa et al. (2020) (ecuación 1, capítulo 1).

2.3.6 Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de *C. vulgaris*

La biomasa de *C. vulgaris* cosechada se analizó para cuantificar carbohidratos totales (% de la biomasa), proteínas (% de la biomasa), lípidos (% de la biomasa). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). Además, se analizó el PAG (%), que fue realizado por el Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (INCAPE, CONICET-UNL).

Las proteínas se cuantificaron mediante la técnica colorimétrica de Bradford (Bradford 1976), adaptada por Bajguz (2011), utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Brevemente, el pellet de algas se incubó en NaOH 0,1 M (24 h, 4 °C) y se centrifugó (10 minutos, 5000 rpm). Una alícuota (100 µL) del sobrenadante se mezcló con 1 mL de reactivo de Bradford (preparado con 0,012 g de Azul Brillante de Coomassie G-250 en 5 mL de etanol al 95%) y se midió la absorbancia a 595 nm después de 10 minutos.

Los carbohidratos se determinaron mediante el método de fenol-ácido sulfúrico de DuBois et al. (1956), adaptado por Purkayastha et al. (2017), utilizando glucosa como estándar. Tras resuspender el pellet de algas en 2 mL de agua destilada, se mezclaron 250 µL de esta suspensión con 250 µL de fenol (5,0 % m/v) y 750 µL de ácido sulfúrico

(98 % m/m). Tras reposar 5 minutos a temperatura ambiente e incubar a 90 °C durante 15 minutos en un baño de agua, se midió la absorbancia a 490 nm.

Los lípidos se cuantificaron mediante la reacción sulfo-fosfo-vainillina (Mishra et al., 2014), utilizando aceite de girasol como estándar. El pellet de algas se resuspendió en 100 µL de agua destilada, se mezcló con 2 mL de ácido sulfúrico (98 % m/m) y se incubó a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar en baño de hielo durante 5 minutos, se añadieron 2,5 mL de reactivo de fosfovainillina y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La absorbancia se midió a 530 nm.

Finalmente, el PAG se determinó mediante cromatografía de gases, según las normas IRAM 5652 e IRAM 5651. Para ello, se realizó previamente una extracción en tres etapas con una mezcla de n-hexano e isopropanol (3:2 v/v), utilizando 5 mL de mezcla de disolventes por gramo de biomasa durante 1 h. La fase disolvente se separó por centrifugación, se purificó mediante lavados sucesivos y se evaporó. Los ácidos grasos se identificaron utilizando un estándar certificado (Supelco 37 component FAME Mix), siguiendo a Breuer et al. (2013).

2.3.6.1 Evaluación preliminar de acumulación de astaxantina

El ensayo para la obtención de astaxantina se llevó a cabo en cultivos de *C. vulgaris* por triplicado, utilizando 100% de ARU como medio de cultivo en Erlenmeyers de 2 L. Como control, se realizaron cultivos por triplicado en medio Johnson modificado (Borowitzka, 1988). Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas en la sección 2.3.5 del presente capítulo: inóculo de 10^5 cel mL⁻¹, iluminación continua con luz blanca fría ($108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura de 24 ± 2 °C, aireación y agitación magnética constante a 100 rpm.

Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó la biomasa y se procedió a la extracción de astaxantina mediante un protocolo adaptado de Liu et al. (2011). El proceso se dividió en dos etapas: degradación de clorofilas y extracción de astaxantina. A la biomasa cosechada se le añadieron 10 mL de una solución de NaOH al 5% (m/v) en metanol al 30% (v/v). La mezcla se incubó en baño termostatzado a 45°C durante 5 minutos y se agitó en vórtex por 1 minuto. Este proceso se realizó dos veces. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para descartar el sobrenadante y el pellet se lavó 4 veces con agua destilada, para eliminar cualquier residuo. En la segunda etapa, para la extracción de astaxantina, se le añadieron al pellet 30 mL de acetato de etilo-etanol 1:1 (v/v). La muestra se dejó macerar 24 h en oscuridad. Luego se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 10 minutos y los extractos obtenidos se reservaron. La determinación final de astaxantina la realizó el Grupo de Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (INTEC) mediante espectrofotometría

derivativa de primer orden. Se utilizó como referencia un estándar de astaxantina de *H. pluvialis*, cuya longitud de onda de máxima absorción es 432 nm. La aplicación de la espectrofotometría derivativa de primer orden permitió diferenciar la señal de astaxantina de la del β -caroteno, evitando la superposición de espectros de absorción y, con ello, posibles errores en la determinación (Ni et al., 2005; Liu et al., 2011).

2.3.7 Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas

Para evaluar la inocuidad y el potencial de uso del efluente tratado para riego en actividades agrícolas, se realizó un ensayo de toxicidad aguda con semillas de *L. sativa*. El ensayo se llevó a cabo con las ARU tratadas (ARU-T) proveniente de los cultivos mixotróficos, de los que *C. vulgaris* había removido nutrientes y modificado los niveles de DQO, DBO₅, y bacterias coliformes. Para esto, una vez cosechada la biomasa algal, por centrifugación, para su análisis (sección 2.3.6 del presente capítulo), se utilizó la fracción líquida para el ensayo de toxicidad, en los dos momentos experimentales: tiempo intermedio (T1-M) y tiempo final (T2-M). El protocolo seguido fue una adaptación de los métodos descritos por Greene et al. (1988) y Sobrero & Ronco (2004).

Para cada tiempo de muestreo, se prepararon cinco concentraciones de ARU-T, diluidas en medio APHA (Rice & Bridgewater, 2012): 6,2 %; 12,5 %; 25 %; 50 % y 100 % (v/v). Adicionalmente, se incluyó un control (medio APHA, sin ARU-T), y todos los tratamientos y el control se realizaron por triplicado.

Cada réplica consistió en una placa de Petri con 20 semillas dispuestas sobre papel de filtro, el cual se humedeció con 4 mL de la dilución correspondiente. Las placas se incubaron en oscuridad a 20 ± 2 °C durante 120 h. Los puntos finales evaluados fueron la germinación de las semillas (número de semillas germinadas), la longitud de la radícula (mm) y la longitud del hipocótilo (mm) (Bagur-González et al., 2011). La validez del ensayo se estableció con una germinación superior al 90 % en el control (Castillo Morales, 2004).

Además de las mediciones directas, se calcularon los siguientes índices de fitotoxicidad, basándose en la metodología de Tiquia (2000) (ecuaciones 13, 14 y 15):

- Germinación relativa de las semillas (RSG): establece la germinación relativa en el ambiente estudiado, donde un valor alto, cercano al 100%, se asocia a un ambiente con bajo potencial tóxico (Bolonhesi & Lopes, 2018).

$$RSG(\%) = \frac{SG_s}{SG_c} \times 100 \quad (13)$$

donde: SG_s = media del número de semillas germinadas en cada tratamiento;
 SG_c = media del número de semillas germinadas en el control.

- Crecimiento relativo de la radícula (RRG): permite evaluar el crecimiento radicular de plantas expuestas a diferentes ambientes y, cuando presenta valores inferiores a 80%, puede indicar alteraciones en el metabolismo vegetal provocadas por factores ambientales (Cuervo Lumbaqué et al., 2017).

$$RRG(\%) = \frac{RL_s}{RL_c} \times 100 \quad (14)$$

donde: RL_s = media de la longitud de la radícula en cada tratamiento; RL_c = media de la longitud de la radícula en el control.

- Índice de germinación (GI): integra datos relativos de germinación con datos de crecimiento radicular y se considera un indicador robusto para evaluar el potencial fitotóxico del entorno (Pentreath et al., 2015). Se establece que valores de $GI \geq 80$ indican concentraciones nulas o muy bajas de sustancias fitotóxicas, mientras que valores inferiores a 50 sugieren una alta presencia de estos compuestos (Aguerre & Gavazzo, 2012; Mañas & De las Heras, 2018).

$$GI = \frac{RSG \times RRG}{100} \quad (15)$$

donde: RSG = germinación relativa de las semillas; RRG = crecimiento relativo de la radícula.

2.3.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos y la elaboración de gráficos se realizaron con los softwares SigmaPlot versión 12.0 y OriginPro versión 9. Para la comparación de la acumulación de pigmentos y la composición algal entre cultivos autótrofos (control) y mixotróficos, se evaluó la distribución de los datos. Cuando estos datos siguieron una distribución paramétrica, se utilizó la prueba t de dos colas; en cambio, cuando no cumplieron con los supuestos paramétricos, se aplicó la prueba de Mann-Whitney.

Para las comparaciones que involucraron más de dos grupos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Previamente, se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Las diferencias significativas entre el control y los tratamientos se determinaron con la prueba de comparación múltiple de Dunnett, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para los datos no paramétricos con más de dos grupos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y, posteriormente, las diferencias se identificaron con la prueba *post hoc* de Dunn.

Finalmente, cuando las características de los datos lo permitieron, en particular que el número de variables fuera superior al número de tratamientos, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA). Este procedimiento permitió reducir la

dimensionalidad del conjunto de datos, identificando los componentes principales que explicaban la mayor parte de la varianza y facilitar la interpretación de los resultados.

2.4 Resultados

2.4.1 Crecimiento de *C. vulgaris* en ARU: ensayos preliminares

Evaluación del crecimiento algal

La caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de ARU empleadas como base del ensayo de inhibición del crecimiento algal se presenta en la Tabla 11. Por su parte, la Figura 21 muestra las curvas de crecimiento de *C. vulgaris* para las distintas concentraciones de ARU evaluadas, y la Tabla 12 resume las tasas de crecimiento, DT y I% a las 72 h.

Tabla 11: Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas residuales urbanas (ARU). OD = Oxígeno disuelto; SPC = Conductividad específica; LC = Límite de cuantificación; LD = Límite de detección; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅= Demanda biológica de oxígeno.

Parámetros	ARU
Temperatura	23,4 °C
OD	6,05 mg L ⁻¹
SPC	968 μS cm ⁻¹
pH	7,8
Cadmio	< LC (0,2 mg L ⁻¹ Cd)
Cromo	< LC (0,2 mg L ⁻¹ Cr)
Plomo	< LC (0,25 mg L ⁻¹ Pb)
Arsénico	0,015 mg L ⁻¹ As
Mercurio	< LC (0,002 mg L ⁻¹ Hg)
DQO	195,4 mg L ⁻¹ O ₂
DBO ₅	45,6 mg L ⁻¹ O ₂
Nitrato	7,18 mg L ⁻¹ N
Nitrito	6,42 mg L ⁻¹ N
Amonio	4,5 mg L ⁻¹ N
Fósforo	7,03 mg L ⁻¹ P
Sulfuros	< LD (0,02 mg L ⁻¹)
Bacterias coliformes totales	4,6 x 10 ⁵ NMP 100 mL ⁻¹
Bacterias coliformes fecales	2,4 x 10 ⁴ NMP 100 mL ⁻¹

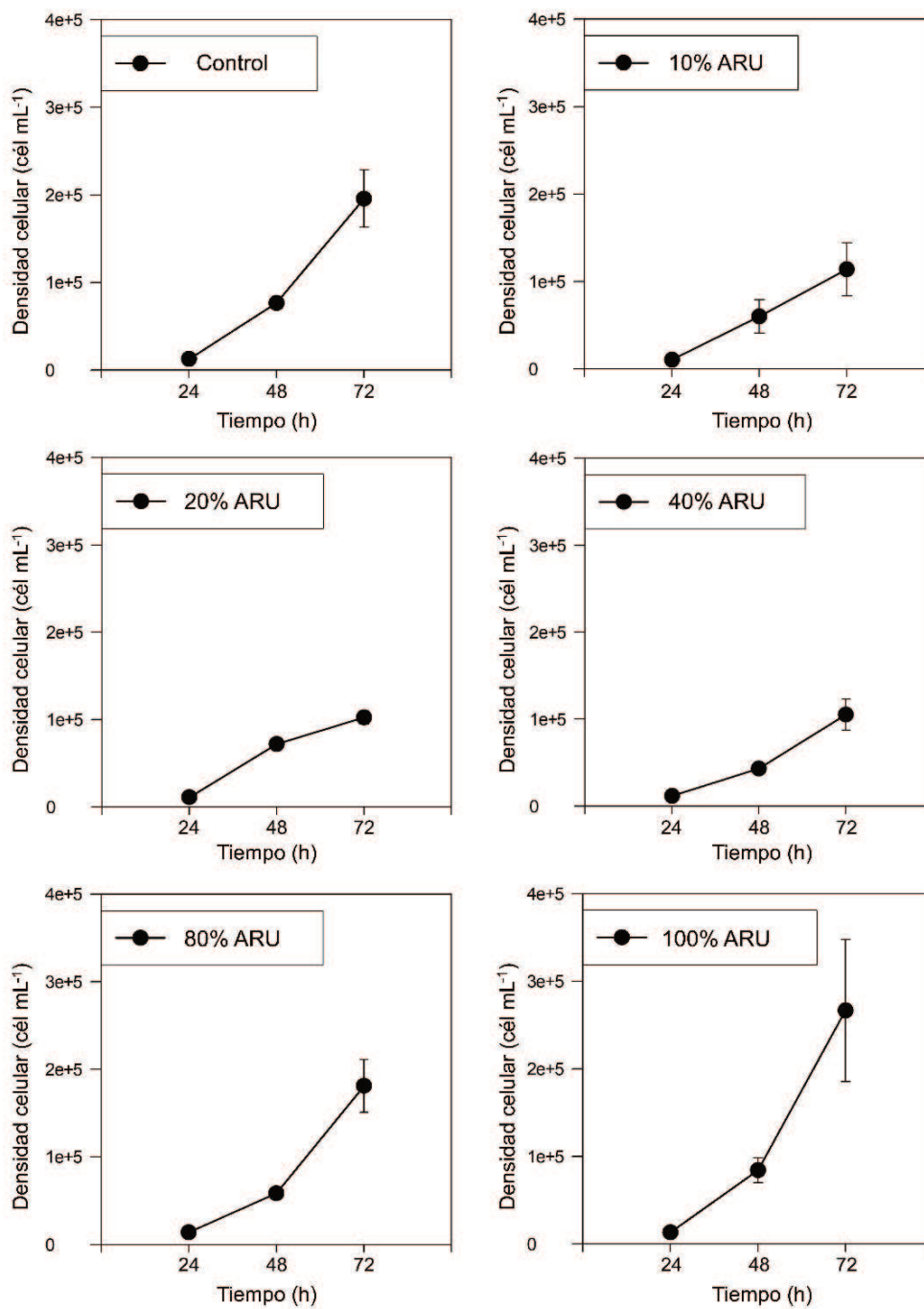


Figura 21: Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el control y en los tratamientos con distintas concentraciones de ARU a las 24 h, 48 h y 72 h en el ensayo de inhibición del crecimiento algal. Barras de error: desviación estándar de n = 3.

Tabla 12: Parámetros de crecimiento *Chlorella vulgaris* a las 72 h de cultivo en el ensayo de inhibición del crecimiento con aguas residuales urbanas (ARU): tasa específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (DT), inhibición del crecimiento (I%), diámetro y volumen celular, densidad celular y biovolumen. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	μ (día ⁻¹)	DT (día)	I%	Célula			
				Diámetro (μm)	Volumen (μm^3)	Densidad ($\times 10^5$ cél mL ⁻¹)	Biovolumen ($\times 10^6$ μm^3 mL ⁻¹)
0 (Control)	0,99 \pm 0,05	0,70 \pm 0,04	-	3,0 \pm 0,2	16 \pm 3	2,0 \pm 0,3	31 \pm 3
10	0,80 \pm 0,09	0,87 \pm 0,09	18,6	2,6 \pm 0,4	12 \pm 5	1,1 \pm 0,3	21 \pm 9
20	0,77 \pm 0,02*	0,89 \pm 0,03	21,5	3,1 \pm 0,4	18 \pm 6	1,0 \pm 0,8	18 \pm 5
40	0,78 \pm 0,05*	0,89 \pm 0,05	20,8	2,8 \pm 0,3	14 \pm 5	1,1 \pm 0,2	15 \pm 5*
80	0,96 \pm 0,06	0,72 \pm 0,06	2,6	3,0 \pm 0,1	17 \pm 2	1,8 \pm 0,3	31 \pm 3
100	1,1 \pm 0,2	0,66 \pm 0,09	0	2,81 \pm 0,06	13,0 \pm 0,6	2,7 \pm 0,8	31 \pm 9

* Diferencias significativas para $p < 0,05$

A las 72 h, la densidad celular de *C. vulgaris* en el cultivo control (sin ARU) aumentó aproximadamente 20 veces respecto a la densidad inicial, lo que permitió confirmar la validez del ensayo. No se observaron diferencias significativas en la densidad celular entre el control y los tratamientos al 10%, 20%, 40%, 80% y 100% de ARU en ninguno de los días evaluados. No obstante, a las 72 h, el análisis de Kruskal-Wallis indicó diferencias entre todos los tratamientos ($H_5 = 12,556$; $p = 0,028$), aunque la prueba *post hoc* de Dunn no detectó diferencias significativas entre el control y ninguno de los tratamientos ($p > 0,05$), lo que sugiere variabilidad interna entre tratamientos, pero no específicamente con relación al control.

En cuanto a la tasa de crecimiento, los tratamientos con 10%, 20% y 40% ARU mostraron valores menores que en el control. El ANOVA detectó diferencias significativas entre tratamientos ($F_{5,12} = 6,577$, $p = 0,004$), y el test *post hoc* de Dunnett confirmó diferencias entre el control y los tratamientos con 20% ($p = 0,037$) y 40% de ARU ($p = 0,043$). La inhibición del crecimiento (I%), mostró valores de 18,6% (10% ARU), 21,5% (20% ARU), 20,8% (40% ARU) y 2,6% (80% ARU) a las 72 h. En contraste, para el 100% de ARU, no se observó inhibición (I% = 0); por el contrario, se evidenció una ligera estimulación del crecimiento (8,1%), acompañada de un DT más breve ($0,66 \pm 0,09$ d) que en el control ($0,70 \pm 0,04$ d).

La Tabla 12 también presenta los parámetros celulares medidos a las 72 h, y la Figura 22 muestra la distribución de diámetros y biovolúmenes celulares. Tanto el diámetro como el volumen celular se mantuvieron relativamente estables entre tratamientos (ANOVA: $F_{5,12} = 1,211$; $p = 0,361$; y ANOVA: $F_{5,12} = 0,86$; $p = 0,535$, respectivamente), con valores mínimos en el 10% de ARU ($2,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ y $12 \pm 5 \mu\text{m}^3$) y máximos en el 20% de ARU ($3,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$ y $18 \pm 6 \mu\text{m}^3$). El biovolumen fue mayor en el control y en los tratamientos con 80% y 100% de ARU: (31 ± 3 ; 31 ± 3 y 31 ± 9) $\times 10^5 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$, respectivamente; tendencia que se asocia a la mayor densidad celular observada en estos tratamientos. El ANOVA reveló diferencias significativas entre tratamientos ($F_{5,12} = 3,953$; $p = 0,024$), y el *post hoc* de Dunnett mostró diferencias entre el biovolumen del control y el del tratamiento con 40 % de ARU ($p = 0,037$).

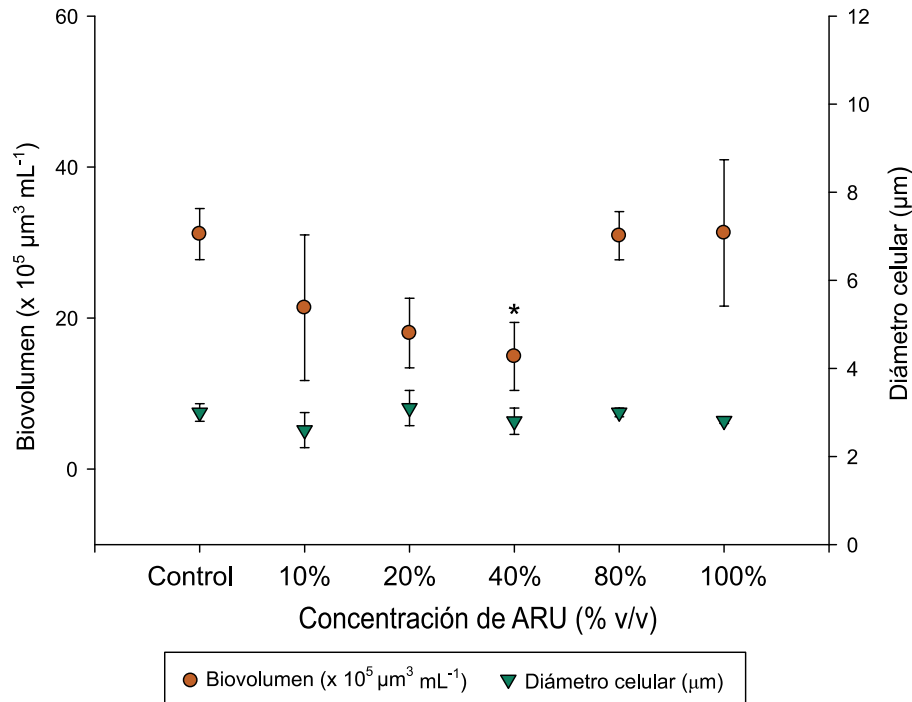


Figura 22: Biovolumen y diámetro celular de *Chlorella vulgaris* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU) al final del ensayo de inhibición del crecimiento algal. Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Diferencias significativas: * $p < 0,05$

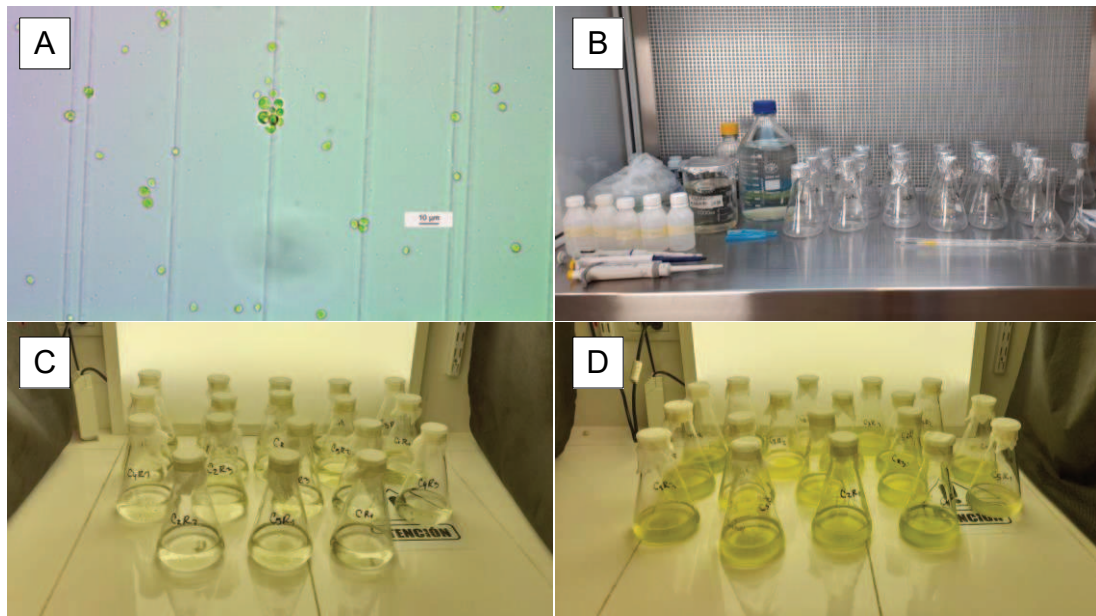


Figura 23: Fotografías tomadas durante los ensayos: inóculo de *Chlorella vulgaris* (Fig. A); preparación de materiales para iniciar el ensayo de inhibición del crecimiento (Fig. B); ensayo de inhibición del crecimiento algal a lo largo del tiempo (Fig. C y D).

Evaluación del estado fisiológico

La Tabla 13 detalla la caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de ARU utilizadas para realizar el ensayo de evaluación del estado fisiológico algal, mientras que las Tablas 14 y 15 presentan los parámetros celulares y fisiológicos medidos al finalizar el mismo. La Figura 24A-D muestra las concentraciones nominales de amonio, nitrato y nitrito (expresadas en $\text{mg L}^{-1} \text{N}$) y de fosfatos (expresadas en $\text{mg L}^{-1} \text{P}$) en los distintos tratamientos y en el control, obtenidas a partir de las diluciones efectuadas del efluente con medio de cultivo Johnson modificado (Borowitzka, 1988).

Tabla 13: Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas residuales urbanas (ARU). OD = Oxígeno disuelto; SPC = Conductividad específica; LC = Límite de cuantificación; LD = Límite de detección; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO_5 = Demanda biológica de oxígeno.

Parámetros	ARU
Temperatura	14,4 °C
OD	6,0 mg L^{-1}
SPC	968 $\mu\text{S cm}^{-1}$
pH	7,9
Cadmio	< LC (0,2 $\text{mg L}^{-1} \text{Cd}$)
Cromo	< LC (0,2 $\text{mg L}^{-1} \text{Cr}$)
Plomo	< LC (0,25 $\text{mg L}^{-1} \text{Pb}$)
Arsénico	0,015 $\text{mg L}^{-1} \text{As}$
Mercurio	< LC (0,002 $\text{mg L}^{-1} \text{Hg}$)
DQO	169 $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$
DBO_5	34,9 $\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$
Nitrato	14,6 $\text{mg L}^{-1} \text{N}$
Nitrito	0,69 $\text{mg L}^{-1} \text{N}$
Amonio	18,8 $\text{mg L}^{-1} \text{N}$
Fósforo	1,5 $\text{mg L}^{-1} \text{P}$
Sulfuros	< LD (0,02 mg L^{-1})
Bacterias coliformes totales	1,1 x 10 ⁵ NMP 100 mL ⁻¹
Bacterias coliformes fecales	4,6 x 10 ⁴ NMP 100 mL ⁻¹

Tabla 14: Parámetros celulares de *Chlorella vulgaris* a las 72 h de cultivo en el ensayo de exposición a las aguas residuales urbanas (ARU): tasa específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (DT), inhibición del crecimiento (I%). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	Densidad algal (cél mL ⁻¹ x 10 ⁵)	μ (día ⁻¹)	DT (día)	I%
0 (Control)	1,9 \pm 0,3	0,98 \pm 0,05	0,71 \pm 0,4	-
10	1,6 \pm 0,3	0,91 \pm 0,07	0,76 \pm 0,06	7,2
20	1,4 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1	0,80 \pm 0,09	11,4
40	1,5 \pm 0,1	0,90 \pm 0,03	0,77 \pm 0,02	8,3
80	2,4 \pm 0,3	1,06 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03	0
100	4,0 \pm 1,0**	1,2 \pm 0,1**	0,57 \pm 0,04*	0

Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

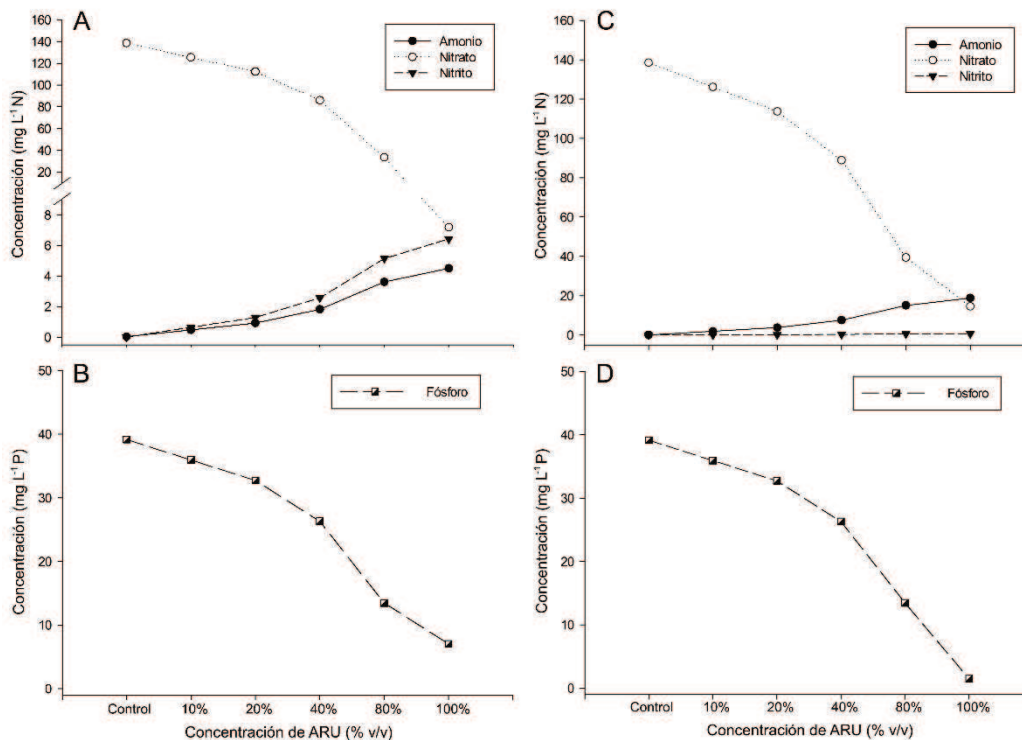


Figura 24: Concentraciones nominales de amonio, nitrato, nitrito, y fósforo en el control y los tratamientos con distintas concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU). Fig. A y B: Ensayo de inhibición del crecimiento algal; Fig. D y C: Ensayo de evaluación del estado fisiológico algal.

Tabla 15: Parámetros fisiológicos de *Chlorella vulgaris* a las 72 h de cultivo en el ensayo de exposición a las aguas residuales urbanas (ARU). Pigmentos e índices fotosintéticos: clorofila-a, clorofila-b, carotenoides, relación de clorofilas (CR) e índice de pigmentos (PI); y marcadores moleculares: catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y malondialdehído (MDA). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	Pigmentos fotosintéticos					Marcadores moleculares			
	Clorofila-a (pg cél ⁻¹)	Clorofila-b (pg cél ⁻¹)	Carotenoides (pg cél ⁻¹)	CR	PI	Proteínas (pg cél ⁻¹)	CAT (μU/pg proteína)	GST (μU/pg proteína)	MDA (pmol cél ⁻¹)
0	4,8 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3	2,0 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	0,43 \pm 0,02	50 \pm 1	5 \pm 2	0,006 \pm 0,002	0,003 \pm 0,001
10	4,7 \pm 0,7	1,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	3,4 \pm 0,2	0,38 \pm 0,02	36 \pm 6	5 \pm 2	0,006 \pm 0,003	0,0010 \pm 0,0006
20	5 \pm 1	1,6 \pm 0,3	0,83 \pm 0,03*	3,24 \pm 0,06	0,16 \pm 0,03	30 \pm 6*	14,7 \pm 0,8***	0,009 \pm 0,002	0,0025 \pm 0,0009
40	4,5 \pm 0,6	1,5 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	0,40 \pm 0,02	48 \pm 8*	2,4 \pm 0,5	0,007 \pm 0,001	0,0007 \pm 0,0005
80	4,1 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	3,41 \pm 0,07	0,42 \pm 0,04	37 \pm 2	9 \pm 2**	0,036 \pm 0,006***	0,004 \pm 0,002
100	1,3 \pm 0,5*	0,48 \pm 0,01*	2,1 \pm 0,4	2,67 \pm 0,01	1,6 \pm 0,3	49 \pm 8	10 \pm 2**	0,022 \pm 0,003***	0,007 \pm 0,003*

Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

La validez del ensayo se confirmó, dado que la densidad celular final en el cultivo control aumentó aproximadamente 19 veces respecto a la densidad inicial. No se detectaron diferencias significativas entre las densidades algales del control y los tratamientos con 10, 20, 40 y 80% de ARU. No obstante, el tratamiento con 100% mostró un incremento significativo respecto al control (ANOVA: $F_{5,12} = 11,896$; $p < 0,001$; Dunnett: $p = 0,001$). Las tasas de crecimiento siguieron el mismo patrón, registrándose diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA: $F_{5,12} = 10,691$; $p < 0,001$), con valores significativamente superiores en 100% de ARU frente al control ($p = 0,005$). El análisis del DT también evidenció diferencias entre tratamientos (ANOVA: $F_{5,12} = 7,675$; $p = 0,002$), registrándose un DT significativamente menor en 100% de ARU ($p = 0,038$), lo que indica un crecimiento más rápido en este medio. Por último, el cálculo del %I reveló efectos contrastantes: los tratamientos con 10, 20 y 40% mostraron inhibición del crecimiento (7,2; 11,4 y 8,3%, respectivamente), aunque sin alcanzar significancia estadística respecto al control. En cambio, las concentraciones de 80% y 100% produjeron una estimulación del crecimiento, con aumentos de 7,5% y 24%, respectivamente.

En conjunto, los patrones de crecimiento de *C. vulgaris* obtenidos en este ensayo guardan coherencia con los registrados en el ensayo previo, evidenciando en ambos casos un efecto estimulante de ARU sobre el crecimiento respecto al control. La magnitud de dicha estimulación fue del 24 % en el presente ensayo, mientras que en el anterior alcanzó el 8,1 %. Entre las principales diferencias observadas en la composición del efluente empleado en cada ensayo, se destacan los valores de DQO y DBO₅, los cuales resultaron entre un 14 y un 24 % superiores en el primer ensayo, además de presentarse variaciones en las concentraciones de nutrientes.

Del análisis de la Figura 24A-D, se observa en ambos ensayos que el nitrato y el fósforo son máximos en el cultivo control, disminuyendo progresivamente a medida que aumenta la proporción de ARU en el medio, mientras que el amonio y el nitrito mostraron el patrón inverso. Por un lado, estas diferencias en la disponibilidad y forma química de los nutrientes constituyen otro aspecto relevante de la caracterización del efluente y podrían, en parte, explicar las respuestas observadas en el crecimiento de *C. vulgaris* bajo las distintas proporciones de ARU evaluadas. Además, el contenido de amonio en el segundo ensayo fue aproximadamente cuatro veces mayor que en el primero, mientras que las concentraciones de fósforo, pese a su variación entre tratamientos y ensayos, no evidenciaron un efecto limitante sobre el crecimiento de *C. vulgaris*.

Posteriormente, se midieron los pigmentos fotosintéticos y los marcadores moleculares. La Figura 25 presenta la acumulación de pigmentos en *C. vulgaris* a las distintas concentraciones de ARU a las 72 h, junto con las tendencias registradas por los índices calculados (valores en Tabla 15). Tanto la clorofila-a como la clorofila-b se redujeron significativamente en el tratamiento con 100% de ARU ($p < 0,05$). Por su parte, los carotenoides alcanzaron valores inferiores al control en los tratamientos entre 10 y 80% de ARU, siendo la disminución significativa únicamente en el 20% de ARU (ANOVA: $F_{5,12} = 9,828$, $p < 0,001$; Dunnett: $p < 0,001$). En contraste, el tratamiento al 100% evidenció un leve incremento, alcanzando valores de picogramos de pigmento por unidad de célula similares a los del control.

La proporción de clorofilas (cl-a/cl-b) se mantuvo estable en el control (3,13) y los tratamientos del 10 al 80% de ARU, cuyos valores oscilaron entre 3,08-3,42, sin un patrón asociado a la concentración de ARU. En el tratamiento al 100%, el CR disminuyó, tomando un valor de 2,67, ligeramente inferior al CR del control (3,13), aunque sin alcanzar una diferencia significativa (Kruskal Wallis: $H_5 = 11,082$; $p = 0,05$; Dunn vs control: $p > 0,05$). Por su parte, el PI también permaneció relativamente constante hasta el 80% de ARU, con valores entre 0,16 y 0,43, sin una tendencia definida, aunque con una disminución en el 20% de ARU (0,16), consistente con la reducción significativa observada en los carotenoides. Finalmente, en el tratamiento al 100%, el PI se incrementó aproximadamente tres veces respecto del control, sin embargo, esta diferencia tampoco fue significativa (Kruskal Wallis: $H_5 = 15,058$; $p = 0,01$; Dunn vs control: $p > 0,05$).

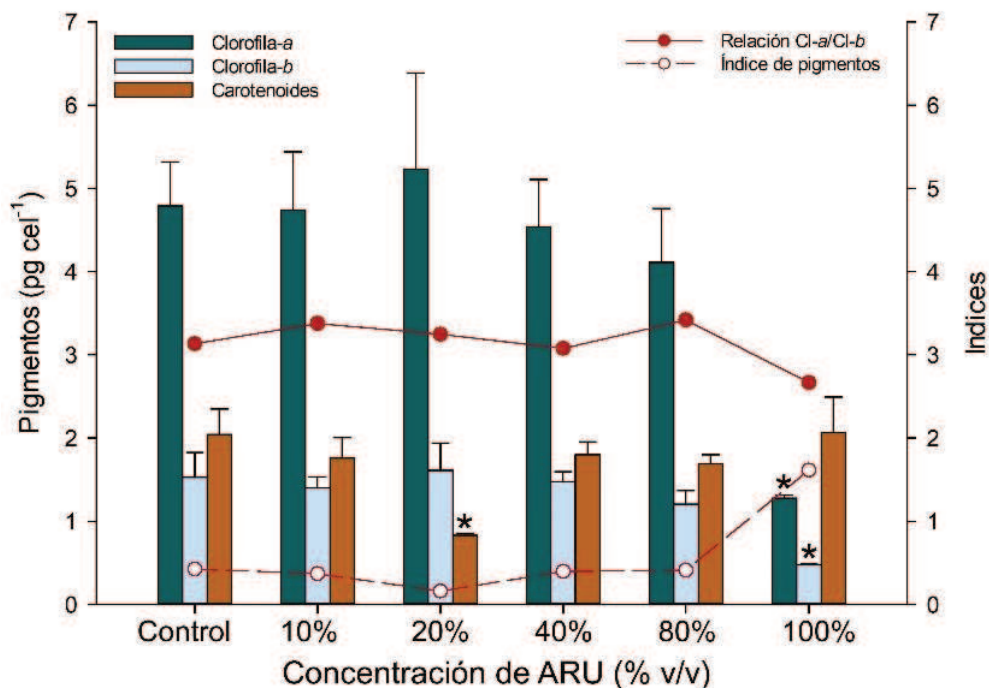


Figura 25: Pigmentos e índices fotosintéticos determinados en *Chlorella vulgaris* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU): clorofila-a, clorofila-b, carotenoides, relación de clorofilas e índice de pigmentos. Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: * $p < 0,05$.

En la Figura 26 se ilustran los niveles de marcadores moleculares medidos en *C. vulgaris* a las 72 h para las distintas concentraciones de ARU. La actividad de CAT mostró un incremento significativo en los tratamientos con 20% de ARU ($p < 0,001$), 80% ($p = 0,007$) y 100% ($p = 0,003$) respecto al control. En el tratamiento al 20%, el bajo valor de CAT puede estar influido por la disminución en el contenido proteico de la microalga con respecto al control ($p < 0,042$). Por su parte, la actividad GST experimentó un aumento relevante en 80% y 100% ARU (ambos $p < 0,001$). Finalmente, el contenido de MDA en *C. vulgaris* en el tratamiento con 100% de ARU fue significativamente mayor al control ($p = 0,019$) denotando la existencia de peroxidación lipídica.

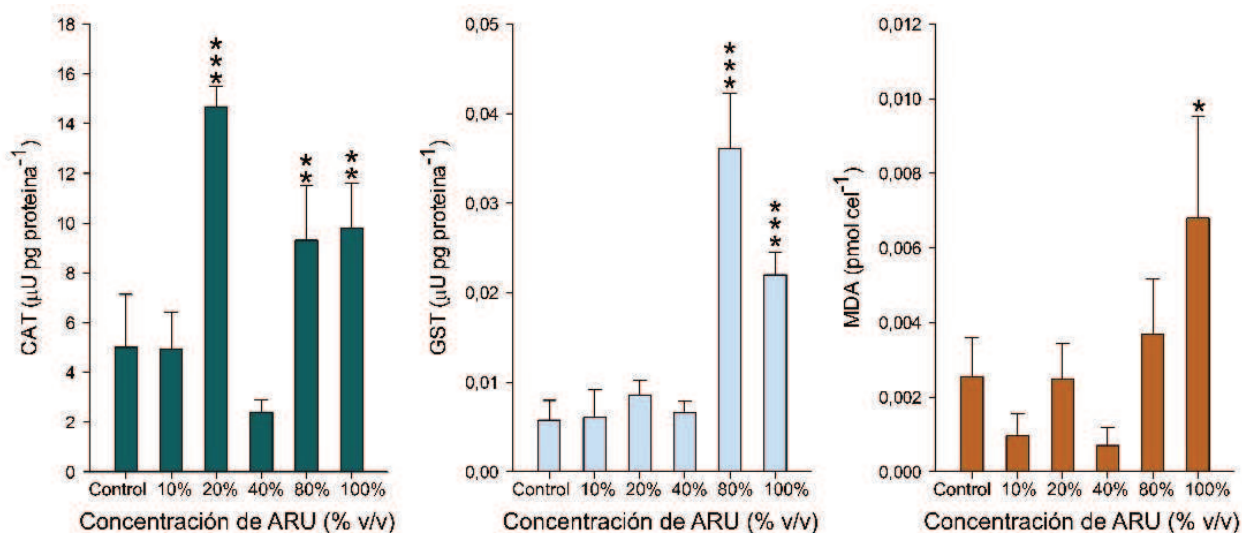


Figura 26: Marcadores moleculares determinados en *Chlorella vulgaris* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU): catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y malondialdehído (MDA). Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por último, se realizó un PCA con el fin de integrar y analizar conjuntamente las variables de crecimiento, pigmentos y biomarcadores de estrés de *C. vulgaris* en los distintos tratamientos. En la Tabla S7 del material suplementario se presentan los valores propios de la matriz de correlación, junto con el porcentaje de varianza explicada y acumulada por cada componente principal, y en la Tabla S8, los vectores propios extraídos: coeficientes de cada variable para los 2 componentes principales. Los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) explicaron en conjunto el 78,94% de la varianza total de los datos (56,84% y 22,09%, respectivamente), lo que justificó el uso de un biplot bidimensional para su interpretación (Figura 27). El PC1 mostró correlaciones positivas con la densidad algal (0,41) y la tasa de crecimiento (0,40), así como con las variables de estrés oxidativo MDA (0,35) y GST (0,25). A su vez, se asoció negativamente con el DT (-0,39), la clorofila-a (-0,36) y la clorofila-b (-0,37). Por su parte, el PC2 explicó una proporción menor de la variabilidad y estuvo dominado por la actividad de CAT (0,61), con menor contribución de la GST (0,28), mostrando a su vez correlaciones negativas con carotenoides (-0,51) y proteínas (-0,50).

El biplot evidenció una diferenciación de tratamientos a lo largo del PC1: las altas concentraciones de ARU (80-100 %) se ubicaron hacia el lado positivo, mientras que el control y las bajas concentraciones (10 y 40 %) se agruparon en el lado negativo. En cambio, el tratamiento al 20 % aunque también se situó en el lado negativo del PC1, se desplazó principalmente a lo largo del PC2, separándose del resto de los tratamientos de manera atípica.

En síntesis, aunque el cultivo en 100% de ARU evidenció ciertos indicadores de estrés, esta condición no limitó el crecimiento de *C. vulgaris*. Luego de analizar conjuntamente los resultados, se seleccionó esta concentración como condición experimental para los ensayos posteriores.

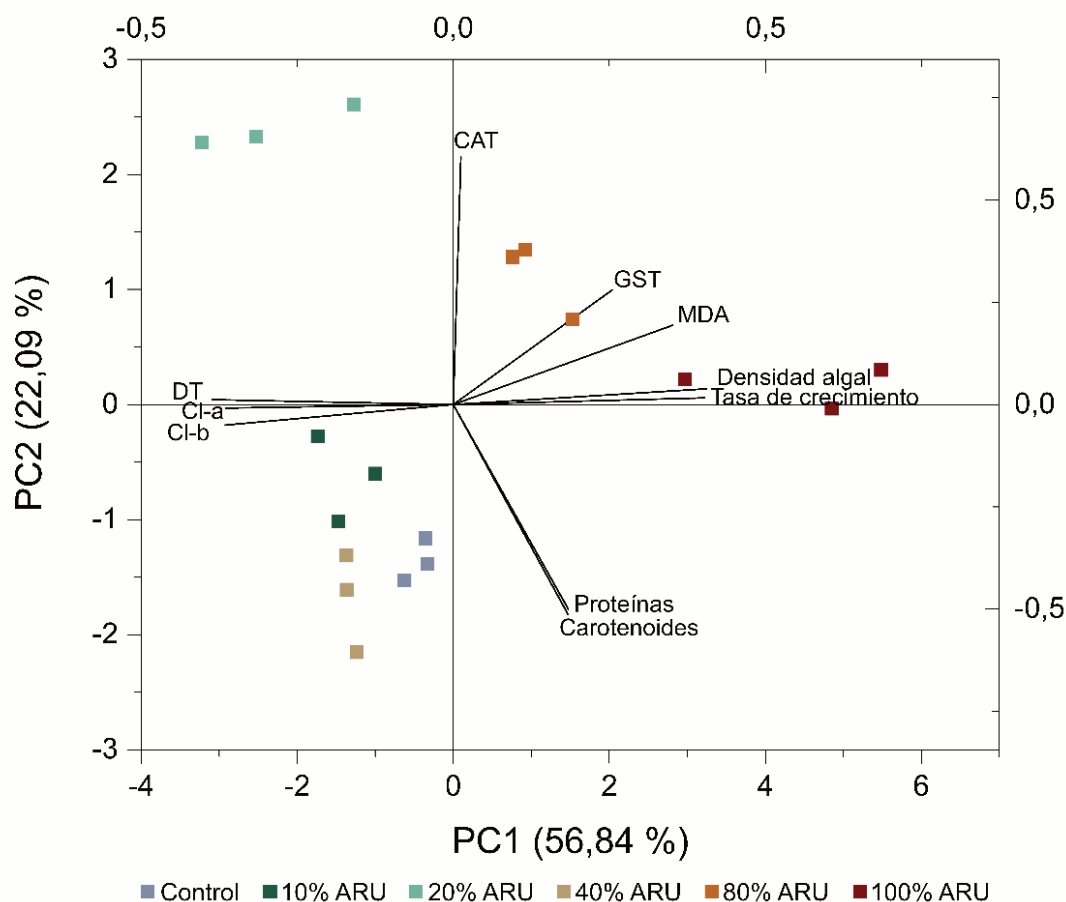


Figura 27: Biplot de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Chlorella vulgaris* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU). DT = tiempo de duplicación; cl-a = clorofila-a; cl-b = clorofila-b; CAT = catalasa; GST = glutatión-S-transferasa; MDA = malondialdehído. Los ejes de la izquierda y abajo corresponden a los puntos de los tratamientos, y los ejes de la derecha y arriba corresponden a los vectores de las variables.

2.4.2 Ensayo de biorremediación de ARU con *C. vulgaris*

La Tabla 11 (sección 2.4.1 del presente capítulo) presenta la caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de ARU empleadas para realizar el ensayo de biorremediación. De acuerdo con la legislación vigente (Tabla 1 del capítulo 1), los parámetros que superaban los límites permisibles en la PTSJ son los siguientes (valor medido > valor límite): DQO ($195,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2 > 125 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$), fósforo ($7,03 \text{ mg}$

$L^{-1} P > 2 \text{ mg } L^{-1} P$), bacterias coliformes totales ($4,6 \times 10^5 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1} > 5 \times 10^3 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) y bacterias coliformes fecales ($2,4 \times 10^4 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1} > 1 \times 10^3 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$). La DBO_5 se encontró cercana al límite de referencia ($45,6 \text{ mg } L^{-1} O_2 < 50 \text{ mg } L^{-1} O_2$). En base a estos valores, se obtuvo un IB de 0,23, el cual corresponde a un efluente de biodegradabilidad media.

Cabe destacar que los niveles de coliformes totales y fecales deberían ajustarse a la normativa tras la etapa de desinfección en la CC.

En cuanto a los metales pesados (Cd, Cr, Pb y Hg), estos no se detectaron en las muestras analizadas, mientras que el arsénico se detectó en niveles por debajo al límite legal ($0,015 \text{ mg } L^{-1} As < 0,5 \text{ mg } L^{-1} As$). No obstante, su presencia se asocia a la geología regional (Blanco et al., 2012).

Respecto de las condiciones del medio, el pH inicial en el sistema con ARU fue 7,8, un valor adecuado para el desarrollo *C. vulgaris*, y al final del ensayo se observó un leve incremento hasta 8,1, consistente con la actividad fotosintética del cultivo.

En los cultivos control y mixotrófico (100% ARU) se realizó el conteo celular diario, a partir del cual se construyeron las curvas de crecimiento (Figura 28A y 28B). En el control, la tasa de crecimiento aumentó desde el inicio del cultivo hasta el día 4 (fase de crecimiento exponencial), cuando alcanzó la tasa máxima de crecimiento diario: $0,82 (\pm 0,04) \text{ día}^{-1}$ (tabla insertada en la Figura 28A). Entre los días 6 y 10 se mantuvo en fase estacionaria y disminuyó a $0,01 (\pm 0,04) \text{ día}^{-1}$ al día 12. Se definieron entonces los siguientes tiempos de muestreo para los análisis posteriores: el día 4 se definió como T1-C y el día 12 como T2-C. La biomasa obtenida en cada punto temporal fue $1,1 (\pm 0,2) \text{ g } L^{-1}$ en T1-C y $1,9 (\pm 0,2) \text{ g } L^{-1}$ en T2-C. A partir de los datos obtenidos del ensayo control, se determinaron los siguientes tiempos de muestreo para el cultivo mixotrófico: el día 4 se definió como T1-M y el día 8 como T2-M. Las tasas de crecimiento diario se presentan en la tabla insertada en la Figura 28B. La biomasa obtenida en cada tiempo fue $0,29 (\pm 0,02) \text{ g } L^{-1}$ en T1-M y $0,4 (\pm 0,1) \text{ g } L^{-1}$ en T2-M.

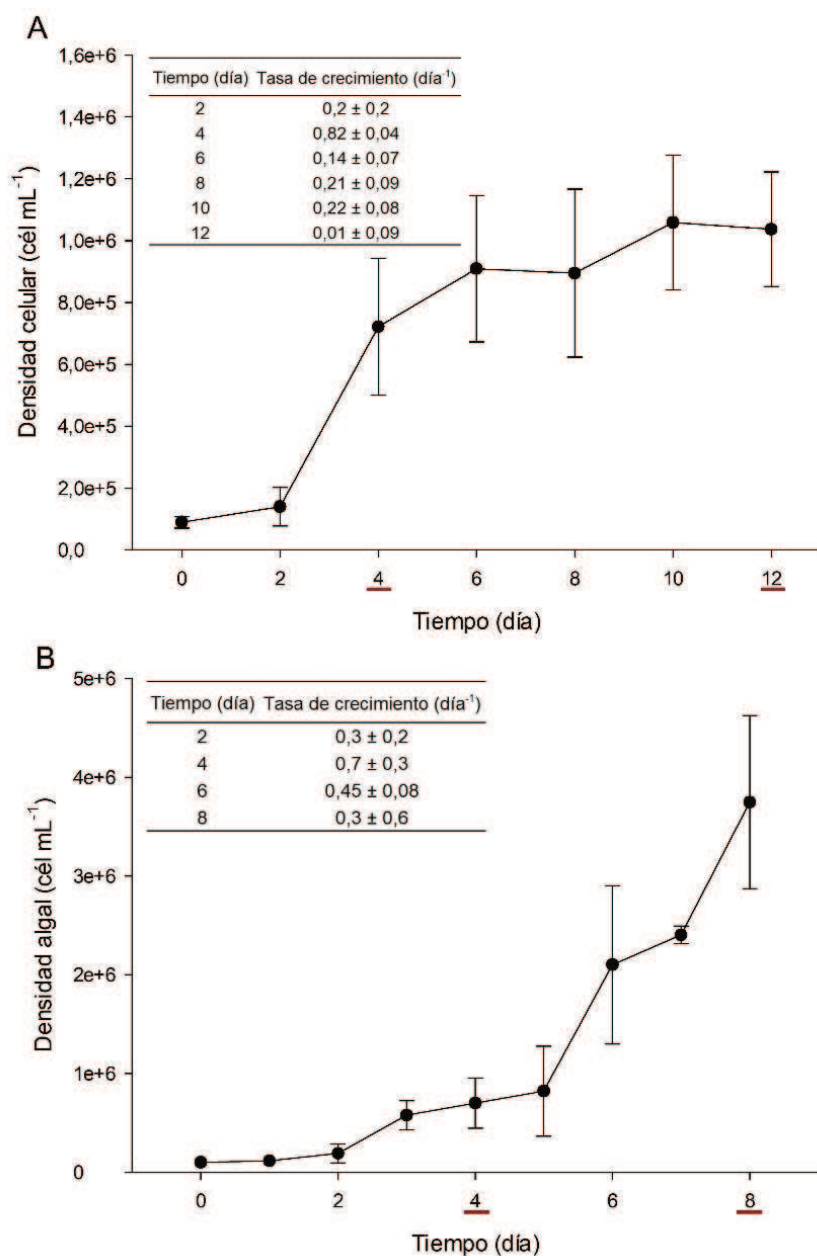


Figura 28: Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cultivo control (Fig. A) y en cultivo mixotrófico en 100% de aguas residuales urbanas (ARU) (Fig. B). Subrayados en rojo: tiempos de muestreo intermedios (T1) y finales (T2). Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Tablas insertadas: Tasas de crecimiento de *C. vulgaris* en cada cultivo; expresadas como media \pm desviación estándar.

Los contenidos de pigmentos fotosintéticos de ambos cultivos se determinaron en los dos momentos previamente definidos, T1 y T2, y se presentan en la Figura 29. En la tabla insertada se exhiben los valores medidos y los respectivos índices calculados. En el tiempo 1 no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los pigmentos analizados entre las microalgas cultivadas en el medio control y las cultivadas en el medio mixotrófico. El análisis estadístico arrojó los siguientes valores de significancia:

clorofila-a, $p = 0,418$; clorofila-b, $p = 0,705$; y carotenoides, $p = 0,056$. Cabe señalar que, en el caso de los carotenoides, el valor de p cercano al umbral de significancia sugiere una tendencia, lo cual resulta apreciable en la representación gráfica, donde se observa una reducción del contenido de carotenoides por célula en las algas expuestas al 100% de ARU. En contraste, en el tiempo 2, se registraron diferencias significativas en todos los pigmentos: clorofila-a, $p < 0,001$; clorofila-b, $p = 0,002$; y carotenoides, $p = 0,006$, siendo en todos los casos los contenidos de pigmento por célula mayores en el control. En cuanto a los índices calculados, el CR se mantuvo similar entre ambos cultivos en los dos tiempos ($p = 0,475$ en T1; $p = 0,548$ en T2). Por su parte, aunque el PI no mostró diferencias significativas ($p = 0,100$ en ambos tiempos), en los cultivos con ARU se observó una disminución de aproximadamente tres veces respecto al control en T1 y de dos veces en T2.

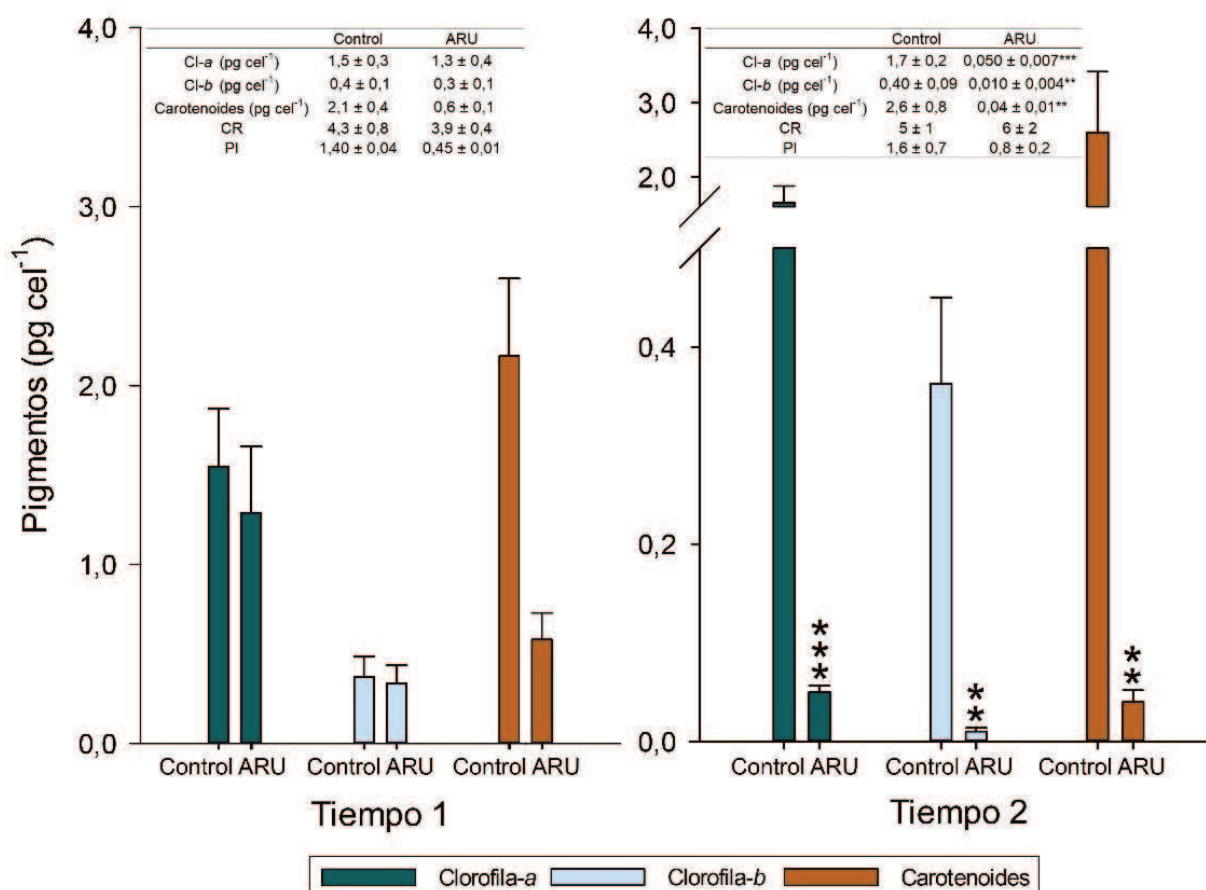


Figura 29: Pigmentos fotosintéticos medidos en *Chlorella vulgaris* en cultivos control y mixotrófico en 100% de aguas residuales urbanas (ARU): clorofila-a, clorofila-b y carotenoides; en dos puntos temporales. CR = Relación cl-a/cl-b; PI = Índice de pigmentos. Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Tablas insertadas: Valores de pigmentos medidos en *C. vulgaris* en cada punto temporal, expresados como media \pm desviación estándar. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Eficiencia de remoción de compuestos

La Tabla 16 presenta los parámetros de ARU medidos en el cultivo mixotrófico en T0, T1-M y T2-M, junto con sus eficiencias de remoción (%). En T1-M, se logró una remoción de nutrientes (nitrito, nitro, amonio y fósforo) del 97,5 al 99,8 %. Los valores de DQO y DBO₅ disminuyeron un 39,8 % y un 73,2 %, respectivamente; y la remoción de coliformes totales y fecales superó el 99 %. Sin embargo, en T2-M la DQO y DBO₅ mostraron incrementos relativos del 18% y 53%, respectivamente, respecto al T0. Los compuestos de nitrógeno no mostraron variación, mientras que el fósforo continuó disminuyendo, al igual que las bacterias coliformes fecales. Por último, las bacterias coliformes totales también presentaron un leve aumento, pero mantuvieron una eficiencia de remoción global del 99 %. Estos resultados indican que un tiempo de cultivo de 4 días con *C. vulgaris* fue suficiente para remover la mayor parte de nutrientes y bacterias coliformes, así como para mejorar los niveles de DQO y la DBO₅. Además, cabe destacar que los parámetros que inicialmente excedían los límites establecidos por la normativa (DQO, fósforo y bacterias) alcanzaron en T1-M los valores normados.

Tabla 16: Parámetros medidos en aguas residuales urbanas (ARU) durante el ensayo de biorremediación con *Chlorella vulgaris*: al inicio (T0) y en los puntos temporales T1-M (día 4) y T2-M (día 8). Los nutrientes y las bacterias coliformes en T1-M y T2-M se expresan como media \pm desviación estándar (n = 3). DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; LD = Límite de detección.

Parámetros de ARU	T0	T1-M		T2-M	
		Medición	Remoción (%)	Medición	Remoción (%)
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	195,4	117,7	39,8	230,7	0
DBO ₅ (mg L ⁻¹ O ₂)	45,6	12,2	73,2	69,9	0
Nitrato (mg L ⁻¹ N)	7,18	< LD (0,018)	99,8	< LD (0,018)	99,8
Nitrito (mg L ⁻¹ N)	6,42	< LD (0,027)	99,6	< LD (0,027)	99,6
Amonio (mg L ⁻¹ N)	4,50	< LD (0,024)	99,6	< LD (0,024)	99,5
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	7,03	0,18 \pm 0,03	97,5	0,013 \pm 0,008	99,8
Bacterias coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	4,6 x 10 ⁵	53 \pm 11	99,9	500 \pm 800	99,9
Bacterias coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	2,4 x 10 ⁴	40,5 \pm 0,6	99,8	< 30	99,9

2.4.3 Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de *C. vulgaris*

La concentración de los metabolitos analizados en los cultivos control y mixotrófico, en T1 y T2, se presenta en la Figura 30. En la Figura 31 se muestra, además, la composición del PAG de *C. vulgaris* en ambos cultivos y momentos de muestreo.

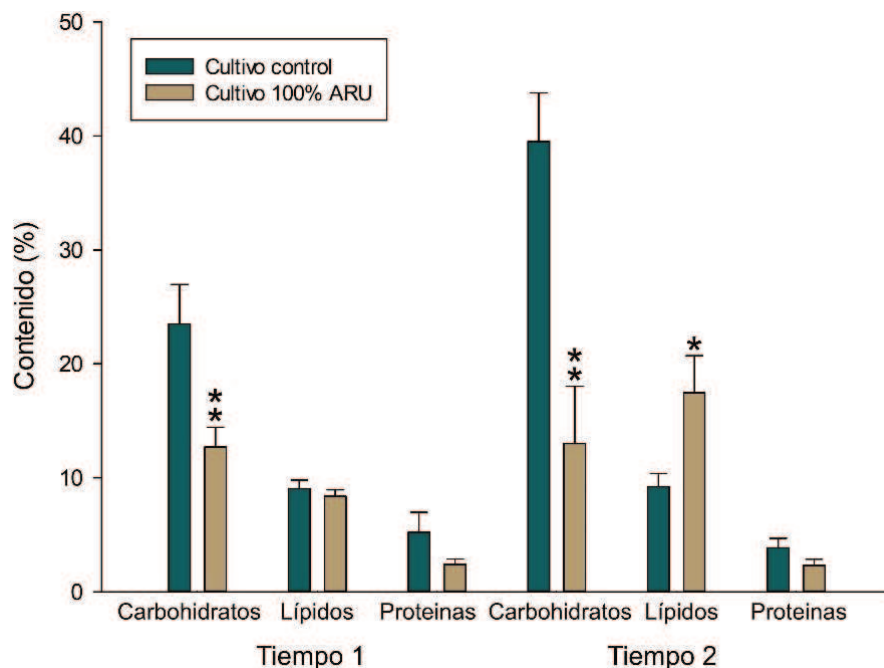


Figura 30: Contenido de metabolitos (%) en *Chlorella vulgaris* en cultivos control y mixotrófico en 100% de aguas residuales urbanas (ARU): carbohidratos, lípidos y proteínas; en dos puntos temporales. Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01.

En T1, los metabolitos se registraron en mayores proporciones en el cultivo control: 23 (±3) % de carbohidratos; 9,1 (±0,7) % de lípidos y 5 (±2) % de proteínas. En T2, los carbohidratos y las proteínas continuaron siendo superiores en el control (40 ± 4% y 3,9 ± 0,8%, respectivamente), mientras que en condiciones mixotróficas la microalga acumuló 17 (±3) % de lípidos, valor casi dos veces mayor al alcanzado en el control (9 ±1 %).

Los análisis estadísticos confirmaron que las concentraciones de carbohidratos fueron significativamente mayores en el control en ambos tiempos: t(4) = 4,831, p = 0,008 en T1; y t(4) = 6,969, p = 0,002 en T2. En el caso de los lípidos, en T2 se observó una acumulación significativamente mayor en el cultivo mixotrófico respecto al control (t(4) = -4,111, p = 0,015), mientras que en T1 no se detectaron diferencias significativas (prueba U de Mann-Whitney: U = 2,000, p = 0,400). El contenido proteico no mostró

diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los tiempos: $t(4) = 2,725$, $p = 0,053$ (T1) y $t(4) = 2,691$, $p = 0,055$ al T2.

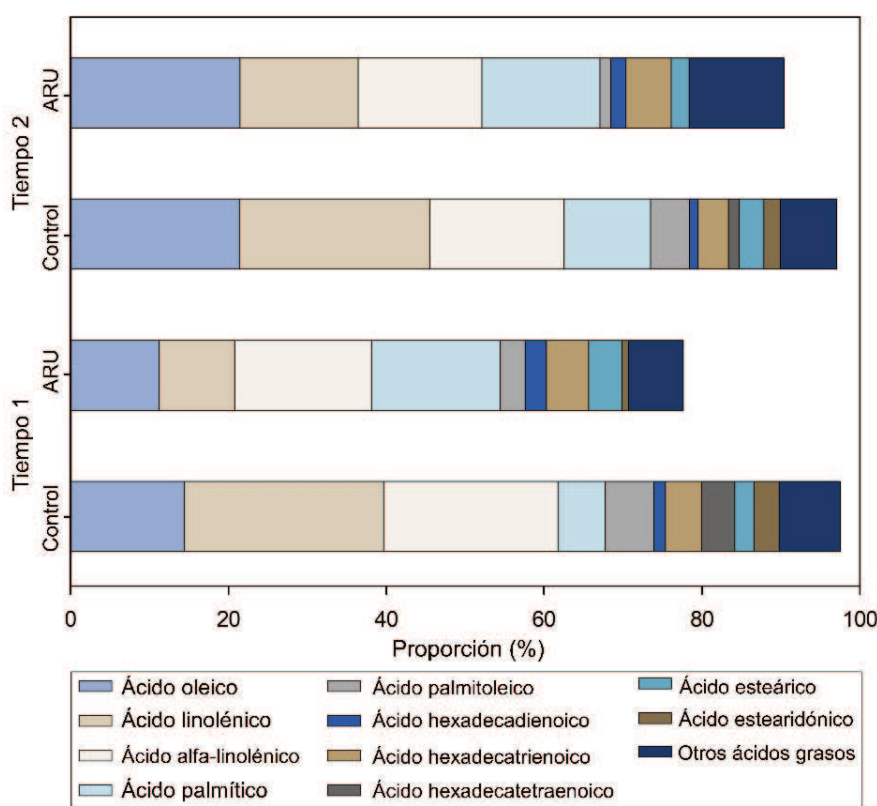


Figura 31: Perfiles de ácidos grasos de *Chlorella vulgaris* en cultivos control y mixotrófico en 100% de aguas residuales urbanas (ARU), en dos puntos temporales. Otros ácidos grasos se distribuyeron en pequeñas proporciones de: margárico, gamma-linolénico, araquídico, gadoleico, dihomo- γ -linolénico, araquidónico y behénico, y otros ácidos de menos de 16 carbonos.

En relación con la composición de ácidos grasos, se identificaron más de 17 especies en la biomasa de *C. vulgaris* del cultivo control. Las proporciones de AGS, monoinsaturados (AGMI) y AGPI fueron: 9,9 %, 21,1 % y 62,2 % (T1-C); 15,2%, 26,8% y 51,6% (T2-C). La mayoría correspondió a ácidos con 16 y 18 átomos de carbono. Los principales fueron el oleico (18:1), el linoleico (18:2) y el alfa-linolénico (18:3), con proporciones respectivas de: 14,7%, 25,2% y 22,1% (T1-C); 21,7%, 24,1% y 17% (T2-C). Los ácidos palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1) representaron el 6% y el 6,2% (T1-C), el 11% y el 4,9% (T2-C). En menores proporciones se detectaron los ácidos hexadecadienoico (16:2), hexadecatrienoico (16:3) y hexadecatetraenoico (16:4): 1,5%, 4,6% y 4,1% (T1-C); 1,1%, 3,8% y 1,4% (T2-C), respectivamente; así como los ácidos esteárico (18:0) y estearidónico (18:4): 2,5% y 3,1% (T1-C); 3,1% y 2,1% (T2-C). Los ácidos grasos restantes se detectaron en bajas proporciones (0,2–1,3 %) e incluyeron

los ácidos margárico (17:0), gamma-linolénico (18:3), araquídico (20:0), gadoleico (20:1), dihomo- γ -linolénico (20:3), araquidónico (20:4) y behénico (22:0), además de otros ácidos menos de 16 carbonos.

Por su parte, en los cultivos mixotróficos se identificaron más de 14 ácidos grasos, también dominados por especies de 16 y 18 átomos de carbono. Las proporciones de AGS, AGMI y AGPI en cada tiempo fueron: 21,1 %, 15,5 % y 37,1 % (T1-M); 17,5 %, 23,6 % y 38,3 % (T2-M). Los AGS fueron aproximadamente el doble en T1-M respecto al control, pero en T2 alcanzaron valores similares entre tratamientos (15,2 % en T2-C y 17,5 % en T2-M). Los AGMI fueron menores en condiciones mixotróficas, pero aumentaron en T2-M, sin superar los valores del control (26,8 % en T2-C y 23,6 % en T2-M). Los AGPI resultaron inferiores en el cultivo mixotrófico, con valores cercanos a la mitad de los observados en el control en ambos tiempos.

Los ácidos oleico (18:1), linoleico (18:2) y alfa-linolénico (18:3) fueron también los principales en el cultivo mixotrófico, con proporciones de 11,5 %, 9,6 % y 17,3 % (T1-M) y 21,7 %, 15 % y 15,7 % (T2-M), respectivamente. Los ácidos palmítico (16:0) y palmitoleico (16:1) representaron el 16,3 % y el 3,2 % (T1-M), y el 15 % y el 1,4 % (T2-M). Asimismo, se identificaron en bajas proporciones los ácidos hexadecadienoico (16:2), hexadecatrienoico (16:3) y esteárico (18:0): 2,7 %, 5,3 % y 4,3 % (T1-M); 1,9 %, 5,7 % y 2,2 % (T2-M), respectivamente. El resto de los ácidos grasos fluctuó entre 0,3 % y el 0,8 %, incluyendo los ácidos gamma-linolénico (18:3), estearidónico (18:4), araquídico (20:0), gadoleico (20:1) y dihomo- γ -linolénico (20:3), además de otros con menos de 16 carbonos.

2.4.3.1 Evaluación preliminar de acumulación de astaxantina

Los extractos obtenidos de los cultivos de *C. vulgaris* se analizaron mediante espectrofotometría. En la Figura 32 se presentan los perfiles de absorción (Figura 32A) y de las derivadas primeras de los espectros (Figura 32B), correspondientes a las réplicas del cultivo control y a una solución estándar de astaxantina (6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). En la Figura 32B se observa que el estándar exhibe una señal positiva definida en 432 nm, indicada con una flecha roja. Las muestras también muestran cierta respuesta en esa longitud de onda; sin embargo, la morfología de sus espectros de absorción (Figura 32A) sugiere que no corresponde a astaxantina. Las muestras exhibieron un máximo de absorción en 445 nm, acompañado por un hombro en ~ 421 - 423 nm y un pico secundario en ~ 471 - 473 nm (los tres indicados con flechas color naranja) (Figura 32A). Este patrón coincide con el de otro carotenoide, la luteína, cuyo espectro de absorción presenta máximos en 421, 445 y 473 nm. Su morfología puede observarse en la Figura S3 (Material suplementario), donde se representa junto con extractos de muestras

alimenticias (Xavier et al., 2012). De este modo, se infiere que las microalgas cultivadas en el control podrían haber acumulado luteína.

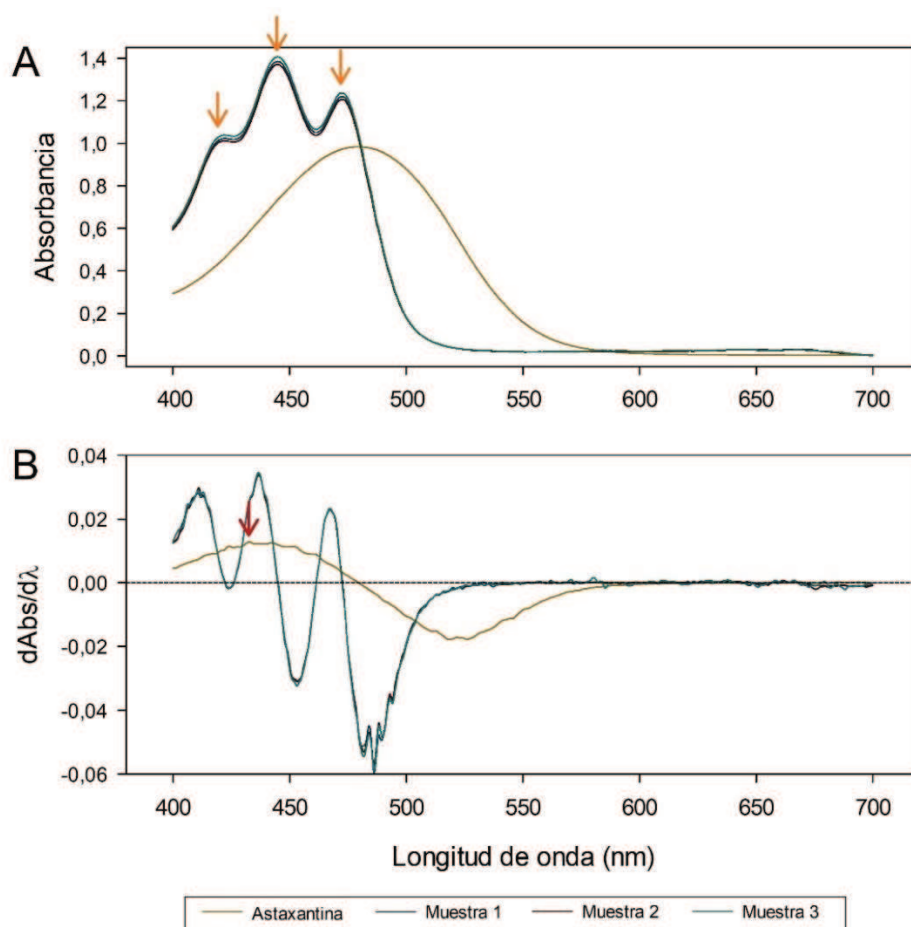


Figura 32: Perfiles de absorción (Fig. A) y de la derivada primera del espectro (Fig. B) del estándar de astaxantina ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) y de las 3 muestras de extractos de *Chlorella vulgaris*, cosechadas del cultivo control. La flecha roja señala la respuesta positiva del estándar en 432 nm.

Las Figuras 33A y 33B muestran los perfiles de absorción y de las derivadas primeras de los espectros de los extractos obtenidos del cultivo con ARU, junto con la solución estándar de astaxantina ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$). El análisis espectral de las muestras reveló un perfil característico de clorofilas y carotenoides, pero sin evidencia de astaxantina. En los espectros de orden cero (Figura 33A) se observaron máximos de absorción en la región azul (~ 430 nm) y roja (~ 660 - 675 nm) (indicados con flechas verdes), atribuibles a clorofilas (Liu et al., 2020; Schenider et al., 2020), lo que indica la presencia residual de este pigmento tras el proceso de extracción. Asimismo, se registraron hombros anchos entre 450 y 480 nm (indicados con flechas color naranja), característicos de carotenoides como el β -caroteno (Schierle et al., 2001; Liu et al., 2011; Xi et al., 2021).

En los espectros de la primera derivada (Figura 33B), las señales de las muestras difirieron del perfil del estándar de astaxantina, el cual presenta una señal positiva en 432 nm, utilizada como parámetro selectivo para su cuantificación (Liu et al., 2011). En contraste, las derivadas de las muestras exhibieron valores cercanos a cero o negativos en dicha longitud de onda.

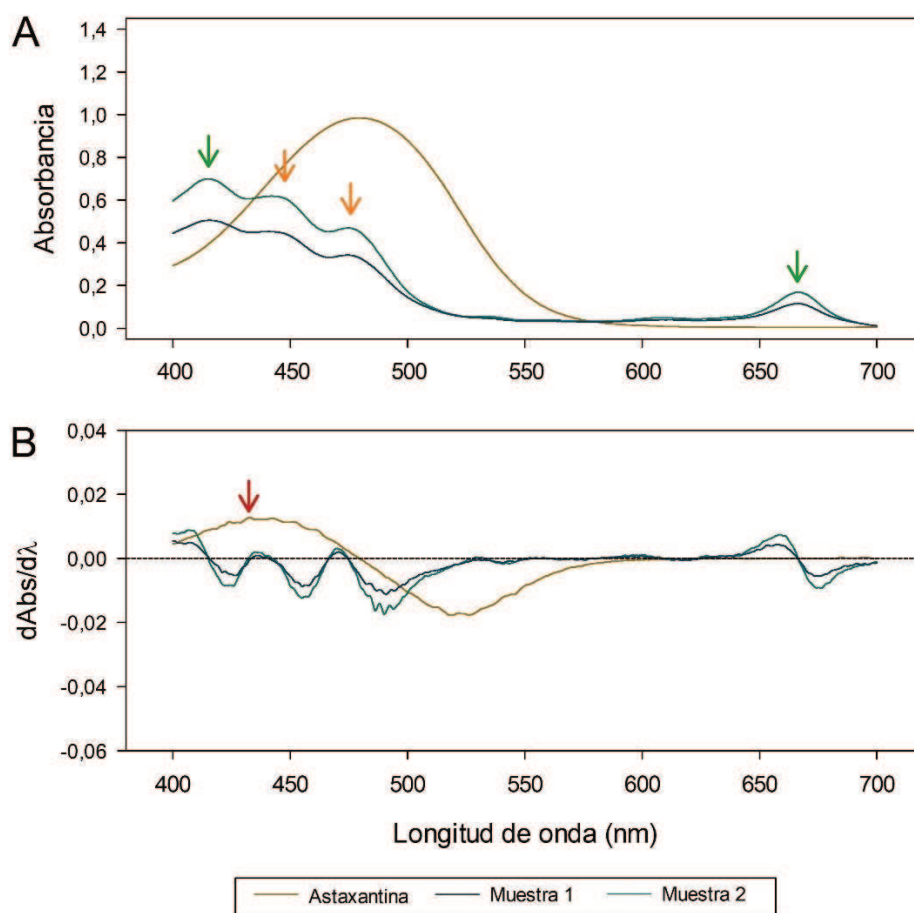


Figura 33: Perfiles de absorción (Fig. A) y de la derivada primera del espectro (Fig. B) del estándar de astaxantina y de las 2 muestras de extractos de *Chlorella vulgaris*, cosechadas del cultivo con aguas residuales urbanas (ARU). La flecha roja señala la respuesta positiva del estándar en 432 nm.

2.4.4 Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas

La germinación de las semillas en el control superó el umbral establecido para la validez del ensayo, y no mostró diferencias significativas respecto de los tratamientos evaluados (para T1: $F_{5,12} = 1,010$, $p = 0,453$; para T2: $F_{5,12} = 0,467$, $p=0,794$) (Fig. 34A y B).

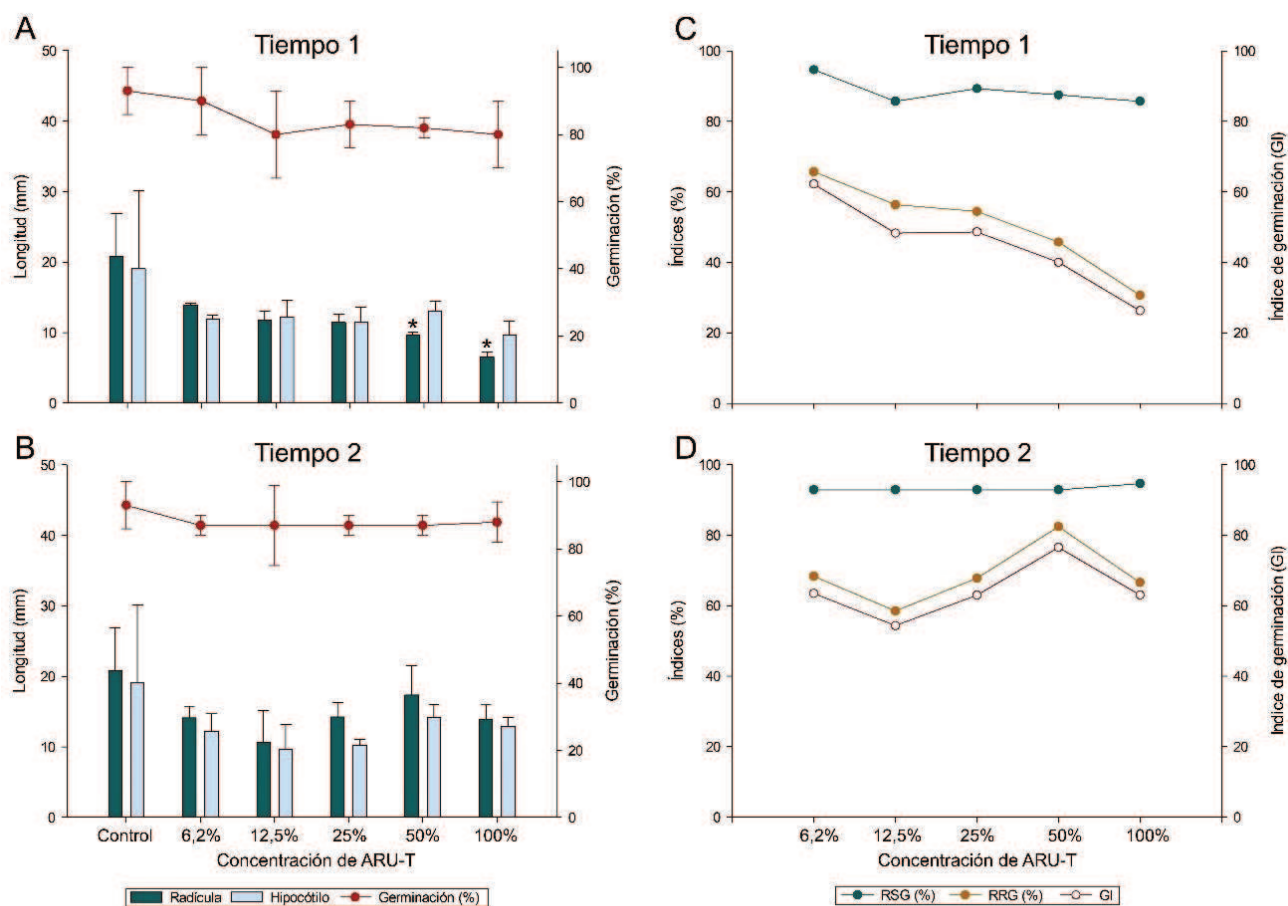


Figura 34: Longitudes de radícula e hipocótilo y germinación de semillas (Fig. A y B) e índices de fitotoxicidad (Fig. C y D) del bioensayo de toxicidad aguda de *Lactuca sativa*, realizado con aguas residuales tratadas (ARU-T) proveniente del tiempo 1 y del tiempo 2 del ensayo de biorremediación. Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Diferencias significativas: * $p < 0,05$. RSG: Germinación relativa de las semillas (%); RRG: Crecimiento relativo de la radícula (%); GI: índice de germinación.

En el tiempo 1, la longitud de la radícula presentó variaciones significativas entre tratamientos ($H_5 = 16,158$, $p = 0,006$). El análisis *post hoc* reveló diferencias entre el control y los tratamientos al 50 y 100% de ARU-T ($p < 0,05$). En contraste, la longitud de hipocótilos no evidenció diferencias entre los tratamientos ($H_5 = 7,175$, $p = 0,208$) (Fig. 34A).

En el tiempo 2, tanto la longitud de la radícula como la del hipocótilo no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (radícula: $F_{5,12} = 2,539$, $p = 0,086$; hipocótilo: $H_5 = 9,515$, $p = 0,090$).

En cuanto a los índices de fitotoxicidad calculados (RSG, RRG y GI), se observó un patrón: los tratamientos con ARU-T correspondiente a T2, así como las concentraciones

más bajas de T1, presentaron los valores más elevados, en tanto que las concentraciones más altas de T1 registraron valores más bajos (Fig. 34C y D).

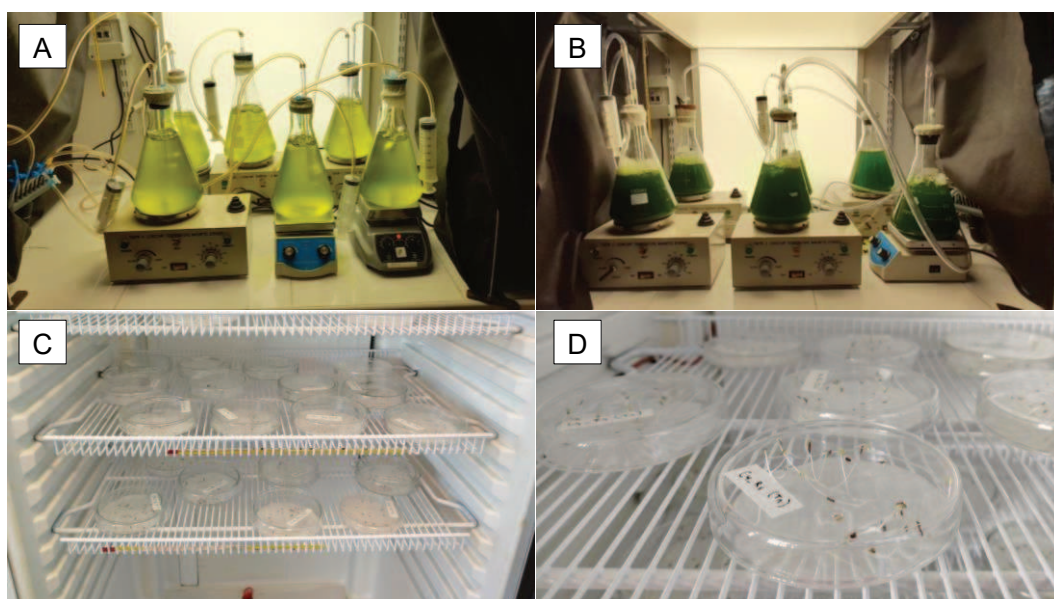


Figura 35: Fotografías tomadas durante los ensayos: ensayo de biorremediación con *Chlorella vulgaris* (Fig. A); ensayo de obtención y análisis de compuestos de interés biotecnológico (Fig. B); bioensayo de fitotoxicidad al inicio (Fig. C) y al final del período experimental (Fig. D).

2.5 Discusión

2.5.1 Crecimiento de *C. vulgaris* en ARU: ensayos preliminares

Evaluación del crecimiento algal

Se realizaron dos ensayos preliminares con concentraciones crecientes de ARU (10-100 %). En ambos, los patrones de crecimiento de *C. vulgaris* evidenciaron un efecto estimulante de ARU sin diluir (100 %). A diferencia del medio control (Borowitzka, 1988), las ARU aportaron una carga orgánica característica de los efluentes domésticos, constituyendo una fuente adicional de carbono para las microalgas. Este carbono puede ser incorporado directamente mediante metabolismo heterotrófico o transformado en dióxido de carbono por procesos de respiración y descomposición microbiana, quedando disponible para la fotosíntesis (D'Imporzano et al., 2017). La fijación simultánea de carbono inorgánico a través de la fotosíntesis y la descomposición de la fuente de carbono orgánico da como resultado un mayor crecimiento celular y un tiempo de generación más corto (Grubišić et al., 2024). Tal flexibilidad responde a la condición mixotrófica de *C. vulgaris*, capaz de combinar fotosíntesis y asimilación heterotrófica,

reduciendo la dependencia exclusiva de la luz y favoreciendo el crecimiento en ambientes ricos en materia orgánica. Además, la interacción con comunidades bacterianas cierra un ciclo en que el oxígeno producido por las microalgas favorece la degradación aeróbica de la materia orgánica, cuyos nutrientes y dióxido de carbono liberados son reutilizados por las algas (Kadir et al., 2018; Pacheco et al., 2021).

La magnitud de la estimulación del crecimiento algal difirió entre los dos ensayos preliminares: en el primero, el crecimiento se incrementó 8,1 %, mientras que, en el segundo, 24 %. Esta diferencia podría atribuirse a variaciones en la composición del efluente. En particular, los valores más altos de DQO y DBO₅ en el primer ensayo reflejan una mayor carga orgánica que podría haber limitado parcialmente el crecimiento. Si bien la materia orgánica constituye un recurso nutritivo, su exceso puede inducir efectos inhibitorios, asociados tanto a la competencia bacteriana como a la acumulación de compuestos recalcitrantes o tóxicos (Liu et al., 2011; Yoo et al., 2014). En este sentido, Gupta et al. (2017) reportaron que *Chlorella pyrenoidosa* redujo su crecimiento y su eficiencia de remoción de carbono en medios con elevada DQO, evidenciando que, concentraciones excesivas comprometieron su metabolismo.

El análisis de nutrientes reveló que, aunque el nitrógeno inorgánico total fue mayor en el control, el amonio y nitrito fueron máximos en el tratamiento con ARU al 100%, y disminuyeron progresivamente con la reducción de la proporción de ARU, en tanto que el nitrato y el fosfato presentaron tendencias inversas. Entre ensayos, la concentración de amonio fue cuatro veces mayor en el segundo, lo que sugiere una relación directa con el mayor crecimiento registrado. Las microalgas muestran una preferencia jerárquica en uso de fuentes nitrogenadas: amonio > nitrito > nitrato (Renuka et al., 2013). Esto se debe a que el amonio se incorpora directamente a los aminoácidos mediante condensación con glutamato, mientras que el nitrito y nitrato requieren reducción enzimática previa (Cai et al., 2013).

Respecto al fósforo inorgánico, su análisis puede explicarse mediante modelos de cuota celular, que sostienen que el crecimiento depende de la cuota intracelular de fósforo y no necesariamente de la concentración externa, siempre que supere un umbral mínimo. De este modo, aunque el fósforo inicial en ARU fuera más bajo, se hipotetiza que fue suficiente para cubrir las necesidades celulares mediante almacenamiento y “absorción de lujo”. El modelo de co-limitación, desarrollado por Molina-Miras et al. (2022), complementa esta visión al señalar que una elevada disponibilidad de nitrógeno puede estimular el crecimiento microalgal e incrementar simultáneamente la demanda de fósforo. Así, el fósforo, aunque presente en menor concentración inicial, no habría sido limitante, dado que superó el umbral mínimo requerido para sostener el crecimiento favorecido por la abundancia de nitrógeno. Cabe señalar, además, que el fósforo medido

corresponde únicamente a la fracción inorgánica soluble (ortofosfato), mientras que en efluentes urbanos una parte se puede hallar en formas orgánicas o particuladas, que pueden mineralizarse durante el cultivo y aumentar la fracción biodisponible (Zhang al., 2019).

Evaluación de tamaño celular

La morfología de las microalgas es crucial para el acceso a la luz y los nutrientes, lo que afecta la aptitud de las especies planctónicas y, por lo tanto, el equilibrio del ecosistema (Borics et al., 2021). En el ensayo preliminar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en diámetro celular ni biovolumen de *C. vulgaris* entre los tratamientos de 10, 20, 80 y 100 % y el control. Sin embargo, en 100 % de ARU el diámetro y el volumen celular fueron ligeramente menores (-6 % y -19 %), aunque sin significancia estadística. Baldisserotto et al. (2023) observaron una disminución progresiva del diámetro de *Chlorella* sp. al exponerse a 50 % y 80 % de aguas residuales, alcanzando una reducción final del 21 % del diámetro celular, y lo atribuyeron al aumento de estrés por las condiciones fisicoquímicas del efluente y la presencia de contaminantes, lo que provocó cambios morfológicos. En un estudio de toxicidad realizado previamente con la misma cepa de *C. vulgaris*, expuesta a óxido de grafeno en distintas concentraciones, no se hallaron diferencias significativas en los parámetros morfológicos y se sugiere que estos no resultaron concluyentes como indicadores de los efectos tóxicos (Schmuck et al., 2024). De modo similar, en el presente estudio, pese a las leves diferencias observadas, puede inferirse que estos parámetros celulares no constituyeron indicadores sensibles frente a las condiciones evaluadas en el período de tiempo ensayado.

Evaluación de pigmentos fotosintéticos

Se analizaron los pigmentos fotosintéticos en todos los tratamientos, a las 72 h. La disminución de clorofila-a y clorofila-b en *C. vulgaris* en 100 % ARU fue significativa con respecto al control. Este comportamiento no podría atribuirse directamente a la deficiencia de nitrógeno, dado que la disponibilidad de amonio fue superior a la del control. La reducción de pigmentos puede explicarse por la presencia de contaminantes propios de las ARU, tales como metales, detergentes, fármacos y compuestos orgánicos, que inducen estrés oxidativo en las microalgas (Pacheco et al., 2021; Baldisserotto et al., 2023; Chen et al., 2024). Dicho estrés afecta la integridad del cloroplasto y el funcionamiento del fotosistema II, disminuyendo la capacidad la biosíntesis de clorofilas. Estudios previos evidenciaron que compuestos tóxicos,

incluyendo alcaloides como la nicotina, así como la acumulación de iones metálicos como Zn, Mn, Cu, Fe, Ag o Al, inhibieron directamente la síntesis de pigmentos (Baldisserotto et al., 2023; Chiellini et al., 2022; Romero et al., 2024, 2025). Adicionalmente, en condiciones mixotróficas se han reportado una menor dependencia de la luz como fuente de energía y consecuentes mecanismos de retroalimentación que inhiben la síntesis de clorofila, tales como la acumulación de hexosas o la regulación de la expresión génica de los cloroplastos (Abreu et al., 2022). Sin embargo, el índice CR, indicador de la eficiencia fotoquímica y del equilibrio entre complejos fotosintéticos, mostró una leve reducción en 100 % ARU, aunque sin diferencias significativas. El mantenimiento de la relación $cl-a/cl-b$ en células estresadas podría contribuir a mitigar los efectos de las ERO y favorecer la recuperación de la eficiencia del fotosistema (Arora et al., 2017).

Por su parte, los carotenoides se mantuvieron relativamente constantes, pero con valores inferiores al control, en los tratamientos entre 10-80% de ARU. En 100 % de ARU, estos presentaron un leve aumento (5%) con respecto al control. Estos pigmentos protegen contra la fotooxidación y neutralizan radicales peróxidos, lo que previene la degradación de los cloroplastos (Bodnar et al., 2016). Su incremento bajo condiciones de estrés se interpreta como un mecanismo adaptativo para contrarrestar el daño oxidativo y preservar la actividad fotosintética. En paralelo, el PI se mantuvo sin cambios en la mayoría de los tratamientos, y mostró un incremento notable en el 100 % de ARU, lo que concuerda con el leve aumento de carotenoides observado, y su relación con la clorofila-a, y respalda su rol adaptativo (Bodnar et al., 2016).

Evaluación de biomarcadores de estrés

La exposición de *C. vulgaris* a altas concentraciones de ARU (80–100 %) indujo un aumento significativo en las actividades de CAT y GST, indicando una activación rápida del sistema antioxidante frente al estrés oxidativo. Este comportamiento coincide con lo reportado en otras microalgas bajo estrés, donde la sobreproducción de ERO constituye la primera señal de toxicidad celular (Gao et al., 2017). Los procesos celulares que generan ERO incluyen la fotosíntesis, diversas reacciones enzimáticas y la interacción con compuestos exógenos que ingresan a la célula (Ke et al., 2010; Gauthier et al., 2020). Se han documentado incrementos en la actividad de CAT en *Dunaliella tertiolecta* y *D. salina* expuestas a hidrocarburos aromáticos policíclicos (como fenantreno y antraceno) (Sajadinasab et al., 2024), en *C. sorokiniana* bajo exposición a distintos fármacos (Chu et al., 2023), así como en *Chlorococcum humicola* cultivada en ARU (Singh et al., 2022a). La CAT desempeña un papel fundamental en la detoxificación de peróxido de hidrógeno, catalizando su conversión en agua y oxígeno, lo que evita el

inicio de procesos de peroxidación lipídica y el consecuente daño a orgánulos fotosintéticos (Ugya et al., 2019).

De manera complementaria, la inducción de la GST confirma la activación de rutas de biotransformación de xenobióticos y de eliminación de subproductos de la peroxidación lipídica, mecanismos descritos como parte de la tolerancia a ambientes contaminados (Chatzikonstantinou et al., 2017; Dos Santos et al., 2021). Este proceso inicia con la transformación de compuestos tóxicos en electrófilos reactivos a través del citocromo P-450. Posteriormente, la GST cataliza su conjugación con el tripéptido glutatión (GSH), produciendo metabolitos menos tóxicos y más hidrófilos (Chatzikonstantinou et al., 2017). En microalgas, la GST se ha vinculado con la detoxificación de herbicidas como atrazina (Castro et al., 2022), pesticidas de uso agrícola y doméstico como la cipermetrina (Cabrera et al., 2021), CF como bisfenol A (BPA) y fármacos como sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacina (CIP) (Chu et al., 2023). En concordancia, ensayos con inhibidores de citocromo P-450 en *C. sorokiniana* evidenciaron una reducción significativa en la degradación de BPA, CIP y SMX, confirmando el rol de esta vía en la detoxificación (Chu et al., 2023).

Respecto al contenido de MDA, se observó un incremento en el tratamiento con 100 % de ARU respecto al control ($p = 0,019$). El MDA constituye un subproducto estable de la peroxidación lipídica y se emplea como biomarcador de daño oxidativo en membranas (Gauthier et al., 2020). No obstante, su incremento en paralelo con la inducción de CAT y GST, sugiere el mantenimiento activo de la maquinaria antioxidante. Patrones similares se reportaron en *C. vulgaris* expuesta a NP de plata, y en *Scenedesmus vacuolatus* cultivada en efluentes urbanos, donde los incrementos de MDA se acompañaron de la inducción de enzimas antioxidantes que limitaron el daño (Singh et al., 2022b; Romero et al., 2025).

El PCA permitió identificar un patrón en la respuesta de *C. vulgaris* frente a las concentraciones de ARU. El eje PC1 representó un gradiente desde condiciones de bajo estrés y crecimiento más lento hacia un estado de alta proliferación celular acompañado de estrés oxidativo. Las concentraciones bajas (10 y 40 %) y el control se asociaron con altos contenidos de clorofilas y ausencia de estrés, indicando una estrategia de crecimiento estable y menos costosa fisiológicamente. La oposición entre clorofilas y marcadores de estrés evidenció sensibilidad del aparato fotosintético a la alta carga de nutrientes, mientras que el aumento de carotenoides sugirió un reajuste metabólico hacia pigmentos fotoprotectores, capaces de mitigar el daño oxidativo y sostener la proliferación celular. La correlación positiva en el PC1 entre densidad celular, tasa de crecimiento, MDA y GST confirmó que, bajo concentraciones elevadas de ARU (80 y

100 %), la microalga alcanzó el máximo crecimiento al costo de activar sus defensas antioxidantes. Este comportamiento coincide con lo reportado para especies tolerantes, como *Chlorella* sp. y *C. vulgaris*, que mantuvieron o incluso estimularon su crecimiento bajo exposición a contaminantes como nonilfenol (Gao et al., 2017). De manera similar, Singh et al. (2022a) observaron en *C. humicola* cultivada en ARU una preservación del crecimiento en paralelo con la activación de respuestas antioxidantes. En contraste, en especies más sensibles, la reducción de GST y CAT se asoció al deterioro fisiológico e incapacidad de detoxificación, como se evidenció en *Selenastrum capricornutum* expuesta a pireno (Lei et al., 2006), o en *S. capricornutum* y *Scenedesmus quadricauda* bajo exposición a nonilfenol, donde se detectaron reducciones en densidad celular y respuestas antioxidantes insuficientes (Gao et al., 2017). Estas diferencias resaltan la plasticidad metabólica de esta cepa de *C. vulgaris*, para sostener un crecimiento elevado en condiciones estresantes.

En menor medida, el eje PC2 reflejó diferencias en el tipo de respuesta fisiológica, separando un perfil dominado por la actividad enzimática de otro caracterizado por elevadas concentraciones de pigmentos y proteínas. La correlación positiva entre carotenoides y proteínas sugiere una respuesta coordinada de defensa. El tratamiento con 20 % de ARU presentó un comportamiento particular: si bien se ubicó en la región de bajo estrés de PC1, presentó la mayor coordenada positiva en PC2 y se asoció con la actividad de CAT, indicando una respuesta antioxidante específica sin daño generalizado.

En conjunto, los resultados demostraron que *C. vulgaris* no solo toleró altas concentraciones de ARU, sino que adaptó su metabolismo reforzando sistemas antioxidantes y fotoprotectores. Esta plasticidad fisiológica le permitió sostener un crecimiento acelerado en un ambiente simultáneamente rico en nutrientes y estresante. Por lo tanto, se seleccionó el 100 % de ARU como condición experimental para los ensayos posteriores.

2.5.2 Ensayo de biorremediación de ARU con *C. vulgaris*

El cultivo mixotrófico para el ensayo de biorremediación se realizó con *C. vulgaris* en 100 % de ARU.

La tasa de crecimiento específico constituye un parámetro clave para evaluar el comportamiento dinámico del cultivo de microalgas (Pacheco et al., 2021). En el cultivo mixotrófico, *C. vulgaris* alcanzó valores entre 0,3 y 0,7 día^{-1} , consistentes con lo informado para *C. vulgaris* en efluentes domésticos secundarios: 0,52 día^{-1} (Almomani y Örmeci, 2016) y 0,62 día^{-1} (Znad et al., 2018). Por su parte, se han reportado tasas menores en distintas condiciones: 0,30 día^{-1} en ARU pretratada a baja concentración

(0,02 % v/v ARU) (Lam et al., 2017), 0,32 día⁻¹ en ARD (Pacheco et al., 2021) y 0,2 día⁻¹ en *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de deshidratación de lodos de una planta de tratamiento municipal (Baldisserotto et al., 2023). Las mayores tasas de crecimiento específico pueden atribuirse a la presencia de nutrientes orgánicos que promueven el crecimiento mixotrófico de *C. vulgaris* (Grubišić et al., 2024).

Si bien el cultivo mixotrófico mostró mayor densidad celular (estimada a partir del número de células por mililitro), la biomasa de *C. vulgaris* fue cuatro veces superior en el cultivo control. Esta diferencia podría estar relacionada con el tamaño celular, registrado en el test de inhibición algal: tanto el diámetro como el volumen celular fueron ligeramente menores en el tratamiento con 100 % de ARU en comparación con el control, con disminuciones del 6 % y el 19 %, respectivamente, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

La biomasa final obtenida (0,4 g L⁻¹) superó la reportada en algunos estudios, como por ejemplo los 0,23 g L⁻¹ alcanzado por *C. vulgaris* en 80% de ARD en Kuala Lumpur, Malasia (Tan et al., 2022). En cambio, valores más altos se registraron en otras investigaciones: *Scenedesmus* sp. cultivada en efluentes primarios y secundarios de una planta de tratamiento de Harbin (China) alcanzó un máximo de 0,69 g L⁻¹ en el efluente primario, atribuible a su mayor carga de nutrientes y materia orgánica, y este rendimiento aumentó un 233 % con la adición de 1 g L⁻¹ de nitrato (Ren et al., 2019). Asimismo, *Scenedesmus rubescens* produjo hasta 0,73 g L⁻¹ (un incremento de 5,4 veces) al optimizar la concentración de nitrato y fosfato (Sureshkumar y Thomas, 2019). En un estudio comparable al presente, *Scenedesmus* sp. expuesta a diferentes concentraciones de ARU de Madurai (India) alcanzó un máximo de 0,95 g L⁻¹ en 100 % de ARU (Thangam et al., 2021). Condori et al. (2025) cultivaron *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en vinaza de aguardiente y evaluaron su potencial de producción de biomasa y recuperación de nutrientes. En los tratamientos con 20% y 40% de vinaza se lograron concentraciones de biomasa de hasta 1,0 g L⁻¹. Este rendimiento se asemeja al obtenido por Thangman et al. (2021), aunque es mayor a la obtenida en este y los otros estudios anteriormente mencionados.

El análisis de pigmentos fotosintéticos constituye un indicador confiable de la influencia de contaminantes ambientales en microalgas, dado que sus variaciones afectan procesos clave de la fotosíntesis, como la síntesis de ATP y la fijación de dióxido de carbono (Fai et al., 2007). En T1 no se hallaron diferencias significativas respecto al control, aunque los carotenoides mostraron una ligera reducción (no significativa). En T2, la disminución de todos los pigmentos fue más notable, con diferencias significativas frente al control. Como se explicó previamente, esta reducción podría atribuirse a la presencia de contaminantes característicos de las ARU (Pacheco et al., 2021;

Baldisserotto et al., 2023; Chen et al., 2024), así como a la activación del metabolismo mixotrófico, que disminuye la dependencia de la luz como fuente energética (Abreu et al., 2022). Adicionalmente, en T2 la carencia de nutrientes habría desempeñado un papel relevante, dado que desde T1 las microalgas se encontraban en inanición de nitrógeno, ya que las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio resultaron no detectables. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Cecchin et al. (2023), quien demostró que la limitación de nitrógeno restringe la biosíntesis de clorofila en *C. vulgaris* al reducir la actividad de la enzima nitrato reductasa y forzar a las células a recurrir al catabolismo de aminoácidos para reciclar grupos amino.

En concordancia, Eida et al. (2018) asociaron la disminución de clorofila-a en *Scenedesmus obliquus* cultivada en ARU tratada, con una menor disponibilidad de fósforo y nitrógeno. Covell (2022) señaló que la privación de nitrógeno induce la degradación de clorofila y proteínas, reasignando nitrógeno hacia enzimas esenciales y promoviendo la acumulación de lípidos y carbohidratos. De manera complementaria, Juneja et al. (2013) demostraron que la deficiencia de fósforo reduce los niveles de clorofila-a y proteínas al limitar la regeneración de ATP y NADPH en el ciclo de Calvin-Benson, lo que compromete la fijación de carbono y síntesis de metabolitos esenciales. Respecto a los carotenoides, Tripathi et al. (2021) observaron que se mantuvieron estables en cultivos de *Coccomyxa* sp. bajo deficiencia de fósforo y azufre, pero disminuyeron drásticamente bajo deficiencia de nitrógeno. Adicionalmente, efectuaron un análisis del fotosistema II que indicó que la reducción de clorofila en estas condiciones se compensó con la estabilidad de la eficiencia del fotosistema II y la acumulación de lípidos, lo que se halla en concordancia con la respuesta de *C. vulgaris* en ARU observada en este estudio, en T2. Los índices CR se mantuvieron prácticamente constantes en ambos cultivos y tiempos, lo que sugiere que, pese a la disminución de clorofila-a y clorofila-b, la relación cl-a/cl-b se conservó en células estresadas. Esta estabilidad podría favorecer la mitigación de los efectos del estrés (Arora et al., 2017), tal como se ha observado en *Coccomyxa* sp. y *Scenedesmus* sp., donde una proporción equilibrada de cl-a/cl-b permitió proteger los centros de reacción frente al estrés nutricional (Pancha et al., 2015; Ruiz-Domínguez et al., 2015; Tripathi et al., 2021). En cambio, el índice PI disminuyó en los cultivos con ARU, lo contrario a lo esperado en condiciones de estrés, lo que estaría relacionado con la falta de aumento de carotenoides. Aunque diversos estudios describen una acumulación de carotenoides bajo estrés, se ha documentado que condiciones de estrés severo o prolongado pueden provocar la pérdida de carotenoides primarios por degradación oxidativa (Chantzistrountsiou et al., 2023).

Eficiencia de remoción de compuestos

La DBO₅ y la DQO son indicadores indirectos de la concentración de materia orgánica y parámetros representativos de la calidad de las aguas residuales. En este estudio, ambos se redujeron considerablemente en los primeros 4 días de cultivo. Esta disminución puede explicarse por dos mecanismos principales: i) la asimilación de determinados compuestos orgánicos por las microalgas bajo condiciones mixotróficas, contribuyendo a su crecimiento; ii) la actividad fotosintética incrementa el OD, lo que favorece la actividad de bacterias aerobias responsables de la degradación de la materia orgánica (Song et al., 2022). Es importante señalar que antes de la inoculación de *C. vulgaris*, el efluente excedía el límite regulatorio de DQO; sin embargo, al día 4 alcanzó el valor exigido por la normativa. En contraste, a los 8 días se observó un incremento de DBO₅ y DQO. Resultados similares fueron reportados por Lima et al. (2022), quienes atribuyeron el aumento de la DQO a la liberación de compuestos orgánicos oxidables, como la celulosa de las paredes celulares microalgales. En el caso de la DBO₅, el aumento podría relacionarse con la presencia de carbohidratos más fácilmente degradables.

Se registró una alta reducción de nutrientes, la eliminación de fósforo alcanzó el 97,5 % al día 4 y el 99,8 % al día 8, mientras que la eliminación de nitrógeno superó el 99 % al día 4 y se mantuvo estable en el día 8. El nitrógeno, componente esencial de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, constituye uno de los nutrientes más relevantes para las microalgas. Sus principales vías de eliminación en sistemas biológicos son la asimilación de la biomasa, la volatilización y la nitrificación (Foladori et al., 2018; Ren et al., 2019). En relación con la volatilización de compuestos amoniacales, para que el amoníaco predomine sobre el amonio, y este proceso sea relevante, el pH del medio debe superar al menos valores cercanos a 8; sin embargo, por debajo de pH 9 la forma amonio continúa siendo predominante (Beltrán-Rocha et al., 2017). En el presente ensayo, el pH alcanzó 8,1 al final del periodo experimental, lo que sugiere que la volatilización del amoníaco no constituyó un mecanismo significativo de eliminación de nitrógeno. Asimismo, la disminución del nitrato observada en el cultivo sugiere que la nitrificación no constituyó el proceso dominante, y que la absorción por las microalgas para la producción de biomasa podría ser el principal mecanismo involucrado. No obstante, no puede descartarse que parte del amonio se haya transformado en nitrato mediante nitrificación bacteriana y que luego fuese rápidamente asimilado por las microalgas, enmascarando su acumulación en el balance final (Baldisserotto et al., 2023).

Respecto al fósforo, las microalgas utilizan preferentemente ortofosfato, que se asimila a través de la membrana plasmática por transporte activo mediado por

fosforilación (Fal et al., 2022). El fosfato desempeña un papel fundamental en la transferencia de energía, la fotosíntesis y la formación de biomoléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas. En condiciones desfavorables, las microalgas pueden presentar una “absorción de lujo” y almacenar el exceso en cuerpos de polifosfato (Singh et al., 2018).

Lima et al. (2022) evaluaron la eliminación de fósforo y nitrógeno de ARU (Balestrate, Italia) con *Chlorella* sp., lodos activados y un consorcio de ambos. Su efluente inicial presentó menor concentración de fósforo (3-4 mg L⁻¹) pero mayor de nitrógeno (40-45 mg L⁻¹) respecto al presente trabajo. *Chlorella* sp. alcanzó la mayor eliminación de fósforo (82,2 %), mientras que el consorcio mostró mejor rendimiento para nitrógeno (83,7 %), lo que sugiere que la adición de lodos activados fue ineficaz para mejorar la reducción de fósforo, pero beneficiosa para la eliminación de nitrógeno. Solo *Chlorella* sp. redujo el fósforo por debajo del límite legal, y el consorcio hizo lo propio con el nitrógeno. Sin embargo, su sistema requirió 10 días para lograr dichas eficiencias, mientras que en este trabajo se superó el 97 % de remoción de estos nutrientes en sólo 4 días. Eida et al. (2018) obtuvieron eficiencias similares con *S. obliquus* (78,5 % de nitrógeno y 95,2 % de fósforo), aunque trabajando con menor concentración de ARU (25 %), lo que redujo su eficiencia en relación con el presente trabajo. En otro estudio, Lima et al. (2020) evaluaron distintas cepas durante 15 días: *Microchloropsis gaditana*, *C. sorokiniana*, *Chlorella* sp. y un consorcio de *Chlorella* sp. y *D. tertiolecta*. Si bien lograron reducciones de nitrógeno (hasta 88,2 %) y fósforo (61 %), no observaron mejoras en DBO₅ y DQO y reportaron periodos iniciales de baja eficiencia por aclimatación. Sureshkumar & Thomas (2019) también reportaron un patrón similar con *S. rubescens*: tras 10 días lograron eliminar el 99,9 % de nitrato y el 83,8 % de fósforo, pero a los 5 días las reducciones fueron sólo moderadas (49-53 %). Fal et al. (2022) evaluaron un sistema basado en microalgas con ARU secundaria y pretratada, y alcanzaron alta remoción de nutrientes después de 26 días. Estas diferencias en los tiempos de cultivo y eficiencias de remoción de nutrientes resaltan la ventaja potencial del presente proceso en términos de ahorro de tiempo y recursos.

Los consorcios algales pueden mejorar la eficiencia de tratamiento, como mostraron Oberholster et al. (2021) en estanques municipales en Motetema y Brandwag (Sudáfrica) con el consorcio *C. vulgaris-Auxenochlorella protothecoides*. El cultivo dominado por *A. protothecoides* alcanzó la mayor reducción de fósforo total (74,4%), mientras que el cultivo dominado por *C. vulgaris* redujo más eficientemente el nitrógeno total (73,1%). Sin embargo, ninguno cumplió con las regulaciones sudafricanas de descarga para DQO, y en Motetema, los límites normados para amonio y nitrógeno total también fueron superados. En contraste, el presente estudio logró cumplir con los

estándares de la normativa utilizando una sola microalga. En un estudio reciente, Ortega-Blas et al. (2025) emplearon un consorcio *Chlorella*-bacteriano para remover nutrientes de ARU de una planta de tratamiento en Huanta (Ayacucho, Perú), logrando eficiencias de eliminación de nitrógeno y fósforo del 87 % y 94 %, respectivamente, tras 7 días de cultivo. Sin embargo, cabe señalar que la concentración inicial de fósforo era aproximadamente la mitad que la registrada en el presente estudio, mientras que la de nitrógeno inorgánico total era casi el doble, lo que debe considerarse al comparar los resultados obtenidos.

La presencia de bacterias coliformes en aguas residuales indica la posible presencia de patógenos transmitidos por el agua (Lee et al., 2022). Los sistemas basados en microalgas constituyen una alternativa prometedora a los métodos convencionales de desinfección, al combinar efectos de radiación luminosa, aumento de OD y pH, y producción de metabolitos antimicrobianos. Posadas et al. (2015) lograron una reducción de *E. coli* cercana a 1 log utilizando HARP (High-Rate Algal Ponds, o estanques de alta tasa de crecimiento de microalgas) con suministro de dióxido de carbono, mientras que Delanka-Pedige et al. (2019) reportaron disminuciones de hasta 7 log de bacterias coliformes al emplear *Galdieria sulphuraria*. En este trabajo, el sistema basado en *C. vulgaris* fue altamente eficiente permitiendo reducir las bacterias coliformes en un 99,9% en 4 días, equivalente a 3,94 log.

Uno de los mecanismos atribuidos a las microalgas es la competencia por nutrientes, que limita la proliferación de otros microorganismos (Thangam et al., 2021). En este trabajo, la reducción simultánea de nutrientes y coliformes, junto con el incremento de la biomasa microalgal, se vincula a su alta eficiencia en la absorción de nutrientes (Pratita & Fathurohman, 2020). Otros autores sostienen que el crecimiento algal favorece la proliferación de bacterias no patógenas que compiten con especies de interés sanitario, reduciendo su abundancia (Lee et al., 2022). De manera complementaria, se ha demostrado que consorcios autóctonos de microalgas y bacterias resultan más eficientes que cultivos monoclonales de *Chlorella* en la eliminación de coliformes en efluentes agroindustriales (Amadu et al., 2023). Asimismo, el aumento de la actividad fotosintética eleva el OD y el pH, condiciones que, combinadas con la exposición lumínica, resultan desfavorables para microorganismos patógenos (Sánchez-Zurano et al., 2021). En este sentido, Marchello et al. (2015) reportaron una disminución en las poblaciones de bacterias en aguas residuales tras el cultivo de microalgas y mediante el burbujeo de aire.

No obstante, los mecanismos de inactivación bacteriana pueden variar según la especie. Bhatt et al. (2023), al estudiar la interacción de *C. pyrenoidosa* con *E. coli* en aguas residuales sintéticas, identificaron dos mecanismos principales: i) la

fotooxidación, donde el incremento del oxígeno y la acción de fotosensibilizadores promovieron la formación de ERO que dañaron las células bacterianas, y ii) la inmovilización de bacterias en matrices de exopolisacáridos producidas por las microalgas, especialmente en ambientes con alta DBO.

Por lo tanto, el cultivo de *C. vulgaris* en las ARU demostró un potencial significativo como estrategia de biorremediación integral, capaz de reducir materia orgánica, nutrientes inorgánicos y coliformes. Sin embargo, se requieren estudios adicionales a escala piloto y determinar las condiciones específicas de cada efluente para confirmar su eficacia y viabilidad en aplicaciones urbanas y a escala regional.

2.5.3 Evaluación de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa de *C. vulgaris*

Posteriormente, y con fines comparativos, se realizaron los mismos análisis en la biomasa cosechada de los cultivos mixotrófico y control (autotrófico). La composición nutricional del medio influye en el perfil bioquímico de la biomasa algal (Mayhead et al., 2018). En este estudio, el contenido proteico disminuyó con el tiempo, mientras que lípidos y carbohidratos aumentaron. Bajo deficiencia de nitrógeno y condiciones de estrés, las microalgas desvían el carbono fotosintético hacia reservas energéticas, reduciendo la síntesis de proteínas estructurales (Morales-Plasencia et al., 2023). La disminución proteica se ha vinculado principalmente a la privación de nitrógeno y, en menor medida, a la carencia de fósforo y azufre (Tripathi et al., 2021). Los valores de proteínas obtenidos al final del ensayo fueron inferiores que los reportados para *C. vulgaris* en condiciones óptimas de crecimiento (Coronado-Reyes et al., 2022; Mendes et al., 2024a), y a los informados por Arrojo et al. (2022) para *Chlorella fusca* cultivada en distintas concentraciones de ARU, pero resultaron similares a los descritos por Borca (2022) para *C. sorokiniana* cultivada en 40% y en 100 % v/v de ARU, con contenido proteico de 2,5-2,7%.

El contenido de carbohidratos en *C. vulgaris* aumentó progresivamente en ambos cultivos. Este fue superior en el cultivo control; no obstante, en el mixotrófico alcanzó niveles adecuados para aplicaciones bioenergéticas, comparables a los obtenidos en *Chlorella* sp. *Pozzillo* (18,4%), la cual los autores consideraron apta para dichas aplicaciones (Lima et al., 2022). Los depósitos de almidón representan el primer almacenamiento de carbono bajo condiciones mixotróficas (Baldisserotto et al., 2023). Asimismo, los polisacáridos de las microalgas pueden transformarse en productos químicos de valor agregado, como el 5-hidroximetilfurfural y el ácido levulínico (Zhou et al., 2022).

Oraby et al. (2023) observaron que la deficiencia de azufre promovió la acumulación de carbohidratos en *C. vulgaris*, mientras que la carencia de fósforo favoreció este fenómeno en *Scenedesmus* sp., alcanzando valores máximos en fase estacionaria. En contraste, Ji et al. (2011) reportaron que la deficiencia de fósforo no indujo la producción de carbohidratos en *Tetraselmis subcordiformis*, atribuyéndolo a la alta biomasa inicial y a reservas intracelulares de fósforo aún no agotadas. Se ha propuesto que para favorecer esta acumulación debe alcanzarse un umbral mínimo de fósforo intracelular (Markou et al., 2012). Asimismo, *Chlorella* sp. presentó una mayor acumulación de carbohidratos en medios mixotróficos suplementados con glucosa, en comparación con aquellos suplementados con acetato o glicerol. Se sugiere que en *C. vulgaris* este proceso puede estar condicionado por la naturaleza de los compuestos orgánicos de carbono presentes en ARU (Liang et al., 2009).

Otros autores enfatizan en los cambios de la actividad enzimática bajo estrés. La síntesis de almidón está regulada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), cuya actividad puede aumentar tras la privación de nitrógeno. No obstante, se ha observado que la enzima podría ser prescindible en algunas cepas o incluso limitar la acumulación de carbohidratos en ciertos casos. Dado que la biosíntesis de almidón comparte precursores con la de lípidos, el bloqueo de su vía metabólica puede redirigir el flujo de carbono hacia la acumulación lipídica. En *Chlamydomonas*, la inhibición de la AGPasa incrementó diez veces la producción de lípidos (Li et al., 2010; Shi et al., 2020). Estos fenómenos varían entre especies, lo que evidencia la necesidad de profundizar en los procesos enzimáticos y metabólicos asociados a la síntesis de carbohidratos (Morales-Plasencia et al., 2023; Oraby et al., 2023).

El contenido lipídico fue mayor en el cultivo mixotrófico en T2-M, alcanzando el 17 (± 3) %, valor similar al 16,7 % reportado por Arrojo et al. (2022) para *C. fusca* en 100 % ARU.

En el presente trabajo, los lípidos aumentaron 1,9 veces en T2-M respecto al control, lo que sugiere privación de nutrientes. Esto coincide con la elevada remoción de nutrientes desde T1-M, que habría inducido el almacenamiento metabólico del exceso de carbono en forma de lípidos (Tripathi et al., 2019). Como se mencionó previamente, desde T1 se evidenció inanición por nitrógeno, mientras que el fósforo aún estaba disponible, aunque en baja proporción. Chu et al. (2014) propusieron que la disponibilidad de fósforo puede mejorar la productividad de biomasa durante la privación de nitrógeno, lo cual se ha comprobado en *Chlorella* sp. y *S. obliquus* (Fu et al., 2017; Shen et al., 2020). Adicionalmente, las propiedades fisicoquímicas del ARU podrían contribuir al aumento de lípidos bajo condiciones de estrés (Cai et al., 2013).

Fal et al. (2022) también registraron un incremento de lípidos y disminución de proteínas y carbohidratos en cultivos mixotróficos, respecto a los autótrofos, en ARD tratadas. Por ejemplo, *C. sorokiniana* alcanzó un 36,9 % de lípidos frente al 15,4 % en medio sintético tras 26 días de cultivo. De igual manera, Chokshi et al. (2015) reportaron un 25,1% de lípidos en *Acutodesmus dimorphus* cultivada en ARD, en comparación con el 21,85% en condiciones autótrofas, y destacaron su potencial para biocombustibles y alimentación animal. En este trabajo, *C. vulgaris* presentó niveles lipídicos ligeramente inferiores a los reportados, pero significativamente superiores a los del medio autótrofo. Estos resultados sugieren una ventaja bioeconómica al emplear ARU para este propósito.

En respuesta al estrés, las microalgas modulan su PAG como mecanismo de defensa frente el daño celular (Vilakazi et al., 2021). Predominantemente, AGPI conforman la fracción lipídica estructural, junto con los AGS, especialmente en membranas de orgánulos, mientras que AGMI y ciertos AGS específicos se concentran en la fracción de almacenamiento (Sajjadi et al., 2018). La composición relativa de AGS, AGMI y AGPI varía según la especie, la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales (Wan Afifudeen et al., 2021).

Aunque la acumulación de lípidos en microalgas con fines bioenergéticos ha sido ampliamente investigada, la evaluación exhaustiva de su idoneidad ha recibido menor atención. Para producir biodiésel de calidad, la fracción lipídica debe contener principalmente ácidos grasos C16-C18 y presentar mayor proporción de AGS y AGMI que de AGPI (Rai & Gupta, 2017), dado que estos últimos son propensos a la oxidación y reducen la lubricidad del combustible. En este estudio, tanto en cultivo autótrofo como mixotrófico, los AGPI fueron mayoritarios, por lo que no se cumplió este requisito. Además, el ácido linolénico (18:3) debería ser inferior al 12 % (CEN, 2009), pero aquí superó el 15 % en todos los cultivos. En contraste, Pantami et al. (2020) y Fal et al. (2022) demostraron que una cepa de *C. vulgaris* sí resultaba adecuada para la conversión a biodiésel, lo que resalta la necesidad de caracterizar la composición bioquímica de cada especie y cepa, considerando las variaciones ambientales a las que puede estar expuesta.

Respecto a las diferencias entre cultivos, la exposición de *C. vulgaris* a las ARU indujo un aumento de AGS y una reducción de AGPI en relación con el control, mientras que los AGMI se mantuvieron relativamente estables. Estos cambios pueden atribuirse a diversos mecanismos adaptativos descritos en la literatura: bajo estrés ambiental o nutricional, los AGPI son más vulnerables al daño oxidativo, lo que conduce a su disminución y a un incremento compensatorio de AGS, más estables, en la membrana. Este fenómeno ha sido documentado en *S. quadricauda* bajo limitación de fósforo

(Sajjadi et al., 2018). Asimismo, el pH y otras características del efluente puede estimular la síntesis de AGS para reducir la fluidez y preservar la integridad de la membrana (Skrupski et al., 2013; Bartley et al., 2014). El incremento observado en el contenido total de lípidos puede explicarse por la acumulación de TAG ricos en AGS y AGMI, junto con la reducción de AGPI estructurales, reflejando una doble estrategia adaptativa: protección de la membrana y almacenamiento de energía. De manera semejante, *Nitzschia cf. biundulata* exhibió aumentos en los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1), vinculados a la síntesis de TAG (Stuart et al., 2025). A su vez, *Coccomyxa* sp. incrementó su contenido de oleico (18:1) en déficit de nitrógeno (Tripathi et al., 2021). En este estudio se observó una tendencia similar en *C. vulgaris* cultivada en ARU, donde el aumento progresivo del ácido oleico coincidió con la disminución de nutrientes nitrogenados. Este hallazgo resulta alentador, debido a que este ácido graso se asocia con beneficios en la prevención y manejo de enfermedades crónicas no transmisibles, como diabetes, obesidad y patologías cardiovasculares (Farak & Gad, 2022).

En lo que respecta a los AGPI y sus posibles aplicaciones, si bien el cultivo autótrofo produjo entre 1,3 y 1,7 veces superiores, los niveles obtenidos en ARU (37,1 % de AGPI en T1, y 38,3 % en T2) también resultan relevantes por sus propiedades antioxidantes. Una aplicación emergente es su incorporación en la industria alimentaria como conservantes frente al deterioro por factores ambientales (Fal et al., 2022). Santhar et al. (2023) propusieron el uso de *Nannochloropsis* sp., con un contenido de 25% de AGPI, como antioxidante en alimentos para acuicultura y en aplicaciones biomédicas. En el presente estudio, *C. vulgaris* cultivada en ARU alcanzó un contenido de AGPI 1,5 veces superior, lo que sugiere un potencial de aplicación análogo. Los AGPI de cadena larga, en particular omega-3 y omega-6, poseen relevancia dietética y terapéutica para el desarrollo de nutracéuticos, productos farmacéuticos y cosméticos (Abreu et al., 2022). En ambos cultivos, se identificaron ácido alfa-linolénico (ω -3), ácido linoleico (ω -6) y ácido gamma-linolénico (ω -6). Conde et al. (2021) no detectaron ácido gamma-linolénico en *C. vulgaris*, aunque reportaron mayores niveles de ácido alfa-linolénico (26,3%) y similares de linoleico (17,6%). Estos dos, son ácidos grasos esenciales necesarios en la dieta y precursores de AGPI de cadena larga, como el eicosapentaenoico (20:5; ω -3), docosahexaenoico (22:6; ω -3) y araquidónico (20:4), con funciones clave en inflamación y coagulación (Marques et al., 2023). El ácido gamma-linolénico, por su parte, se emplea en cosmética por sus propiedades dermatoprotectoras (Kawamura et al., 2011).

Evaluación preliminar de acumulación de astaxantina

Se llevó a cabo un ensayo en ARU al 100% para evaluar la acumulación de astaxantina, un carotenoide secundario de elevado interés biotecnológico. La estructura de los carotenoides se caracteriza por una larga cadena de dobles enlaces conjugados, responsable tanto de su capacidad para absorber luz en la región visible como de su alta reactividad química. Su análisis se realiza habitualmente por HPLC, técnica que ofrece alta resolución y precisión, aunque requiere una preparación laboriosa de las muestras, instrumentación costosa, tiempos de análisis prolongados y personal calificado. Por su parte, la espectrofotometría UV-visible resulta adecuada cuando en la matriz predominan pocos carotenoides, dado que presentan espectros muy característicos, generalmente con tres bandas cuyo desplazamiento depende del número de dobles enlaces conjugados. Esta técnica puede complementarse con análisis de derivadas para mitigar interferencias y efectos de matriz (Ni et al., 2005; Xavier et al., 2012).

Para la extracción de astaxantina se empleó una mezcla acetato de etilo:etanol (1:1), debido a que estudios previos demostraron que permite recuperar concentraciones significativamente mayores de este pigmento en comparación con otros solventes, como la acetona, que, si bien extrae eficientemente clorofilas, puede subestimar carotenoides como la astaxantina (Liu et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugirieron la posible presencia de luteína en las microalgas cultivadas en el control, en concordancia con reportes previos en *C. vulgaris*. Yadav et al. (2020), tras optimizar las condiciones de cultivo y las fuentes de nutrientes, identificaron mediante HPLC perfiles dominados por luteína, que representó un 8,8% de la biomasa, junto con proporciones menores de β -caroteno y astaxantina. En paralelo, análisis por LC-MS/MS en *C. vulgaris* han descrito una diversidad de carotenoides, entre ellos, violaxantina, neoxantina, luteína, β -caroteno, vulgaxantina I, astaxantina y anteraxantina (Pantami et al., 2020).

La luteína posee gran valor cosmeceútico y nutracéutico, asociado a sus propiedades antioxidantes, así como a su rol en la protección de la visión (Leong & Chang, 2023). Su acumulación y productividad en microalgas dependen de variables de cultivo como temperatura, pH, estrés oxidativo y régimen lumínico. Comercialmente, la fuente tradicional de luteína ha sido *Tagetes* (caléndula), pero el bajo contenido en las flores y los costos asociados al cultivo han impulsado el interés en microalgas como alternativa, dadas sus elevadas tasas de crecimiento y la ausencia de limitaciones estacionales para su cultivo (Sathasivam & Ki, 2018; Goswami et al., 2021).

Dentro de la clasificación funcional de carotenoides (primarios o secundarios), la luteína corresponde a una xantofila primaria. Cumple funciones esenciales en la

disipación del exceso de energía lumínica y en el mantenimiento de la integridad de las membranas fotosintéticas (Sanchez et al., 2008). Se ha señalado que los carotenoides primarios se encuentran acoplados al crecimiento, y tienden a degradarse bajo estrés, a diferencia de los carotenoides secundarios, como la astaxantina, que se acumula en gotas lipídicas citoplasmáticas en respuesta al estrés (Lemoine & Schoefs, 2010).

Los extractos obtenidos de *C. vulgaris* cultivadas en ARU no mostraron astaxantina detectable bajo las condiciones analíticas empleadas. No obstante, los espectros evidenciaron la co-presencia de clorofilas y carotenoides. Estudios previos han demostrado que la clorofila y el β -caroteno pueden coexistir, con picos próximos a 437 nm y 456 nm, respectivamente, generando interferencias y solapamientos que dificultan la detección inequívoca de carotenoides (Liu et al., 2011). Asimismo, se ha reportado que el β -caroteno, tradicionalmente considerado un carotenoide primario, puede acumularse bajo condiciones de estrés y comportarse funcionalmente como carotenoide secundario (Hermawan et al., 2018). En concordancia con estas evidencias y con los resultados obtenidos, se sugiere que uno de los pigmentos identificados en los cultivos de ARU fue probablemente el β -caroteno, mientras que la astaxantina no fue detectada.

El β -caroteno es un metabolito de alto valor biotecnológico: actúa como provitamina A, presenta actividad antioxidante y se utiliza extensamente como aditivo alimentario y colorante (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018). Aunque *D. salina* es la microalga más utilizada comercialmente por su elevado contenido en β -caroteno (Goswami et al., 2021) su posible detección en *C. vulgaris*, particularmente en cultivos desarrollados en ARU, refuerza la viabilidad de profundizar estrategias de economía circular que integren biorremediación con la producción de metabolitos de interés.

2.5.4 Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas

En este estudio se evaluó la fitotoxicidad de las ARU-T, posterior a la cosecha de biomasa algal. La germinación de las semillas de *L. sativa* arrojó resultados prometedores, porque fue mayor en los tratamientos con ARU-T de T2-M en comparación con los de T1-M; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas respecto al control, lo que indicó la ausencia de efectos tóxicos relevantes sobre la germinación. En contraste, en los dos tratamientos con mayor concentración de ARU-T del T1-M (es decir, tras 4 días de cultivo) la longitud de la radícula fue significativamente menor que en el control. Este resultado coincide con lo reportado por Rocha Scharfenberg et al. (2021), quienes señalaron que el desarrollo radicular fue más sensible a la fitotoxicidad que la germinación, dado que las raíces actúan como principal vía de absorción de compuestos bioactivos y son más vulnerables a aleloquímicos.

Con el fin de caracterizar con mayor detalle la respuesta de *L. sativa*, se calcularon índices de fitotoxicidad. El RSG mostró valores elevados, entre el 86-97 % en ARU-T de T1-M y 92-95 % en T2-M, es decir, con baja toxicidad e impacto en la germinación, de modo consistente con lo informado por Bolonhesi y Lopes (2018) para aguas residuales tratadas.

Por su parte, el RRG, indicador del crecimiento radicular, presentó valores entre 31-67 % en T1-M y 52-84 % en T2-M. En T1-M se observó un aumento del RRG con la concentración de ARU-T, mientras que en T2-M no se identificó una tendencia definida. En todos los casos, excepto en el tratamiento con 50 % de ARU-T de T2-M, los valores se mantuvieron por debajo del umbral del 80 %, considerado indicativo de alteraciones metabólicas inducidas por factores ambientales (Cuervo Lumbaqué et al., 2017). De manera semejante, Mañas & De las Heras (2018) hallaron valores de RRG inferiores a 80% en *L. sativa* expuesta a altas concentraciones de lodos, mientras que las bajas concentraciones arrojaron valores superiores a dicho umbral, y sugirieron su potencial aplicación agrícola bajo un control estricto de dosis.

El índice GI, considerado un indicador robusto de fitotoxicidad, porque integra potencial de germinación con desarrollo radicular (Pentreath et al., 2015), confirmó estas tendencias. En T1-M, el GI disminuyó con el aumento de la concentración de ARU-T, alcanzando valores entre 27-64. La concentración más baja superó el umbral de 50, mientras que las concentraciones intermedias se acercaron a este valor, lo que, según los autores, podría considerarse un valor limítrofe e indicativo de toxicidad moderada.

En T2-M, el GI osciló entre 48-78, sin una relación vinculada a la concentración de ARU-T, destacándose el tratamiento al 50 % por alcanzar un valor cercano al umbral no tóxico. En conjunto, los resultados sugieren que un mayor tiempo de cultivo de *C. vulgaris* redujo la fitotoxicidad de ARU-T, aunque se requieren estudios adicionales con semillas de *L. sativa*, u otras especies, para confirmar esta asociación.

Estos resultados demuestran que, a pesar del incremento de DBO₅ y DQO en T2-M, las semillas mostraron un mejor desempeño que con ARU-T de T1-M, lo que sugiere que otros factores, además de la carga orgánica, pueden influir en la respuesta vegetal. Las ARU pueden contener contaminantes como fármacos, cuya presencia es frecuente en efluentes urbanos. Chan-Keb et al. (2021) demostraron que *L. sativa* expuesta a distintos fármacos presentó reducciones en la germinación y en las longitudes de radícula e hipocótilo, atribuibles a su biodisponibilidad y absorción radicular. En este sentido, se propone como perspectiva para futuros estudios una caracterización más exhaustiva del efluente.

Adicionalmente, puede considerarse, por las altas eficiencias de remoción de nitrógeno y fósforo alcanzadas en el ensayo de biorremediación, que los nutrientes

disponibles en las ARU-T fueron insuficientes para una absorción radicular efectiva (Reynolds et al., 2024). En respaldo a esto, diversos estudios han demostrado que efluentes con elevados contenidos de nutrientes promovieron el crecimiento de *L. sativa*, tanto en ensayos de germinación como en estudios a mayor escala en suelo, favoreciendo el rendimiento de los cultivos y reduciendo la necesidad de aplicación de fertilizantes (Cuba et al., 2015; Urbano et al., 2017; Sangare et al., 2020; Ait-Mouheb et al., 2022; Niquice-Janeiro et al., 2023).

Los organismos internacionales como la OMS y la FAO establecen recomendaciones de umbrales de parámetros fisicoquímicos en aguas residuales destinadas a su reutilización en riego agrícola. Entre estos, el límite definido para nitrato sin restricción de uso es $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ y tanto en T1 como en T2 el nitrato no fue detectado ($< 0,027 \text{ mg L}^{-1}$). Además, debe resaltarse que el efluente utilizado en este estudio no contenía metales pesados, sólo trazas de arsénico. Con respecto a este elemento, la concentración máxima recomendada para agua de riego es $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, valor ampliamente superior al registrado ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$) (FAO, 1985).

Por otro lado, las directrices de la Environmental Protection Agency (EPA) proponen niveles guías para los valores máximos de DBO, según su destino de uso: 10 mg L^{-1} para riego de cultivos a consumir crudos y 30 mg L^{-1} para cultivos alimentarios no consumidos crudos o no alimentarios (US EPA, 2012). Según los valores medidos en el presente estudio, sólo en T1 se cumple el criterio menos estricto, aunque se encuentra cercano al criterio más riguroso ($12,2 \text{ mg L}^{-1}$). Mientras, para DQO no se identificaron normativas o recomendaciones oficiales para este parámetro en guías o estándares internacionales.

Finalmente, los coliformes fecales y los huevos de nematodos son indicadores biológicos comúnmente utilizados en la evaluación de la reutilización de aguas residuales. De acuerdo con las recomendaciones otorgadas por la OMS y la FAO, para el riego de cultivos destinados al consumo en fresco se definieron como límites de referencia: $< 1000 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ de coliformes fecales y $\leq 0,1$ huevos de helmintos L^{-1} (FAO, 1992; Blumenthal et al., 2000; WHO, 2006). Las concentraciones de coliformes fecales en las ARU-T oscilaron entre < 30 a $40,5 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$, valores que se encuentran por debajo del umbral recomendado por estos organismos internacionales. Por otro lado, tanto la normativa europea como las directrices de la EPA adoptan criterios más conservadores. La Comisión Europea emplea *E. coli* como indicador específico de contaminación fecal, y establece el límite de $100 \text{ UFC } 100 \text{ mL}^{-1}$ para este tipo de reúso del agua residual (Truchado et al., 2021). Por su parte, la US EPA (2012) recomienda la ausencia detectable de coliformes fecales para el riego de cultivos a consumir crudos, y para cultivos alimentarios que no se consumen crudos o cultivos no alimentarios

propone un límite de 200 UFC 100 mL⁻¹. En este contexto, los valores obtenidos cumplen con las recomendaciones de la OMS y la FAO y con el criterio menos restrictivo de la EPA. No obstante, se destaca la necesidad de incorporar en futuros análisis el monitoreo de *E. coli* y de huevos de nemátodos, para mantener una caracterización microbiológica acorde con los estándares internacionales.

En síntesis, los resultados evidenciaron que prolongar el cultivo de *C. vulgaris* mejoró las condiciones de ARU-T para favorecer la germinación y el crecimiento de *L. sativa*, a la vez que las ARU-T cumplieron con los criterios establecidos en estándares internacionales. En este contexto, resulta necesario profundizar estas evaluaciones mediante estudios de dilución o suplementación del efluente tratado como estrategias de optimización. Asimismo, se requieren análisis complementarios que consideren contaminantes específicos y su interacción con parámetros fisicoquímicos para consolidar el uso de ARU-T en aplicaciones agrícolas.

Capítulo 3: Biorremediación de ARU con *Euglena gracilis* y obtención de β -1,3-glucano

3.1 Introducción

3.1.1 Morfología y organización celular de *E. gracilis*

Euglena gracilis pertenece al filo Euglenozoa (clase Euglenida) (Kostygov et al., 2021). Es una microalga unicelular flagelada de vida libre que habita predominantemente en cuerpos de agua continentales (Feregrino Mondragon, 2019), especialmente en estanques y lagos eutróficos (Nezbrytska et al., 2022).

Como célula eucariota, *E. gracilis* posee los orgánulos celulares típicos, entre ellos cloroplastos (adquiridos mediante un proceso de endosimbiosis secundaria), núcleo, aparato de Golgi y un sistema de vacuolas contráctiles (Figura 36A) (Khatiwada et al., 2020). La célula presenta un flagelo anterior largo que constituye su principal estructura locomotora. El citoplasma alberga, además, una mitocondria de gran tamaño, que forma una red ramificada o retículo mitocondrial, que favorece una respiración celular eficiente e incluye la capacidad de asimilar sustratos orgánicos exógenos (Gulk et al., 2023). En el extremo frontal se localiza una invaginación denominada reservorio, que se asocia al sistema de vacuolas contráctiles con función osmorreguladora (Häder & Iseki, 2017) (Figura 36B).

Bajo condiciones de iluminación, las células desarrollan entre diez y doce cloroplastos discoidales relativamente grandes, provistos de pirenoides. Cuando se cultiva en oscuridad, *E. gracilis* puede perder funcionalmente sus cloroplastos y adoptar un metabolismo heterótrofo; sin embargo, puede recuperarlos al retornar a condiciones de iluminación (Feregrino Mondragon, 2019).

En cuanto al sistema de fotorrecepción, históricamente se consideró que el estigma era el principal fotorreceptor. Sin embargo, estudios posteriores identificaron al cuerpo paraxonemal (PAB, por sus siglas en inglés), también llamado cuerpo paraflagelar, ubicado en el flagelo posterior dentro del reservorio, como el verdadero orgánulo fotosensible. El estigma facilita la percepción de la dirección de la luz al sombrear el PAB cuando la célula rota helicoidalmente frente a una fuente de luz lateral. En la base del reservorio se originan los dos flagelos a partir de los cuerpos basales, aunque sólo uno emerge como flagelo posterior, mientras que el segundo se extiende internamente hasta el PAB (Häder & Iseki, 2017).

Las células de *E. gracilis* miden aproximadamente 50 μm de longitud por 10 μm de ancho y carecen de una pared rígida, característica que le confiere a la célula una morfología altamente flexible. Por debajo de la membrana plasmática se ubica la

película proteica o *pelicle*, compuesta por estructuras longitudinales entrelazadas que pueden deslizarse entre sí. Esta organización estructural permite a la célula adoptar formas que varían desde una morfología esférica hasta un huso alargado, y posibilita el movimiento euglenoide o metabolia, mediante el cual *E. gracilis* ajusta su forma y tamaño en respuesta a cambios ambientales (Feregrino Mondragon, 2019; Muchut, 2020).

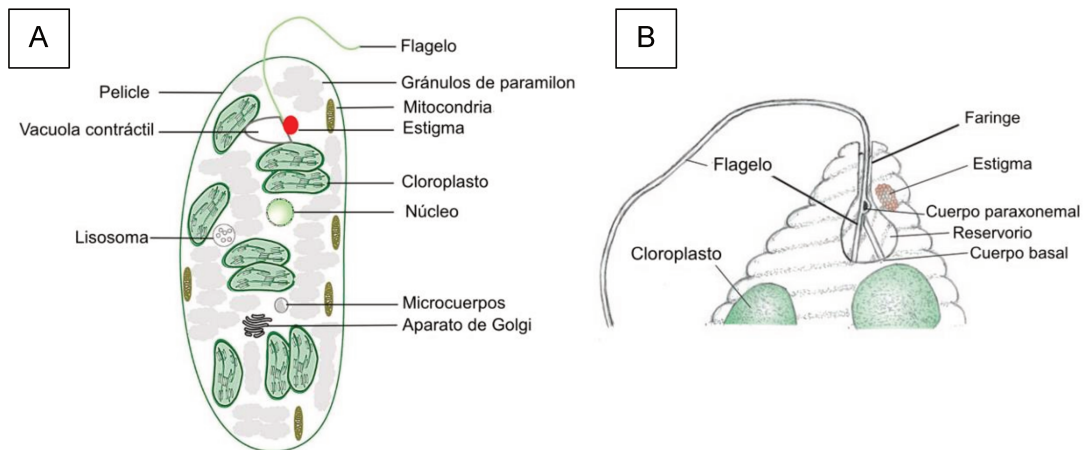


Figura 36: A) Esquema estructural de una célula de *Euglena gracilis* que ilustra sus principales orgánulos. Adaptado de Khatiwada et al. (2020). B) Esquema del extremo frontal de *E. gracilis*, adaptado de Häder & Iseki (2017).

3.1.2 Fisiología y metabolismo

Euglena gracilis se considera un organismo metabólicamente versátil debido a su capacidad de alternar entre modos fotoautótrofos, heterotróficos y mixotróficos según las condiciones ambientales. Esta versatilidad se complementa con su aptitud para crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y en un amplio intervalo de pH (Feregrino Mondragon, 2019; Hasan et al., 2019). Esta microalga puede utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono, entre ellos glucosa, glutamato, malato, lactato, butanol, glicina y glicerol (Jasso-Chávez et al., 2005; Gulk et al., 2023).

Diversos estudios han demostrado que la productividad de *E. gracilis* puede incrementarse bajo condiciones heterotróficas o mixotróficas en comparación con el crecimiento autotrófico. Por ejemplo, tanto la tasa de crecimiento como la productividad de paramilón en *E. gracilis* aumentaron bajo estas modalidades de cultivo; y, además, dentro de la condición mixotrófica, la suplementación con etanol y acetato provocaron aumentos significativos en la biomasa algal (1,2 y 0,8 g L⁻¹, respectivamente) (Rubiyatno et al., 2021). De manera similar, el rendimiento lipídico de una cepa de *E. gracilis* superó tres veces el valor al suplementarse el medio con glicerol, con respecto al cultivo

autotrófico (Khanra & Rai, 2018). Muchut (2020) también observó que la fuente de carbono y el régimen de iluminación del cultivo influyeron en las densidades algales alcanzadas y en la proporción de metabolitos acumulados.

Bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, la microalga emplea una vía metabólica alternativa para sintetizar ésteres de cera mediante un proceso llamado fermentación de ésteres de cera (Feregrino Mondragon, 2019). Estos compuestos poseen relevancia biotecnológica dado que son recursos para la producción de biodiésel, y para la fabricación de lubricantes, velas y cosméticos (Papadaki et al., 2017; Gissibl et al., 2019).

En otro estudio con *Euglena pisciformis*, se demostró que la disponibilidad de nutrientes modulaba el crecimiento mixotrófico al ensayar diversos sustratos, resultando el acetato de sodio la fuente más adecuada, que permitió alcanzar una biomasa de 0,63 g L⁻¹ (Fan et al., 2022).

En conjunto, la capacidad de *E. gracilis* para ajustar su metabolismo según la disponibilidad de luz, oxígeno y fuentes de carbono explica su flexibilidad fisiológica y su utilidad en distintas estrategias de cultivo y producción.

3.1.3 Composición bioquímica y potencial biotecnológico

Euglena gracilis sintetiza una amplia variedad de compuestos con relevancia nutricional y biotecnológica. Su contenido proteico puede oscilar entre el 12 % y el 50% del peso seco, en función del modo de cultivo, autótrofo o heterótrofo, de la exposición a diferentes temperaturas y del tipo de fuente nitrogenada utilizada (Suzuki et al., 2018; Wang et al., 2018; Xie et al., 2023; Yuan et al., 2024). Además, se ha demostrado que la microalga contiene los 20 aminoácidos proteínogénicos, lo que refuerza su interés como recurso proteico de alta calidad (Gissibl et al., 2019).

La biomasa de *E. gracilis* también ha sido investigada como fuente de lípidos, debido a que en condiciones favorables puede acumular hasta un 20 % de la biomasa seca (Schwarzthans et al., 2015; Wang et al., 2018; Casas-Arrojo et al., 2022; Khatiwada et al., 2020), y la mayoría de estos lípidos son saturados o poseen un bajo grado de insaturación, características que los hacen adecuados para la producción de biodiésel (Rai & Gupta, 2017; Gissibl et al., 2019). No obstante, *E. gracilis* también sintetiza en menores proporciones ácidos grasos de reconocido valor nutricional, entre ellos los ácidos α -linolénico (18:3; ω -3), araquidónico (20:4), eicosapentaenoico (20:5; ω -3) y docosahexaenoico (22:6; ω -3) (Korn, 1964; Wang et al., 2018). Esta dualidad convierte a la especie en una fuente valiosa de compuestos lipídicos de relevancia industrial.

Entre los principales pigmentos fotosintéticos presentes en *E. gracilis* se encuentran las clorofilas a y b, así como los carotenoides diadinoxantina y neoxantina (Cunningham

& Schiff, 1986). La especie también se caracteriza por la producción de β -caroteno como pigmento con función protectora frente al daño fotooxidativo, acumulándose en mayores cantidades bajo condiciones fotoautotróficas (Gissibl et al., 2019). Como se ha mencionado, este compuesto posee un elevado valor biotecnológico al actuar como provitamina A, y es ampliamente utilizado como aditivo alimentario (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018).

En cuanto a micronutrientes, *E. gracilis* se destaca por contener elevadas concentraciones de vitamina E, sintetizada casi exclusivamente en forma de α -tocoferol, mediante una vía biosintética similar a la descrita para las plantas superiores. Esta predominancia de la forma α , reconocida por sus propiedades antioxidantes, confiere a la biomasa algal un interés para su aplicación como conservante natural y como suplemento nutricional (Krajcovic et al., 2015).

3.1.3.1 β -1,3-glucano de reserva en *E. gracilis*: paramilon

En *E. gracilis*, el principal polisacárido de reserva es el paramilon, un β -1,3-glucano lineal no ramificado, que presenta una estructura helicoidal altamente organizada (Figura 37A). La acumulación de este polímero se incrementa en condiciones de exceso de sustratos en el medio y constituye la principal forma de almacenamiento de carbono de esta microalga en ambientes aeróbicos. En condiciones adversas, el paramilon se degrada fácilmente para sostener sus funciones celulares (Matsuda et al., 2011; Feregrino Mondragon, 2019; Muchut, 2020).

Uno de los primeros estudios que aplicó microscopía electrónica de grabado por congelación (*freeze-etching*) al análisis de paramilon, confirmó la elevada cristalinidad de los gránulos maduros del polímero (Figura 37B). Esta se atribuyó al empaquetamiento ordenado de sus microfibrillas elementales en agregados supramoleculares, en contraste con la disposición menos organizada observada en los gránulos inmaduros (Kiss et al., 1988). Estos autores también confirmaron que la distribución de los gránulos de paramilon está condicionada por el tipo de cultivo. En medios autotróficos, los gránulos se acumulan mayormente en regiones cercanas al pirenoide, mientras que en condiciones heterotróficas se dispersan a lo largo de todo el citoplasma celular (Kiss et al., 1986)

Como se mencionó previamente, además, el paramilon puede transformarse en ésteres de cera en condiciones anaeróbicas, compuestos que han sido propuestos como materia prima para la producción de biodiésel, así como para aplicaciones industriales en lubricantes, velas y cosméticos (Papadaki et al., 2017; Gissibl et al., 2019).

El paramilon ha sido ampliamente investigado por sus aplicaciones nutracéuticas y biomédicas. Diversos estudios han demostrado su capacidad inmunomoduladora, incluyendo la regulación de la respuesta frente a patógenos (Levine et al., 2013; Nakashima et al., 2017), la modulación de factores inflamatorios en linfomonocitos (Russo et al., 2016) y su acción en la cicatrización de heridas mediante la inhibición de procesos inflamatorios (Yasuda et al., 2020). También se han reportado efectos beneficiosos en modelos de daño hepático (Sugiyama et al., 2009; Nakashima et al., 2019), dermatitis atópica (Sugiyama et al., 2010) y artritis (Suzuki et al., 2018). Actualmente, el paramilon se comercializa como suplemento alimenticio o prebiótico en Estados Unidos y Japón (Barsanti & Gualtieri, 2018; Gulk et al., 2023).

Asimismo, su suplementación en dietas de animales también ha demostrado tener efectos inmunoestimulantes y reguladores, documentados en pollos de engorde (Levine et al., 2018) y en peces como el corvinón rojo (*Sciaenops ocellatus*) (Yamamoto et al., 2018).

Finalmente, el paramilon se ha propuesto como precursor para la síntesis de biomateriales. Su singular estructura helicoidal le confiere propiedades mecánicas y térmicas distintivas respecto de otros polisacáridos (Krajcovic et al., 2015; Muchut, 2020). Sin embargo, su implementación requiere modificaciones químicas específicas. Por ejemplo, mediante la incorporación de grupos acilo se obtuvo un material termoplástico comparable a las resinas derivadas del petróleo (Shibakami et al., 2014), por otro lado, su procesamiento ha posibilitado la creación de nanofibras basadas en paramilon (Shibakami et al., 2013).

La acumulación de carbohidratos totales puede alcanzar valores comprendidos entre el 8 % y el 59 % de la biomasa seca cuando la microalga se cultiva en condiciones autotróficas (Suzuki et al., 2015; Suzuki et al., 2018; Casas-Arrojo et al., 2022; Asiandu et al., 2023). Sin embargo, bajo determinadas condiciones, el paramilon se acumula en las células de *Euglena* en cantidades significativas entre el 35 y el 80 % del peso seco (Barsanti et al., 2001; Sun et al., 2018b; Hasan et al., 2019; Muchut, 2020; Gulk et al., 2023).

Matsuda et al. (2011) sugirieron que la acumulación de paramilon podía optimizarse modulando variables del cultivo, como el nivel de suplemento de nitrógeno, el tipo de fuente de carbono y la intensidad de aireación. Mientras determinados sustratos orgánicos como el etanol y la glucosa estimularon significativamente tanto el crecimiento algal como el incremento intracelular de paramilon, la glicina no estimuló el crecimiento, pero sí aumentó la acumulación de este polisacárido (Gulk et al., 2023). En otro estudio realizado a mayor escala, bajo condiciones de mixotrofia las algas mostraron indicadores de mejor viabilidad celular, alcanzando un rendimiento máximo de biomasa

de 86 g L⁻¹, mientras que el contenido de paramilon fue superior en las condiciones heterotróficas, alcanzando hasta un 78 % de la biomasa seca (Wu et al., 2021). Entre los valores más elevados documentados, la acumulación de paramilon ha sido favorecida principalmente por condiciones de cultivo heterotróficas (Barsanti et al., 2001; Matsuda et al., 2011; Sun et al., 2018b; Hasan et al., 2019) y, en menor medida, por condiciones mixotróficas (Fan et al., 2022; Gulk et al., 2023).

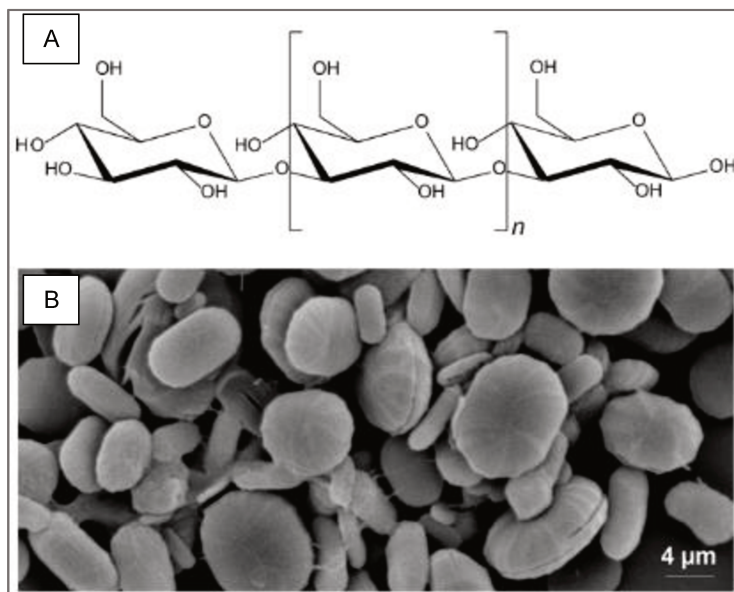


Figura 37: A) Estructura molecular de paramilon: cadena lineal de β -1,3-glucano. B) Micrografía de gránulos de paramilon, obtenida con microscopía electrónica de barrido (SEM). Adaptado de Gissibl et al. (2019).

3.1.4 Biorremediación de aguas residuales con *E. gracilis*

El estudio de microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* para el tratamiento de aguas residuales se encuentra ampliamente documentado (de Cassia Soares Brandão et al., 2023; Schmuck et al., 2025a, 2025b), mientras existen menos investigaciones centradas específicamente en *E. gracilis*. Como se mencionó previamente, se ha recurrido a la suplementación con fuentes de carbono en cultivos mixotróficos para incrementar la biomasa o la producción de metabolitos; sin embargo, este enfoque aumenta los costos operativos del cultivo. En contraste, los efluentes y subproductos orgánicos provenientes de diversas actividades industriales o urbanas se proponen como una alternativa rentable para aportar carbono y nutrientes al medio (Rubiyatno et al., 2021; Asiandu et al., 2023).

La versatilidad fisiológica de *E. gracilis* le permite crecer en medios compuestos por aguas residuales, incluso en presencia de amplias variaciones de pH o contaminantes

diversos. Asiandu et al. (2023) demostraron que *Euglena* sp. creció en medios con hasta 75 % v/v de aguas residuales provenientes de la producción de tofu, en un rango de pH de 5 a 7, alcanzando una biomasa máxima de 4,5 g L⁻¹. Además, mostró mayor tolerancia que *Scenedesmus* sp., cuyo crecimiento se inhibió al 40% de dicho efluente (Elystia et al., 2020). *Euglena gracilis* también toleró concentraciones elevadas de fosfato (14 mg L⁻¹) y amoníaco (90 mg L⁻¹) en estudios que emplearon aguas residuales sintéticas (Nezbrytska et al., 2022). Por otro lado, en ARU enriquecidas con diferentes residuos orgánicos como melaza, licor de maceración de maíz, y subproducto vinícola, *E. gracilis* logró crecer e incluso aumentar significativamente la producción de paramilon. No obstante, el mayor contenido celular de este polisacárido (67,7 %) se observó en condiciones de baja productividad (0,048 g L⁻¹ d⁻¹), lo que se atribuyó a la reducida biomasa final del cultivo (Rubiyatno et al., 2021). Feregrino Mondragon (2019) también reportó altas densidades celulares en presencia de subproductos de desecho con glucosa, glutamato y etanol, obteniendo valores de 2,5 x 10⁶ cél mL⁻¹ en condiciones aerobias.

En cuanto a estudios de biorremediación, se reportan escasos trabajos que evalúen la capacidad de *E. gracilis* de remover nutrientes inorgánicos u orgánicos. En aguas residuales porcinas se obtuvieron eficiencias de remoción entre 20 y 40% para fósforo y entre 60 y 100% para nitrógeno, obteniendo los máximos valores inyectar dióxido de carbono durante el cultivo (Jutidamrongphan et al., 2015), mientras, en ARU se reportaron remociones de entre 80% y 100% de nitrógeno y de fósforo (Mahapatra et al., 2013; Kuroda et al., 2018). En este último estudio, el cultivo alcanzó densidades 1,5 veces superiores en un efluente primario con respecto a un efluente secundario (6,3 x 10⁻³ cél mL⁻¹), junto con una disminución de la DQO (Kuroda et al., 2018).

Considerando su capacidad para crecer en distintos tipos de aguas residuales, tolerar altas cargas orgánicas e inorgánicas y producir compuestos de interés, como el paramilon, en este estudio se propone *E. gracilis* como una microalga con potencial en la producción biotecnológica y la biorremediación.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Estudiar el potencial del cultivo de *Euglena gracilis* para obtener biomasa con fines de: biorremediación de ARU, y obtención de moléculas de interés biotecnológico.

3.2.2 Objetivos Específicos

Cultivar la microalga *E. gracilis* a escala de laboratorio.

Evaluar las condiciones fisiológicas del cultivo mediante la determinación de densidad celular, biovolumen, producción de pigmentos fotosintéticos y concentración de biomarcadores de estrés oxidativo.

Evaluar la capacidad de *E. gracilis* para biorremediar ARU, mediante la determinación de DBO, DQO, nutrientes y bacterias coliformes (totales y fecales).

Evaluar la presencia y concentración de compuestos de interés biotecnológico en la biomasa obtenida tras la biorremediación: carbohidratos y paramilon.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Materiales y reactivos

Las consideraciones generales referidas a la calidad de los reactivos, la preparación de soluciones y buffers, el lavado del material de vidrio y las condiciones de esterilidad fueron las mismas que las descritas en la sección 2.3.1 del capítulo 2. En síntesis, se emplearon reactivos de grado analítico, soluciones preparadas con agua Milli-Q y el material de laboratorio previamente lavado con ácido nítrico al 10 % v/v durante 72 h, enjuagado con agua Milli-Q y esterilizado en autoclave antes de su uso.

Para el cultivo de *E. gracilis*, se utilizó el medio Cramer & Myers (C&M), cuya composición por litro se detalla a continuación: 0,8 g de $C_6H_5O_7Na_3$; 1 g de KH_2PO_4 ; 1 g de $(NH_4)_2HPO_4$; 0,2 g de $MgSO_4$; 0,02 g de $CaCl_2$, 0,0073 g de $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$; 0,0004 g de $ZnSO_4$; 0,0018 g de $MnCl_2$; 0,00002 g de Na_2MoO_4 ; 0,0018 g de $CoCl_2$; 0,00002 g de $CuSO_4$; 0,00001 g de tiamina; 5×10^{-7} g de cianocobalamina (Cramer & Myers, 1952). El instrumental empleado fue el mismo que el listado en el capítulo 2.

3.3.2 Cepa de microalga y condiciones de cultivo stock

Euglena gracilis (cepa UTEX 753) fue suministrada por el Laboratorio de Enzimología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), con procedencia original del algario de la Universidad de Texas (USA).

La cepa fue inicialmente acondicionada en la cámara de incubación en pequeños volúmenes (hasta 25 mL), cultivada en botellas de cultivo bajo condiciones controladas de iluminación ($80 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 23 ± 2 °C, conforme a las condiciones reportadas por Muchut (2020), empleando el medio de cultivo C&M.

Luego de su adaptación inicial, los cultivos fueron transferidos a la sala de cultivo y progresivamente escalados a volúmenes mayores (hasta 100 mL), en Erlenmeyers de 100 y 250 mL, manteniendo el medio C&M y las mismas condiciones de iluminación,

fotoperíodo y temperatura. Todas las etapas de adaptación y los ensayos experimentales se desarrollaron en el Laboratorio de Ecotoxicología (FHUC-UNL).

3.3.3 Recolección y caracterización de ARU

Para los ensayos experimentales correspondientes a este capítulo se utilizaron muestras de ARU procedentes de la PTSJ. La recolección se efectuó en el efluente de salida de las LFS, previo a la etapa de cloración. Durante la toma de muestras se registraron *in situ* la temperatura, OD, SPC y pH, mediante un equipo multiparamétrico YSI Professional Plus. La caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras se realizó siguiendo los procedimientos establecidos en la sección 1.3.3 del capítulo 1.

3.3.4 Crecimiento de *E. gracilis* en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal

Optimización de densidad algal inicial

Previo a la aplicación del protocolo de inhibición de crecimiento algal establecido por la Guía 201 de la OECD (OECD, 2011), se realizaron ensayos preliminares con el propósito de determinar una densidad celular inicial adecuada para *E. gracilis*. De acuerdo con los criterios de validez del protocolo, el cultivo control debe exhibir un incremento mínimo de un factor de 16 respecto de la densidad inicial.

Bajo las condiciones utilizadas para *C. vulgaris* (1×10^4 cél mL⁻¹), *E. gracilis* no alcanzó el incremento requerido. Considerando que la Guía 201 admite el empleo de inóculos menores para evitar limitaciones por agotamiento temprano de nutrientes, se evaluaron tres densidades iniciales en medio C&M: $1,5 \times 10^3$; $2,5 \times 10^3$ y 5×10^3 cél mL⁻¹ (tres réplicas por tratamiento). Los cultivos se mantuvieron en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de volumen efectivo, bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura detalladas en la sección 3.3.2. del presente capítulo.

Los cultivos fueron monitoreados diariamente mediante conteo directo en cámara de Neubauer hasta verificar el cumplimiento del incremento mínimo establecido. Dado que *E. gracilis* no se encuentra incluida en el Anexo 2 de la Guía 201, y conforme a lo establecido por dicha guía para otras microalgas, la duración del ensayo de inhibición del crecimiento algal se extendió hasta 8 días.

Evaluación del crecimiento algal

Para el ensayo de inhibición del crecimiento algal se empleó una densidad inicial de 5×10^3 cél mL⁻¹, definida como condición experimental para *E. gracilis*. El diseño general siguió el esquema aplicado para *C. vulgaris* (capítulo 2), con algunas adaptaciones.

Las muestras de ARU fueron filtradas y centrifugadas conforme al procedimiento detallado en la sección 2.3.4 del capítulo 2. Se prepararon cinco concentraciones de ARU (expresadas como % v/v): 10 %, 20 %, 40 %, 80 % y 100 %, diluidas en medio C&M, además de un control constituido únicamente por medio C&M. Cada tratamiento se realizó por triplicado en Erlenmeyer de 250 mL con volumen efectivo de 100 mL.

Se cuantificaron nitrato, nitrito, amonio y fósforo al inicio del ensayo, en cada tratamiento, aplicando las metodologías estandarizadas (sección 1.3.3, capítulo 1). Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones experimentales específicas para *E. gracilis* (Muchut, 2020): $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad), y temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los recuentos celulares diarios se efectuaron en cámara de Neubauer utilizando los cuadrados de mayor área, siguiendo la adaptación propuesta por Arredondo-Vega & Voltolina (2007) para células de tamaño superior a $6 \mu\text{m}$. La tasa específica de crecimiento, el DT y el I% se calcularon mediante las ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3 del capítulo 2.

El volumen celular se determinó al inicio y al final del ensayo aplicando la fórmula correspondiente a microorganismos de morfología elipsoidal (ecuación 16) según Hillebrand et al. (1999), y posteriormente se estimó el biovolumen mediante la ecuación 7 del capítulo 2.

$$V(\mu\text{m}^3) = \frac{\pi}{6} \times w^2 \times L \quad (16)$$

donde: w =ancho de la célula (μm); y L =longitud de la célula (μm).

Evaluación del estado fisiológico

Al finalizar el ensayo de inhibición del crecimiento algal, el estado fisiológico de *E. gracilis* se evaluó mediante la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y biomarcadores de estrés oxidativo. Para ello, en cada réplica experimental ($n = 3$) se aplicaron exactamente los mismos procedimientos analíticos correspondientes a *C. vulgaris* y detallados en la sección 2.3.4 del capítulo 2.

Se determinaron las concentraciones de clorofila-a, clorofila-b y carotenoides mediante extracción con acetona y lectura espectrofotométrica, utilizando las ecuaciones previamente establecidas (8, 9 y 10, capítulo 2). A partir de estos valores se calcularon los índices derivados (CR y PI) siguiendo las mismas fórmulas allí especificadas (11 y 12, capítulo 2).

Asimismo, la biomasa algal de cada réplica fue cosechada y procesada siguiendo el procedimiento detallado en el capítulo 2 para la determinación de las actividades enzimáticas de CAT y GST, así como para la estimación de MDA. Las condiciones de extracción, los buffers utilizados, los procedimientos espectrofotométricos y el

tratamiento de datos empleados para las determinaciones de CAT, GST y MDA fueron idénticos a los descritos en la sección 2.3.4 del capítulo 2.

Evaluación de acumulación de paramilon en *E. gracilis*

Con el propósito de determinar la presencia de compuestos de reserva, se cuantificó el paramilon (%) acumulado por *E. gracilis* al finalizar el ensayo de inhibición del crecimiento algal. Para este análisis, se aplicó un protocolo de extracción y purificación adaptado de Muchut et al. (2021) y Fukuda et al. (2024). A su vez, se determinó la biomasa (expresada en g L⁻¹) siguiendo el método descrito por Ratha et al. (2016) (ver sección 2.3.5 del capítulo 2), para facilitar la expresión e interpretación del resultado de paramilon.

Para cada réplica, se recuperaron $1,5 \times 10^6$ células, las cuales se sometieron a tres lavados sucesivos con agua destilada. El pellet resultante se resuspendió en 500 µL de NaOH 0,1 M, se homogeneizó con vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó posteriormente a 8600 rpm durante 5 minutos, separándose la fracción soluble de la insoluble enriquecida en paramilon. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se lavó repetidamente con agua destilada hasta alcanzar pH cercano a la neutralidad.

La purificación se completó mediante lavados sucesivos con la mezcla hexano:agua (1:1), destinados a remover compuestos hidrofóbicos residuales. Finalmente, el pellet se lavó nuevamente con agua destilada hasta obtener un material blanco homogéneo (ver Figura 38). El paramilon obtenido se secó en estufa a 50 °C hasta alcanzar peso constante.

La cuantificación se efectuó siguiendo el método de fenol-ácido sulfúrico de DuBois et al. (1956), de acuerdo con la adaptación propuesta por Purkayastha et al. (2017), utilizando glucosa como estándar. Para expresar los valores de paramilon como masa del polisacárido, se aplicó el factor estequiométrico 162/180 que corrige la diferencia entre la masa molar de la glucosa libre y unidad anhidra del polímero (Sluiter et al., 2021; Fukuda et al., 2024).

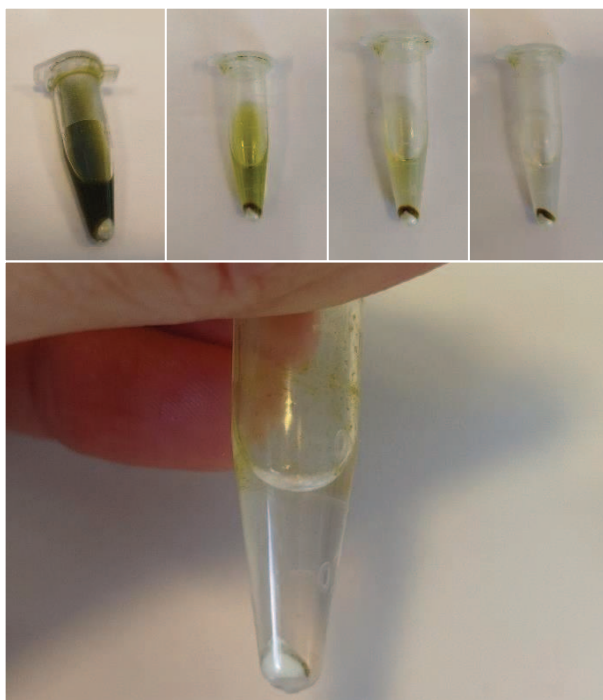


Figura 38: Fotografías tomadas de las primeras pruebas de la secuencia experimental del procedimiento de extracción y purificación de paramilon: desde etapa inicial de extracción hasta la obtención del pellet blanco, previo al secado en estufa.

3.3.5 Ensayo de biorremediación de ARU con *E. gracilis*

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se seleccionó la concentración de 80% de ARU para el ensayo de biorremediación con *E. gracilis*. Las muestras de ARU se procesaron siguiendo el mismo procedimiento de filtración y centrifugación empleado en el ensayo con *C. vulgaris* (sección 2.3.4 del capítulo 2).

El diseño experimental incluyó un cultivo control autotrófico en medio C&M, manteniendo las condiciones de cultivo específicas para *E. gracilis*: iluminación de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad) y temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Los tratamientos se realizaron por triplicado, empleando Erlenmeyers de 250 mL con un volumen efectivo de 250 mL, inoculados con una densidad inicial de $5 \times 10^4 \text{ cél mL}^{-1}$ (Muchut, 2020).

La densidad algal (cél mL^{-1}) se determinó diariamente mediante conteo en cámara de Neubauer. A partir de la evolución del cultivo control y de resultados previos, se establecieron dos tiempos de muestreo: un tiempo intermedio T1 (día 7), correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, y un tiempo final T2 (día 10), coincidente con el inicio de la fase estacionaria. A fin de evaluar el estado fisiológico de las microalgas en cada momento de muestreo, se determinaron los pigmentos

fotosintéticos ($\mu\text{g c\acute{e}l}^{-1}$) y los índices derivados (CR y PI), siguiendo las metodologías descritas para *C. vulgaris* (sección 2.3.4 del capítulo 2).

Adicionalmente, en cada tiempo de muestreo se monitorearon los siguientes parámetros fisicoquímicos, en ambos cultivos: pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), OD (mg L^{-1}), SPC ($\mu\text{S cm}^{-1}$), sólidos disueltos totales (SDT; mg L^{-1}), con un equipo multiparamétrico YSI Professional Plus.

Eficiencia de remoción de compuestos

La evaluación del proceso de remediación de las ARU se realizó mediante la determinación de los mismos parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos empleados en el estudio con *C. vulgaris*: DQO, DBO_5 , nutrientes inorgánicos (nitrato, nitrito, amonio y fósforo) y bacterias coliformes totales y fecales. Las determinaciones se realizaron en T0 (inicio del ensayo), T1 (día 7) y T2 (día 10), aplicando los procedimientos estandarizados descritos en la sección 1.3.3 del capítulo 1. Los valores obtenidos se compararon con la normativa vigente (Ley N° 11.220 de la provincia de Santa Fe), cuyos límites regulatorios se presentan en la Tabla 1 del capítulo 1.

Le eficiencia de remoción para cada parámetro determinado en las ARU se calculó para los tiempos de muestreo T1 y T2, mediante la ecuación 1 (capítulo 1).

3.3.6 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon en la biomasa de *E. gracilis*

En los tiempos de muestreo T1 y T2 se analizaron, tanto en los cultivos control como en los cultivos con ARU, i) la biomasa algal (g L^{-1}), ii) los carbohidratos totales (%) y iii) el contenido de paramilon (%). El procedimiento de cuantificación de biomasa fue el mismo que el descrito para *C. vulgaris* (sección 2.3.5 del capítulo 2). La determinación de carbohidratos se realizó según el método de DuBois et al. (1956), adaptado por Purkayastha et al. (2017), y el paramilon se cuantificó según lo detallado en la sección 3.3.4 del presente capítulo.

3.3.7 Bioensayo de fitotoxicidad aguda de las ARU tratadas

El potencial uso agrícola del efluente obtenido tras el cultivo mixotrófico de *E. gracilis* se evaluó mediante un bioensayo de fitotoxicidad aguda utilizando semillas de *L. sativa*. El procedimiento experimental se desarrolló siguiendo el protocolo previamente descrito para *C. vulgaris* (capítulo 2, sección 2.3.7). El efluente empleado correspondió a las ARU-T recuperadas luego de la cosecha de la biomasa algal.

Se analizaron los dos tiempos experimentales definidos para *E. gracilis*: T1 (día 7) y T2 (día 10). Para cada tiempo se prepararon las siguientes diluciones de ARU-T

(expresadas en % v/v): 6,2 %; 12,5 %; 25 %; 50 % y 100 %. Como medio diluyente se utilizó el medio APHA (Rice & Bridgewater, 2012), también empleado para los controles negativos. Las condiciones de incubación fueron idénticas a las detalladas en el capítulo 2.

Los puntos finales evaluados fueron: germinación, longitud de la radícula (mm) y longitud del hipocótilo (mm). Los índices de fitotoxicidad (RSG, RRG y GI) se calcularon siguiendo las ecuaciones presentadas en el capítulo 2 (ecuaciones 13, 14 y 15).

3.3.8 Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos correspondientes a *E. gracilis* se desarrolló siguiendo el mismo criterio metodológico aplicado para *C. vulgaris* (capítulo 2, sección 2.3.8). El procesamiento de datos y la elaboración de gráficos se realizaron con los softwares SigmaPlot 12.0 y OriginPro 9.

La selección de los métodos estadísticos respondió a la verificación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para comparaciones entre dos grupos de datos se utilizó la prueba *t* de dos colas o, cuando no se cumplieron los supuestos paramétricos, la prueba de Mann-Whitney. En comparaciones que involucraron más de dos grupos, se aplicó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett, o bien la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test *post hoc* de Dunn, según correspondía.

Adicionalmente, cuando la estructura del conjunto de datos lo permitió, se realizó un PCA, siguiendo los lineamientos utilizados en el capítulo anterior.

3.4 Resultados

3.4.1 Crecimiento de *E. gracilis* en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal

Optimización de densidad algal inicial

En la Figura 39 se presentan las curvas de crecimiento de *E. gracilis* en medio C&M durante 10 días, a partir de tres densidades celulares iniciales. Los cultivos establecidos con los dos mayores inóculos alcanzaron el incremento mínimo requerido por la Guía 201 (OECD, 2011). En el tratamiento con densidad inicial de $2,5 \times 10^3$ cél mL⁻¹ se registró una densidad final de $4,6 \times 10^4 (\pm 4,1 \times 10^3)$ cél mL⁻¹ al día 10 (incremento de 18,4 veces). Por su parte, el cultivo iniciado con 5×10^3 cél mL⁻¹ alcanzó $8,1 \times 10^4 (\pm 8,1 \times 10^3)$ cél mL⁻¹ al día 8 (incremento de 16,2 veces).

El tratamiento con mayor densidad inicial logró más rápidamente el incremento requerido y presentó una fase de adaptación más breve. Por lo tanto, se seleccionó 5×10^3 cél mL⁻¹ como densidad inicial para el ensayo de inhibición del crecimiento algal.

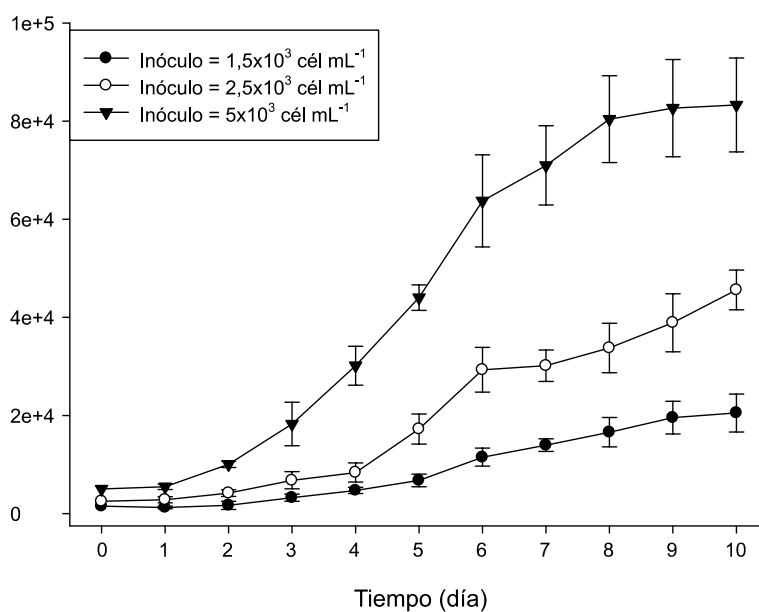


Figura 39: Curvas de crecimiento de *Euglena gracilis* en medio Cramer & Myers (C&M) obtenidas a partir de tres densidades iniciales: $1,5 \times 10^3$; $2,5 \times 10^3$ y 5×10^3 cél mL⁻¹. Barras de error: desviación estándar de $n = 3$.

Evaluación del crecimiento algal

En la Tabla 17 se presenta la caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las muestras de ARU que se utilizaron para los ensayos desarrollados en el presente capítulo. A partir de esta matriz, se prepararon los tratamientos experimentales con diferentes concentraciones de ARU (10 a 100 %), cuyas concentraciones iniciales de amonio, nitrato, nitrito y fósforo (ver fotografía de la Figura 40) se presentan en la Figura 41.

Tabla 17: Caracterización fisicoquímica y bacteriológica de aguas residuales urbanas (ARU).
 OD = Oxígeno disuelto; SPC = Conductividad específica; LC = Límite de cuantificación; LD = Límite de detección; DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅= Demanda biológica de oxígeno.

Parámetros	ARU
Temperatura	17,8 °C
OD	5,0 mg L ⁻¹
SPC	498 μS cm ⁻¹
pH	7,81
Cadmio	< LC (0,2 mg L ⁻¹ Cd)
Cromo	< LC (0,2 mg L ⁻¹ Cr)
Plomo	< LC (0,25 mg L ⁻¹ Pb)
Arsénico	0,015 mg L ⁻¹ As
Mercurio	< LC (0,002 mg L ⁻¹ Hg)
DQO	276,3 mg L ⁻¹ O ₂
DBO ₅	51,6 mg L ⁻¹ O ₂
Nitrato	282,3 mg L ⁻¹ N
Nitrito	5,9 mg L ⁻¹ N
Amonio	30,5 mg L ⁻¹ N
Fósforo	2,6 mg L ⁻¹ P
Sulfuros	< LD (0,02 mg L ⁻¹)
Bacterias coliformes totales	2,6 x 10 ⁴ NMP 100 mL ⁻¹
Bacterias coliformes fecales	5,0 x 10 ³ NMP 100 mL ⁻¹



Figura 40: Determinaciones de nutrientes al inicio del ensayo de inhibición del crecimiento algal. De izquierda a derecha: amonio (color azul claro), nitrato y nitrito (color rosado) y fósforo (color azul oscuro). De arriba hacia abajo: blancos y testigos, control, y tratamientos con aguas residuales urbanas (ARU) desde la menor hasta la mayor concentración.

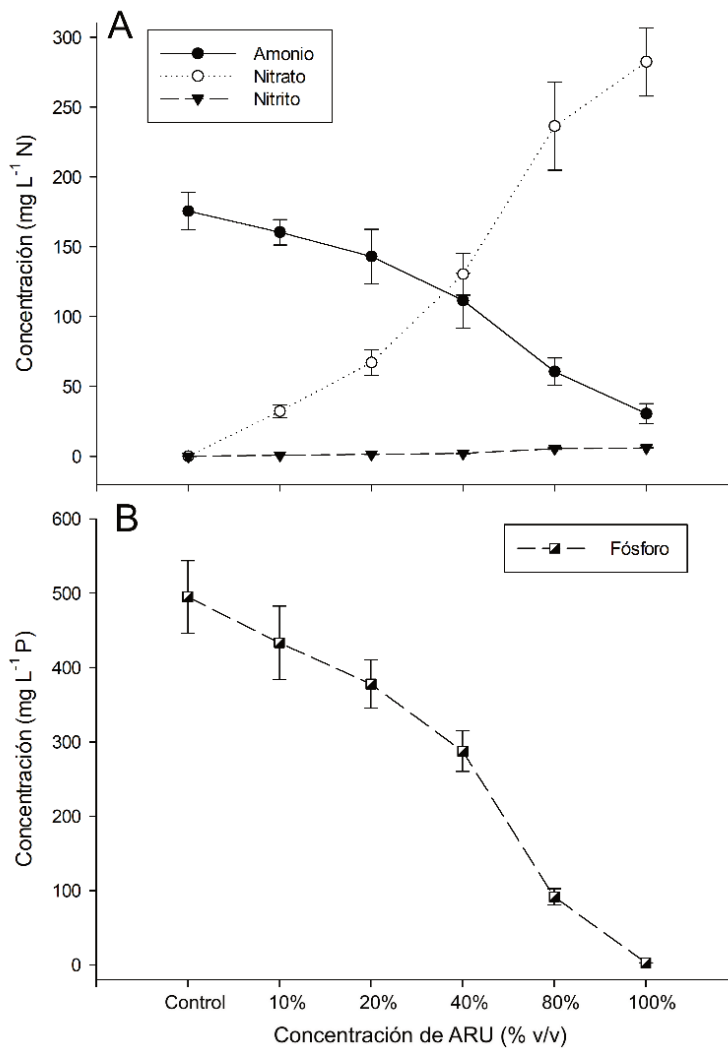


Figura 41: Concentraciones de amonio, nitrato, nitrito (expresadas como mg L⁻¹ N) (Fig. A), y fósforo (expresadas como mg L⁻¹ P) (Fig. B) en el control y los tratamientos con distintas concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU) al inicio del ensayo de inhibición del crecimiento algal.

En el cultivo control (medio C&M), las concentraciones de fósforo y amonio fueron máximas (495 ± 48 mg L⁻¹ P y 176 ± 13 mg L⁻¹ N, respectivamente) y disminuyeron progresivamente conforme aumentó la concentración de ARU. El tratamiento al 100% de ARU presentó las menores concentraciones de ambos nutrientes: $2,6 \pm 0,4$ mg L⁻¹ P, y 31 ± 7 mg L⁻¹ N en forma de amonio. Mientras, el nitrato y el nitrito estuvieron ausentes en el control, y aumentaron sostenidamente desde el tratamiento al 10 % hasta el 100 % de ARU. En este último, alcanzaron valores máximos de 282 ± 24 mg L⁻¹ N (en forma de nitrato) y $5,9 \pm 0,2$ mg L⁻¹ N (en forma de nitrito).

Las curvas de crecimiento de *E. gracilis* para todos los tratamientos del ensayo se exponen en la Figura 43, mientras que la Tabla 18 resume los parámetros celulares medidos al final del ensayo: densidad algal, tasa de crecimiento, DT, I%, y los parámetros morfológicos. Estos últimos se representan en la Figura 44.

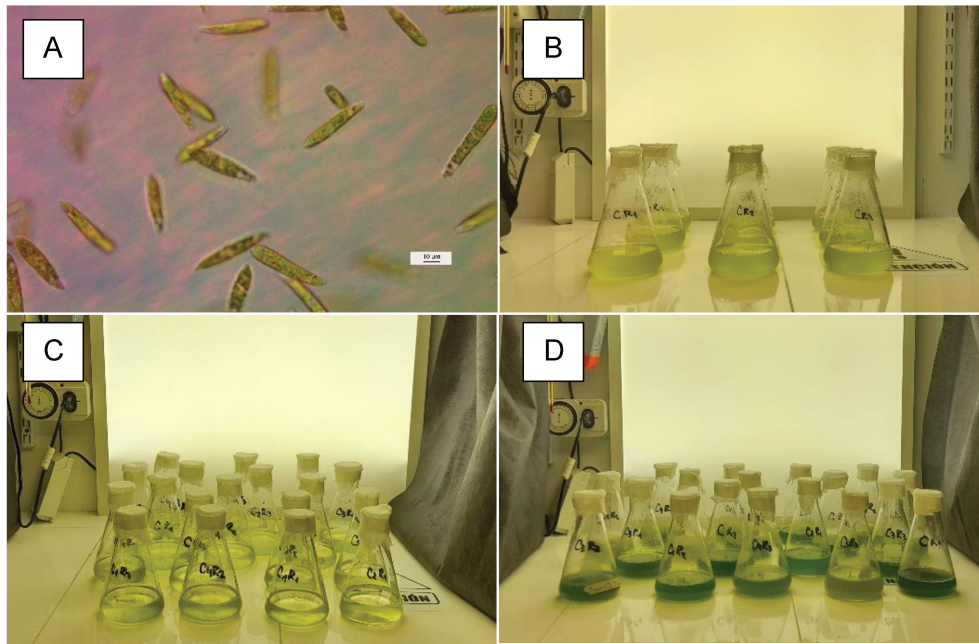


Figura 42: Fotografías tomadas durante los ensayos: inóculo de *Euglena gracilis*, luego de la adaptación a las condiciones del laboratorio (Fig. A); ensayo de optimización de densidad algal inicial (Fig. B); ensayo de inhibición del crecimiento algal a lo largo del tiempo (Fig. C y D).

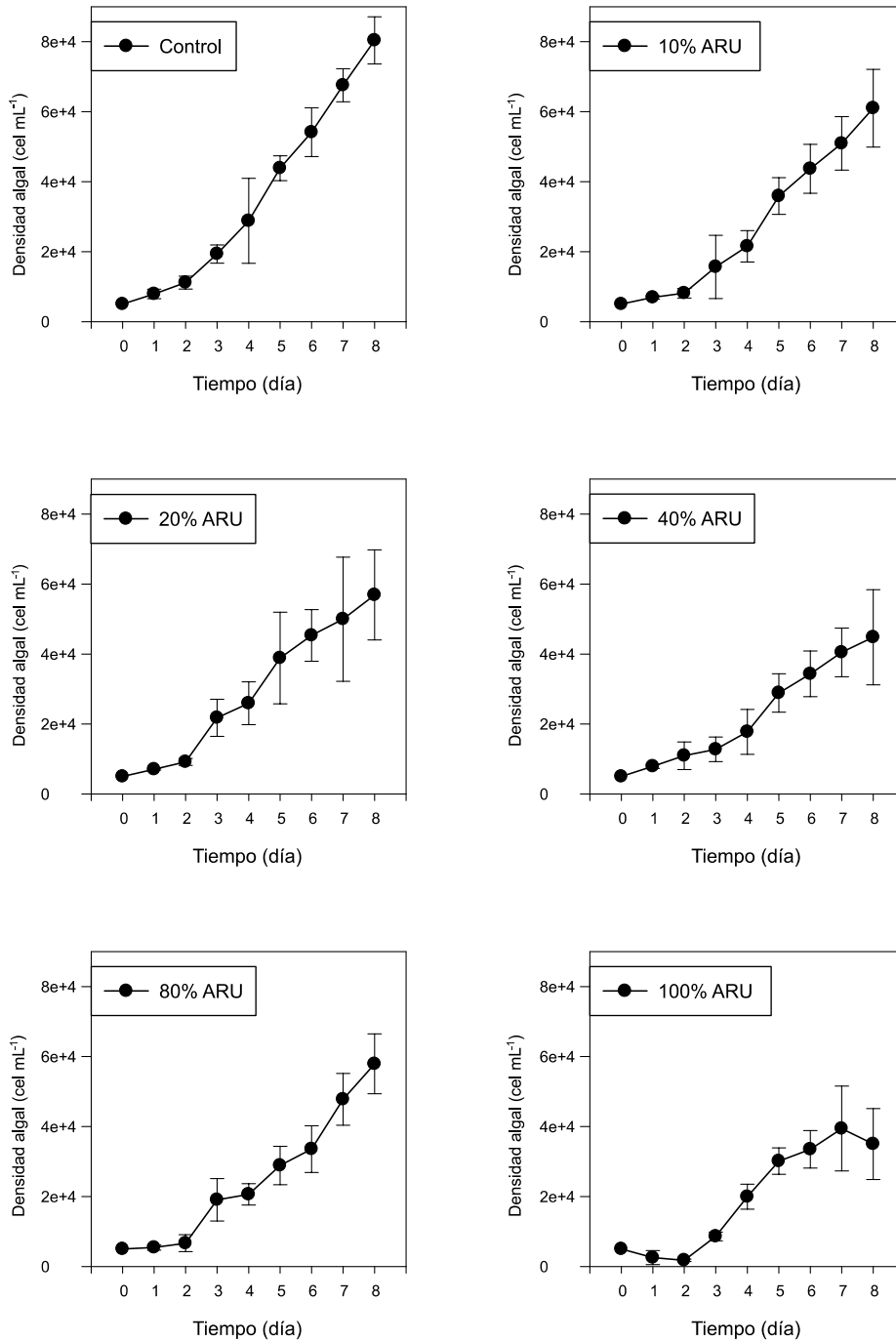


Figura 43: Crecimiento de *Euglena gracilis* en el control y en tratamientos con distintas concentraciones de ARU en el ensayo de inhibición del crecimiento algal. Barras de error: desviación estándar de n = 3.

Tabla 18: Parámetros de crecimiento de *Euglena gracilis* a los 8 días de cultivo en el ensayo de inhibición del crecimiento con aguas residuales urbanas (ARU): tasa específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (DT), inhibición del crecimiento (I%), ancho y longitud celular, volumen celular, densidad celular y biovolumen. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	μ (día ⁻¹)	DT (día)	I%	Célula				
				Ancho (μm)	Longitud (μm)	Volumen ($\times 10^3 \mu\text{m}^3$)	Densidad ($\times 10^4 \text{cél mL}^{-1}$)	Biovolumen ($\times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$)
0 (Control)	0,40 \pm 0,01	1,75 \pm 0,05	-	10,1 \pm 0,2	42 \pm 1	230 \pm 20	8,1 \pm 0,7	183 \pm 7
10	0,36 \pm 0,03	2,0 \pm 0,1	4,1	10 \pm 0	40,9 \pm 0,6	214 \pm 3	6 \pm 1	130 \pm 20
20	0,35 \pm 0,03	2,0 \pm 0,2	5,1	10 \pm 0	41 \pm 1	214 \pm 5	6 \pm 1	120 \pm 20*
40	0,31 \pm 0,05*	2,3 \pm 0,4	8,8	10,7 \pm 0,5	39,6 \pm 0,8*	240 \pm 30	5 \pm 1**	110 \pm 40**
80	0,35 \pm 0,02	2,0 \pm 0,1	4,8	10,3 \pm 0,2	40,7 \pm 0,8	224 \pm 6	5,8 \pm 0,9	130 \pm 20
100	0,27 \pm 0,05**	2,6 \pm 0,5*	12,3	10,5 \pm 0,6	39 \pm 2**	230 \pm 20	4 \pm 1**	80 \pm 30***

Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

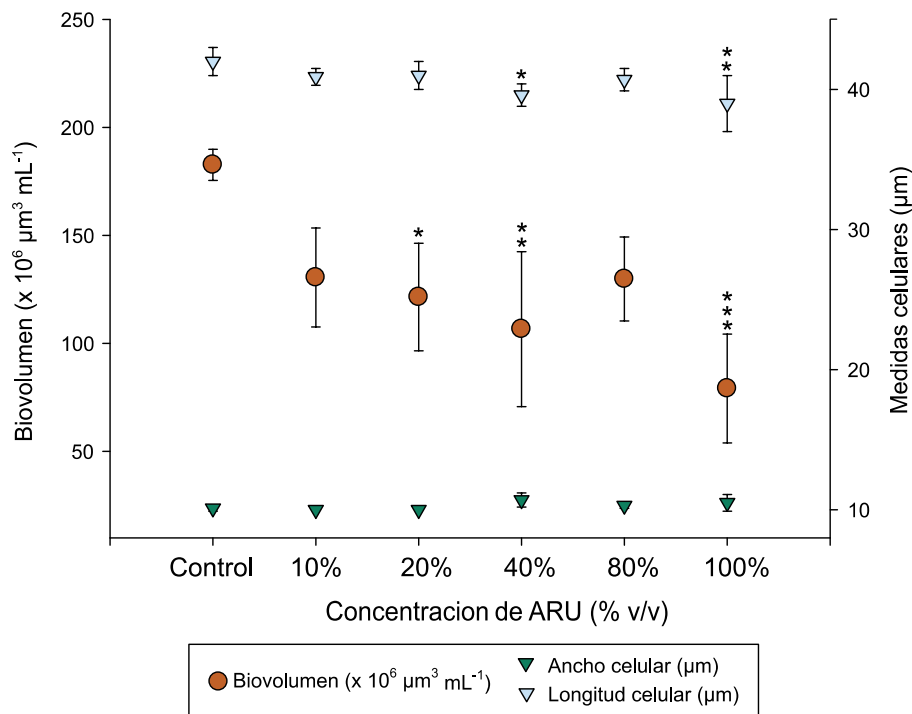


Figura 44: Parámetros morfométricos de *Euglena gracilis* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU) al final del ensayo de inhibición del crecimiento: biovolumen, ancho y longitud celular. Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

La mayor densidad celular se obtuvo en el cultivo control, seguida por los tratamientos con 10, 20 y 80 % ARU. Los tratamientos al 40 y 100% presentaron densidades significativamente inferiores al control (ANOVA: $F_{5,12} = 6,161$; $p = 0,005$), diferencias que fueron confirmadas en el test *post hoc*: $p = 0,007$ y $p = 0,001$, respectivamente. La tasa específica de crecimiento diaria mostró un patrón similar (ANOVA: $F_{5,12} = 4,875$; $p = 0,011$), con reducciones significativas en los tratamientos al 40 % ($p = 0,027$) y 100% ARU ($p = 0,003$). El DT registró sus valores más elevados en los tratamientos al 40 y 100% ARU, alcanzando significancia únicamente en este último (ANOVA: $F_{5,12} = 3,536$; $p = 0,034$; Dunnett: $p = 0,011$), lo que refleja un crecimiento más lento bajo esta condición.

La inhibición del crecimiento fue positiva en todos los tratamientos, con valores entre 4,1 % y 5,1 % en los tratamientos con 10, 20 y 80% ARU y alcanzando 8,8 % y 12,3 % en los cultivos al 40 % y 100%.

Respecto a los parámetros morfométricos, el biovolumen reflejó la tendencia observada en la densidad algal, al estar influenciado directamente por ésta. No se detectaron diferencias significativas en el volumen celular (ANOVA: $F_{5,12} = 0,872$; $p = 0,528$), ni en

el ancho celular (ANOVA: $F_{5,12} = 2,031$; $p = 0,146$), no obstante, se observó una tendencia al incremento del ancho con el aumento de la concentración de ARU. Por el contrario, la longitud celular sí presentó diferencias significativas en los tratamientos al 40 % y 100 %, con valores inferiores a los del control: ANOVA: $F_{5,12} = 3,942$; $p = 0,024$; Dunnett: $p = 0,026$ y $p = 0,007$, respectivamente.

Evaluación del estado fisiológico

En la Tabla 19 se detallan las concentraciones de pigmentos fotosintéticos, los índices derivados (CR y PI) y los biomarcadores de estrés cuantificados en *E. gracilis* al finalizar el ensayo con ARU. Las Figuras 45 y 46 ilustran gráficamente estos resultados.

La acumulación de pigmentos fotosintéticos mostró una tendencia general al aumento en los tratamientos al 10, 20 y 40 % ARU respecto del control. Las diferencias significativas se registraron en clorofila-a para los tratamientos al 10 % ($p = 0,0165$), 20 % ($p = 0,0178$) y 40 % ARU ($p = 0,0259$). En carotenoides, se observaron incrementos significativos en los cultivos al 20% ($p = 0,039$) y 40 % ARU ($p = 0,018$). Por su parte, en el tratamiento al 80 % ARU la clorofila-a y los carotenoides presentaron incrementos leves, mientras que la clorofila-b disminuyó; no obstante, ninguna de estas variaciones alcanzó significancia estadística. Finalmente, los cultivos en 100% ARU evidenciaron reducción en el contenido de clorofilas, con diferencias significativas en clorofila-b (ANOVA: $F_{5,12} = 9,781$, $p < 0,001$; Dunnett: $p < 0,006$), junto con un leve aumento de carotenoides que no alcanzó significancia ($p = 0,854$).

Los índices fotosintéticos reflejaron las variaciones observadas en los pigmentos. La CR aumentó progresivamente hasta el tratamiento al 80%, con valores que oscilaron entre 2,2 (control) y 4 (80% ARU). El PI, en cambio, se mantuvo estable entre estos cultivos (0,72-0,71), sin un patrón definido. No obstante, en el cultivo con 100% ARU ambos índices registraron incrementos notables: la CR superó 4 veces al control y el PI se incrementó aproximadamente 1,3 veces.

Luego se analizaron los biomarcadores de estrés oxidativo. Entre el control y los tratamientos 10 a 80% ARU no se registraron variaciones relevantes. En cambio, el tratamiento con 100 % ARU evidenció alteraciones significativas en los tres biomarcadores, lo que reflejó un compromiso fisiológico. La actividad de CAT disminuyó significativamente respecto del control (ANOVA: $F_{5,12} = 4,434$, $p = 0,016$; Dunnett: $p < 0,019$), mientras que la GST mostró un incremento pronunciado (ANOVA: $F_{5,17} = 13,76$, $p < 0,001$; Dunnett: $p < 0,001$). Asimismo, los niveles de MDA aumentaron ($p < 0,001$), indicando daño oxidativo celular. Como excepción al patrón general, el cultivo al 10 % ARU presentó un incremento significativo en la actividad de GST ($p = 0,025$).

Tabla 19: Parámetros fisiológicos de *Euglena gracilis* a los 8 días de cultivo en el ensayo de exposición a las aguas residuales urbanas (ARU). Pigmentos e índices fotosintéticos: clorofila-a, clorofila-b, carotenoides, relación de clorofilas (CR) e índice de pigmentos (PI); y marcadores moleculares: catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y malondialdehído (MDA). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	Pigmentos fotosintéticos					Marcadores moleculares			
	Clorofila-a (pg cél ⁻¹)	Clorofila-b (pg cél ⁻¹)	Carotenoides (pg cél ⁻¹)	CR	PI	Proteínas (pg cél ⁻¹)	CAT (μU/pg proteína)	GST (μU/pg proteína)	MDA (pmol cél ⁻¹)
0	47 \pm 2	22 \pm 8	34 \pm 3	2,2 \pm 0,6	0,72 \pm 0,04	63 \pm 9	12,01 \pm 0,04	0,008 \pm 0,002	0,00072 \pm 0,00004
10	63 \pm 2*	28,5 \pm 0,8	44 \pm 2	2,2 \pm 0,1	0,70 \pm 0,01	64 \pm 10	13 \pm 2	0,018 \pm 0,003*	0,00067 \pm 0,00003
20	65 \pm 5*	27 \pm 8	46 \pm 6*	2,4 \pm 0,6	0,71 \pm 0,04	67 \pm 8	11 \pm 3	0,014 \pm 0,004	0,00075 \pm 0,00006
40	72 \pm 3*	23 \pm 4	47 \pm 5*	3,2 \pm 0,4	0,65 \pm 0,04	61 \pm 8	12 \pm 4	0,010 \pm 0,001	0,00075 \pm 0,00005
80	50 \pm 7	12 \pm 5	35 \pm 7	4 \pm 1	0,71 \pm 0,04	59 \pm 8	11 \pm 3	0,010 \pm 0,003	0,00083 \pm 0,00002
100	39 \pm 8	4 \pm 0,6**	37,4 \pm 0,6	9 \pm 2***	0,97 \pm 0,03***	50 \pm 10	4 \pm 2*	0,029 \pm 0,007***	0,00095 \pm 0,00009***

Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

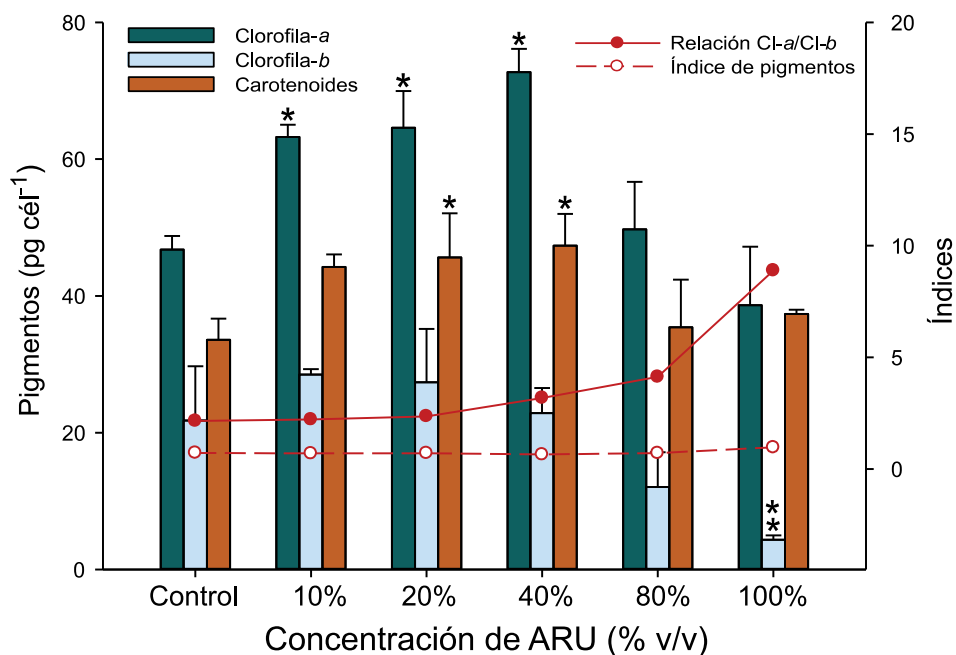


Figura 45: Pigmentos e índices fotosintéticos determinados en *Euglena gracilis* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU): clorofila-a, clorofila-b, carotenoides, relación de clorofilas e índice de pigmentos. Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01.

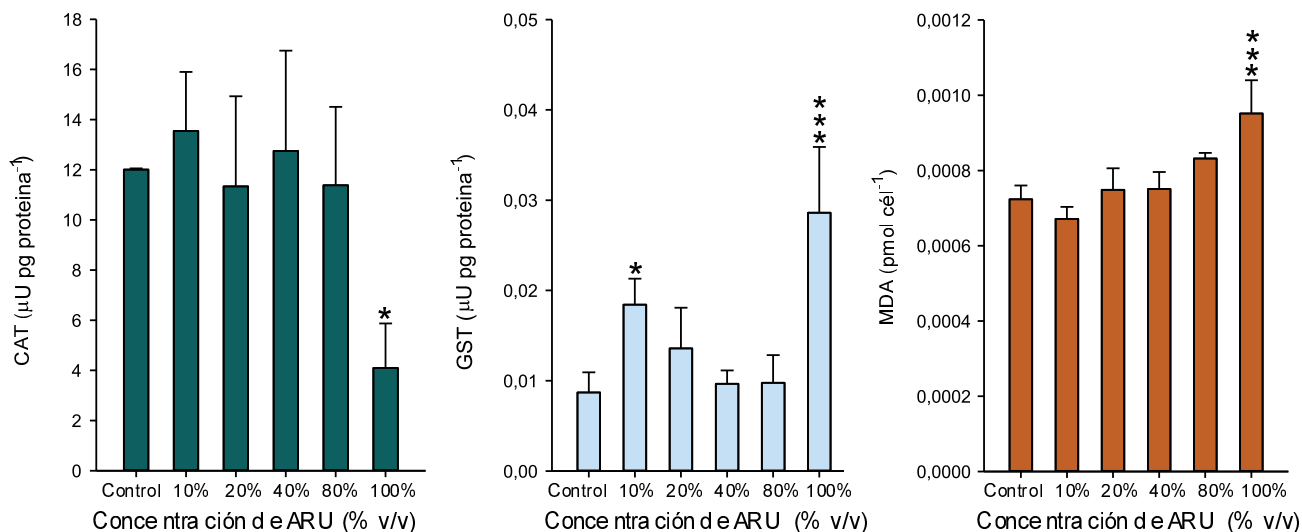


Figura 46: Marcadores moleculares determinados en *Euglena gracilis* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU): catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y malondialdehído (MDA). Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: * p < 0,05; *** p < 0,001.

Evaluación de acumulación de paramilon en *E. gracilis*

Al finalizar el ensayo, se cuantificó la biomasa algal de cada cultivo, y el contenido de paramilon en la biomasa cosechada. La Tabla 20 y la Figura 47 sintetizan los resultados obtenidos. El tratamiento al 100 % ARU mostró la mayor acumulación de paramilon (34 ± 1 %), valor que triplicó significativamente al control (ANOVA: $F_{5,17} = 71,399$, $p < 0,001$; Dunnett: $p < 0,001$), con baja variabilidad entre réplicas. Sin embargo, la biomasa algal por litro de cultivo fue inferior a los demás tratamientos, con diferencias significativas respecto del control (ANOVA: $F_{5,17} = 3,745$, $p < 0,028$; Dunnett: $p < 0,008$), lo que disminuye la productividad global del cultivo.

Por su parte, el tratamiento al 80 % ARU también presentó una elevada acumulación de paramilon (33 ± 4 %), con diferencias significativas respecto del control ($p < 0,001$). Aunque presentó mayor variabilidad entre sus réplicas, la biomasa final no difirió significativamente del control ($p = 0,673$).

Tabla 20: Biomasa algal (mg L^{-1}) y contenido de paramilon (%) de *Euglena gracilis* a los 8 días de cultivo con aguas residuales urbanas (ARU). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

ARU (%)	Biomasa algal (mg L^{-1})	Paramilon (%)
0 (Control)	52 ± 5	11 ± 1
10	41 ± 1	$12,4 \pm 0,3$
20	47 ± 7	13 ± 3
40	40 ± 3	$15 \pm 0,5$
80	46 ± 10	$33 \pm 4^{***}$
100	$33 \pm 3^{**}$	$34 \pm 1^{***}$

Diferencias significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

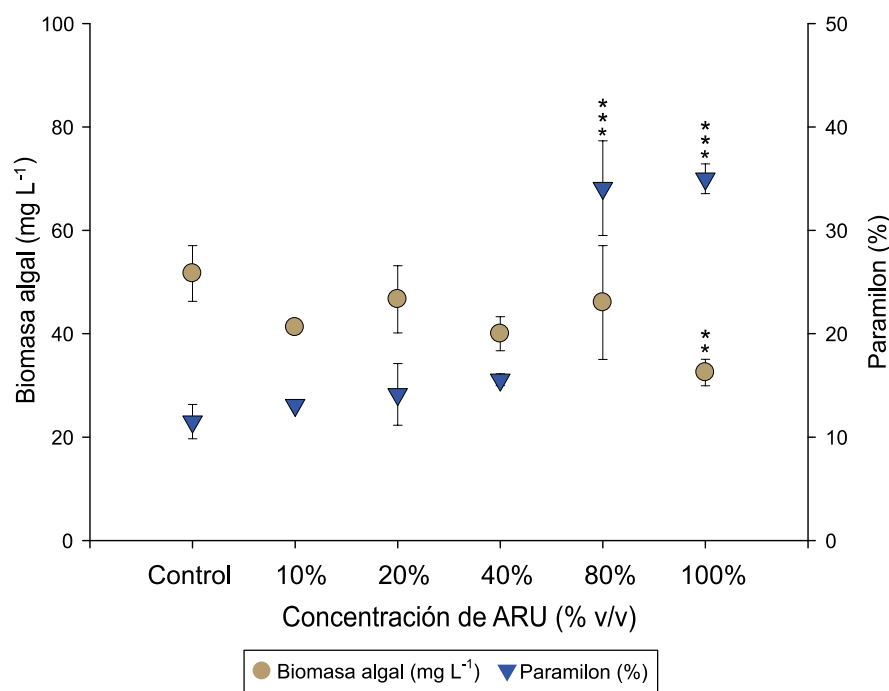


Figura 47: Biomasa algal y contenido de paramilon en *Euglena gracilis* expuesta a aguas residuales urbanas (ARU). Barras de error: desviación estándar de n = 3. Diferencias significativas: ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Finalmente se realizó un PCA integrando las 16 variables medidas en *Euglena gracilis* en este ensayo de inhibición algal. En el material suplementario se detallan los resultados del análisis, incluyendo los valores propios de la matriz de correlación junto con los porcentajes de varianza explicados por cada componente principal (Tabla S9) y los coeficientes de las variables para los dos componentes principales (Tabla S10).

El PC1 explicó el 46,29% de la variabilidad total de los datos y el PC2 el 17,81%, acumulando conjuntamente el 64,10% de la varianza. Esto indica que ambos componentes logran sintetizar las relaciones existentes entre el conjunto de variables estudiado (Figura 48).

El PC1 estuvo influido de manera positiva por variables asociadas al crecimiento y morfología celular: la tasa específica de crecimiento (0,32), la densidad algal (0,31), el biovolumen (0,30), la clorofila-b (0,29), biomasa (0,28) y la longitud celular (0,24). En contraste, presentó cargas negativas para el DT (-0,31), el MDA (-0,31), la actividad GST (-0,25) y el contenido de paramilon (-0,28). En conjunto, este componente representa un gradiente que parte desde condiciones de mayor crecimiento y biomasa hacia

condiciones caracterizadas por aumentos en biomarcadores de estrés oxidativo y acumulación de reservas.

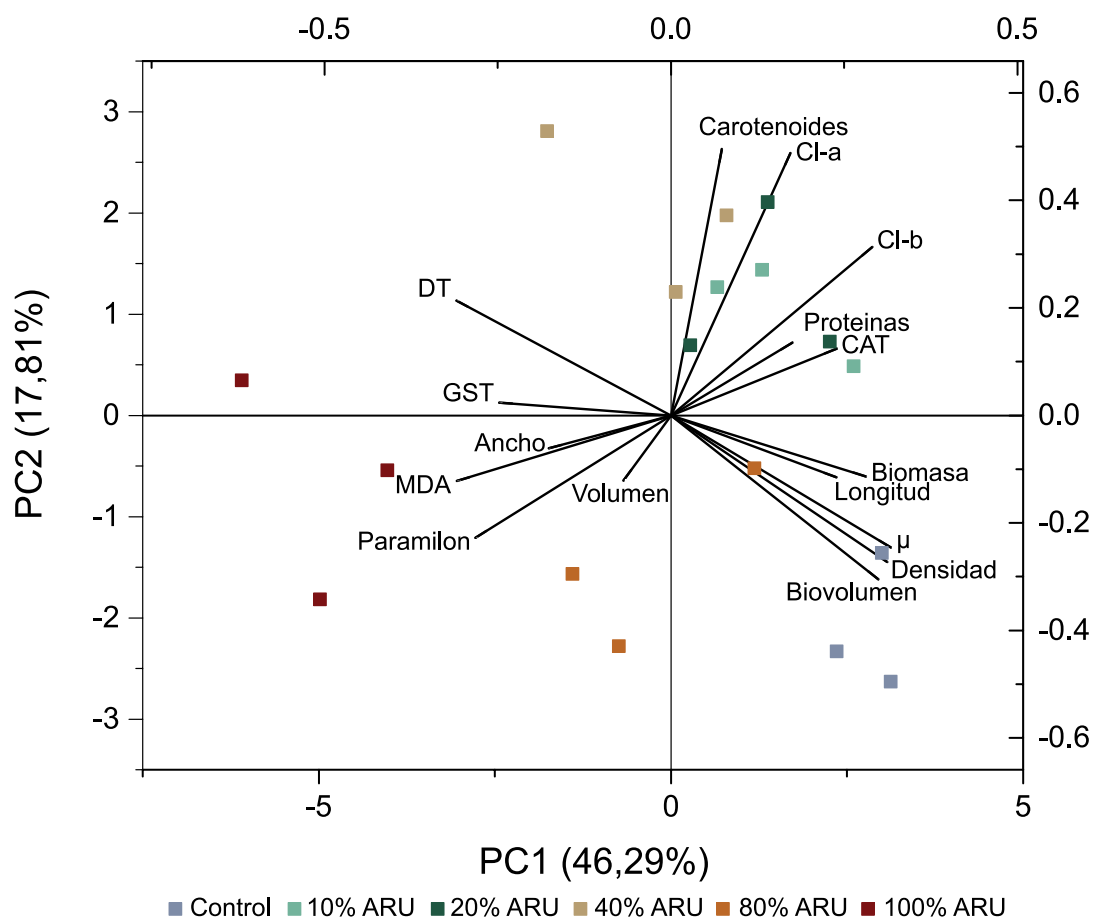


Figura 48: Biplot de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Euglena gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU). DT = tiempo de duplicación; μ = tasa específica de crecimiento; Cl-a = clorofila-a; Cl-b = clorofila-b; CAT = catalasa; GST = glutatión-S-transferasa; MDA = malondialdehído. Los ejes de la izquierda y abajo corresponden a los puntos de los tratamientos, y los ejes de la derecha y arriba corresponden a los vectores de las variables.

El PC2 presentó cargas positivas para los tres pigmentos fotosintéticos (con coeficientes de entre 0,31 y 0,50) y cargas negativas para algunas variables de crecimiento como densidad algal (-0,27), tasa de crecimiento (-0,25), biovolumen (-0,30), y también para el contenido de paramilon (-0,23). Este componente representa un gradiente pigmentario independiente del eje de crecimiento algal. En el biplot, las

réplicas del control se ubicaron en la región negativa del PC2 y positiva del PC1, coincidente con niveles moderados de pigmentos y altos indicadores de crecimiento.

Los tratamientos al 10 y 20 % ARU se ubicaron en las regiones positivas de ambos componentes, coincidiendo con las variables asociadas al crecimiento y a los pigmentos. Las réplicas del cultivo al 40 % ARU se distribuyeron en la región positiva del PC2, pero dispersas respecto del eje PC1. Por su parte, el tratamiento al 80% ARU se ubicó en la región negativa del PC2, y alrededor del origen del PC1, con cierta variabilidad entre las réplicas. Por último, las réplicas del tratamiento al 100 % se localizaron con claridad en la región negativa del PC1, asociándose con las variables vinculadas al estrés oxidativo y la acumulación de paramilon.

Se evaluaron de manera conjunta los resultados obtenidos, considerando los objetivos generales del presente capítulo, y se decidió realizar el ensayo posterior con la concentración de ARU de 80 %.

3.4.2 Ensayo de biorremediación de ARU con *E.gracilis*

La caracterización fisicoquímica y bacteriológica de las ARU utilizadas para el ensayo de biorremediación se expone en la Tabla 17. Los siguientes parámetros superaron los valores establecidos por la normativa provincial (valor medido > valor límite): DQO ($276,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2 > 125 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$), DBO₅ ($51,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2 > 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$), fósforo ($2,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ P} > 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$), amonio ($30,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ N} > 25 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$), coliformes totales ($2,6 \times 10^4 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1} > 5 \times 10^3 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) y coliformes fecales ($5 \times 10^3 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1} > 1 \times 10^3 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$). En contraste, los metales pesados analizados (Cd, Cr, Pb y Hg) no fueron detectados en las muestras, mientras que el arsénico se detectó en niveles inferiores al límite legal ($0,015 \text{ mg L}^{-1} \text{ As} < 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ As}$). Como se mencionó previamente, su presencia se asocia a las características geológicas locales (Blanco et al., 2012).

En base a los indicadores de carga orgánica, DQO y DBO₅, se calculó el IB, el cual fue 0,19. Este valor se corresponde con una baja biodegradabilidad del efluente.

Se registró diariamente la evolución de la densidad celular de *E. gracilis* en los cultivos control y mixotrófico (80% ARU), con el fin de elaborar las curvas de crecimiento correspondientes (Figura 49). En el cultivo control, la fase exponencial se extendió hasta aproximadamente el día 7, seleccionado como tiempo intermedio de muestreo (T1). Posteriormente, el cultivo culminó la fase estacionaria entre los días 9 y 10, cuando las tasas específicas de crecimiento registraron valores cercanos a cero o negativos (Tabla 21), y se definió el día 10 como tiempo final de muestreo (T2).

El cultivo mixotrófico presentó una fase de adaptación más prolongada, lo que retrasó el establecimiento de la fase exponencial y no permitió alcanzar una fase estacionaria claramente definida dentro del período experimental, aunque sí se observó desaceleración del crecimiento. Se realizaron los muestreos en los mismos días que en el cultivo control. A lo largo del ensayo, la densidad algal fue mayor en el cultivo control, con diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los días. Al finalizar el ensayo, el cultivo control alcanzó $5,6 (\pm 0,8) \times 10^5$ cél mL⁻¹, mientras que el cultivo mixotrófico registró $4 (\pm 1) \times 10^5$ cél mL⁻¹, si bien esta diferencia no resultó significativa ($t(4) = 2,151$, $p = 0,098$).

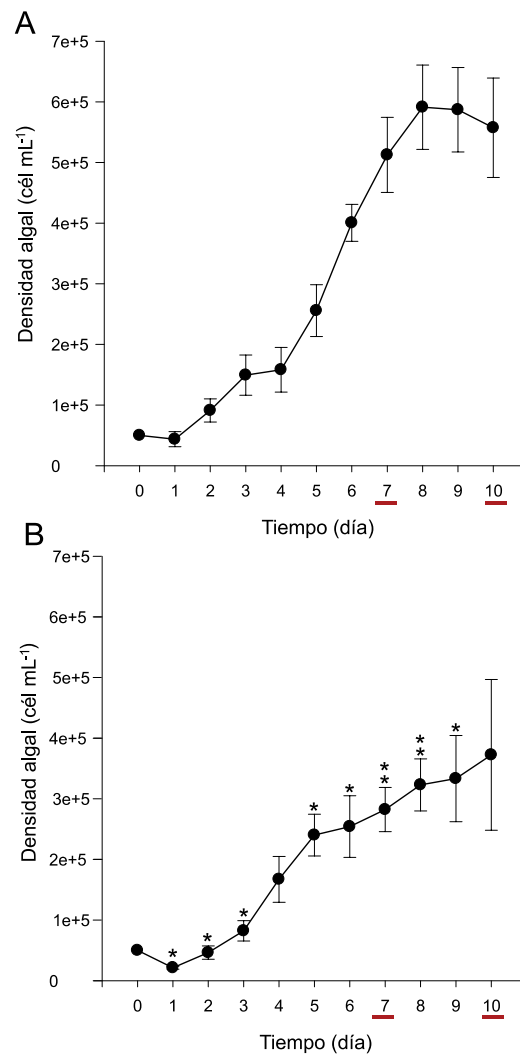


Figura 49: Curvas de crecimiento de *Euglena gracilis* en cultivo control (Fig. A) y en cultivo mixotrófico en 80% de aguas residuales urbanas (ARU) (Fig. B). Subrayados en rojo: tiempos de muestreo intermedios (T1) y finales (T2). Barras de error: desviación estándar de $n = 3$.

Tabla 21: Tasas específicas de crecimiento por día (día^{-1}) de *Euglena gracilis* en cultivo control y en cultivo mixotrófico en 80% de aguas residuales urbanas (ARU). Las tasas específicas de crecimiento se expresan como media \pm desviación estándar.

Tiempo (día)	Tasa de crecimiento específica (día^{-1})	
	Cultivo control	Cultivo mixotrófico
1	- 0,2 \pm 0,2	- 0,9 \pm 0,1
2	0,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
3	0,5 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3
4	0,1 \pm 0,2	0,7 \pm 0,4
5	0,5 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1
6	0,46 \pm 0,09	0,1 \pm 0,3
7	0,24 \pm 0,06	0,11 \pm 0,07
8	0,14 \pm 0,04	0,1 \pm 0,1
9	0,0 \pm 0,2	0,0 \pm 0,1
10	- 0,1 \pm 0,3	0,1 \pm 0,5

Las concentraciones de clorofila-a, clorofila-b y carotenoides (pg cel^{-1}) de ambos cultivos se exponen en la Figura 50, junto con los índices derivados CR y PI (tabla insertada). Tanto la clorofila-a como la clorofila-b presentaron valores inferiores en el cultivo mixotrófico con respecto al control en ambos tiempos de muestreo. En T1, estas diferencias fueron significativas: $p = 0,002$ para clorofila-a y $p = 0,006$, para clorofila-b. En T2, la clorofila-a mantuvo una diferencia significativa entre tratamientos ($p = 0,036$), mientras que la clorofila-b no difirió significativamente ($p = 0,518$).

Por su parte, los carotenoides no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en ninguno de los tiempos evaluados (T1: $p = 0,206$; T2 = 0,430). No obstante, se observó un leve incremento de sus valores en el cultivo mixotrófico respecto del control.

En cuanto a los índices calculados a partir de la relación entre pigmentos, tanto el CR como el PI mostraron valores superiores en el cultivo mixotrófico en ambos tiempos. El incremento osciló entre 1,5 y 1,8 veces respecto del cultivo control, según el índice y el tiempo considerado. Sin embargo, la diferencia solo alcanzó significancia estadística para PI en T2 ($p = 0,022$).

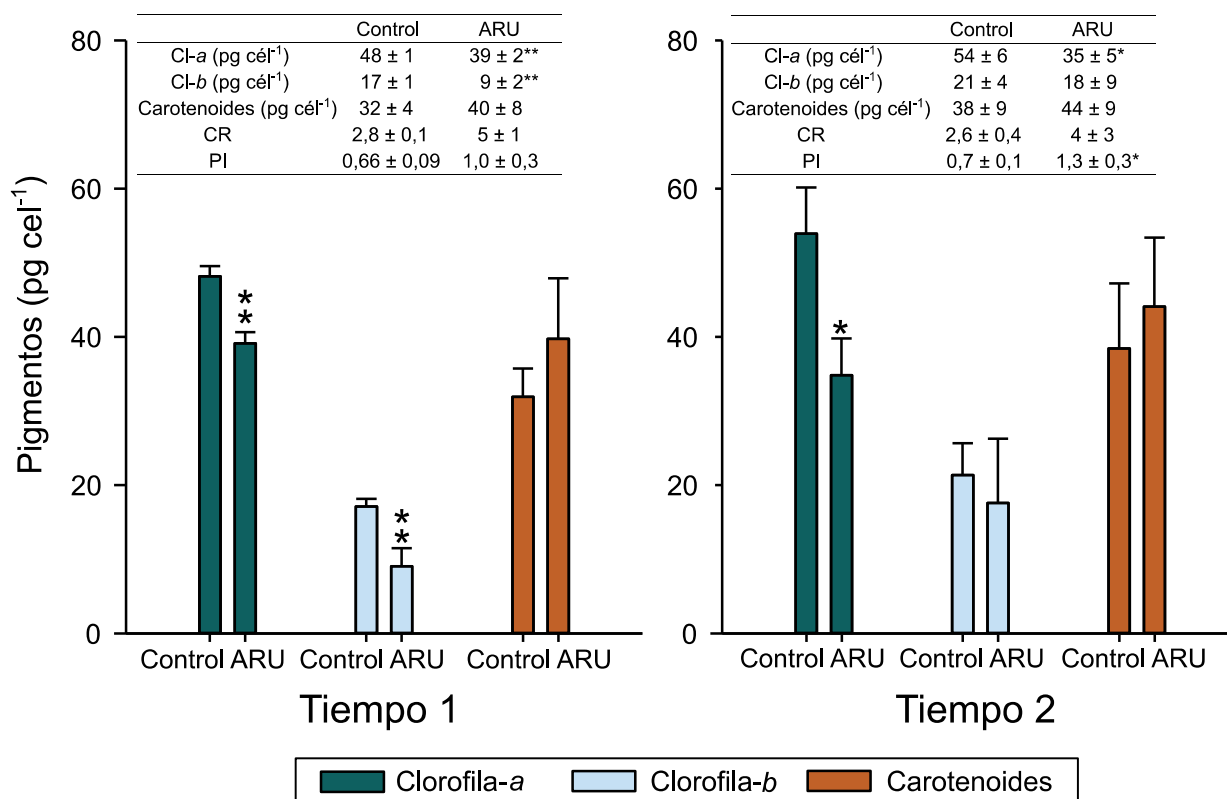


Figura 50: Pigmentos fotosintéticos medidos en cultivos control y mixotrófico de *Euglena gracilis* en 80% de aguas residuales urbanas (ARU): clorofila-a, clorofila-b y carotenoides; en cada tiempo de muestreo. CR = Relación cl-a/cl-b; PI = Índice de pigmentos. Barras de error: desviación estándar de n = 3. Tablas insertadas: Valores de pigmentos medidos en *E. gracilis* en cada punto temporal, expresados como media ± desviación estándar. Diferencias significativas: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Adicionalmente, se monitorearon los parámetros fisicoquímicos del medio al inicio (T0), en T1 y en T2, cuyos valores se presentan en la Tabla 22. En ambos tratamientos el pH aumentó desde T0 hacia T1, manteniendo un valor cercano a la neutralidad hacia el final del ensayo. La temperatura presentó variaciones moderadas entre tiempos de muestreo, permaneciendo dentro del rango establecido experimentalmente. El OD fue menor en el cultivo mixotrófico. Adicionalmente, presentó una disminución en T1, en ambos tratamientos, y aumentó nuevamente en T2. En el cultivo control, la SPC y los SDT fueron elevados en comparación con el cultivo mixotrófico, durante todo el ensayo.

Tabla 22: Parámetros fisicoquímicos del medio en el control y en el cultivo mixotrófico en 80% de aguas residuales urbanas (ARU), medidos al inicio (T0), en el tiempo intermedio (T1) y al final del ensayo (T2). OD = Oxígeno disuelto; SPC = Conductividad específica; SDT = Sólidos disueltos totales.

Parámetros fisicoquímicos	Control			Cultivo mixotrófico		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
pH	5,70	7,13	7,07	7,30	7,81	7,81
Temperatura (C°)	23	22,6	24,8	23	22,3	19,8
OD (mg L ⁻¹)	7,5	7	7,4	6,4	4,9	7,5
SPC (μS cm ⁻¹)	2072	1536	2081	731	294,9	323,2
SDT (mg L ⁻¹)	1345,5	1001	1352	474,5	191,96	209,95

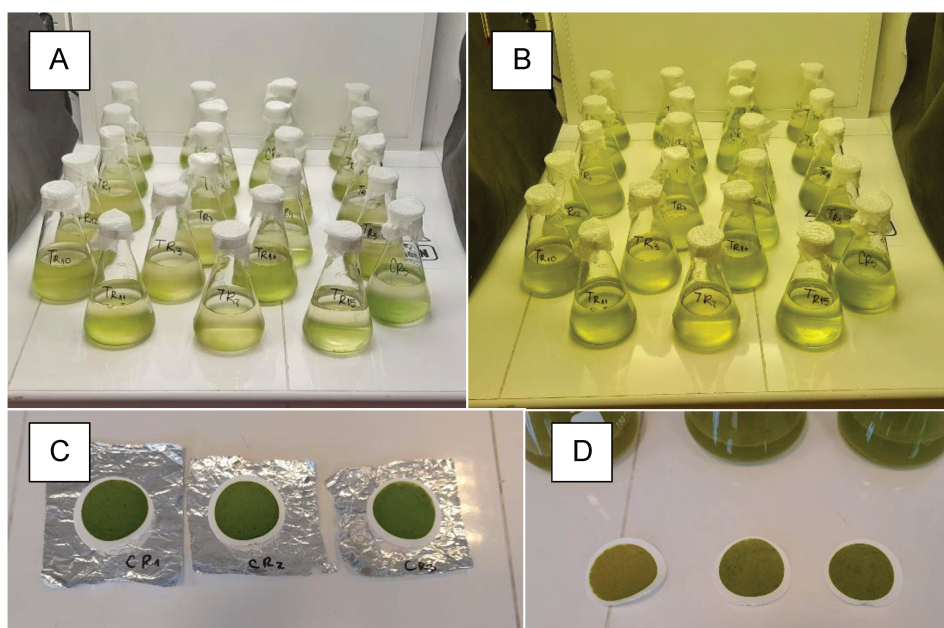


Figura 51: Fotografías tomadas durante el ensayo de biorremediación con *Euglena gracilis* (Fig. A y B) y durante los procedimientos de determinación de biomasa algal (Fig. C) y de pigmentos fotosintéticos (Fig. D).

Eficiencia de remoción de compuestos

En la Tabla 23 se presentan los valores registrados para los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos en el cultivo mixotrófico al inicio del ensayo, en T1 (día 7) y en T2 (día 10). Las eficiencias de remoción se calcularon con relación a las concentraciones medidas en T0. Debe considerarse que el cultivo se preparó con 80% ARU, diluido en medio C&M, lo que elevó las concentraciones iniciales de fósforo y amonio (ver Figura 41).

Tabla 23: Parámetros medidos en los cultivos mixotróficos durante el ensayo de biorremediación con *Euglena gracilis*: al inicio (T0) y en T1 (día 7) y T2 (día 10). Los nutrientes se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$). DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno.

Parámetros de ARU	T0	T1		T2	
		Medición	Remoción (%)	Medición	Remoción (%)
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	221	228	0	174	21
DBO ₅ (mg L ⁻¹ O ₂)	41,3	29,3	29	23,7	43
Nitrato (mg L ⁻¹ N)	236 \pm 30	243 \pm 37	0	136 \pm 6	43
Nitrito (mg L ⁻¹ N)	5,5 \pm 0,6	5,8 \pm 0,2	0	4,0 \pm 0,2	27
Amonio (mg L ⁻¹ N)	61 \pm 9	8 \pm 2	87	0,7 \pm 0,3	99
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	92 \pm 11	74 \pm 8	19	60 \pm 6	34
Bacterias coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	2,1 x 10 ⁴	930	96	480	98
Bacterias coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	4 x 10 ³	< 30	99	40	99

La DBO₅ presentó una disminución progresiva a lo largo del ensayo (29% en T1 y 43% en T2), mientras que la DQO mostró una dinámica diferente: registró un incremento inicial y posteriormente una disminución moderada (21% en T2). Entre los nutrientes inorgánicos se observaron comportamientos heterogéneos. El amonio registró la mayor eficiencia de remoción (99% global) y el fósforo mostró una remoción más moderada (19% en T1 y 34% en T2). Tanto el nitrato como el nitrito evidenciaron incrementos leves iniciales en T1, seguidos de disminuciones hacia T2 (43% para nitrato y 27% para nitrito).

En relación con los parámetros bacteriológicos, los coliformes totales presentaron reducciones de 96% en T1 y 98% en T2. Las bacterias coliformes fecales mostraron disminuciones cercanas al 99% en T1 y, en T2, se registró un leve aumento; no obstante, la remoción acumulada se mantuvo en 99 %.

Entre los parámetros que inicialmente superaban los valores establecidos por la normativa provincial, la DBO₅, el amonio y las bacterias coliformes alcanzaron niveles dentro de los límites regulatorios al finalizar el ensayo, en contraste con la DQO y el fósforo. Sin embargo, en el caso del fósforo, debe considerarse que su concentración inicial estuvo influenciada por el enriquecimiento con el medio C&M.

3.4.3 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon en la biomasa de *E. gracilis*

Se determinó el contenido de carbohidratos totales y de paramilon en la biomasa cosechada de los cultivos control y mixotrófico. En la Tabla 24 y la Figura 52 se presentan los resultados obtenidos, junto con la biomasa algal expresada por unidad de volumen de cultivo. En ambos tiempos de muestreos, los valores de carbohidratos totales y paramilon mostraron variaciones en el mismo sentido dentro de cada tratamiento.

Tabla 24: Biomasa algal (mg L⁻¹) y contenido de carbohidratos totales (%) y paramilon (%) en *Euglena gracilis* en los dos momentos de muestreo, en cultivo control y mixotrófico (80% v/v ARU). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Tiempo	Cultivo	Biomasa algal (mg L ⁻¹)	Carbohidratos (%)	Paramilon (%)
T1	Control	380 ± 79	19 ± 5	8,2 ± 0,5
	Mixotrófico	257 ± 12	34 ± 6***	22 ± 5**
T2	Control	387 ± 81	20 ± 6	10 ± 1
	Mixotrófico	347 ± 64	31 ± 8**	21 ± 4**

Diferencias significativas: ** p < 0,01; *** p < 0,001.

En el cultivo control el paramilon representó entre el 43 y el 50% del contenido total de carbohidratos. En el cultivo mixotrófico, esta proporción fue mayor, con valores de entre 64 y 67% del total de carbohidratos, en T1 y T2, respectivamente. Asimismo, los cultivos mixotróficos presentaron valores significativamente superiores en ambos

tiempos, tanto para carbohidratos (T1: $p < 0,001$; T2: $p = 0,009$) como para paramilon (T1 y T2: $p = 0,003$). No obstante, el contenido de paramilon obtenido en el ensayo preliminar bajo las mismas condiciones de dilución del efluente (80% ARU) (ver resultados en la sección 3.4.1) fue aproximadamente 1,6 veces mayor que el observado en este ensayo de biorremediación.

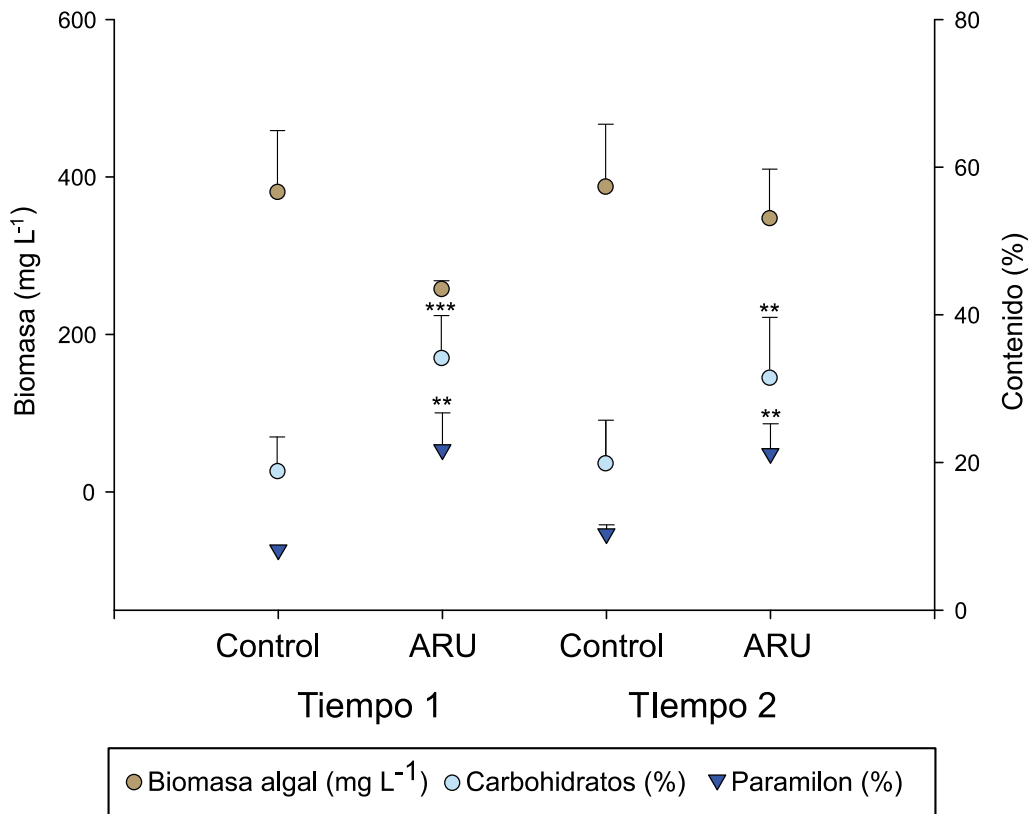


Figura 52: Biomasa algal (eje izquierdo) y contenido de carbohidratos totales (%) y paramilon (%) (eje derecho) en *Euglena gracilis* en cultivos control y mixotrófico en 80% de aguas residuales urbanas (ARU). Barras de error superiores: desviación estándar de $n = 3$. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

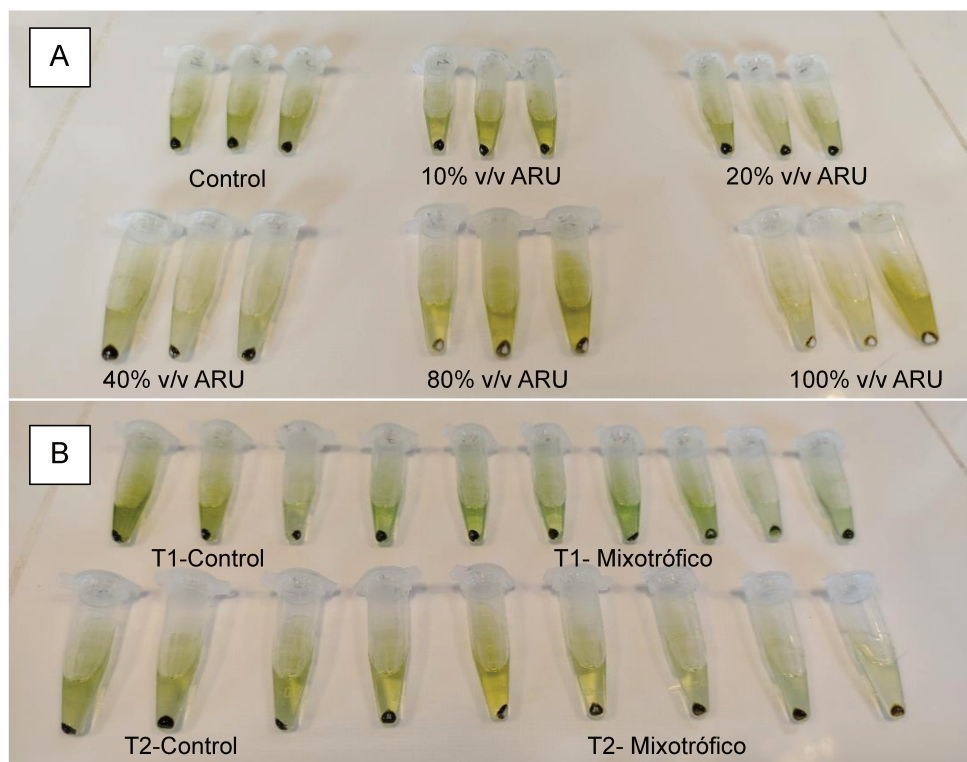


Figura 53: Fotografías tomadas durante la primera etapa de extracción de paramilon, de las muestras correspondientes al ensayo de inhibición del crecimiento algal (Fig. A) y las muestras correspondientes al ensayo de biorremediación (Fig. B).

3.4.4 Bioensayo de fitotoxicidad aguda de las ARU tratadas

La validez del ensayo fue confirmada por el elevado porcentaje de germinación observado en el control ($98 \pm 2 \%$). Este parámetro no mostró diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos, ni en T1 ($p = 0,504$), ni en T2 ($p = 0,083$) (Fig. 54A y B).

En el tiempo 1, las longitudes de la radícula y del hipocótilo no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. No obstante, se observó una tendencia al incremento de la longitud del hipocótilo, aunque no en todos los tratamientos. La longitud de la radícula, en cambio, no evidenció un patrón definido entre tratamientos, aunque en la concentración más elevada de ARU-T se registró una reducción respecto al control (Fig. 54A).

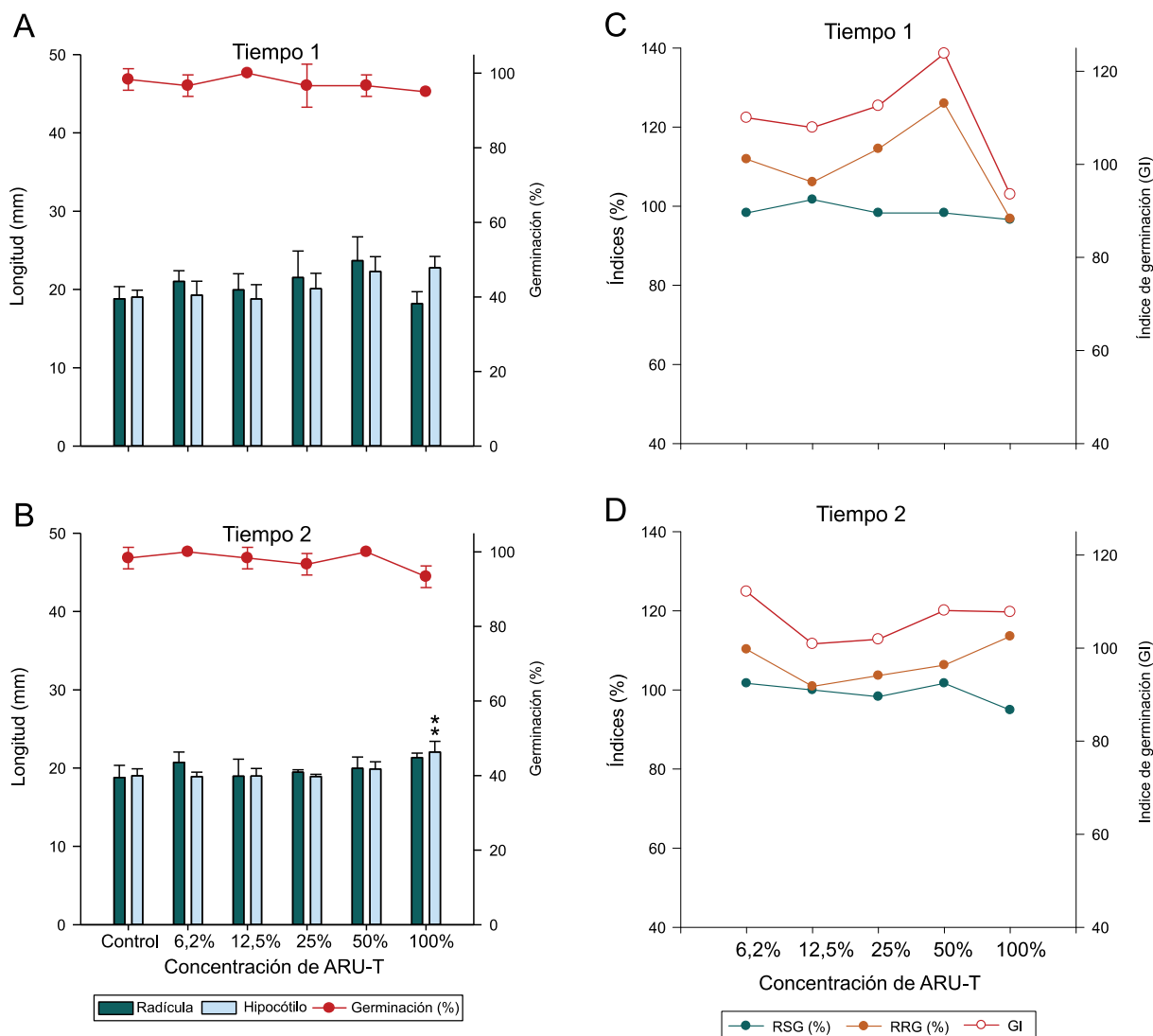


Figura 54: Longitudes de radícula e hipocótilo y germinación de semillas (Fig. A y B) e índices de fitotoxicidad (Fig. C y D) del bioensayo de toxicidad aguda de *Lactuca sativa*, realizado con aguas residuales tratadas (ARU-T) proveniente del tiempo 1 y del tiempo 2 del ensayo de biorremediación. Barras de error: desviación estándar de $n = 3$. Diferencias significativas: ** $p < 0,01$. RSG: Germinación relativa de las semillas (%); RRG: Crecimiento relativo de la radícula (%); GI: índice de germinación.

En el tiempo 2, las longitudes de la radícula y del hipocótilo correspondientes a las diluciones entre 6,2 y 50% de ARU-T se mantuvieron relativamente constantes. Sin embargo, en el tratamiento con ARU-T al 100%, ambos parámetros se vieron estimulados en relación con el control, alcanzando significancia estadística únicamente

en el hipocótilo (radícula: $F_{5,12} = 1,601$, $p = 0,233$; hipocótilo: $F_{5,12} = 5,779$, $p = 0,006$; *post hoc* de Dunnet: $p = 0,006$) (Fig. 54B).

En relación con los índices de fitotoxicidad, el índice RSG se mantuvo relativamente constante hasta el tratamiento con 50% de ARU-T, disminuyendo levemente en 100% ARU-T, en ambos tiempos experimentales. El índice RRG, por su parte, presentó en T1 un valor máximo en el tratamiento al 50%, mientras que en T2 el valor máximo se registró en 100% de ARU-T. Finalmente, el índice GI mostró un patrón similar al RRG, aunque los valores máximos se observaron en ambos tiempos en el tratamiento al 50 % de ARU-T (Fig. 54C y D).

3.5 Discusión

3.5.1 Crecimiento de *E. gracilis* en ARU: Ensayo de inhibición del crecimiento algal

Evaluación del crecimiento algal

La mayor densidad celular registrada en el cultivo control (0% ARU) concuerda con lo esperado, dado que el medio C&M constituye un medio nutritivo optimizado para el desarrollo de *E. gracilis* (Cramer & Myers, 1952). En contraste, todos los tratamientos con ARU produjeron inhibición del crecimiento algal, aunque sólo en 40 y 100% de ARU la densidad celular final presentó diferencias significativas con respecto al control, con valores de inhibición del crecimiento del 8,8 % y 12,3 %, respectivamente. Por su parte, los tratamientos con 10, 20 y 80 % de ARU también registraron valores positivos de I%, aunque estos fueron bajos (entre 4,1 y 5,1 %) y no se tradujeron en diferencias estadísticamente significativas respecto del control.

En conjunto, los parámetros de crecimiento mostraron efectos negativos en el tratamiento al 100% de ARU: reducciones significativas en la densidad celular, la tasa de crecimiento específico, la longitud y biovolumen celular, junto con un aumento en el DT. Estos resultados evidenciaron un deterioro del desempeño fisiológico general de la microalga bajo esta condición.

El análisis de los parámetros morfológicos permitió identificar respuestas celulares sutiles frente al estrés ambiental. Si bien el ancho celular no presentó diferencias significativas entre tratamientos, se observó una tendencia al incremento conforme aumentaba la concentración de ARU. En cambio, la longitud celular disminuyó significativamente en los tratamientos al 40 y 100 % ARU, con reducciones aproximadas del 6 y 8%, respectivamente, con respecto al control. Este tipo de cambios morfológicos

pueden asociarse a respuestas adaptativas de *E. gracilis* frente a condiciones adversas, en las que las modificaciones en la forma y tamaño celular reflejan alteraciones fisiológicas vinculadas al estrés (Kim et al., 2019).

Se ha demostrado que *E. gracilis* incrementa el contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana celular en condiciones adversas, lo que le confiere mayor fluidez e hidrofobicidad y mejora su capacidad de adaptación al entorno (Wu et al., 2021). Asimismo, mediante el movimiento de metabolia, esta microalga puede modificar su longitud y anchura hasta alcanzar una forma más esférica (Gulk et al., 2023). En este sentido, se ha observado que en cultivos heterótrofos las células presentaron una forma más redondeada y acumularon mayor cantidad de paramylon, mientras que en condiciones fotoheterotróficas predominaron células más alargadas, con mayor movilidad y menor contenido de reservas (Muchut, 2020). Se sugiere que las reducciones de longitud celular observadas en los tratamientos con mayor proporción de ARU podrían interpretarse como parte de un proceso de reorganización metabólica y estructural.

Desde el punto de vista nutricional, el tratamiento con 100% de ARU contenía las menores concentraciones iniciales de amonio y de fósforo inorgánico. Nezbyrsky et al. (2022) demostraron que *E. gracilis* incrementaba su productividad de biomasa conforme aumentaban las concentraciones de nitrógeno amoniacal y fósforo, lo que podría explicar, al menos parcialmente, el menor crecimiento observado en este tratamiento.

Si bien en 100 % de ARU se registraron las mayores concentraciones de nitrato y nitrito, y se ha descrito que las microalgas pueden asimilar el nitrógeno en diversas formas (Renuka et al., 2013), *E. gracilis* constituye un caso particular. La evidencia experimental demostró que esta microalga no creció utilizando nitrato como única fuente de nitrógeno y que la enzima nitrato reductasa no fue detectada analíticamente (Cramer & Myers, 1952; Oda et al., 1979), observación que ha sido retomada por estudios posteriores (Richter et al., 2015; Xie et al., 2023; Kennedy et al., 2024; Krüger et al., 2024). No obstante, también se ha señalado que la expresión y actividad de esta enzima puede reprimirse en presencia de amonio en concentraciones suficientes (Kadir et al., 2018). En este contexto, la elevada disponibilidad de nitrato y nitrito en el medio no habría compensado la baja concentración de amonio, ya sea por una limitación intrínseca en el uso del nitrato o por una preferencia metabólica y regulación negativa de su asimilación mientras el amonio estuvo disponible (Renuka et al., 2013).

Adicionalmente, las ARU aportaron materia orgánica a los distintos tratamientos, reflejada en los valores de DQO y DBO₅, lo que constituyó una fuente adicional de

carbono para *E. gracilis*. Se ha demostrado que esta microalga posee una plasticidad metabólica, que le permite reorganizar su metabolismo durante la asimilación mixotrófica de sustratos orgánicos de diversa naturaleza química. Por ejemplo, la presencia de sustratos de asimilación eficiente como etanol y glucosa se ha asociado con mejoras en el crecimiento y en la síntesis de compuestos de reserva (Gulk et al., 2023). En el presente estudio, el incremento del contenido de paramilon en los tratamientos al 80 y 100% ARU, que superó 3 veces los valores alcanzados en el control, confirmó la capacidad de *E. gracilis* para asimilar el carbono orgánico presente en el efluente.

Sin embargo, en el tratamiento al 100% ARU, la acumulación elevada de paramilon coexistió con indicadores negativos de crecimiento, lo que sugiere la presencia de condiciones desfavorables como exceso de materia orgánica o compuestos recalitrantes (Liu et al., 2011; Yoo et al., 2014). En este sentido, se ha reportado la capacidad de *Euglena* sp. para crecer en ARD con altas concentraciones de amonio y carbono orgánico, alcanzando tasas específicas de crecimiento cercanas a $0,28 \text{ día}^{-1}$, valor comparable al observado en este estudio para *E. gracilis* bajo 100 % de ARU ($0,27 \pm 0,05 \text{ día}^{-1}$), aunque inferior al registrado en los demás tratamientos. La coexistencia de una elevada acumulación de paramilon con un desempeño de crecimiento reducido resulta consistente con redistribución en la asignación de carbono bajo condiciones de estrés o disponibilidad nutricional fluctuante, en los que una mayor fracción del carbono se orienta hacia compuestos de reserva, junto con ajustes fisiológicos y morfológicos, como se ha descrito para *E. gracilis* en distintos regímenes metabólicos y de disponibilidad de nutrientes (Bakku et al., 2023; Xiao et al., 2025).

Finalmente, el análisis de las curvas de crecimiento mostró diferencias en la duración de la fase de latencia. En la mayoría de los tratamientos, esta fase no superó los dos días, mientras que en 100% ARU se extendió hasta 4 días. Gulk et al. (2023) asociaron fases de latencia prolongadas con la mayor presencia de sustratos de difícil metabolización, que requieren cambios metabólicos significativos.

Las ARU también aportaron una carga bacteriana característica de los efluentes domésticos. Las poblaciones bacterianas autóctonas pueden favorecer el crecimiento microalgal mediante el aporte de nutrientes, vitaminas o compuestos orgánicos volátiles (Croft et al., 2005; Villa et al., 2014; Amavizca et al., 2017; Toyama et al., 2018). Sin embargo, también pueden ejercer efectos inhibitorios por liberación de compuestos inhibidores del crecimiento, inducción de lisis celular o competencia por sustratos (Brussaard & Riegman, 1998; Paul & Pohnert, 2011; Fulbright et al., 2016). En particular,

en el tratamiento al 100% ARU, la fase exponencial fue más breve que la de los demás tratamientos, lo que puede asociarse a la presencia de microorganismos que pueden retardar el crecimiento de *E. gracilis* por competencia por los sustratos, reduciendo la biomasa final, lo que se reflejó en una menor duración del período de crecimiento exponencial. Este comportamiento coincide con lo observado por Torihara & Kishimoto (2015).

Evaluación del estado fisiológico

En los tratamientos con 10 a 40% de ARU, la clorofila-a en *E. gracilis* se incrementó significativamente con respecto al control, mientras que la clorofila-b no presentó cambios estadísticamente significativos. En contraste, el tratamiento con 100 % ARU evidenció una disminución de ambas clorofilas, más acentuada para la clorofila-b ($p < 0,01$), mientras que en 80% ARU, *E. gracilis* presentó un comportamiento intermedio, sin diferencias significativas respecto del control.

El aumento del contenido de clorofila celular observado en los tratamientos con 10 a 40% de ARU puede interpretarse como un proceso de aclimatación fisiológica bajo condiciones subóptimas, en el cual la célula ajusta su capacidad de captación de luz. En este sentido, Beneragama & Goto (2010) reportaron que *E. gracilis* incrementó el contenido de clorofila como respuesta temprana orientada a maximizar la captación lumínica. Asimismo, en estos tratamientos y en el 80% ARU, los valores de CR y PI se mantuvieron similares al control, lo que indica que las variaciones en el contenido de clorofilas no se tradujeron en cambios considerables en la relación entre clorofilas ni en aumentos relativos de carotenoides respecto de la clorofila-a. Estos resultados sugieren que los ajustes pigmentarios ocurrieron sin alteraciones significativas en las proporciones entre complejos colectores de luz y mecanismos de fotoprotección (Bodnar et al., 2016).

El aumento de carotenoides observado en la mayoría de los tratamientos es consistente con su función fotoprotectora y antioxidante, mecanismos que se incrementan bajo condiciones de estrés (Bodnar et al., 2016).

Por otro lado, la disminución de clorofilas observada en el tratamiento con 100% ARU indica un compromiso del estado pigmentario bajo condiciones más severas del efluente. Tal como se discutió previamente para *C. vulgaris* (capítulo 2), la exposición a contaminantes característicos de las ARU puede inducir al estrés oxidativo, afectar la integridad del cloroplasto y el funcionamiento del fotosistema II y, en consecuencia, reducir la síntesis de clorofilas (Pacheco et al., 2021; Baldisserotto et al., 2023; Chen et

al., 2024). Adicionalmente, si bien no se considera que *E. gracilis* haya experimentado inanición de nutrientes, la menor concentración inicial de amonio y fósforo en este tratamiento, en comparación con el control, podría haber contribuido a la reducción del contenido de clorofila. La limitación de nitrógeno puede favorecer la reasignación de este elemento desde pigmentos hacia enzimas esenciales o compuestos de reserva, mientras que la deficiencia de fósforo puede afectar la disponibilidad de ATP y NADPH necesarios para rutas biosintéticas (Juneja et al., 2013; Covell, 2022).

En este tratamiento (100% ARU), además, el aumento significativo del CR y del PI es consistente con una reorganización de la composición pigmentaria, asociada a una reducción proporcional de pigmentos de captación y un aumento de componentes de fotoprotección, patrón que suele observarse bajo estrés del sistema fotosintético (Bodnar et al., 2016). En 80% ARU, la ausencia de cambios significativos en CR y PI, junto con tendencia de disminución de la clorofila-b, podría interpretarse como una transición entre la aclimatación observada a bajas concentraciones de ARU y el estado de estrés más evidente en el 100%.

En este contexto, Gain et al. (2021) demostraron en *E. gracilis* que el pasaje de un estado fotoautotrófico a uno mixotrófico, inducido por la disponibilidad de sustratos orgánicos, modificó el acoplamiento funcional entre la fotosíntesis y la respiración, con reorganización del metabolismo energético celular sin inhibición de la fotosíntesis. Este marco es consistente con lo observado a bajas concentraciones de ARU, donde la presencia de materia orgánica podría inducir ajustes metabólicos en *E. gracilis* sin comprometer su capacidad fotosintética.

A concentraciones bajas del efluente no se registraron cambios significativos en los biomarcadores de estrés analizados, con excepción del tratamiento al 10% ARU que mostró un incremento puntual de la actividad de GST ($p = 0,025$). Sin embargo, dado que este aumento no se acompañó de cambios en los otros biomarcadores, no se observó un patrón integrado de respuestas a estrés oxidativo.

En contraste, en el tratamiento con 100% de ARU se observó un incremento pronunciado de GST ($p < 0,001$) que sugiere la activación de las vías de detoxificación y eliminación de las ERO. No obstante, en este mismo tratamiento se registró una disminución de la actividad de CAT, lo que podría indicar una saturación o desbalance del sistema antioxidante enzimático. Considerando la naturaleza del efluente, la posible presencia de mezclas de compuestos podría generar, mediante efectos sinérgicos o aditivos, un nivel de estrés oxidativo que supere la capacidad de respuesta celular de la microalga (Romero et al., 2025).

Cuando las ERO no son neutralizadas, pueden inducir daño celular a través de la peroxidación de AGPI, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides, proteínas y ARNm (Ke et al., 2010; Gauthier et al., 2020). En el tratamiento con 100% de ARU, la disminución de la actividad de CAT se acompañó de un aumento significativo de los niveles de MDA ($p < 0,001$), lo que respalda la ocurrencia de daño oxidativo celular. La peroxidación lipídica puede comprometer la fluidez y permeabilidad de la membrana y alterar el transporte molecular, afectando proteínas asociadas a la membrana (Ke et al., 2010).

Resultados similares fueron reportados por Liu et al. (2018) en *S. obliquus* expuesta a estrés por líquidos iónicos, donde a elevadas concentraciones del contaminante la actividad de CAT se vio superada, conduciendo a un aumento de ERO, daño de membranas celulares y del fotosistema II.

En comparación con lo observado para *C. vulgaris* (capítulo 2), que sostuvo el crecimiento bajo 100 % de ARU en paralelo con la activación de respuestas antioxidantes, los resultados de *E. gracilis* sugieren una menor capacidad para sostener los mecanismos antioxidantes frente a la mayor carga de ARU, un comportamiento que previamente fue asociado a especies consideradas más sensibles (Lei et al., 2006; Gao et al., 2017).

Con el fin de profundizar los posibles factores que expliquen la mayor sensibilidad, distintos estudios han analizado el rol de las características morfológicas y estructurales de las microalgas. En un estudio comparativo de tolerancia entre distintas especies, Castro et al. (2022) sugirieron que una mayor sensibilidad frente a la presencia de sustancias tóxicas podría estar vinculada a la morfología celular. En particular, las células de menor tamaño, que presentan una relación superficie/volumen mayor, derivada de sus dimensiones y forma celular, requerirían concentraciones más bajas de tóxicos incorporados por absorción para generar efectos inhibitorios, en comparación con microalgas de mayor tamaño y relación superficie/volumen (Weiner et al., 2004). No obstante, los autores señalaron que este criterio no podía generalizarse, ya que observaron respuestas discordantes entre las especies evaluadas.

En el presente trabajo, a pesar de su mayor tamaño celular y de una menor relación superficie/volumen inferida a partir de sus dimensiones y morfología, *E. gracilis* mostró una mayor sensibilidad al efluente en comparación con *C. vulgaris*, evidenciada por una mayor inhibición del crecimiento, en particular en la concentración más elevada de ARU, y una disminución de la actividad CAT. Estos resultados sugieren que, en el contexto de un efluente de composición compleja, la respuesta diferencial entre especies estuvo dominada por factores fisiológicos y metabólicos, más que por mecanismos pasivos de

incorporación asociados al tamaño o la geometría celular. Asimismo, la resistencia de las microalgas a determinados compuestos podría depender de la composición de la pared celular, siendo favorecida por la presencia de paredes celulares gruesas (Labbé et al., 2017). Este planteo resulta consistente con las características de *C. vulgaris*, que presenta una pared celular rígida cuyo espesor aumenta progresivamente durante la maduración hasta alcanzar aproximadamente 21 nm (Yamamoto et al., 2004), a diferencia de *E. gracilis*, cuyas células carecen de una pared rígida (Feregrino Mondragón, 2019).

Evaluación de acumulación de paramilon

El paramilón constituye la principal forma de almacenamiento de carbono de *E. gracilis* bajo condiciones aeróbicas. En el presente estudio, esta microalga acumuló entre 11 y 34 % de paramilon respecto de la biomasa total, registrándose el menor contenido en cultivo control (11 ± 1 %), y un aumento progresivo conforme aumentó la concentración de ARU, hasta alcanzar el valor máximo en 100 % (34 ± 1 %). Un patrón similar fue reportado por Rubiyatno et al. (2021) en *E. gracilis* cultivada en ARU. En dicho estudio, el efluente contenía menores concentraciones de nitrógeno, fosfato y diversos minerales en comparación con el medio de cultivo control, y los autores sugirieron que los compuestos orgánicos presentes en el efluente fueron aprovechados por esta microalga, favoreciendo la acumulación de reservas.

Numerosos trabajos reportaron contenidos superiores, alcanzando hasta valores cercanos a 80% de la biomasa celular (Matsuda et al., 2011; Schwarzahns et al., 2015; Muchut, 2020; Rubiyatno et al., 2021; Wu et al., 2021). Estas comparaciones se desarrollarán con mayor detalle en la sección posterior (sección 3.5.3), dado que el objetivo principal de este ensayo fue analizar el comportamiento fisiológico de *E. gracilis* frente a la exposición a diferentes concentraciones de ARU, no la acumulación del compuesto como relevancia biotecnológica.

En general, los valores más elevados corresponden a cultivos heterotróficos en oscuridad, donde la disponibilidad continua de carbono orgánico y la ausencia de fotosíntesis favorecen la acumulación de reservas. En contraste, en cultivos autotróficos sometidos a ciclos de luz-oscuridad, los rendimientos suelen ser menores debido al uso de reservas durante los periodos de oscuridad, lo que limita la acumulación neta, en concordancia con lo propuesto por Muchut (2020). En su estudio, el autor reportó que en condiciones heterotróficas no se detectó actividad de β -1,3-glucanasas en *E. gracilis*, sugiriendo una regulación de su expresión en función de la condición trófica. En este

marco, los valores obtenidos en el presente trabajo resultan consistentes con un escenario intermedio entre ambas estrategias metabólicas, debido a que los tratamientos con ARU se desarrollaron en condiciones mixotróficas, mientras que el control autotrófico presentó el menor contenido de paramilon.

Por otra parte, se ha reportado que la depleción de nitrógeno puede estimular la acumulación de β -glucanos (Jia et al., 2015), incluyendo aumentos significativos de crisolaminarina, un β -glucano ramificado, en diatomeas (Granum et al., 2002; Xia et al., 2014; Espinoza-Gallardo et al., 2017). No obstante, en el presente estudio, si bien los cultivos con ARU presentaron menores concentraciones iniciales de amonio, no se considera que *E. gracilis* haya experimentado una condición de inanición de nitrógeno, por lo que este mecanismo no sería el principal responsable de la acumulación observada.

En el tratamiento con 100 % de ARU, el contenido de paramilon triplicó el valor registrado en el cultivo control; sin embargo, la biomasa final fue significativamente menor. Este resultado indica que la acumulación de reservas ocurrió en paralelo con una disminución en la división celular, reduciendo la productividad de biomasa (Espinoza-Gallardo et al., 2017), en línea con procesos de redistribución en la asignación de recursos descritos para *E. gracilis* bajo distintos regímenes metabólicos (Bakku et al., 2023; Xiao et al., 2025). Además de ello, en este tratamiento también se observaron alteraciones en la composición pigmentaria y una activación de los biomarcadores de estrés oxidativo, lo que indica que la acumulación de reservas se produjo bajo un estado fisiológico más comprometido. Por su parte, el tratamiento al 80 % ARU presentó un elevado contenido de paramilon, con diferencias significativas respecto del control, pero sin cambios significativos en la biomasa algal ni en los demás parámetros fisiológicos evaluados.

Posteriormente, el PCA permitió integrar de manera conjunta todas las variables medidas en *E. gracilis*, revelando patrones de respuesta asociados a las diferentes concentraciones de ARU. El PC1 definió un gradiente fisiológico desde condiciones asociadas a un buen desempeño celular, caracterizadas por mayores valores de crecimiento, biomasa y longitud celular, hacia condiciones dominadas por respuestas de estrés oxidativo y acumulación de paramilon. En el extremo positivo se ubicaron el control y los tratamientos al 10 y 20% de ARU, mientras que el 100 % ARU se posicionó en el extremo negativo, asociado a niveles elevados de MDA y GST, acumulación de reservas y desaceleración del crecimiento. Los tratamientos al 40 y 80% de ARU se

localizaron próximos al origen de este eje, y se diferenciaron principalmente a lo largo del PC2.

El PC2 discriminó dos tipos de respuestas observadas a concentraciones intermedias de ARU, separando tratamientos caracterizados por aumentos de pigmentos fotosintéticos, de aquellos asociados a mayor acumulación de paramilon y mantenimiento relativo de variables de crecimiento. La estructura de este componente, en el cual no participan los biomarcadores de estrés oxidativo, sugiere que las variaciones pigmentarias no necesariamente implicaron daño celular, sino que pueden interpretarse como ajustes fisiológicos frente a las condiciones de cultivo. En este contexto, el tratamiento al 40 % ARU se ubicó en la región positiva del PC2, caracterizada por el aumento de pigmentos, mientras que el 80% de ARU se posicionó en la región negativa de este componente, asociado a mayor acumulación de paramilon, sin una reducción significativa del crecimiento.

Finalmente, el PCA sugiere que el paramilon puede asociarse tanto a respuestas vinculadas al estrés oxidativo (como en 100 % de ARU), como también a condiciones sin deterioro significativo del crecimiento (80 % de ARU), lo que puede atribuirse a la plasticidad metabólica de *E. gracilis*, capaz de redistribuir el carbono entre diferentes rutas metabólicas en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo (Matsuda et al., 2011). Este patrón respalda la selección de 80 % ARU como condición experimental para el ensayo posterior.

3.5.2 Ensayo de biorremediación de ARU con *E. gracilis*

Se definieron los tiempos de muestreo para el análisis de la biomasa algal y de los parámetros del medio en los días 7 y 10 (T1 y T2, respectivamente), en función de la dinámica de crecimiento observada. El cultivo control alcanzó la fase estacionaria hacia el final del período experimental. En contraste, el cultivo mixotrófico no presentó una fase estacionaria claramente definida, aunque hacia los últimos días se evidenció una desaceleración del crecimiento, con tasas específicas cercanas a cero.

El cultivo mixotrófico alcanzó tasas específicas de crecimiento máximas entre 0,6 y 0,8 día⁻¹ al inicio de la fase exponencial, valores comparables a los reportados por Mahapatra et al. (2013) para *Euglena* sp. cultivada en ARU (0,72 día⁻¹) y por Asiandu et al. (2023) en efluentes de desechos de tofu (0,81 día⁻¹). A diferencia de lo observado en el presente estudio, Asiandu et al. (2023) registraron una fase de adaptación más prolongada en el cultivo control que en los tratamientos con efluentes, y sugirieron que la presencia de materia orgánica favoreció una adaptación más rápida. Por su parte,

Gulk et al. (2023) señalaron que fases de adaptación más prolongadas pueden atribuirse a la necesidad de ajustes metabólicos que las microalgas deben realizar frente a la presencia de sustratos de difícil metabolización.

En estudios previos con cultivos mixotróficos de *E. gracilis* se han reportado densidades celulares superiores a las obtenidas en este trabajo. Por ejemplo, Muchut (2020) registró densidades finales de 3×10^6 cél mL⁻¹ en cultivos suplementados con glucosa, mientras que Wu et al. (2021) informaron valores de hasta $4,6 \times 10^7$ cél mL⁻¹. Asimismo, en cultivos desarrollados en efluentes se reportaron densidades de $2,3 \times 10^6$ cél mL⁻¹ (Asiandu et al., 2023) y $2,5 \times 10^6$ cél mL⁻¹ (Feregrino Mondragon, 2019). No obstante, en estos últimos estudios los cultivos se iniciaron con densidades algales mayores que las empleadas en el presente trabajo, lo que dificulta la comparación directa.

En cuanto a la biomasa algal, los valores reportados para especies del género *Euglena* presentan una elevada variabilidad. En un cultivo mixotrófico sin empleo de efluentes, la biomasa máxima de *E. pisciformis* alcanzó $0,72 \text{ g L}^{-1}$ (Fan et al., 2022). En ARU, *Euglena* sp. alcanzó un máximo de $1,24 (\pm 0,74) \text{ g L}^{-1}$ (Mahapatra et al., 2013), mientras que en ARD, *E. gracilis* alcanzó biomásas comprendidas entre $0,81$ y $0,99 \text{ g L}^{-1}$ (Kuroda et al., 2018). Estos valores que superan aproximadamente 3 veces los obtenidos en el presente estudio ($0,347 \text{ g L}^{-1}$). En contraste, Rubiyatno et al. (2021) reportaron biomásas cercanas a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ en cultivos de *E. gracilis* desarrollados en ARU sin suplementación, comparables o incluso inferiores a los registrados en este trabajo, aunque observaron aumentos significativos al adicionar fuentes específicas de carbono orgánico.

La menor densidad celular y biomasa observadas podrían estar asociadas, al menos parcialmente, a la competencia con comunidades bacterianas presentes en las aguas residuales, tal como fue sugerido por Torihara & Kishimoto (2015). Por otro lado, la suplementación con nutrientes específicos o fuentes de carbono fácilmente asimilables se presenta como una estrategia potencial para mejorar el rendimiento de los cultivos mixotróficos.

Se analizaron los pigmentos fotosintéticos en los tiempos T1 y T2 con el objetivo de evaluar el estado fisiológico de *E. gracilis* durante el ensayo de biorremediación. En el cultivo control, los valores de clorofilas y carotenoides registrados en T1 fueron similares a los obtenidos en el ensayo preliminar bajo la misma condición de cultivo, lo que indica una respuesta pigmentaria consistente y reproducible en ausencia de ARU. En contraste, en el cultivo mixotrófico se observó una disminución del contenido de

clorofilas con respecto al control desde T1. Debido a que en el ensayo preliminar el tratamiento con 80% ARU no había mostrado diferencias significativas en las clorofilas respecto del control, esta respuesta no estaría asociada exclusivamente a la concentración de ARU. En particular, en este ensayo se utilizó una mayor densidad algal inicial, lo que pudo generar condiciones limitantes adicionales, tales como una menor disponibilidad lumínica por efecto de sombreado (Andersen, 2005) y un agotamiento más rápido de los nutrientes disponibles.

En este sentido, debe considerarse que en T1 la remoción de amonio en el cultivo mixotrófico alcanzó el 87%. Resultados similares fueron reportados por Rubiyatno et al. (2021), quienes atribuyeron la reducción del contenido de clorofila en *E. gracilis* cultivada en ARU a la menor disponibilidad de nitrógeno. Tal como se discutió previamente, la restricción de nitrógeno puede reducir la síntesis de clorofila (Covell, 2022). No obstante, a pesar de la disminución observada en las clorofilas, los índices CR y PI no mostraron diferencias significativas respecto del control en T1, lo que sugiere que los ajustes pigmentarios ocurrieron sin alteraciones relevantes en la organización del aparato fotosintético (Bodnar et al., 2016).

En cuanto a los carotenoides, estos se incrementaron en *E. gracilis* en el cultivo mixotrófico con respecto al control, aunque sin diferencias significativas. Sin embargo, en T2, la disminución del contenido de clorofila-a, junto con la tendencia al incremento en carotenoides, condujo a un aumento significativo del índice PI. En este tiempo de muestreo, las concentraciones de amonio y fósforo se habían reducido en 99 % y 34 %, respectivamente, lo que, junto con la presencia de contaminantes característicos de las ARU, pudo contribuir a un estado de estrés fisiológico y a la reducción de biosíntesis de clorofila (Juneja et al., 2013; Covell, 2022). El aumento del índice PI puede atribuirse a la mayor susceptibilidad de la clorofila-a a la degradación bajo condiciones desfavorables, en contraste con la mayor estabilidad de los carotenoides (Bodnar et al., 2016).

Eficiencia de remoción de compuestos

Las variaciones de pH en cultivos algales están determinadas por procesos como la respiración, la productividad fotosintética, la composición química del medio y la actividad microbiana (Hernández-Pérez & Labbé 2014). En el cultivo mixotrófico el pH aumentó a 7,81 en T1 y se mantuvo hasta el final del ensayo. La asimilación de carbono inorgánico por microalgas produce un aumento de pH, asociado al consumo del dióxido de carbono y al desplazamiento del equilibrio del sistema carbonato (Kadir et al., 2018).

Esto a su vez favorece la volatilización del amoníaco y la precipitación del fósforo. Sin embargo, estos procesos se ven favorecidos a mayores pH, cercanos a 9 (von Sperling, 2007; Beltrán-Rocha et al., 2017), por lo que se sugiere que en el presente ensayo predominó la asimilación celular.

En este contexto, la remoción de amonio alcanzó el 99% global (T2), valores comparables con los obtenidos por Mahapatra et al. (2013), quienes registraron una reducción del 98 % de reducción de amonio en ARU tras 8 días de cultivo con *Euglena* sp. Asimismo, al igual que en este trabajo, la mayor eficiencia de eliminación de amonio se produjo durante el periodo de mayor crecimiento, en los primeros 6 días.

El patrón temporal observado en la remoción de nitrato y nitrito (nula en T1 y moderado en T2) sugirió la ocurrencia de procesos de nitrificación bacteriana a partir del amonio disponible (Mahapatra et al., 2013), seguidos de cambio en los mecanismos dominantes de transformación del nitrógeno, una vez agotada la fuente preferencial de este elemento. A partir de lo discutido previamente, se sugiere que la contribución directa de *E. gracilis* a la asimilación del nitrato sería incierta o limitada (Oda et al., 1979, Richter et al., 2015; Krüger et al., 2024). En consecuencia, se hipotetiza que la remoción observada en T2 estuvo mediada principalmente por procesos bacterianos. Aunque los niveles medidos de OD (4,9 a 7 mg L⁻¹) indican condiciones globalmente aeróbicas, se ha documentado que en sistemas microalgas-bacterias pueden ocurrir procesos de desnitrificación como consecuencia de microgradientes de oxígeno o de la actividad metabólica durante los periodos sin iluminación (Bai et al., 2022; Li et al., 2023). Por ejemplo, Li et al. (2023) demostraron la contribución de la desnitrificación en sistemas con concentraciones de OD comparables a las registradas en el presente estudio, y destacaron el rol de géneros con esta capacidad, como *Paracoccus*, reportados en aguas residuales (Wu et al., 2013; Medhi & Thakur, 2018).

Por otro lado, el fósforo presentó una remoción moderada, alcanzando un 34% global al finalizar el ensayo. Este patrón asimétrico, caracterizado por una alta eficiencia en la remoción del amonio y una remoción limitada del fósforo, fue reportado previamente para cultivos de *Euglena* spp. con ARU (Mahapatra et al., 2013; Jutidamrongphan et al., 2015) y se ha asociado a desequilibrios en la relación N/P del medio. Bajo condiciones de depleción de nitrógeno, la síntesis de proteínas y ribosomas disminuye, lo que reduce el crecimiento celular y, en consecuencia, la demanda metabólica de fósforo (Tan et al., 2022).

El OD en el cultivo control se mantuvo estable durante todo el ensayo, con valores comprendidos entre 7 y 7,5 mg L⁻¹. En contraste, en el cultivo mixotrófico se registraron

valores inferiores, particularmente al inicio y en T1, alcanzando 6,4 y 4,9 mg L⁻¹, respectivamente, consistentes con la carga orgánica del efluente que contribuyen al consumo microbiano del oxígeno en el medio (Abdel-Raouf et al., 2012). La disminución de OD observada en T1 coincidió con la mayor remoción de DBO₅, y la ausencia de reducción de DQO, lo que puede asociarse al mayor consumo de oxígeno por procesos respiratorios durante la degradación de la fracción fácilmente biodegradable de la materia orgánica, que habrían superado transitoriamente la producción fotosintética de oxígeno. Debido al bajo IB de las ARU (0,19), la limitada reducción en DQO aquí puede atribuirse a la predominancia de fracciones recalcitrantes o a la liberación de compuestos orgánicos oxidables o productos intermedios de degradación (Lima et al., 2022).

Hacia el final del ensayo (T2), el incremento de OD, hasta 7,5 mg L⁻¹, sugiere un cambio en el balance del sistema, con una menor demanda respiratoria de oxígeno y una mayor contribución relativa de la actividad fotosintética, en concordancia con lo reportado por Labbé et al. (2017). En este punto temporal, la mayor disponibilidad de oxígeno coincidió con una mayor remoción de DQO.

Cabe destacar que las reducciones en los indicadores de materia orgánica alcanzadas en el sistema basado en *C. vulgaris* (capítulo 2) fueron mayores que las observadas en el sistema basado en *E. gracilis*. Esta diferencia podría asociarse a la mayor biodegradabilidad del efluente utilizado en el primer caso (IB = 0,23), en comparación con el empleado en los cultivos de *E. gracilis* (IB = 0,19), lo que le confiere al efluente una mayor facilidad de degradación por procesos biológicos.

También se monitorearon la SPC y los SDT, parámetros fisicoquímicos ampliamente utilizados para evaluar la calidad del agua. Mientras la SPC se relaciona con la concentración de iones disueltos, los SDT incluyen minerales, sales y materia orgánica. Existe una fuerte correlación entre la SPC y los SDT, debido a que la mayoría de los sólidos disueltos corresponde a especies iónicas, responsables de la capacidad del agua para conducir electricidad (Dewangana & Shrivastava, 2024). Esta relación se mantuvo en el presente estudio, donde para cada tratamiento y tiempo de muestreo los valores de SPC y SDT variaron de manera concordante.

Finalmente, se sugiere que las disminuciones de SPC y SDT observadas durante la fase de crecimiento exponencial reflejan procesos de asimilación de nutrientes y de especies iónicas disueltas. Mientras, los aumentos SPC y SDT, observados en T2, más evidente en el cultivo control, podrían atribuirse a procesos de senescencia y liberación

de compuestos intracelulares, en concordancia con lo reportado para sistemas de microalgas en efluentes (Labbé et al., 2017; Moondra et al. 2023).

La reducción de bacterias coliformes totales y fecales en el sistema con *E. gracilis* fue altamente eficiente, alcanzando remociones globales de 98 y 99%, respectivamente. Este comportamiento es consistente con lo registrado en el sistema de *C. vulgaris*, y reportado en el capítulo correspondiente (capítulo 2). Allí se discutieron los mecanismos potenciales de inactivación bacteriana en sistemas microalgales desarrollados en ARU.

En ambos ensayos, la reducción de coliformes coincidió con el crecimiento del cultivo y el consumo de nutrientes en el medio, y, en el caso de este estudio con *E. gracilis*, se pudo constatar que también coincidió con los cambios en las condiciones fisicoquímicas del cultivo. Esto sugiere que procesos generales asociados a la actividad microalgal pueden haber desempeñado un rol central en la disminución de las poblaciones bacterianas (Pratita & Fathurohman, 2020; Kumar et al., 2021; Sánchez-Zurano et al., 2021; Thangam et al., 2021). A su vez, la similitud en las eficiencias obtenidas sugiere que la remoción bacteriológica estuvo predominada por las condiciones generales inducidas del cultivo, más que por mecanismos específicos de cada especie.

3.5.3 Evaluación de carbohidratos totales y paramilon

Se cosechó la biomasa de los cultivos control y mixotróficos, en la cual se determinaron carbohidratos totales y el contenido de paramilon.

Similar a lo observado para *C. vulgaris*, en el cultivo control de *E. gracilis* los carbohidratos aumentaron con el tiempo, aunque de forma leve, variando entre 19 y 20% de la biomasa. En general, a medida que los nutrientes se agotan en el medio y se presenta una deficiencia de nitrógeno, las microalgas desvían el carbono asimilado hacia compuestos de reservas (Morales-Plasencia et al., 2023).

Por otra parte, en el cultivo mixotrófico, *E. gracilis* alcanzó una acumulación significativamente mayor de carbohidratos (entre 31 y 34%). Este contenido fue comparable al reportado por Asiandu et al. (2023) en cultivos de *E. gracilis* desarrollados en efluentes de procesamiento de tofu (36 % de la biomasa), y por Jutidamrongphan et al. (2015) en *E. gracilis* cultivada en efluentes porcinos (30 a 40%). Aunque se ha reportado mayormente la depleción de nitrógeno como estrategia general para acumular carbohidratos en la biomasa algal (Morales-Plasencia et al., 2023), distintos estudios señalan que la respuesta a cambios ambientales puede diferir según la especie evaluada (Markou et al., 2012; Oraby et al., 2023).

En cuanto al contenido de paramilon, en el cultivo autotrófico (control) representó entre el 43 y el 50% del contenido total de carbohidratos, mientras que en el cultivo mixotrófico esta proporción aumentó a 64-67% en T1 y T2, respectivamente. Esta diferencia sugiere que, aunque el paramilon constituye el principal polisacárido de reserva en *E. gracilis*, bajo condiciones autotróficas una fracción relevante de carbohidratos corresponde a otros compuestos distintos al paramilon.

Estudios previos han demostrado que *Euglena* tiene una gran capacidad para sintetizar una variedad de carbohidratos complejos, incluyendo glicanos de superficie y polisacáridos como galactanos, xilanos, mananos, arabinanos y arabinogalactanos (O'Neill et al., 2017). Asimismo, O'Neill et al. (2017) reportaron que la composición relativa de estos carbohidratos variaba según la condición trófica: en células de cultivos fotoautotróficos se detectaron mayores concentraciones de glicanos complejos, como xiloglucanos, y glucanos de enlace mixto, mientras en condiciones fotoheterotróficas, con disponibilidad continua de sustratos orgánicos, se evidenció la centralidad metabólica de la uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), principal precursor de la biosíntesis del paramilon y de otros nucleótidos de azúcar. De manera complementaria, análisis metabolómicos indicaron que células de *E. gracilis* desarrolladas bajo condiciones autotróficas presentaron concentraciones relativas más elevadas de carbohidratos de bajo peso molecular como la trehalosa, mio-inositol-fosfato y otros disacáridos no identificados, mientras que la transición a la mixotrofia se asoció a un reordenamiento del metabolismo del carbono, favoreciendo su canalización hacia compuestos de almacenamiento (Gulk et al., 2023). El incremento en la proporción de paramilon en los cultivos mixotróficos del presente estudio puede interpretarse como una redistribución del carbono asimilado hacia la síntesis de este polisacárido, en detrimento de otras fracciones de carbohidratos.

En cuanto a la variación temporal del contenido de paramilon, se observaron tendencias contrastantes: el cultivo mixotrófico mostró una leve disminución hacia T2, mientras que en el control se evidenció un ligero incremento hacia el final del ensayo. Estas diferencias sugieren que la dinámica del paramilon estaría condicionada por la condición trófica y por el estado fisiológico de los cultivos. En el sistema mixotrófico, la desaceleración del crecimiento puede asociarse al inicio de movilización de reservas, frente a la menor disponibilidad de carbono orgánico fácilmente asimilable, lo que fue previamente reportado por Barsanti et al. (2011). Mientras que, en el cultivo autotrófico, la desaceleración del crecimiento no implicaría una limitación de carbono y podría favorecer la acumulación del polisacárido de reserva.

Finalmente, en este ensayo se mantuvo la tendencia previamente reportada en el ensayo preliminar bajo la misma concentración de ARU (80 %): el paramilon en el cultivo mixotrófico fue significativamente mayor que en el control. No obstante, en el ensayo preliminar se alcanzó un contenido de paramilon aproximadamente 1,6 veces mayor que en este ensayo. Esto sugiere que, además de la concentración de ARU, otras condiciones pueden haber afectado la acumulación de reservas, como la mayor densidad algal y las diferencias en la dinámica del crecimiento. En su estudio, Rubiyatno et al. (2021) reportaron un patrón similar, con mayores proporciones de paramilon en *E. gracilis* cultivada en ARU que, en medio sintético, y sugirieron que los sustratos orgánicos del efluente favorecieron la acumulación de reservas.

Como se ha mencionado en secciones previas de la Discusión, *E. gracilis* puede acumular grandes cantidades de paramilon, en particular bajo condiciones heterotróficas (Schwarzthans et al., 2015). Se han descrito como condiciones favorables para estimular su síntesis la iluminación periódica del cultivo y la presencia de una fuente de carbono orgánico en el medio. Estudios difieren sobre los sustratos orgánicos más efectivos para estimular esta acumulación. Entre distintos compuestos orgánicos estudiados, el etanol y el acetato presente en residuos orgánicos aumentaron significativamente la producción de paramilón en *E. gracilis* en condiciones mixotróficas, tanto en medio de cultivo sintéticos como en aguas residuales (Rubiyatno et al., 2021). Mientras que, en otros estudios se afirman la glucosa y la fructosa como sustratos más efectivos (Mokrosnop, 2016). Matsuda et al. (2011) indicaron que el exceso de glucosa en el medio mixotrófico favoreció la acumulación celular de paramilon en *E. gracilis* cultivadas en oscuridad, alcanzando 58% de la biomasa total. Con resultados similares, *E. gracilis* alcanzó hasta 51% de paramilon respecto del peso seco celular en células crecidas en condición heterotrófica con el agregado de glucosa como fuente de carbono externa, mientras que, en cultivos autótrofos, esta microalga acumuló valores cercanos al 35% (Muchut, 2020). Por su parte, Wu et al. (2021) reportaron 23,1 % en condiciones mixotróficas, más cercano a lo obtenido en este estudio, mientras que en condiciones heterotróficas alcanzaron 78,2 % de la biomasa.

No obstante, la productividad de paramilón depende de la productividad de la biomasa algal, y en ocasiones se ha reportado que el aumento del paramilon se acompaña de la disminución crecimiento o de la biomasa total (Muchut, 2020; Rubiyatno et al., 2021, Wu et al., 2021). En este sentido, Wu et al. (2021) reportaron que mientras la viabilidad celular mejoró en condiciones de mixotrofia, asociada a una mayor síntesis

de aminoácidos y lípidos de membrana, el paramilon se acumuló más en condiciones de heterotrofia.

En el presente estudio, si bien el cultivo control presentó valores de biomasa ligeramente superiores al cultivo mixotrófico, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Cabe destacar que en T1 la biomasa del cultivo mixotrófico fue considerablemente menor, mientras que en T2 ambos tratamientos alcanzaron valores de biomasa comparables. En consecuencia, la mayor acumulación no se vio comprometida y el cultivo mixotrófico desarrollado con elevada concentración de ARU presentó un rendimiento comparable al del cultivo control, lo que respalda el potencial del sistema para valorizar este efluente urbano como sustrato de cultivo orientado a la obtención de compuestos de interés biotecnológico.

3.5.4 Bioensayo de fitotoxicidad de las ARU tratadas

En el ensayo de fitotoxicidad de las ARU-T no se registraron efectos adversos sobre la germinación de las semillas de *L. sativa* en ninguno de los tratamientos evaluados. Tampoco se detectaron diferencias en las longitudes de radícula e hipocótilo, en relación con el control, con excepción de un único tratamiento, 100% de ARU-T correspondiente a T2, en el cual el hipocótilo se vio estimulado. A partir de estas mediciones se calcularon los índices de fitotoxicidad. El índice RSG, que expresa la germinación relativa en un determinado entorno, presentó valores cercanos a 100% en todos los tratamientos, lo que se ha asociado con un bajo potencial tóxico de los efluentes tratados (Bolonhesi & Lopes, 2018). Asimismo, el índice RRG se mantuvo en todos los tratamientos por encima del 80%, umbral por debajo del cual se considera indicativo de alteraciones en el metabolismo vegetal (Cuervo Lumbaque et al., 2017). En concordancia, los valores de GI obtenidos en este ensayo indicaron toxicidad nula o muy baja en todos los tratamientos (Aguerre & Gavazzo, 2012; Mañas & De las Heras, 2018). En conjunto, estos resultados contrastan con el sistema basado en *C. vulgaris*, en el que la reducción de la fitotoxicidad se consideró parcial y dependiente del tiempo de cultivo y del grado de dilución, mientras que las ARU-T resultantes del cultivo con *E. gracilis* mostraron índices compatibles con una baja o nula fitotoxicidad.

Por su parte, en el bioensayo realizado con el efluente tratado por el sistema de *C. vulgaris* no se halló una correlación directa entre los valores elevados de DQO y la afectación del desarrollo de las semillas, por lo que se planteó como hipótesis la posible presencia de contaminantes típicos de las ARU como los productos farmacéuticos (Chan-Keb et al., 2021). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio

sugieren que estos contaminantes, de hallarse presentes, no resultaron tóxicos para las semillas de *L. sativa*, o bien que la composición nutritiva del efluente fue adecuada para compensar eventuales efectos adversos.

En cuanto a la composición del efluente, los cultivos con *C. vulgaris* alcanzaron mayores remociones de carga orgánica y reducciones casi completas de los nutrientes inorgánicos, en comparación con los cultivos de *E. gracilis*. En este contexto, se propone que la mayor disponibilidad de nutrientes en las ARU-T utilizadas en el presente bioensayo habría contribuido a estimular el crecimiento de *L. sativa*, mientras en el efluente tratado con *C. vulgaris* la baja concentración de nutrientes podría haber limitado la absorción radicular efectiva (Reynolds et al., 2024). Esto resulta coherente con investigaciones previas que demostraron que efluentes con mayores contenidos de nutrientes favorecieron el crecimiento de *L. sativa*, tanto en estudios de germinación como en trabajos a mayor escala en suelo (Cuba et al., 2015; Urbano et al., 2017; Sangare et al., 2020; Ait-Mouheb et al., 2022; Niquice-Janeiro et al., 2023). Por ejemplo, Sangare et al. (2020) observaron mayores tasas de germinación en semillas de *L. sativa* irrigadas con aguas grises que contenían nitrato, amonio y fósforo, en comparación con agua del grifo utilizada como control. En la misma línea, Niquice-Janeiro et al. (2023) demostraron que las aguas residuales tratadas aportaron entre 88 % y 97 % de los requerimientos de nitrógeno, fósforo, y potasio de las plantas, mientras que la materia orgánica presente en los efluentes contribuyó a mejorar la estructura y estabilidad del suelo.

En relación con los parámetros fisicoquímicos, las ARU-T de T1 y de T2 cumplieron con los valores recomendados por la FAO (1985) para riego agrícola en términos de pH ($7,81 < 8,5$), SPC ($294,9 - 323,2 \mu\text{S cm}^{-1} < 700 \mu\text{S cm}^{-1}$), y SDT ($191,96 - 209,95 \text{ mg L}^{-1} < 450 \text{ mg L}^{-1}$). En contraste, las concentraciones de nitrato superaron el valor considerado como restricción severa de uso ($243 \pm 37 - 136 \pm 6 \text{ mg L}^{-1} > 30 \text{ mg L}^{-1}$). Si bien concentraciones elevadas de nitrato pueden promover una sobreestimulación del crecimiento en etapas tempranas, su aplicación excesiva puede retrasar la maduración o reducir la calidad del producto final, por lo que se ha propuesto como alternativa en tales casos restringir su aplicación sólo en fases iniciales del cultivo (FAO, 1985). No obstante, se debe realizar un monitoreo adecuado, debido a que la acumulación de nitrato en hortalizas de hoja puede representar un riesgo para la salud humana (Abd-Elrahman et al., 2022).

Por otro lado, no se detectaron metales pesados en el efluente, aunque se registraron trazas de arsénico. La concentración máxima recomendada para agua de riego es $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, valor que supera al registrado en el presente estudio ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$) (FAO, 1985).

Entre los parámetros evaluados, además del elevado contenido de nitrato, la DQO constituyó un aspecto relevante desde el punto de vista de la carga orgánica, aunque no se hallaron valores de referencia para este parámetro en guías o estándares internacionales de reúso agrícola. Por su parte, de acuerdo con las directrices de la EPA, el efluente cumplió con el criterio correspondiente al valor guía máximo de DBO para cultivos alimentarios que no se consumen crudos o cultivos no alimentarios (US EPA, 2012).

En cuanto a los indicadores microbiológicos, las concentraciones de coliformes fecales en las ARU-T oscilaron entre < 30 y $40 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$, valores inferiores al límite de referencia propuesto por la OMS y la FAO para riego de cultivos destinados al consumo fresco ($< 1000 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ de coliformes fecales) (FAO, 1992; Blumenthal et al., 2000). Asimismo, estos valores cumplen también con el criterio menos restrictivo de la EPA ($200 \text{ UFC } 100 \text{ mL}^{-1}$) para cultivos no consumidos crudos, aunque no alcanza al estándar más exigente para cultivos a consumir crudos (US EPA, 2012). No obstante, resulta pertinente ampliar la caracterización microbiológica como perspectiva para estudios posteriores.

Finalmente, estos resultados refuerzan el potencial de las ARU como fuente complementaria de nutrientes para el desarrollo de cultivos agrícolas. En este contexto, es necesaria la ampliación de estudios que contemplen distintas diluciones para compatibilizar la reutilización del efluente con el cumplimiento de los parámetros establecidos en estándares internacionales. Este enfoque contribuye a la reducción de la demanda de agua potable, al reciclado de nutrientes y a la disminución de las descargas de efluentes en cuerpos de agua (Urbano et al., 2017). Estas estrategias adquieren relevancia en un escenario global en el que la gestión del nitrógeno y del fósforo se reconoce como un desafío emergente para la seguridad alimentaria y la protección de los ecosistemas acuáticos, en concordancia con los lineamientos de la Agenda 2030 y los ODS vinculados al agua y a la agricultura sostenible (ODS6 y ODS2) (United Nations, 2018).

Conclusiones

La presente tesis abordó, desde una perspectiva integrada, el potencial del cultivo de dos microalgas (*C. vulgaris* y *E. gracilis*) como estrategia de tratamiento terciario de ARU y, simultáneamente, como plataforma para la obtención de biomoléculas de interés biotecnológico. En conjunto, los resultados permitieron articular tres dimensiones complementarias: i) la calidad y variabilidad de las ARU tratadas mediante sistemas convencionales, ii) el desarrollo de una herramienta analítica alternativa para el monitoreo de contaminantes de interés ambiental, y iii) la evaluación de microalgas con diferentes estrategias metabólicas para la biorremediación de ARU y la acumulación de metabolitos de valor.

Los hallazgos evidenciaron que las ARU con tratamiento secundario constituyen un recurso aprovechable para el crecimiento de microalgas. La caracterización fisicoquímica y bacteriológica de estos efluentes mostró un comportamiento característico de ARU tratadas mediante sistemas de lagunas en serie, con un desempeño globalmente adecuado en la reducción de fracciones biodegradables y de la carga bacteriológica. Sin embargo, se observó la persistencia de materia orgánica refractaria y una remoción no siempre eficiente de nutrientes inorgánicos, lo que refuerza la necesidad de incorporar tratamientos terciarios orientados específicamente a estas fracciones remanentes.

Por otro lado, el desarrollo del biosensor enzimático electroquímico destinado a la detección de CF representó un aporte relevante como herramienta analítica alternativa con potencial aplicación en el monitoreo ambiental. La estrategia de diseño basada en SPE y recubrimientos poliméricos permitió definir condiciones de formulación y operación reproducibles, con señales diferenciables del blanco y una sensibilidad compatible con rangos ambientalmente relevantes. Estas evidencias sientan una base experimental sólida para las futuras instancias de validación, evaluación de interferencias y aplicación en matrices reales.

En relación con los estudios de biorremediación, *C. vulgaris* mostró una elevada tolerancia a las condiciones de las ARU y una plasticidad fisiológica frente a un ambiente simultáneamente nutritivo y estresante. Los ensayos preliminares evidenciaron un efecto general estimulante de las ARU sin diluir, coherente con la capacidad mixotrófica de la especie y con la disponibilidad de carbono orgánico presente en el efluente. La evaluación integrada de variables de crecimiento y marcadores de estrés confirmó que la microalga no solo sostuvo su crecimiento en altas concentraciones de ARU, sino que además reorientó su metabolismo mediante refuerzo de mecanismos antioxidantes y

fotoprotectores, atributo clave para su aplicación en sistemas de tratamiento sometidos a variaciones en la composición del efluente.

El desempeño observado permitió seleccionar condiciones de trabajo exigentes (ARU sin diluir) para los ensayos posteriores, consolidando a *C. vulgaris* como una especie robusta para esquemas de biorremediación. En este sentido, se logró una remoción eficiente de contaminantes luego de cuatro días de cultivo, con reducciones significativas de DBO, DQO y nutrientes, alcanzando valores compatibles con la normativa local vigente. Asimismo, tiempos de cultivo más prolongados disminuyeron la eficiencia, al evidenciar aumentos de DBO y DQO, asociados a la posible liberación de compuestos orgánicos oxidables. Desde una perspectiva biotecnológica, el cultivo en ARU permitió obtener biomasa con componentes de interés, destacándose un contenido lipídico 1,9 veces superior al observado en el cultivo sintético, con elevadas proporciones de AGPI de relevancia para los sectores farmacéutico, terapéutico y nutracéutico. Estos resultados evidencian la factibilidad de integrar el tratamiento de efluentes con la generación de productos de valor agregado. No obstante, bajo las condiciones ensayadas no se detectó la presencia de astaxantina en los extractos algales, lo que sugiere que el cultivo de ARU favoreció la acumulación de otros carotenoides. Este resultado pone de manifiesto la necesidad de implementar estrategias específicas de estrés, tales como modificaciones nutricionales, en caso de priorizar la producción de este pigmento.

Por su parte, *E. gracilis* presentó un comportamiento diferente respecto de *C. vulgaris*, asociado a su versatilidad metabólica y a su capacidad de acumular paramilon como reserva carbonada. Este polisacárido de elevado interés biotecnológico ha sido ampliamente estudiado en los últimos años por sus propiedades bioactivas y su potencialidad para aplicaciones nutracéuticas, biomédicas y en el desarrollo de biomateriales.

En concentraciones crecientes de ARU, se observó un incremento significativo en la acumulación de paramilon en *E. gracilis*, alcanzando valores superiores a los del cultivo control. Este hallazgo confirma el interés de la especie para la producción de β -1,3-glucano en contextos de disponibilidad de carbono orgánico, como las ARU. Sin embargo, en la concentración máxima de ARU (100%) esta acumulación se acompañó de una disminución de la biomasa algal total, evidenciando un balance entre el almacenamiento de reservas y la productividad de biomasa. En concentraciones elevadas, pero no máximas (80%), fue posible establecer un equilibrio adecuado entre

ambos parámetros, lo que resalta la importancia de optimizar las condiciones de cultivo en función del objetivo productivo.

En cuanto a los procesos de biorremediación, el sistema basado en *E. gracilis* mostró un desempeño moderado, con reducciones más acotadas de materia orgánica y remociones variables de nutrientes, aunque se destacó una remoción óptima de amonio. Este comportamiento debe interpretarse considerando que el cultivo mixotrófico empleado en estos ensayos presentó condiciones iniciales diferentes con respecto al utilizado para *C. vulgaris*, asociadas al esquema de cultivo mixotrófico empleado.

Adicionalmente, en ambos sistemas, la biorremediación algal se acompañó de una disminución de indicadores microbiológicos, incluyendo coliformes fecales, reforzando el potencial del enfoque como tratamiento terciario también desde una perspectiva sanitaria.

La comparación fisiológica sugiere que *E. gracilis* es más sensible a las condiciones impuestas por elevadas concentraciones del efluente, especialmente en su capacidad de sostener respuestas antioxidantes ante mayores cargas. En consecuencia, los resultados refuerzan la necesidad de seleccionar la especie microalgal en función del objetivo prioritario del proceso: *C. vulgaris* mostró un desempeño más eficiente para la remediación del efluente bajo las condiciones ensayadas, mientras que *E. gracilis* se destacó por su capacidad para acumular un metabolito de gran interés biotecnológico, como el β -1,3-glucano. En ambos casos fue posible integrar biorremediación y valorización de biomasa, aunque la optimización simultánea de ambos objetivos requiere ajustar las condiciones de cultivo y asumir compromisos entre eficiencia de remoción y productividad biotecnológica.

Respecto de los bioensayos de toxicidad, los resultados indicaron que el efluente tratado mediante cada sistema algal presentó una disminución de los efectos adversos, aportando así una evaluación biológica complementaria a la tradicional caracterización fisicoquímica del agua residual. Las diferencias observadas entre ambos sistemas sugieren que la mayor remoción de nutrientes en el caso de *C. vulgaris* y su mayor disponibilidad residual en el sistema de *E. gracilis* podrían haber influido en la respuesta vegetal, sin descartar la posible incidencia de contaminantes específicos. No obstante, la interpretación de estos ensayos debería complementarse con análisis microbiológicos específicos, como la determinación de *E. coli*, para una evaluación sanitaria más completa. Este aspecto resulta clave en la búsqueda de esquemas de economía circular, particularmente al considerar el posible reúso de las ARU tratadas.

En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran que las ARU tratadas por sistemas convencionales pueden aprovecharse como insumo en sistemas algales para la recuperación y reúso de los nutrientes presentes en ARU, con dos aportes principales: la mejora adicional de la calidad del efluente, y la generación de biomasa con potencial aplicación biotecnológica. Las diferencias observadas entre *C. vulgaris* y *E. gracilis* ponen de manifiesto que no existe un organismo óptimo, sino perfiles funcionales diferenciados que requieren condiciones de cultivo específicas.

En este marco, el desarrollo del biosensor enzimático como herramienta analítica complementaria refuerza el enfoque integral del trabajo, destacando que el avance hacia sistemas de tratamiento y valorización de efluentes requiere también de disponibilidad de metodologías accesibles que faciliten el monitoreo ambiental y la toma de decisiones operativas en matrices complejas. La tesis aporta así bases experimentales para futuras etapas de optimización, escalado y validación en escenarios de aplicación real.

Bibliografía

- Abd-Elrahman, S. H., Saady, H. S., El-Fattah, D. A. A., & Hashem, F. A. E. (2022). Effect of irrigation water and organic fertilizer on reducing nitrate accumulation and boosting lettuce productivity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(2), 2144-2155. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00799-8>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abdel-Razik, M. H. (1991). *Dynamic modelling of facultative waste stabilization ponds* (Tesis doctoral). University of London, Inglaterra.
- Abdullah, J., Ahmad, M., Karuppiah, N., Heng, L. Y., & Sidek, H. (2006). Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 604-609. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.019>
- Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247>
- Achi, F., Bensana, A., Bouguettoucha, A., & Chebli, D. (2020). Nanobiosensors for detection of phenolic compounds. En I. Inamuddin & A. M. Asiri (Eds.), *Nanosensor Technologies for Environmental Monitoring* (pp. 275-307). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45116-5_10
- Ación, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. D. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9013-9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Acuña, C., Cetrángolo, O., Cáceres, V., & Goldschmit, A. (2017) La economía política de la política de agua y saneamiento en la Argentina: Historia, actualidad y perspectivas. *Serie Documentos de Trabajo del IIEP N° 22*. Instituto Interdisciplinario de Economía Política de Buenos Aires.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. En L. Packer (Ed.), *Methods in enzymology* (pp. 121-126). Academic press.
- Aguerre, Y. S., & Gavazzo, G. B. (2012). Fitotoxicidad de papel reciclado. Ensayos preliminares. En *Proceedings of the ABTCP 2012: VII CIADICYP – The 45th ABTCP International Pulp and Paper Congress and VII Ibero American Congress on Pulp and Paper Research* (p. 417). ABTCP.

Ahmad, N. M., Abdullah, J., Yusof, N. A., Ab Rashid, A. H., Abd Rahman, S., & Hasan, M. R. (2016). Amperometric biosensor based on zirconium oxide/polyethylene glycol/tyrosinase composite film for the detection of phenolic compounds. *Biosensors*, 6(3), 31. <https://doi.org/10.3390/bios6030031>

Aigner, S., Glaser, K., Arc, E., Holzinger, A., Schletter, M., Karsten, U., & Kranner, I. (2020). Adaptation to aquatic and terrestrial environments in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta). *Frontiers in Microbiology*, 11, 585836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585836>

Ait Braham, S., Siar, E. H., Arana-Peña, S., Bavandi, H., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., de Andrades, D., Kornecki, J. F., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Positive effect of glycerol on the stability of immobilized enzymes: Is it a universal fact?. *Process Biochemistry*, 102, 108-121. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.015>

Ait-Mouheb, N., Mange, A., Froment, G., Lequette, K., Bru-Adan, V., Maihol, J. C., Molle, B., & Wery, N. (2022). Effect of untreated or reclaimed wastewater drip-irrigation for lettuces and leeks on yield, soil and fecal indicators. *Resources, Environment and Sustainability*, 8, 100053. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2022.100053>

Akbulut, H., Bozokalfa, G., Asker, D. N., Demir, B., Guler, E., Odaci Demirkol, D., Timur, S., & Yagci, Y. (2015). Polythiophene-g-poly (ethylene glycol) with lateral amino groups as a novel matrix for biosensor construction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(37), 20612-20622. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04967>

Akinnawo, S. O. (2023). Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges*, 12, 100733. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100733>

Alcaraz, M. R., Fabiano, S. N., & Cámara, M. S. (2013). Desarrollo de un biosensor amperométrico de tirosinasa para la determinación de contenido fenólico total en aguas superficiales. *AUGM Domus*, 5, 47-59.

Alemán García, M. A. (2008). *Desarrollo y validación de un método cromatográfico para la separación y determinación de 11 compuestos fenólicos en muestras de agua* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al-Hashimi, M. A. I., & Hussain, H. T. (2013). Stabilization pond for wastewater treatment. *European Scientific Journal*, 9(14), 278-294.

Almomani, F. A., & Örmeci, B. (2016). Performance of *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering*, 95, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.038>

Alvarez, A., Saez, J. M., Costa, J. S. D., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., Benimeli, C. S., Polti, M. A., & Amoroso, M. J. (2017). Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41-62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>

Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragan, J., Garrido-Pérez, M. C., & Perales, J. A. (2017). Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Research*, 24, 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.006>

Amadu, A. A., Abbew, A. W., Qiu, S., Addico, G. N. D., Hodgson, I., Duodu, S., Appiah, S. A., & Ge, S. (2023). Advanced treatment of food processing effluent by indigenous microalgae-bacteria consortia: Population dynamics and enhanced nitrogen uptake. *Algal Research*, 69, 102913. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102913>

Amavizca, E., Bashan, Y., Ryu, C. M., Farag, M. A., Bebout, B. M., & de-Bashan, L. E. (2017). Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*. *Scientific Reports*, 7(1), 41310. <https://doi.org/10.1038/srep41310>

American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation (APHA). (1975). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (14th ed.).

American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation (APHA). (1980). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (15th ed.).

American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation (APHA). (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.).

Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier.

Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512-523.

Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021). Insights into the physiology of *Chlorella vulgaris* cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Scientific Reports*, 11(1), 6779. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86372-2>

Arora, N., Gulati, K., Patel, A., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2017). A hybrid approach integrating arsenic detoxification with biodiesel production using

oleaginous microalgae. *Algal Research*, 24, 29-39.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.012>

Arora, N., Jaiswal, K. K., Kumar, V., Vlaskin, M. S., Nanda, M., Pruthi, V., & Chauhan, P. K. (2020). Small-scale phyco-mitigation of raw urban wastewater integrated with biodiesel production and its utilization for aquaculture. *Bioresource Technology*, 297, 122489. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122489>

Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: B. O. Arredondo-Vega & D. Voltolina, *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 17-25). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Arrojo, M. Á., Regalado, L., Calvo Orquín, J., Figueroa, F. L., & Abdala Díaz, R. T. (2022). Potential of the microalgae *Chlorella fusca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) for biomass production and urban wastewater phycoremediation. *AMB Express*, 12(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01384-z>

Asiandu, A. P., Nugroho, A. P., Naser, A. S., Sadewo, B. R., Koerniawan, M. D., Budiman, A., Siregar, U. J., Suwanti, S., & Suyono, E. A. (2023). The Effect of Tofu Wastewater and pH on the Growth Kinetics and Biomass Composition of *Euglena* sp. *Current Applied Science and Technology*, 23(2). <https://doi.org/10.55003/cast.2022.02.23.010>

Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid) s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 281-289. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>

Bai, X., McKnight, M. M., Neufeld, J. D., & Parker, W. J. (2022). Nitrogen removal pathways during simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal under low temperature and dissolved oxygen conditions. *Bioresource Technology*, 354, 127177. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127177>

Bajguz, A. (2011). Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 406-416. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9551-0>

Bakku, R. K., Yamamoto, Y., Inaba, Y., Hiranuma, T., Gianino, E., Amariato, L., Mahrous, W, Suzuki, H., & Suzuki, K. (2023). New insights into raceway cultivation of

Euglena gracilis under long-term semi-continuous nitrogen starvation. *Scientific Reports*, 13(1), 7123. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34164-1>

Baldisserotto, C., Demaria, S., Arcidiacono, M., Benà, E., Giacò, P., Marchesini, R., Ferroni, L., Benetti, L., Zanella, M., Benini, A., & Pancaldi, S. (2023). Enhancing urban wastewater treatment through isolated *Chlorella* strain-based phytoremediation in centrate stream: An analysis of algae morpho-physiology and nutrients removal efficiency. *Plants*, 12(5), 1027. <https://doi.org/10.3390/plants12051027>

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable?. *Algal Research*, 31, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.001>

Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A. M., & Gualtieri, P. (2011). Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Natural Product Reports*, 28(3), 457-466. <https://doi.org/10.1039/C0NP00018C>

Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., & Gualtieri, P. (2001). Paramylon (β -1, 3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 59-65. <https://doi.org/10.1023/A:1008105416065>

Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., & Schaub, T. (2014). pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1431-1437. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>

Bedoya Pérez, J. C., Ardila Arias, A. N., & Reyes Calle, J. (2014). Evaluación de un humedal artificial de flujo subsuperficial en el tratamiento de las aguas residuales generadas en la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Colombia. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(3), 275-283.

Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., & López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417-427. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>

Beneragama, C. K., & Goto, K. (2011). Chlorophyll a:b ratio increases under low-light in 'shade-tolerant' *Euglena gracilis*. *Tropical Agricultural Research*, 22(1), 12-25. <https://doi.org/10.4038/tar.v22i1.2666>

Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., & Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research*, 23(3), 229-241. <https://doi.org/10.4491/eer.2017.220>

Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10), 3425-3431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064>

Bhatt, A., Arora, P., & Prajapati, S. K. (2023). *Chlorella pyrenoidosa*-mediated removal of pathogenic bacteria from municipal wastewater—multivariate process optimization and application in the real sewage. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(2), 109494. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109494>

Biscay, J., García, M. B. G., & García, A. C. (2014). Electrochemical biotin determination based on a screen printed carbon electrode array and magnetic beads. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 205, 426-432. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.08.042>

Blanco, M. del C., Paoloni, J. D., Morrás, H., Fiorentino, C., Sequeira, M. E., Amiotti, N. N., Bravo, O., Diaz, S., & Espósito, M. (2012). Partition of arsenic in soils sediments and the origin of naturally elevated concentrations in groundwater of the southern pampa region (Argentina). *Environmental Earth Sciences*, 66(7), 2075-2084. <https://doi.org/10.1007/s12665-011-1433-x>

Blosi, M., Albonetti, S., Dondi, M., Martelli, C., & Baldi, G. (2011). Microwave-assisted polyol synthesis of Cu nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(1), 127-138. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0010-7>

Blumenthal, U. J., Mara, D. D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., & Stott, R. (2000). Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 1104-1116.

Bodnar, O. I., Viniarska, H. B., Vasilenko, O. V., & Grubinko, V. V. (2016). Pigment content of *Chlorella vulgaris* Beij. under influence of sodium selenite and metals ions. *Biotechnologia Acta*, 9(1), 71-78.

Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69-74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>

Bolonhesi, I. B. D. T. M., & Lopes, D. D. (2018). Analysis of toxicity from the effluent generated in a furniture industry spray booth using the species *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. *Revista Ambiente & Água*, 13, e2246. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2246>

Borba, F.H., Sottoriva, P.R.S., & Módenes, A.N. (2008). Tratamento do efluente madeireiro por processo foto-Fenton. *Estudos tecnológicos*, 4 (1), 12-20.

Borca, J. (2022). *Bioprospección de microalgas de interés biotecnológico aisladas de aguas residuales urbanas de la localidad de San Justo (Santa Fe)* (Tesina de grado). Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Borics, G., Lerf, V., Enikő, T., Stanković, I., Pickó, L., Béres, V., & Várбірó, G. (2021). Biovolume and surface area calculations for microalgae, using realistic 3D models. *Science of the Total Environment*, 773, 145538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145538>

Borowitzka, M. A. (1988). Algal growth media and sources of algal cultures. En M. A. Borowitzka & L. J. Borowitzka (Eds.), *Micro-algal biotechnology* (pp. 456-465). Cambridge University Press.

Bouknana, D., Hammouti, B., Salghi, R., Jodeh, S., Zarrouk, A., Warad, I., Aouniti, A., & Sbaa, M. (2014). Physicochemical characterization of olive oil mill wastewaters in the eastern region of Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(4), 1039-1058.

Bounegru, A. V., & Apetrei, C. (2023). Tyrosinase immobilization strategies for the development of electrochemical biosensors—a review. *Nanomaterials*, 13(4), 760. <https://doi.org/10.3390/nano13040760>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brendler, T., & Williamson, E. M. (2019). Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3090-3111. <https://doi.org/10.1002/ptr.6514>

Brett, C. M. (2018). Perspectives and challenges for self-assembled layer-by-layer biosensor and biomaterial architectures. *Current Opinion in Electrochemistry*, 12, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.11.004>

Breuer, G., Evers, W. A., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Lamers, P. P. (2013). Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, 80, 50628. <https://doi.org/10.3791/50628>

Brussaard, C. P., & Riegman, R. (1998). Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with phosphorus or nitrogen as the algal-growth-limiting nutrient. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(3), 271-280. <https://doi.org/10.3354/ame014271>

Cabrera, J., Marcoval, M. A., Díaz-Jaramillo, M., & Gonzalez, M. (2021). Single and combined effects of Cypermethrin and UVR pre-exposure in the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3), 507-516. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00889-1>

Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>

Caporgno, M. P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. (2015). Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, 10, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

Carinelli, S. (2011). *Biosensor para el diagnóstico y seguimiento de inmunodeficiencias* (Tesis de máster). Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Carneiro, M., Ranglová, K., Lakatos, G. E., Manoel, J. A. C., Grivalský, T., Kozhan, D. M., Toribio, A., Moreno, J., Otero, A., Varela, J., Malcata, F. X., Suárez Estrella, F., Ación-Fernández, F. G., Molnár, Z., Ördög, V., & Masojídek, J. (2021). Growth and bioactivity of two chlorophyte (*Chlorella* and *Scenedesmus*) strains co-cultured outdoors in two different thin-layer units using municipal wastewater as a nutrient source. *Algal Research*, 56, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102299>

Casas-Arrojo, V., Arrojo Agudo, M. D. L. Á., Cárdenas García, C., Carrillo, P., Pérez Manríquez, C., Martínez-Manzanares, E., & Abdala Díaz, R. T. (2022). Antioxidant, immunomodulatory and potential anticancer capacity of polysaccharides (glucans) from *Euglena gracilis* GA klebs. *Pharmaceuticals*, 15(11), 1379. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0458-4>

Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC.

Castro, M. S., Silva, J. C., Machado, B. R., Guimarães, P. S., Lombardi, A. T., Martins, C. D. M. G., & Zanette, J. (2022). Differential Effects of Atrazine on Chlorophyceae Species and Association with Morphology, Photosynthesis, Chlorophyll Content, and Glutathione-S-Transferase Activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(7), 1675-1685. <https://doi.org/10.1002/etc.5339>

Cecchin, M., Simicevic, J., Chaput, L., Hernandez Gil, M., Girolomoni, L., Cazzaniga, S., Remacle, C., Hoeng, J., Ivanov, N. V., Titz, B., & Ballottari, M. (2023). Acclimation strategies of the green alga *Chlorella vulgaris* to different light regimes revealed by physiological and comparative proteomic analyses. *Journal of Experimental Botany*, 74(15), 4540-4558. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad170>

Chai, W. S., Cheun, J. Y., Kumar, P. S., Mubashir, M., Majeed, Z., Banat, F., Ho, S., & Show, P. L. (2021). A review on conventional and novel materials towards heavy metal adsorption in wastewater treatment application. *Journal of Cleaner Production*, 296, 126589. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126589>

Chan-Keb, C. A., Agraz-Hernández, C. M., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Ake-Canché, B., Tirado-Torres, D., Ruiz-Hernández, J., Sarabia-Alcocer, B., Gómez-Solano, M. I., & Pérez-Balan, R. A. (2021). Acute phytotoxicity of four common pharmaceuticals on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(5), 3737–3746. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/2005_37373746

Chantzistrountsiou, X., Ntzouvaras, A., Papadaki, S., Tsirigoti, A., Tzovenis, I., & Economou-Amilli, A. (2023). Carotenogenic activity of two hypersaline Greek *Dunaliella salina* strains under nitrogen deprivation and salinity stress. *Water*, 15(2), 241. <https://doi.org/10.3390/w15020241>

Chao, C., Zhao, Y., Guan, H., Liu, G., Hu, Z., & Zhang, B. (2017). Improved performance of immobilized laccase on poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized halloysite for 2, 4-dichlorophenol degradation. *Environmental Engineering Science*, 34(10), 762-770. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0549>

Chatoui, M., Lahsaini, S., Souabi, S., Bahlaoui, M. A., Hobaizi, S., & PALA, A. (2016). Study of refining wastewater pollution: case of vegetable oil refining industry Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(10).

Chatzikonstantinou, M., Vlachakis, D., Chronopoulou, E., Papageorgiou, L., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2017). The glutathione transferase family of *Chlamydomonas reinhardtii*: identification and characterization of novel sigma class-like enzymes. *Algal Research*, 24, 237-250. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.010>

Chawla, S., Rawal, R., & Pundir, C. S. (2011). Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. *Journal of Biotechnology*, 156(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.008>

Chawla, S., Rawal, R., Kumar, D., & Pundir, C. S. (2012). Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver

nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode. *Analytical Biochemistry*, 430(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.025>

Chen, Z., Shi, C., & Liu, A. (2024). Toxicity of urban stormwater on *Chlorella pyrenoidosa*: Implications for reuse safety. *Science of The Total Environment*, 926, 171803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171803>

Chiellini, C., Mariotti, L., Huaranca Reyes, T., de Arruda, E. J., Fonseca, G. G., & Guglielminetti, L. (2022). Remediation capacity of different microalgae in effluents derived from the cigarette butt cleaning process. *Plants*, 11(13), 1770. <https://doi.org/10.3390/plants11131770>

Cho, H. S., & Lee, J. (2024). Taxonomic reinvestigation of the genus *Tetradasmus* (Scenedesmaceae; Sphaeropleales) based on morphological characteristics and chloroplast genomes. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1303175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1303175>

Chokshi, K., Pancha, I., Trivedi, K., George, B., Maurya, R., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource Technology*, 180, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.102>

Chu, F. F., Chu, P. N., Shen, X. F., Lam, P. K., & Zeng, R. J. (2014). Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, 152, 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.013>

Chu, Y., Zhang, C., Chen, X., Li, X., Ren, N., & Ho, S. H. (2023). Multistage defense response of microalgae exposed to pharmaceuticals in wastewater. *Chinese Chemical Letters*, 34(4), 107727. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2022.08.007>

Comité Europeo de Normalización (CEN). (2009). *EN 14214:2009 – Combustibles de automoción. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diésel – Requisitos y métodos de ensayo*. European Committee for Standardization.

Conde, T. A., Neves, B. F., Couto, D., Melo, T., Neves, B., Costa, M., Silva, J., Domingues, P., & Domingues, M. R. (2021). Microalgae as sustainable bio-factories of healthy lipids: Evaluating fatty acid content and antioxidant activity. *Marine drugs*, 19(7), 357. <https://doi.org/10.3390/md19070357>

Condori, M. A. M., Gutierrez, M. E. V., Oviedo, R. D. N., & Choix, F. J. (2024). Valorization of nutrients from fruit residues for the growth and lipid production of *Chlorella* sp.: A vision of the circular economy in Peru. *Journal of Applied Phycology*, 36(1), 101-111. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03153-2>

Cordero, B. F., Obratzsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A., & Rodriguez, H. (2011). Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine Drugs*, 9(9), 1607-1624. <https://doi.org/10.3390/md9091607>

Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juarez-Campos, B., & Gonzalez-Hernandez, J. C. (2022). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology*, 42, e37320. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>

Costa, J. A. V., Cruz, C. G., & da Rosa, A. P. C. (2021). Insights into the technology utilized to cultivate microalgae in dairy effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102106. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102106>

Covell, L. (2022). *Metabolic responses to nitrogen deficiency and rapamycin treatment in freshwater microalgae strains* (Tesis doctoral). Universidade Federal de Viçosa, Brazil.

Cramer, M., & Myers, J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 17(1), 384-402. <https://doi.org/10.1007/BF00410835>

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438, 90-93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>

Cuba, R. D. S., do Carmo, J. R., Souza, C. F., & Bastos, R. G. (2015). Potencial de efluente de esgoto doméstico tratado como fonte de água e nutrientes no cultivo hidropônico de alface. *Revista Ambiente & Água*, 10(3), 574-586. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1575>

Cuervo Lumbaque, E., Gomes, M. F., Carvalho, V. D. S., de Freitas, A. M., Regina, E., & Tiburtius, L. (2017). Degradation and ecotoxicity of dye Reactive Black 5 after reductive-oxidative process. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(7), 6126.

Cunningham Jr, F. X., & Schiff, J. A. (1986). Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b: II. Polypeptide composition. *Plant Physiology*, 80(1), 231-238. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.231>

D'Imporzano, G., Silvia, S., Davide, V., Barbara, S., & Fabrizio, A. (2017). Microalgae mixotrophic growth: opportunity for stream depuration and carbon recovery. En B. N. Tripathi & D. Kumar, *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology* (pp. 141-177). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1950-0_5

Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Guardini, Z., Barera, S., Benedetti, M., Mannino, G., Maffei, M. E., & Bassi, R. (2019). Combined resistance to oxidative stress and reduced antenna size enhance light-to-biomass conversion efficiency in *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1566-9>

Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(1), 015009.

Das, P., Barbora, L., Das, M., & Goswami, P. (2014). Highly sensitive and stable laccase based amperometric biosensor developed on nano-composite matrix for detecting pyrocatechol in environmental samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192, 737-744. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.11.021>

Data Bridge Market Research. (2022) Global Microalgae Market – Industry Trends and Forecast to 2030. Disponible en <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-microalgae-market>.

de Cassia Soares Brandão, B., Oliveira, C. Y. B., Dos Santos, E. P., de Abreu, J. L., Oliveira, D. W. S., da Silva, S. M. B. C., & Gálvez, A. O. (2023). Microalgae-based domestic wastewater treatment: a review of biological aspects, bioremediation potential, and biomass production with biotechnological high-value. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(11), 1384. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-12031-w>

Del Campo, J.A., García-González, M., & Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>

Delanka-Pedige, H. M., Munasinghe-Arachchige, S. P., Cornelius, J., Henkanatte-Gedera, S. M., Tchinda, D., Zhang, Y., & Nirmalakhandan, N. (2019). Pathogen reduction in an algal-based wastewater treatment system employing *Galdieria sulphuraria*. *Algal Research*, 39, 101423. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101423>

Dewangana, S. K., & Shrivastava, S. (2024). A correlation between EC and TDS in water: A review. *International Journal of Progressive Research in Engineering Management and Science*, 5(4), 180-186.

Dhas, N. A., Raj, C. P., & Gedanken, A. (1998). Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 10(5), 1446-1452. <https://doi.org/10.1021/cm9708269>

Dirección Nacional de Agua Potable y Saneamiento (DNAPyS). (2023). *Tratamiento de aguas residuales en Argentina: Diagnóstico y prospectiva*. Ministerio de Obras Públicas, Secretaría de Infraestructura y Política Hídrica.

Dodevska, T. (2025). A Review on Xanthine Oxidase-Based Electrochemical Biosensors: Food Safety and Quality Control Applications. *Chemosensors*, 13(5), 159. <https://doi.org/10.3390/chemosensors13050159>

Dos Santos, R. N., Machado, B. R., Hefler, S. M., & Zanette, J. (2021). Glutathione S-transferase activity in aquatic macrophytes and halophytes and biotransformation potential for biocides. *Journal of Plant Research*, 134(3), 577-584. <https://doi.org/10.1007/s10265-021-01266-8>

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Eida, M. F., Darwesh, O. M., & Matter, I. A. (2018). Cultivation of oleaginous microalgae *Scenedesmus obliquus* on secondary treated municipal wastewater as growth medium for biodiesel production. *Journal of Ecological Engineering*, 19(5).

Elisma, N., Labanni, A., Rilda, Y., Asrofi, M., & Arief, S. (2019). Green synthesis of copper nanoparticles using *Uncaria gambir* Roxb. leaf extract and its characterization. *Rasayan Journal of Chemistry*, 12(4). <https://doi.org/10.31788/RJC.2019.1245347>

Elystia, S., Larasati, D., & Muria, S. R. (2020). Produksi lipid dari mikroalga *Scenedesmus* sp. pada media limbah cair tahu dengan variasi konsentrasi limbah dan photoperiod. *Al-Ard: Jurnal Teknik Lingkungan*, 5(2), 54-61. <https://doi.org/10.29080/alard.v5i2.519>

Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2015). Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 185, 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.004>

Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017). β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1), 33-49. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000100003>

European Communities. (1991). Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment. *Official Journal of the European Communities*, L135, 40–52.

Evans, L., Hennige, S. J., Willoughby, N., Adeloye, A. J., Skroblin, M., & Gutierrez, T. (2017). Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Algal research*, 24, 368-377. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.011>

Fai, P. B., Grant, A., & Reid, B. (2007). Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7), 1520-1531. <https://doi.org/10.1897/06-394R1.1>

Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.007>

Fai, S., Benhima, R., El Mernissi, N., Kasmi, Y., Smouni, A., & El Arroussi, H. (2022). Microalgae as promising source for integrated wastewater treatment and biodiesel production. *International Journal of Phytoremediation*, 24(1), 34-46. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1920572>

Fan, P., Li, Y., Deng, R., Zhu, F., Cheng, F., Song, G., Mi, W., & Bi, Y. (2022). Mixotrophic cultivation optimization of microalga *Euglena pisciformis* AEW501 for paramylon production. *Marine Drugs*, 20(8), 518. <https://doi.org/10.3390/md20080518>

Farag, M. A., & Gad, M. Z. (2022). Omega-9 fatty acids: Potential roles in inflammation and cancer management. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00329-0>

Farruggia, C., Kim, M. B., Bae, M., Lee, Y., Pham, T. X., Yang, Y., Han, M. J., Park, Y. K., & Lee, J. Y. (2018). Astaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.005>

Feregrino Mondragón, R. D. (2019). *Remoción de materia orgánica por E. gracilis heterotrófica a partir de desechos de cultivos celulares* (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de México.

Fernández Cordero, B. (2013). *Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en Chlorella zofingiensis* (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, España.

Ferro, L., Colombo, M., Posadas, E., Funk, C., & Muñoz, R. (2019). Elucidating the symbiotic interactions between a locally isolated microalga *Chlorella vulgaris* and its co-occurring bacterium *Rhizobium* sp. in synthetic municipal wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2299-2310. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1741-1>

Ferro, L., Gorzsás, A., Gentili, F. G., & Funk, C. (2018). Subarctic microalgal strains treat wastewater and produce biomass at low temperature and short photoperiod. *Algal Research*, 35, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.031>

Figuroa-Torres, G. M., Bermejo-Padilla, E., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2020). Microalgae strain catalogue. A strain selection guide for microalgae users: cultivation and chemical characteristics for high added-value products. The University of Manchester, Manchester, UK.

Foladori, P., Petrini, S., Nessenzia, M., & Andreottola, G. (2018). Enhanced nitrogen removal and energy saving in a microalgal–bacterial consortium treating real municipal wastewater. *Water Science and Technology*, 78(1), 174-182. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.094>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1985). *Water quality for agriculture*.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1992). *Wastewater treatment and use in agriculture*.

Frau, D., Pineda, A., Mayora, G., & Devercelli, M. (2022). Phytoplankton taxonomic and functional diversity in two shallow alluvial lakes with contrasting river connectivity. *Aquatic Sciences*, 84(2), 26. <https://doi.org/10.1007/s00027-022-00857-4>

Fu, L., Cui, X., Li, Y., Xu, L., Zhang, C., Xiong, R., Zhou, D., & Crittenden, J. C. (2017). Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal*, 330, 566-572. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.182>

Fu, Y., An, Q., Ni, R., Zhang, Y., Li, Y., & Ke, H. (2018). Preparation of polyaniline-encapsulated carbon/copper composite nanofibers for detection of polyphenol pollutant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 559, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.065>

Fu, Y., An, Q., Ni, R., Zhang, Y., Li, Y., & Ke, H. (2018). Preparation of polyaniline-encapsulated carbon/copper composite nanofibers for detection of polyphenol pollutant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 559, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.065>

Fukuda, M., Kinkawa, M., & Hayashi, M. (2024). Fed-batch cultivation of *Euglena gracilis* for the high-yield production and GPC-assisted molecular weight determination of paramylon. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 88(2), 206-211. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbad152>

Fulbright, S. P., Chisholm, S., & Reardon, K. F. (2016). Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*. *Algal Research*, 20, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.016>

Gain et al., 2021

Gain, G., Vega de Luna, F., Cordoba, J., Perez, E., Degand, H., Morsomme, P., Thiry, M., Baurain, D., Pierangelini, M., & Cardol, P. (2021). Trophic state alters the mechanism whereby energetic coupling between photosynthesis and respiration occurs in *Euglena gracilis*. *New Phytologist*, 232(4), 1603-1617. <https://doi.org/10.1111/nph.17677>

Gao, Q. T., Wong, Y. S., & Tam, N. F. (2017). Antioxidant responses of different microalgal species to nonylphenol-induced oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1317-1329. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1065-y>

García-Molina, M. M., Muñoz, J. L. M., Martínez-Ortiz, F., Martínez, J. R., García-Ruiz, P. A., Rodríguez-López, J. N., & García-Cánovas, F. (2014). Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: A kinetic study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(13), 3360-3369. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.048>

Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>

Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>

Giménez, L., Polla, W., Romero, N., Reno, U., Regaldo, L. & Gagneten, A.M. (2022) *Estudio cualitativo del fitoplancton en lagunas de tratamiento de aguas residuales urbanas (San Justo, Santa Fe)*. En VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019). Bioproducts from *Euglena gracilis*: synthesis and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 108. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>

Gobierno de la Provincia de Santa Fe. (1994). *Ley N° 11.220: Prestación y Regulación de Servicios Sanitarios*. Santa Fe, Argentina

Gomes, W. E., Beatto, T. G., Marcatto, L. C., Matsubara, E. Y., Mendes, R. K., & Rosolen, J. M. (2021). Electrochemical determination of hydroquinone using a

tyrosinase-based cup-stacked carbon nanotube (CSCNT)/carbon fiber felt composite electrode. *Analytical Letters*, 54(17), 2700-2712. <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1884256>

Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>

González García, M. B., & Costa García, A. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. En F. Ortega Ortiz de Apodaca (Ed.), *Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica* (pp. 197-222). Real Academia Nacional de Farmacia.

Goswami, R. K., Agrawal, K., Shah, M. P., & Verma, P. (2022). Bioremediation of heavy metals from wastewater: a current perspective on microalgae-based future. *Letters in Applied Microbiology*, 75(4), 701-717. <https://doi.org/10.1111/lam.13564>

Granum, E., Kirkvold, S., & Mykkestad, S. M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series*, 242, 83-94. <https://doi.org/10.3354/meps242083>

Greene, J. C., Bartels, C. L., Warren-Hicks, W. J., Parkhurst, B. R., & Linder, G. L. (1988). *Protocols for short-term toxicity screening of hazardous-waste sites* (No. PB-88-235510/XAB; EPA-600/3-88/029). Environmental Protection Agency.

Groppa, M. D., Trentini, A. G., Zawoznik, M. S., Bigi, R. I., Nadra, C., & Marconi, P. L. (2019). Optimization of a bioremediation strategy for an urban stream of Matanza-Riachuelo basin. *International Journal of Environmental and Ecological Engineering*, 13(5), 418-424

Grubišić, M., Peremin, I., Djedović, E., Šantek, B., & Ivančić Šantek, M. (2024). Cultivation of a novel strain of *Chlorella vulgaris* S2 under phototrophic, mixotrophic, and heterotrophic conditions, and effects on biomass growth and composition. *Fermentation*, 10(6), 270. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060270>

Gu, Y., Yuan, L., Jia, L., Xue, P., & Yao, H. (2021). Recent developments of a co-immobilized laccase–mediator system: A review. *RSC Advances*, 11(47), 29498-29506. <https://doi.org/10.1039/D1RA05104K>

Guin, P. S., Das, S., & Mandal, P. C. (2011). Electrochemical reduction of quinones in different media: a review. *International Journal of Electrochemistry*, 2011(1), 816202. <https://doi.org/10.4061/2011/816202>

Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of Environmental Management*, 203, 299-315. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.012>

Gulk, E. I., Zamyatkina, E. B., Birkemeyer, C., & Tarakhovskaya, E. R. (2023). Biochemical composition of *Euglena gracilis* cells during mixotrophic growth in the presence of various organic substrates. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(2), 21. <https://doi.org/10.1134/S1021443722602671>

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>

Guzmán Duxtan, A. J., Rengifo Maraví, J. C., & Echevarría Muñoz, J. M. (2020). Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPs Cu) por el método poliol asistido vía microondas (MW). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(4), 412-427.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

Häder, D. P., & Iseki, M. (2017). Photomovement in *Euglena*. En S. D. Schwartzbach & S. Shigeoka (Eds.), *Euglena: Biochemistry, cell and molecular biology* (pp. 207-235). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_11

Han, E., Yang, Y., He, Z., Cai, J., Zhang, X., & Dong, X. (2015). Development of tyrosinase biosensor based on quantum dots/chitosan nanocomposite for detection of phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*, 486, 102-106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.001>

Hasan, M. T., Sun, A., Khatiwada, B., McQuade, L., Mirzaei, M., Te'o, J., Hobba, G., Sunna, A., & Nevalainen, H. (2019). Comparative proteomics investigation of central carbon metabolism in *Euglena gracilis* grown under predominantly phototrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivations. *Algal Research*, 43, 101638. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101638>

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

Henze, M., & Comeau, Y. (2008). Wastewater characterization. En M. Henze, M. C. M. van Loosdrecht, G. A. Ekama & D. Brdjanovic (Eds.), *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design* (pp. 33-52). IWA Publishing.

Hermawan, J., Masithah, E. D., Tjahjaningsih, W., & Abdillah, A. A. (2018). Increasing β -carotene content of phytoplankton *Dunaliella salina* using different salinity media. En *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (pp.12-34). IOP Publishing.

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Hervás-Pérez, J. P., Martín-Carbajo, L., Izcará, S., & Sánchez-Paniagua, M. (2026). Enhanced amperometric tyramine sensing via tyrosinase entrapment in polyethylene glycol-modified methacrylate microgels. *Talanta*, 300, 129253. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.129253>

Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>

Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019-1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>

Jasso-Chávez, R., García-Cano, I., Marín-Hernández, Á., Mendoza-Cózatl, D., Rendón, J. L., & Moreno-Sánchez, R. (2005). The bacterial-like lactate shuttle components from heterotrophic *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1709(2), 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.07.007>

Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191-194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)

Jeffrey, S. W. (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 162(2), 271-285. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(68\)90109-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(68)90109-6)

Ji, C. F., Yu, X. J., Chen, Z. A., Xue, S., Legrand, J., & Zhang, W. (2011). Effects of nutrient deprivation on biochemical compositions and photo-hydrogen production of *Tetraselmis subcordiformis*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(10), 5817-5821. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.138>

Jia, J., Han, D., Gerken, H. G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., & Xu, J. (2015). Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Research*, 7, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.005>

Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607-4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>

Jutidamrongphan, W., Park, K. Y., Lee, K., Kim, D., Lim, B. R., & Lee, J. W. (2015). Effect of carbon dioxide injection on photosynthetic wastewater treatment using microalgae *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*. *Desalination and Water Treatment*, 54(13), 3654-3660. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.923197>

Kadam, A. A., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Saratale, R. G., Shahzad, A., Magotra, V. K., Kumar, M., Palem, R. R., & Sung, J. S. (2022). Recent advances in the development of laccase-based biosensors via nano-immobilization techniques. *Chemosensors*, 10(2), 58. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10020058>

Kadir, W. N. A., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., & Lee, K. T. (2018). Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: a review. *Energy Conversion and Management*, 171, 1416-1429. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.06.074>

Karim, M. N., & Lee, H. J. (2013). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on Au nanoparticle modified screen printed carbon electrodes. *Talanta*, 116, 991-996. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.003>

Ke, L., Luo, L., Wang, P., Luan, T., & Tam, N. F. Y. (2010). Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101(18), 6950-6961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.011>

Kendirlioglu, G., & Cetin, A. K. (2017). Effect of different wavelengths of light on growth, pigment content and protein amount of *Chlorella vulgaris*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 7974-7980.

Kennedy, V., Kaszecki, E., Donaldson, M. E., & Saville, B. J. (2024). The impact of elevated sulfur and nitrogen levels on cadmium tolerance in *Euglena species*. *Scientific Reports*, 14(1), 11734. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61964-w>

Khalifa, M. E., Abou El-Reash, Y. G., Ahmed, M. I., & Rizk, F. W. (2020). Effect of media variation on the removal efficiency of pollutants from domestic wastewater in

constructed wetland systems. *Ecological Engineering*, 143, 105668. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105668>

Khanna, P. K., Gaikwad, S., Adhyapak, P. V., Singh, N., & Marimuthu, R. (2007). Synthesis and characterization of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 61(25), 4711-4714. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.03.014>

Khanra, A., & Rai, M. P. (2018). Evaluation of mixotrophic cultivation of *Euglena gracilis* for lipid synthesis and FAME characterization towards biodiesel application. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 77, 359-364.

Khatiwada, B., Sunna, A., & Nevalainen, H. (2020). Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: From biorefineries to bioremediation. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(12), 3952-3967. <https://doi.org/10.1002/bit.27516>

Kim, J. Y., Oh, J. J., Kim, D. H., Park, J., Kim, H. S., & Choi, Y. E. (2019). Rapid and accurate quantification of paramylon produced from *Euglena gracilis* using an ssDNA aptamer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 402-408. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04588>

Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown Jr, R. M., & Triemer, R. E. (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146(2), 150-156. <https://doi.org/10.1007/BF01405924>

Kiss, J. Z., Vasoconcelos, A. C., & Triemer, R. E. (1986). Paramylon Synthesis and Chloroplast Structure Associated with Nutrient Levels in *Euglena* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology*, 22(3), 327-333. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1986.tb00031.x>

Kochana, J., Wapiennik, K., Kozak, J., Knihnicki, P., Pollap, A., Woźniakiewicz, M., Nowak, J., & Kościelniak, P. (2015). Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system. *Talanta*, 144, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.078>

Kokufuta, E., & Nishimura, H. (1991). Complexation of pepsin poly (ethylene glycol). *Polymer Bulletin*, 26(3), 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF00587970>

Kong, W., Kong, J., Ma, J., Lyu, H., Feng, S., Wang, Z., Yuan, P., & Shen, B. (2021). *Chlorella vulgaris* cultivation in simulated wastewater for the biomass production, nutrients removal and CO₂ fixation simultaneously. *Journal of Environmental Management*, 284, 112070. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112070>

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*, 32(3), 1569-1579. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02089-1>

Korn, E. D. (1964). The fatty acids of *Euglena gracilis*. *Journal of Lipid Research*, 5(3), 352-362. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40204-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40204-4)

Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2021). Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open biology*, 11(3), 200407. <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>

Krajčovič, J., Vesteg, M., & Schwartzbach, S. D. (2015). Euglenoid flagellates: a multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, 202, 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.035>

Kruger et al., 2024

Krüger, J., Richter, P., Stoltze, J., Prasad, B., Strauch, S. M., Krüger, M., Nasir, A., & Lebert, M. (2024). Changes in Gravitaxis and Gene-Expression in an *Euglena gracilis* Culture over Time. *Biomolecules*, 14(3), 327. <https://doi.org/10.3390/biom14030327>

Kube, M., Jefferson, B., Fan, L., & Roddick, F. (2018). The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Algal Research*, 31, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.009>

Kumar, V., Jaiswal, K. K., Verma, M., Vlaskin, M. S., Nanda, M., Chauhan, P. K., Singh, A., & Kim, H. (2021). Algae-based sustainable approach for simultaneous removal of micropollutants, and bacteria from urban wastewater and its real-time reuse for aquaculture. *Science of the Total Environment*, 774, 145556. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145556>

Kurbanoglu, S., Rivas, L., Ozkan, S. A., & Merkoçi, A. (2017). Electrochemically reduced graphene and iridium oxide nanoparticles for inhibition-based angiotensin-converting enzyme inhibitor detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.109>

Kurbanoglu, S., Rivas, L., Ozkan, S. A., & Merkoçi, A. (2017). Electrochemically reduced graphene and iridium oxide nanoparticles for inhibition-based angiotensin-converting enzyme inhibitor detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.109>

Kuroda, M., Horino, T., Inoue, D., Morikawa, M., & Ike, M. (2018). Biomass production and nutrient removal through cultivation of *Euglena gracilis* in domestic wastewater. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 54, 105-113.

Labbé, J. I., Ramos-Suárez, J. L., Hernández-Pérez, A., Baeza, A., & Hansen, F. (2017). Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 635-643. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.040>

Lacroux, J., Seira, J., Trably, E., Bernet, N., Steyer, J. P., & van Lis, R. (2021). Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* on acetate and butyrate: interplay between substrate, C: N ratio and pH. *Frontiers in microbiology*, 12, 703614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703614>

Lam, M. K., Yusoff, M. I., Uemura, Y., Lim, J. W., Khoo, C. G., Lee, K. T., & Ong, H. C. (2017). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 103, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.032>

Laranjo, M. T., Morawski, F. M., Dias, S. L., Benvenuti, E. V., Arenas, L. T., & Costa, T. M. (2019). Silica/titania graphite composite modified with chitosan and tyrosinase employed as a sensitive biosensor for phenolic compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(12), 2660-2672. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190190>

Le Goff, A., Holzinger, M., & Cosnier, S. (2015). Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 941-952. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1828-4>

Lee, S. A., Kim, M., Kim, H. S., & Ahn, C. Y. (2022). Extra benefit of microalgae in raw piggery wastewater treatment: pathogen reduction. *Microbiome*, 10(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01339-3>

Lei, A., Hu, Z., Wong, Y., & Tam, N. F. (2006). Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *Journal of Applied Phycology*, 18(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9016-4>

Lei, A., Hu, Z., Wong, Y., & Tam, N. F. (2006). Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *Journal of Applied Phycology*, 18(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9016-4>

Lemoine, Y., & Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106(1), 155-177. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>

Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2023). Lutein biosynthesis from microalgae—Recent advances and circular economy. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103097>

Levine, R. B., LeBrun, J. R., & Horst, G. P. (2013). *Multi-stage process for production of immune modulator*. U.S. Patent Application US20130303752A1.

Levine, R., Horst, G., Tonda, R., Lumpkins, B., & Mathis, G. (2018). Evaluation of the effects of feeding dried algae containing beta-1, 3-glucan on broilers challenged with *Eimeria*. *Poultry Science*, 97(10), 3494-3500. <https://doi.org/10.3382/ps/pey227>

Li, Q., Xu, Y., Liang, C., Peng, L., & Zhou, Y. (2023). Nitrogen removal by algal-bacterial consortium during mainstream wastewater treatment: transformation mechanisms and potential N₂O mitigation. *Water Research*, 235, 119890. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119890>

Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2010). Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 258-268. <https://doi.org/10.1002/bit.22807>

Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>

Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>

Lima, S., D'Agostino, N., Brucato, A., Caputo, G., Grisafi, F., & Scargiali, F. (2022). Civil wastewater remediation through employment of indigenous microalgae and sewage sludge. *Chemical Engineering Transactions*, 93, 301-306. <https://doi.org/10.3303/CET2293051>

Lima, S., Villanova, V., Grisafi, F., Caputo, G., Brucato, A., & Scargiali, F. (2020). Autochthonous microalgae grown in municipal wastewaters as a tool for effectively removing nitrogen and phosphorous. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101647. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101647>

Litescu, S. C., Eremia, S. A., Bertoli, A., Pistelli, L., & Radu, G. L. (2010). Laccase-nafion based biosensor for the determination of polyphenolic secondary metabolites. *Analytical Letters*, 43(7-8), 1089-1099. <https://doi.org/10.1080/00032710903518518>

Liu, D., Liu, H., Wang, S., Chen, J., & Xia, Y. (2018). The toxicity of ionic liquid 1-decylpyridinium bromide to the algae *Scenedesmus obliquus*: growth inhibition,

phototoxicity, and oxidative stress. *Science of the Total Environment*, 622, 1572-1580.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.021>

Liu, J. Y., Zeng, L. H., & Ren, Z. H. (2021). The application of spectroscopy technology in the monitoring of microalgae cells concentration. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(3), 171-192. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1763380>

Liu, J., Mao, X., Zhou, W., & Guarnieri, M. T. (2016). Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 214, 319-327.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.112>

Liu, X. J., Wu, Y. H., Zhao, L. C., Xiao, S. Y., Zhou, A. M., & Liu, X. (2011). Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1752-1757.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-177>

Liu, Y., Yao, L., He, L., Liu, N., & Piao, Y. (2019). Electrochemical enzyme biosensor bearing biochar nanoparticle as signal enhancer for bisphenol a detection in water. *Sensors*, 19(7), 1619. <https://doi.org/10.3390/s19071619>

Lofrano, G., & Brown, J. (2010). Wastewater management through the ages: A history of mankind. *Science of the Total Environment*, 408(22), 5254-5264.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.062>

Luo, J. J., Pan, S. W., Yang, J. H., Chang, T. L., Lin, P. Y., Wu, C. L., Liu, W. F., Huang, X. R., Koshevoy, I. O., Chou, P. T., & Ho, M. L. (2018). Detecting glucose levels in blood plasma and artificial tear by Au (I) Complex on the carbopol polymer: A microfluidic paper-based method. *Polymers*, 10(9), 1001.
<https://doi.org/10.3390/polym10091001>

Mahapatra, D. M., Chanakya, H. N., & Ramachandra, T. V. (2013). *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 855-865.
<https://doi.org/10.1007/s10811-013-9979-5>

Mamani Condori, M. A., Colque Ollachica, D., Ccapa Loncone, A. R., Pires, J. C., & Gagneten, A. M. (2025). Sustainable Nutrient Recovery from Wastewater Mixture to Optimize Microalgal Lipid Production: A Vision of Zero Water Footprint. *Bioengineering*, 12(12), 1291.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering12121291>

Mañas, P., & De las Heras, J. (2018). Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. *International Journal of*

Environmental Science and Technology, 15(2), 273-280.
<https://doi.org/10.1007/s13762-017-1386-z>

Mandotra, S. K., Kumar, P., Suseela, M. R., Nayaka, S., & Ramteke, P. W. (2016). Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, 201, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.042>

Mao, X., Wu, T., Sun, D., Zhang, Z., & Chen, F. (2018). Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 249, 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.090>

Marchello, A. E., Lombardi, A. T., Dellamano-Oliveira, M. J., & Souza, C. W. D. (2015). Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 75-84. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131225>

Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631-645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>

Marques, F., Lopes, D., Conde, T., Melo, T., Silva, J., Abreu, M. H., Domingues, P., & Domingues, M. R. (2023). Lipidomic characterization and antioxidant activity of macro- and microalgae blend. *Life*, 13(1), 231. <https://doi.org/10.3390/life13010231> Kawamura, A., Ooyama, K., Kojima, K., Kachi, H., Abe, T., Amano, K., & Aoyama, T. (2011). Dietary supplementation of gamma-linolenic acid improves skin parameters in subjects with dry skin and mild atopic dermatitis. *Journal of Oleo Science*, 60(12), 597-607. <https://doi.org/10.5650/jos.60.597>

Matsuda, F., Hayashi, M., & Kondo, A. (2011). Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(11), 2253-2256. <https://doi.org/10.1271/bbb.110482>

Mayhead, E., Silkina, A., Llewellyn, C. A., & Fuentes-Grünwald, C. (2018). Comparing nutrient removal from membrane filtered and unfiltered domestic wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Biology*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/biology7010012>

Medhi, K., & Thakur, I. S. (2018). Bioremoval of nutrients from wastewater by a denitrifier *Paracoccus denitrificans* ISTOD1. *Bioresource Technology Reports*, 1, 56-60. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.02.006>

Mendes, A. R., Spínola, M. P., Lordelo, M., & Prates, J. A. (2024a). Chemical compounds, bioactivities, and applications of *Chlorella vulgaris* in food, feed and medicine. *Applied Sciences*, 14(23), 10810. <https://doi.org/10.3390/app142310810>

Mendes, A. R., Spínola, M. P., Lordelo, M., & Prates, J. A. (2024b). Advances in bioprocess engineering for optimising *Chlorella vulgaris* fermentation: Biotechnological innovations and applications. *Foods*, 13(24), 4154. <https://doi.org/10.3390/foods13244154>

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, 330-333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>

Mokrosnop, V. M. (2016). Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation. *Studia Biologica*, 10(2), 141-148. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1002.483>

Molina-Miras, A., Bueso-Sánchez, A., Cerón-García, M. D. C., Sánchez-Mirón, A., Contreras-Gómez, A., & García-Camacho, F. (2022). Effect of nitrogen, phosphorous, and light colimitation on amphidinol production and growth in the marine dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae*. *Toxins*, 14(9), 594. <https://doi.org/10.3390/toxins14090594>

Moondra, N., Jariwala, N., & Christian, R. (2022). Optimization of detention time for domestic wastewater treatment using phycoremediation. *Pollution*, 8(4), 1185-1195.

Moondra, N., Jariwala, N., & Christian, R. (2023). Impact of Microalgae in Domestic Wastewater Treatment: A Lab-Scale Experimental Study. *Pollution*, 9(1), 211-221.

Morales-Plasencia, M. E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., Nieves-Soto, M., Bermúdez-Lizárraga, J. F., & Rojo-Cebreros, A. H. (2023). The effect of nitrogen limitation on carbohydrates and β -glucan accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Algal Research*, 72, 103125. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103125>

Moustafa, A. M., EINadi, M. E. H., Abdelmomen, M. M., & Nagy, A. M. (2023). Impact of microalgae layer thickness on the treatment performance of drain water. *Scientific Reports*, 13(1), 20785. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48129-x>

Muchut, R. J. (2020). *Estudio de estructura-función y regulación en enzimas del metabolismo del carbono y de la generación del poder reductor en células autótrofas* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Muchut, R. J., Calloni, R. D., Arias, D. G., Arce, A. L., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2021). Elucidating carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse genetics-

based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie*, 184, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.016>

Municipalidad de San Justo. (2006). *Ordenanza N° 2037/06*. San Justo, Santa Fe, Argentina.

Muronetz, V. I., Pozdyshev, D. V., & Semenyuk, P. I. (2022). Polyelectrolytes for Enzyme Immobilization and the Regulation of Their Properties. *Polymers*, 14(19), 4204. <https://doi.org/10.3390/polym14194204>

Nakashima, A., Sugimoto, R., Suzuki, K., Shirakata, Y., Hashiguchi, T., Yoshida, C., & Nakano, Y. (2019). Anti-fibrotic activity of *Euglena gracilis* and paramylon in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Food Science & Nutrition*, 7(1), 139-147. <https://doi.org/10.1002/fsn3.828>

Nakashima, A., Suzuki, K., Asayama, Y., Konno, M., Saito, K., Yamazaki, N., & Takimoto, H. (2017). Oral administration of *Euglena gracilis* Z and its carbohydrate storage substance provides survival protection against influenza virus infection in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1-2), 379-383. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.167>

Nam, K., Lee, H., Heo, S. W., Chang, Y. K., & Han, J. I. (2017). Cultivation of *Chlorella vulgaris* with swine wastewater and potential for algal biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1171-1178. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

Nezbrytska, I., Shamanskyi, S., Pavliukh, L., & Gorbunova, Z. (2022). Application of *Euglena gracilis* in wastewater treatment processes. *BioTechnologia*, 103(4), 323. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.120702>

Ni, H., He, G. Q., Ruan, H., Chen, Q. H., & Chen, F. (2005). Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 6(6), 514-522. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0514>

Niño Castillo, C. M., Rodríguez-Rivera, F. C., Díaz, L. E., & Lancheros-Díaz, A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31.

Niquice-Janeiro, C. A., Arsénio, A. M., & van Lier, J. B. (2023). Wastewater-based nutrient supply for lettuce production in the Infulene Valley, Maputo, Mozambique. *Agriculture*, 13(11), 2158. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112158>

Nomdedeu, O. (2018). *Indicadores biológicos: Ecología aplicada al tratamiento de líquidos residuales y aguas superficiales*. Arte Editorial Servicop.

Núñez, J. A. (2013). *Agua y saneamiento a nivel nacional: alternativas de innovación*. Cámara Argentina de la Construcción.

O'Neill, E. C., Kuhadomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J. U., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W. G. T., & Field, R. A. (2017). Exploring the glycans of *Euglena gracilis*. *Biology*, 6(4), 45. <https://doi.org/10.3390/biology6040045>

Oberholster, P. J., Steyn, M., & Botha, A. M. (2021). A comparative study of improvement of phycoremediation using a consortium of microalgae in municipal wastewater treatment pond systems as an alternative solution to Africa's sanitation challenges. *Processes*, 9(9), 1677. <https://doi.org/10.3390/pr9091677>

Oda, Y., Miyatake, K., & Kitaoka, S. (1979). Inability of *Euglena gracilis* Z to utilize nitrate, nitrite and urea as the nitrogen sources. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Ser. B, Agriculture and Biology*, 31, 43-48.

Odjadjare, E. C., Mutanda, T., Chen, Y. F., & Olaniran, A. O. (2018). Evaluation of pre-chlorinated wastewater effluent for microalgal cultivation and biodiesel production. *Water*, 10(8), 977. <https://doi.org/10.3390/w10080977>

O'Farrell, I., Motta, C., Forastier, M., Polla, W., Otaño, S., Meichtry, N., Devercelli, M., & Lombardo, R. (2019). Ecological meta-analysis of bloom-forming planktonic Cyanobacteria in Argentina. *Harmful Algae*, 83, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.01.004>

Oraby, S., Hegazy, M. I., Labeeb, H. M., & Mahdy, A. A. (2023). Biochemical responses of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. under nutrient limitation. *Sinai Journal of Applied Sciences*, 12(1), 9-26.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2011). *Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>

Orner, K. D. (2019). *Removal and Recovery of Nutrients from Wastewater in Urban and Rural Contexts* (Tesis doctoral). University of South Florida, USA.

Ortega-Blas, F. M., Ramos-Saravia, J. C., & Cossío-Rodríguez, P. L. (2025). Removal of Nitrogen and Phosphorus from Municipal Wastewater Through Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. in Consortium. *Water*, 17(8), 1160. <https://doi.org/10.3390/w17081160>

Oruganti, R. K., Katam, K., Show, P. L., Gadhamshetty, V., Upadhyayula, V. K. K., & Bhattacharyya, D. (2022). A comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant

removal. *Bioengineered*, 13(4), 10412-10453.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056823>

Osmani, M., Hoxha, B., Kucaj, E., Mazrreku, A., & Cinari, R. (2023). Wastewater treatment impact on water quality-a case study. *Periodico di Mineralogia*, 92(1).

Othman, A. M., & Wollenberger, U. (2020). Amperometric biosensor based on coupling aminated laccase to functionalized carbon nanotubes for phenolics detection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 855-864.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.049>

Pacheco, D., Rocha, A. C. S., Garcia, A., Bóia, A., Pereira, L., & Verdelhos, T. (2021). Municipal wastewater: A sustainable source for the green microalgae *Chlorella vulgaris* biomass production. *Applied Sciences*, 11(5), 2207.
<https://doi.org/10.3390/app11052207>

Palácio, S. M., Nogueira, D. A., Manenti, D. R., Módenes, A. N., Quiñones, F. R. E., & Borba, F. H. (2012). Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. *Engevista*, 14(2), 127-134.

Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216-1226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>

Pan, D., Gu, Y., Lan, H., Sun, Y., & Gao, H. (2015). Functional graphene-gold nanocomposite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol. *A. Analytica Chimica Acta*, 853, 297-302.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.004>

Pan, D., Gu, Y., Lan, H., Sun, Y., & Gao, H. (2015). Functional graphene-gold nanocomposite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol. *A. Analytica Chimica Acta*, 853, 297-302.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.004>

Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>

Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>

Pantami, H. A., Ahamad Bustamam, M. S., Lee, S. Y., Ismail, I. S., Mohd Faudzi, S. M., Nakakuni, M., & Shaari, K. (2020). Comprehensive GCMS and LC-MS/MS metabolite profiling of *Chlorella vulgaris*. *Marine drugs*, 18(7), 367. <https://doi.org/10.3390/md18070367>

Papadaki, A., Mallouchos, A., Efthymiou, M. N., Gardeli, C., Kopsahelis, N., Agueiras, E. C., Freire, D. M. G., Papanikolau, S., & Koutinas, A. A. (2017). Production of wax esters via microbial oil synthesis from food industry waste and by-product streams. *Bioresource Technology*, 245, 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.004>

Paul, C., & Pohnert, G. (2011). Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS ONE*, 6(6), e21032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021032>

Peña García, N. (2004). *Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa: aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.

Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S. M., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Revista de Salud Ambiental*, 15(1), 13-20.

Peshkov, A., Iliev, I., & Dimcheva, N. (2025). Laccase-Based Biosensors: Advancements and Applications in Environmental, Biochemical and Biomedical Sensing. *Ecologia Balkanica*, 17(1).

Phul, R., Kaur, C., Farooq, U., & Ahmad, T. (2018). Ascorbic acid assisted synthesis, characterization and catalytic application of copper nanoparticles. *Material Science & Engineering International Journal*, 2(4), 90-94.

Pino, F., Mayorga-Martinez, C. C., & Merkoçi, A. (2016). High-performance sensor based on copper oxide nanoparticles for dual detection of phenolic compounds and a pesticide. *Electrochemistry Communications*, 71, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.08.001>

Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Lepore, M., Mita, D. G., Diano, N., Mita, L., & Moscone, D. (2010). A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9), 2003-2008. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.01.025>

Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Moscone, D., Cammarota, M., Mita, D. G., & Lepore, M. (2013). Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with

thionine–carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection. *Electrochimica Acta*, 109, 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.129>

Posadas, E., del Mar Morales, M., Gomez, C., Acién, F. G., & Muñoz, R. (2015). Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chemical Engineering Journal*, 265, 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.059>

Prajapati, S. K., Kaushik, P., Malik, A., & Vijay, V. K. (2013). Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1408-1425. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.005>

Pratita, A. T. K., & Fathurohman, M. (2020). Potential of autotrophic microalgae (*Spirulina plantensis*) in decreased coliform bacteria. En *2nd Bakti Tunas Husada-Health Science International Conference (BTH-HSIC 2019)* (pp. 208-210). Atlantis Press. <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.200523.050>

Purkayastha, J., Bora, A., Gogoi, H. K., & Singh, L. (2017). Growth of high oil yielding green alga *Chlorella ellipsoidea* in diverse autotrophic media, effect on its constituents. *Algal Research*, 21, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.009>

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>

Rajasulochana, P., & Preethy, V. (2016). Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water–A comprehensive review. *Resource-Efficient Technologies*, 2(4), 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.09.004>

Rajesh, Takashima, W., & Kaneto, K. (2004). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(2), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.028>

Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Mechanistic aspects of the tyrosinase oxidation of hydroquinone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(11), 2463-2464. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.009>

Ratha, S. K., Rao, P. H., Govindaswamy, K., Jaswin, R. S., Lakshmidivi, R., Bhaskar, S., & Chinnasamy, S. (2016). A rapid and reliable method for estimating

microalgal biomass using a moisture analyser. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1725-1734. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0731-1>

Regaldo, L., Reno, U., Romero, N., Avilés, A., Díaz, R. T. A., Polla, W., & Gagneten, A. M. (2020). Multifunctional approach to evaluate the efficiency of landfill leachate treatments. En M. P. Shah (Ed.), *Removal of Toxic Pollutants Through Microbiological and Tertiary Treatment* (pp. 179-209). Elsevier.

Ren, H. Y., Zhu, J. N., Kong, F., Xing, D., Zhao, L., Ma, J., Ren, N. Q., & Liu, B. F. (2019). Ultrasonic enhanced simultaneous algal lipid production and nutrients removal from non-sterile domestic wastewater. *Energy Conversion and Management*, 180, 680-688. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.11.028>

Ren, H. Y., Zhu, J. N., Kong, F., Xing, D., Zhao, L., Ma, J., Ren, N. Q., & Liu, B. F. (2019). Ultrasonic enhanced simultaneous algal lipid production and nutrients removal from non-sterile domestic wastewater. *Energy Conversion and Management*, 180, 680-688. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.11.028>

Reno, U., Regaldo, L., Ojeda, G., Schmuck, J., Romero, N., Polla, W., Kervaravat, S. V., & Gagneten, A. M. (2022). Wastewater-based epidemiology: Detection of SARS-CoV-2 RNA in different stages of domestic wastewater treatment in Santa Fe, Argentina. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(9), 372. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05772-w>

Renuka, N., Sood, A., Ratha, S. K., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2013). Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1529-1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9982-x>

Reynolds, L. P., Leme, V. F., & Davidson, P. C. (2024). Investigating the impacts of wastewaters on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination and growth. *Agriculture*, 14(4), 608. <https://doi.org/10.3390/agriculture14040608>

Rice, E. W., & Bridgewater, L. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.

Richter, P. R., Liu, Y., An, Y., Li, X., Nasir, A., Strauch, S. M., Becker, I., Krüger, J., Schuster, M., Ntefidou, M., Daiker, V., Haag, F. Q. M., Aiach, A., & Lebert, M. (2015). Amino acids as possible alternative nitrogen source for growth of *Euglena gracilis* Z in life support systems. *Life Sciences in Space Research*, 4, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2014.11.001>

Rocha Scharfenberg, H., Massao Shimano, M., Ludovico Beraldo, A., & Borella Marfil Anhê, A. C. (2021). Avaliação do efeito tóxico de preservantes de bambu sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa*. *Revista Ciência e Natura*, 43.

Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>

Romero, N., Brito, A., Troiani, H. E., Nantes, I. L., Castro, G. R., & Gagneten, A. M. (2024). Assessment of endogenous and exogenous silver nanoparticles effects on the microalgae *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(11), 343. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04152-2>

Romero, N., Kergaravat, S. V., Regaldo, L., Hernández, S. R., Seabra, A. B., Ferreira, F. F., Lourenço, I. M., Castro, G. R., & Gagneten, A. M. (2025). Multiple physiological response analyses of *Chlorella vulgaris* exposed to silver nanoparticles, ciprofloxacin, and their combination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 44(4), 1051-1065. <https://doi.org/10.1093/etoinl/vgaf013>

Rubiyatno, R., Matsui, T., Mori, K., & Toyama, T. (2021). Paramylon production by *Euglena gracilis* via mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste organic compounds. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100735>

Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P. D., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2013). Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater. *Environmental Technology*, 34(8), 979-991. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.724451>

Ruiz-Domínguez, M. C., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vílchez, C., & Vega, J. M. (2015). Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain onubensis) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1099-1108. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0403-6>

Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Longo, V., Pucci, L., Penno, G., & Gualtieri, P. (2017). *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Science & Nutrition*, 5(2), 205-214. <https://doi.org/10.1002/fsn3.383>

Sá, A. C. D., Barbosa, S. C., Raymundo-Pereira, P. A., Wilson, D., Shimizu, F. M., Raposo, M., & Oliveira Jr, O. N. (2020). Flexible carbon electrodes for electrochemical

detection of bisphenol-a, hydroquinone and catechol in water samples. *Chemosensors*, 8(4), 103. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040103>

Saeed, M. U., Hussain, N., Sumrin, A., Shahbaz, A., Noor, S., Bilal, M., Aleya, L., & Iqbal, H. M. (2022). Microbial bioremediation strategies with wastewater treatment potentialities—A review. *Science of the Total Environment*, 818, 151754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151754>

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>

Sajadinasab, J., Manaffar, R., Askarizadeh, M., Hosseini, S., Dehghani, I., & Pourakbar, L. (2024). Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in *Dunaliella* microalgae can diminish toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in favor of valuable metabolites production. *Preprint*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5426946/v1>

Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>

Salvo-Comino, C., Gonzalez-Gil, A., Rodriguez-Valentin, J., Garcia-Hernandez, C., Martin-Pedrosa, F., Garcia-Cabezon, C., & Rodriguez-Mendez, M. L. (2020). Biosensors platform based on chitosan/AuNPs/phthalocyanine composite films for the electrochemical detection of catechol. The role of the surface structure. *Sensors*, 20(7), 2152. <https://doi.org/10.3390/s20072152>

Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Acién, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), 398-405. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>

Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Contreras-Esquivel, J. C., Medina-Morales, M. A., Aguilar, C. N., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quimica Nova*, 37, 504-512. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>

Sánchez-Zurano, A., Ciardi, M., Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., Bermejo, R., & Molina-Grima, E. (2021). Role of microalgae in the recovery of nutrients from pig manure. *Processes*, 9(2), 203. <https://doi.org/10.3390/pr9020203>

Sangare, D., Coulibaly, L. S., Sylla, S., & Coulibaly, L. (2020). Effect of treated greywater by black shale and laterite on *Lactuca sativa* L. germination rate. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 12(3), 265-271.

Santhar, D. T., Haq, M. B., Marudhupandi, T., Vaseeharan, B., Rajan, D. K., & Moovendhan, M. (2023). Evaluation of chemical compositions and antioxidant potential of marine microalgae of the genus *Nannochloropsis*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(17), 15751-15757. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01929-5>

Sathasivam, R., & Ki, J. S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine Drugs*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.3390/md16010026>

Schierle, J., Schellenberger, T., Fizet, C., & Betz, R. (2002). A simple spectrophotometric determination of total β -carotene in food additives with varying E/Z-isomer ratios using an isobestic wavelength. *European Food Research and Technology*, 215(3), 268-274. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0547-5>

Schmuck, J., Reno, U., Márquez, V. E., Regaldo, L., Hernández, S. R., & Gagneten, A. M. (2025b). *Chlorella vulgaris*-mediated Bioremediation and Valorization of Urban Wastewater, from a circular economy approach. *Journal of Applied Phycology*, 37(3), 1795-1813. <https://doi.org/10.1007/s10811-025-03511-2>

Schmuck, J., Reno, U., Regaldo, L., Romero, N., Polla, W., & Gagneten, A. M. (2025a). Current progress and challenges of municipal wastewater phycoremediation and microalgae-based biorefinery. En M. P. Shah & A. Sarkar (Eds.), *Bio Refinery of Wastewater Treatment* (pp. 19-42). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95670-3.00011-3>

Schmuck, J., Rondan, W., Reno, U., Vasquez, J., Regaldo, L., Gagneten, A. M., & Champi, A. (2024). Lyophilized and sonicated graphene oxide and its nanoecotoxicity applications. *Diamond and Related Materials*, 145, 111145. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2024.111145>

Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., Von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global water pollution and human health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 109-136. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>

Schwarzans, J. P., Cholewa, D., Grimm, P., Beshay, U., Risse, J. M., Friehs, K., & Flaschel, E. (2015). Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1389-1399. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0458-4>

Sella, E., & Shabat, D. (2013). Hydroquinone–quinone oxidation by molecular oxygen: a simple tool for signal amplification through auto-generation of hydrogen peroxide. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(31), 5074-5078. <https://doi.org/10.1039/C3OB40962G>

Shen, X. F., Gao, L. J., Zhou, S. B., Huang, J. L., Wu, C. Z., Qin, Q. W., & Zeng, R. J. (2020). High fatty acid productivity from *Scenedesmus obliquus* in heterotrophic cultivation with glucose and soybean processing wastewater via nitrogen and phosphorus regulation. *Science of the Total Environment*, 708, 134596. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134596>

Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., & Huang, H. (2020). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 610. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00610>

Shibakami, M., Tsubouchi, G., & Hayashi, M. (2014). Thermoplasticization of euglenoid β -1, 3-glucans by mixed esterification. *Carbohydrate Polymers*, 105, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.053>

Shibakami, M., Tsubouchi, G., Nakamura, M., & Hayashi, M. (2013). Preparation of carboxylic acid-bearing polysaccharide nanofiber made from euglenoid β -1, 3-glucans. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.026>

Shitanaka, T., Fujioka, H., Khan, M., Kaur, M., Du, Z. Y., & Khanal, S. K. (2024). Recent advances in microalgal production, harvesting, prediction, optimization, and control strategies. *Bioresource Technology*, 391, 129924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129924>

Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A., Cornejo, P., Kamaraj, B., & Chi, N. T. L. (2021). Removal of nutrients from domestic wastewater by microalgae coupled to lipid augmentation for biodiesel production and influence of deoiled algal biomass as biofertilizer for *Solanum lycopersicum* cultivation. *Chemosphere*, 268, 129323. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129323>

Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Reboleira, J., Pedrosa, R., & Bernardino, S. (2019). *Chlorella*. En *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements* (pp. 187-193). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00026-6>

Singh, D., Nedbal, L., & Ebenhöf, O. (2018). Modelling phosphorus uptake in microalgae. *Biochemical Society Transactions*, 46(2), 483-490. <https://doi.org/10.1042/BST20170262>

Singh, D. V., Upadhyay, A. K., Singh, R., & Singh, D. P. (2022a). Microalgal competence in urban wastewater management: phycoremediation and lipid production. *International Journal of Phytoremediation*, 24(8), 831-841. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1979463>

Singh, D. V., Upadhyay, A. K., Singh, R., & Singh, D. P. (2022b). Implication of municipal wastewater on growth kinetics, biochemical profile, and defense system of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102334. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102334>

Singh, K. N., Patil, S., & Barkate, H. (2019). Protective effects of astaxanthin on skin: Recent scientific evidence, possible mechanisms, and potential indications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 22-27. <https://doi.org/10.1111/jocd.13019>

Skrupski, B., Wilson, K. E., Goff, K. L., & Zou, J. (2013). Effect of pH on neutral lipid and biomass accumulation in microalgal strains native to the Canadian prairies and the Athabasca oil sands. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 937-949. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9930-1>

Sluiter, J. B., Michel, K. P., Addison, B., Zeng, Y., Michener, W., Paterson, A. L., Perras, F. A., & Wolfrum, E. J. (2021). Direct determination of cellulosic glucan content in starch-containing samples. *Cellulose*, 28(4), 1989-2002. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03652-2>

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En G. C. Morales (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (pp. 63-70). IDRC.

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563-2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>

Song, Y., Wang, L., Qiang, X., Gu, W., Ma, Z., & Wang, G. (2022). The promising way to treat wastewater by microalgae: Approaches, mechanisms, applications and challenges. *Journal of Water Process Engineering*, 49, 103012. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103012>

Sonone, S. S., Jadhav, S., Sankhla, M. S., & Kumar, R. (2021). Water contamination by heavy metals and their toxic effect on aquaculture and human health through food Chain. *Letters in Applied NanoBioScience*, 10(2), 2148-2166. <https://doi.org/10.33263/LIANBS102.21482166>

Stratford, M. R., Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2012). The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(14), 4364-4370. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.041>

Stuart, J., Smith, K. F., Miller, M., Pearman, J. K., Robinson, N., Rhodes, L., Thompson, L., Challenger, S., Parnell, N., & Ryan, K. G. (2025). Light-dependent variations in fatty acid profiles and gene expression in Antarctic microalgal cultures. *PLoS ONE*, 20(1), e0317044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0317044>

Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y., & Takeuchi, T. (2010). Oral administration of paramylon, a β -1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), 755-763. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0526>

Sugiyama, A., Suzuki, K., Mitra, S., Arashida, R., Yoshida, E., Nakano, R., Yabuta, Y., & Takeuchi, T. (2009). Hepatoprotective effects of paramylon, a β -1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z, on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), 885-890. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.885>

Sun, A., Hasan, M. T., Hobba, G., Nevalainen, H., & Te'o, J. (2018b). Comparative assessment of the *Euglena gracilis* var. *saccharophila* variant strain as a producer of the β -1, 3-glucan paramylon under varying light conditions. *Journal of Phycology*, 54(4), 529-538. <https://doi.org/10.1111/jpy.12758>

Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., & Huang, H. (2018a). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 272. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>

Sun, N., Wang, Y., Li, Y. T., Huang, J. C., & Chen, F. (2008). Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, 43(11), 1288-1292. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.07.014>

Sureshkumar, P., & Thomas, J. (2019). Strategic growth of limnic green microalgae with phycoremediation potential for enhanced production of biomass and biomolecules for sustainable environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 34702-34712. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4012-9>

Suzuki, K., Mitra, S., Iwata, O., Ishikawa, T., Kato, S., & Yamada, K. (2015). Selection and characterization of *Euglena anabaena* var. *minor* as a new candidate

Euglena species for industrial application. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(10), 1730-1736. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1045828>

Suzuki, K., Nakashima, A., Igarashi, M., Saito, K., Konno, M., Yamazaki, N., & Takimoto, H. (2018). *Euglena gracilis* Z and its carbohydrate storage substance relieve arthritis symptoms by modulating Th17 immunity. *PLoS One*, 13(2), e0191462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191462>

Talaei, M., & Prieto, A. (2024). A review on performance of sustainable microalgae photobioreactor façades technology: Exploring challenges and advantages. *Architectural Science Review*, 67(5), 387-414. <https://doi.org/10.1080/00038628.2024.2305889>

Tan, Y. H., Chai, M. K., Ooi, Y. K., & Wong, L. S. (2022). Assessment of Domestic Wastewaters as Potential Growth Media for *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis*. *Pertanika Journal of Science & Technology*, 30(1). <https://doi.org/10.47836/pjst.30.1.31>

Thangam, K. R., Santhiya, A., Sri, S. A., MubarakAli, D., Karthikumar, S., Kumar, R. S., Thajuddin, N., Soosai, M. R., Varalakshmi, P., Moorthy, I. G., & Pugazhendhi, A. (2021). Bio-refinery approaches based concomitant microalgal biofuel production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 785, 147267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147267>

Tiquia, S. M. (2000). Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pigeon-litter system. En P. R. Warman & B. R. Taylor (Eds.), *Proceedings of the International Composting Symposium* (pp 625–647). CBA Press.

Torihara, K., & Kishimoto, N. (2015). Evaluation of growth characteristics of *Euglena gracilis* for microalgal biomass production using wastewater. *Journal of Water and Environment Technology*, 13(3), 195-205. <https://doi.org/10.2965/jwet.2015.195>

Toyama, T., Kasuya, M., Hanaoka, T., Kobayashi, N., Tanaka, Y., Inoue, D., Sei, K., Moriwaka, M., & Mori, K. (2018). Growth promotion of three microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1174-0>

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>

Tripathi, S., Choudhary, S., & Poluri, K. M. (2021). Insights into lipid accumulation features of *Coccomyxa* sp. IITRSTKM4 under nutrient limitation regimes. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 101786. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101786>

Truchado, P., Gil, M. I., López, C., Garre, A., López-Aragón, R. F., Böhme, K., & Allende, A. (2021). New standards at European Union level on water reuse for agricultural irrigation: Are the Spanish wastewater treatment plants ready to produce and distribute reclaimed water within the minimum quality requirements? *International Journal of Food Microbiology*, 356, 109352. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109352>

Turiel, S., Garrido-Cardenas, J. A., Gómez-Serrano, C., Acién, F.G., Carretero-Paulet, L., & Blanco, S. A. (2021). Polyphasic Characterisation of *Tetrademus almeriensis* sp. nov. (Chlorophyta: Scenedesmaceae). *Processes*, 9, 2006. <https://doi.org/10.3390/pr9112006>

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) (1994). *Method 200.2: Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements*.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) (2012). *Guidelines for water reuse* (EPA/600/R-12/618).

Ugya, A. Y., Imam, T. S., Li, A., Ma, J., & Hua, X. (2020). Antioxidant response mechanism of freshwater microalgae species to reactive oxygen species production: a mini review. *Chemistry and Ecology*, 36(2), 174-193. <https://doi.org/10.1080/02757540.2019.1688308>

United Nations World Water Assessment Programme. (2017). *The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater: The Untapped Resource*. UNESCO.

United Nations (UN). (2018). *Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development*. Disponible en: <https://sdgs.un.org/>

Urbano, V. R., Mendonça, T. G., Bastos, R. G., & Souza, C. F. (2017). Effects of treated wastewater irrigation on soil properties and lettuce yield. *Agricultural Water Management*, 181, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.12.001>

Van Puijenbroek, P. J. T. M., Beusen, A. H. W., & Bouwman, A. F. (2019). Global nitrogen and phosphorus in urban waste water based on the Shared Socio-economic pathways. *Journal of Environmental Management*, 231, 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.048>

Vander Wiel, J. B., Mikulicz, J. D., Boysen, M. R., Hashemi, N., Kalgren, P., Nauman, L. M., Baetzold, S. J., Powell, G. G., He, Q., & Hashemi, N. N. (2017).

Characterization of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* using multi-pixel photon counters in a 3D focusing optofluidic system. *RSC Advances*, 7(8), 4402-4408. <https://doi.org/10.1039/C6RA25837A>

Venrick, E. L. (1978). How many cells to count? En A. Sournia (Ed.), *Phytoplankton manual* (pp. 167-180). UNESCO.

Vilakazi, H., Olasehinde, T. A., & Olaniran, A. O. (2021). Chemical characterization, antiproliferative and antioxidant activities of polyunsaturated fatty acid-rich extracts from *Chlorella* sp. S14. *Molecules*, 26(14), 4109. <https://doi.org/10.3390/molecules26144109>

Villa, J. A., Ray, E. E., & Barney, B. M. (2014). *Azotobacter vinelandii* siderophore can provide nitrogen to support the culture of the green algae *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus* sp. BA032. *FEMS Microbiology Letters*, 351(1), 70-77. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12347>

Von Sperling, M. (2007). *Waste stabilisation ponds*. IWA publishing.

Wan Afifudeen, C. L., Loh, S. H., Aziz, A., Takahashi, K., Effendy, A. W. M., & Cha, T. S. (2021). Double-high in palmitic and oleic acids accumulation in a non-model green microalga, *Messastrum gracile* SE-MC4 under nitrate-repletion and-starvation cultivations. *Scientific Reports*, 11(1), 381. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79711-2>

Wang, H. F., Wu, Y. Y., & Yan, X. P. (2013). Room-temperature phosphorescent discrimination of catechol from resorcinol and hydroquinone based on sodium tripolyphosphate capped Mn-doped ZnS quantum dots. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1920-1925. <https://doi.org/10.1021/ac303374s>

Wang, H. H., Qin, Y., Chen, K. Y., & Xue, H. G. (2016). The phenol biosensor based on LDHs/SWNTs hybrid materials. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(1), 777-791. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15883-4](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15883-4)

Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(7), 3307-3329. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>

Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H., & Wiebe, M. G. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PLoS One*, 13(4), e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>

Wang, Y., Wang, X., Wu, B., Zhao, Z., Yin, F., Li, S., Qin, X., & Chen, Q. (2008). Dispersion of single-walled carbon nanotubes in poly (diallyldimethylammonium chloride) for preparation of a glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130(2), 809-815. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.10.054>

Weber, S., Grande, P. M., Blank, L. M., & Klose, H. (2022). Insights into cell wall disintegration of *Chlorella vulgaris*. *PLoS ONE*, 17(1), e0262500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262500>

Wee, Y., Park, S., Kwon, Y. H., Ju, Y., Yeon, K. M., & Kim, J. (2019). Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds. *Biosensors and Bioelectronics*, 132, 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.008>

Weiner, J. A., DeLorenzo, M. E., & Fulton, M. H. (2004). Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.004>

World Health Organization (WHO). (2006). *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*.

Wu, L., Deng, D., Jin, J., Lu, X., & Chen, J. (2012). Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.045>

Wu, L., Deng, D., Jin, J., Lu, X., & Chen, J. (2012). Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.045>

Wu, L., Yan, H., Wang, J., Liu, G., & Xie, W. (2019). Tyrosinase incorporated with Au-Pt@ SiO₂ nanospheres for electrochemical detection of bisphenol A. *Journal of the Electrochemical Society*, 166(8), B562. <https://doi.org/10.1149/2.0141908jes>

Wu, M., Qin, H., Deng, J., Liu, Y., Lei, A., Zhu, H., Hu, Z., & Wang, J. (2021). A new pilot-scale fermentation mode enhances *Euglena gracilis* biomass and paramylon (β -1, 3-glucan) production. *Journal of Cleaner Production*, 321, 128996. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128996>

Wu, Z. G., Zhang, D. F., Liu, Y. L., Wang, F., Jiang, X., Li, C., Li, S. P., Hong, Q., & Li, W. J. (2013). *Paracoccus zhejiangensis* sp. nov., isolated from activated sludge in wastewater-treatment system. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(1), 123-128. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9932-2>

Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Domingos, L. D., & Viotto, W. H. (2012). Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Química Nova*, 35, 2057-2062. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000028>

Xi, Y., Kong, F., & Chi, Z. (2021). ROS induce β -carotene biosynthesis caused by changes of photosynthesis efficiency and energy metabolism in *Dunaliella salina* under stress conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 613768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.613768>

Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., & Zhang, C. (2014). Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 12(9), 4883-4897. <https://doi.org/10.3390/md12094883>

Xiao, X., He, R., Guo, X., Zhao, X., Yang, Z., Yin, Y., Wakisaka, M., & Zhu, J. (2025). Strategic Carbon Source Selection Enhances Biomass and Paramylon Yields in Mixotrophic *Euglena gracilis* Cultivation. *Microorganisms*, 13(10), 2339. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13102339>

Xie, W. M., Ni, B. J., Sheng, G. P., Seviour, T., & Yu, H. Q. (2016). Quantification and kinetic characterization of soluble microbial products from municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 88, 703-710. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.065>

Xie, W., Li, X., Xu, H., Chen, F., Cheng, K. W., Liu, H., & Liu, B. (2023). Optimization of heterotrophic culture conditions for the microalgae *Euglena gracilis* to produce proteins. *Marine Drugs*, 21(10), 519. <https://doi.org/10.3390/md21100519>

Yadav, S., Bansal, S., Chaithra, M. L., & Sibi, G. (2020). Assessment of optimal growth conditions for specific carotenoids production by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied and Natural Science*, 12(4), 550. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i4.2399>

Yamamoto, F. Y., Yin, F., Rossi Jr, W., Hume, M., & Gatlin III, D. M. (2018). β -1, 3 glucan derived from *Euglena gracilis* and Algamune™ enhances innate immune responses of red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 77, 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.003>

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117(4), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0154-6>

Yaropolov, A. I., Skorobogat'Ko, O. V., Vartanov, S. S., & Varfolomeyev, S. D. (1994). Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49(3), 257-280. <https://doi.org/10.1007/BF02783061>

Yashas, S. R., Shivakumara, B. P., Udayashankara, T. H., & Krishna, B. M. (2018). Laccase biosensor: Green technique for quantification of phenols in wastewater (a review). *Oriental Journal of Chemistry*, 34(2), 631.

Yasuda, K., Nakashima, A., Murata, A., Suzuki, K., & Adachi, T. (2020). *Euglena Gracilis* and β -glucan paramylon induce Ca^{2+} signaling in intestinal tract epithelial, immune, and neural cells. *Nutrients*, 12(8), 2293. <https://doi.org/10.3390/nu12082293>

Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>

Yoo, J., Lee, B., Hur, J., & Jung, J. (2014). Physicochemical and toxicological properties of effluent organic matters from sewage and industrial treatment plants. *Journal of Korean Society on Water Environment*, 30(1), 80-86.

Yuan, S., Fu, W., Du, M., Yao, R., Zhang, D., Li, C., Chen, Z., & Wang, J. (2024). Enhanced cold tolerance mechanisms in *Euglena gracilis*: comparative analysis of pre-adaptation and direct low-temperature exposure. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1465351. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1465351>

Zakil, F. A., Kamarudin, S. K., & Basri, S. (2016). Modified Nafion membranes for direct alcohol fuel cells: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 841-852. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.040>

Zhang, X., Li, J., Fan, W. Y., & Sheng, G. P. (2019). Photomineralization of effluent organic phosphorus to orthophosphate under simulated light illumination. *Environmental Science & Technology*, 53, 9, 4997-5004. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00348>

Zhang, Z., Huang, J. J., Sun, D., Lee, Y., & Chen, F. (2017). Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP). *Bioresource Technology*, 224, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.081>

Zheng, S., Chen, S., Zou, S., Yan, Y., Gao, G., He, M., Wang, C., Chen, H., & Wang, Q. (2021). Bioremediation of *Pyropia*-processing wastewater coupled with lipid production using *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 321, 124428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124428>

Zhou, Y., Liu, L., Li, M., & Hu, C. (2022). Algal biomass valorisation to high-value chemicals and bioproducts: Recent advances, opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 344, 126371. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126371>

Zhou, Y., Tang, L., Zeng, G., Chen, J., Cai, Y., Zhang, Y., Yang, G., Liu, Y., Cai, Y., Zhang, C., & Tang, W. (2014). Mesoporous carbon nitride based biosensor for highly sensitive and selective analysis of phenol and catechol in compost bioremediation. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.063>

Zhu, X., Yuri, I., Gan, X., Suzuki, I., & Li, G. (2007). Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1600-1604. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.07.007>

Znad, H., Al Ketife, A. M., Judd, S., AlMomani, F., & Vuthaluru, H. B. (2018). Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 110, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>

Material suplementario

Tabla S1 (Capítulo 1): Caracterización fisicoquímica y bacteriológica del efluente crudo, de la Planta de Tratamiento de San Justo (Santa Fe). DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; IB = Índice de biodegradabilidad; SST = Sólidos suspendidos totales.

Parámetros	Invierno 2021			Primavera-verano 2021/2022			Invierno 2022			Primavera-verano 2022/2023		
	jun-21	jul-21	ago-21	nov-21	dic-21	feb-22	jun-22	jul-22	ago-22	nov-22	dic-22	feb-23
pH	7,7	7,9	7,1	7,7	7,5	7,8	7,6	8,2	7,7	7,6	7,3	7,8
DQO (mg L ⁻¹)	475,5	341,3	2349	383,7	621,5	257	339	484,9	527	508,5	317,8	459
DBO (mg L ⁻¹)	224	154,5	1220	174,6	276,8	119	119	221,5	247,4	243	146,3	199,7
IB	0,47	0,45	0,52	0,46	0,45	0,46	0,35	0,46	0,47	0,48	0,46	0,44
Sulfuros (mg L ⁻¹)	0,4	0,7	6,5	1	3,5	1,5	1,5	1	1,5	8	0,1	1,5
SST (mg L ⁻¹)	83	54	1124	52	131	75	84	103	93	37	69	15
Nitratos (mg L ⁻¹ N)	2,7	2,45	3,81	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41	<0,41
Nitritos (mg L ⁻¹ N)	<0,01	<0,01	0,025	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Amonio (mg L ⁻¹ N)	58,2	61,2	75,2	5,2	20,6	6,8	1,6	20,9	41,4	52,5	124,8	65,1
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	1,72	3,8	5,8	4,56	2,82	1,54	3,63	3,9	4,6	2,6	3,3	1,97
Bacterias coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	4,6x10 ⁷	1,1x10 ⁷	4,7x10 ⁷	3,9x10 ⁷	2,4x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,1x10 ⁷	2,1x10 ⁷	2,1x10 ⁷	4,6x10 ⁷	3,9x10 ⁷	>1,1x10 ⁸
Bacterias coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	1,5x10 ⁷	2,1x10 ⁶	1,5x10 ⁷	2,3x10 ⁷	9,3x10 ⁶	4,6x10 ⁶	4,6x10 ⁶	9,3x10 ⁶	1,1x10 ⁷	2,4x10 ⁷	2,3x10 ⁷	>1,1x10 ⁸

Tabla S2 (Capítulo 1): Caracterización fisicoquímica y bacteriológica del efluente tratado, de las lagunas facultativas secundarias, de la Planta de Tratamiento de San Justo (Santa Fe). DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; IB = Índice de biodegradabilidad; SST = Sólidos suspendidos totales.

Parámetros	Invierno 2021			Primavera-verano 2021/2022			Invierno 2022			Primavera-verano 2022/2023		
	jun-21	jul-21	ago-21	nov-21	dic-21	feb-22	jun-22	jul-22	ago-22	nov-22	dic-22	feb-23
pH	7,5	7,7	7,7	7,8	7,7	7,7	7,7	8,2	7,9	8,1	7,4	8,5
DQO (mg L ⁻¹)	160,1	150,7	155,4	195,4	185,9	193	191	201	169	214,2	183,6	150,6
DBO (mg L ⁻¹)	45,5	41,2	41,3	45,6	26,1	41	39	36,8	34,9	42,5	39,8	18,7
IB	0,28	0,27	0,27	0,23	0,14	0,21	0,20	0,18	0,21	0,20	0,22	0,12
Sulfuros (mg L ⁻¹)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
SST (mg L ⁻¹)	47	38	47	12	65	56	62	55	165	75	64	31
Nitratos (mg L ⁻¹ N)	5,3	3,81	6,71	7,18	11,48	27,17	41,29	1,58	14,6	29,1	145,3	135,76
Nitritos (mg L ⁻¹ N)	0,02	0,02	0,03	6,42	3,76	3,36	1,56	0,37	0,69	1,99	8,2	0,39
Amonio (mg L ⁻¹ N)	37,6	36,4	45,3	4,5	14,47	19,6	1,93	9,3	18,8	16,86	95,6	18,72
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	6,63	1,71	3,75	7,03	1,41	1,86	1,47	2,2	1,5	1,8	3	1,37
Bacterias coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	2,4x10 ⁵	2,4x10 ⁵	1,5x10 ⁵	4,6x10 ⁵	4,6x10 ³	1,1x10 ⁵	4,6x10 ⁶	2,4x10 ⁵	1,1x10 ⁵	4,8x10 ⁴	4,8x10 ⁴	9x10 ⁴
Bacterias coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	9,3x10 ⁴	9,3x10 ⁴	7,5x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,4x10 ³	4,6x10 ⁴	7x10 ⁴	9,3x10 ³	4,6x10 ⁴	9x10 ³	2,3x10 ⁴	4x10 ⁴

Tabla S3 (Capítulo 1): Eficiencias de remoción (%) de los parámetros monitoreados entre el efluente crudo y efluente tratado, de lagunas facultativas secundarias, previo a la cloración. DQO = Demanda química de oxígeno; DBO₅ = Demanda biológica de oxígeno; SST = Sólidos suspendidos totales.

Parámetros	Invierno 2021			Primavera-verano 2021/2022			Invierno 2022			Primavera-verano 2022/2023		
	jun-21	jul-21	ago-21	nov-21	dic-21	feb-22	jun-22	jul-22	ago-22	nov-22	dic-22	feb-23
DQO (mg L ⁻¹)	66,3	55,8	93,4	49,1	70,1	24,9	43,7	58,5	67,9	57,9	42,2	67,2
DBO (mg L ⁻¹)	79,7	73,3	96,6	73,9	90,6	65,5	67,2	83,4	85,9	82,5	72,8	90,6
Sulfuros (mg L ⁻¹)	95,0	97,1	99,7	98,0	99,4	98,7	98,7	98,0	98,7	99,8	80,0	98,7
SST (mg L ⁻¹)	43,4	29,6	95,8	76,9	50,4	25,3	26,2	46,6	0,0	0,0	7,2	0,0
Nitratos (mg L ⁻¹ N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitritos (mg L ⁻¹ N)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amonio (mg L ⁻¹ N)	35,4	40,5	39,8	12,6	29,9	0	0	55,5	54,6	67,9	23,4	71,2
Fósforo (mg L ⁻¹ P)	0	55	35,3	0	50	0	59,5	43,6	67,4	30,8	9,1	30,5
Bacterias coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	94,8	78,2	99,7	98,8	100	99,3	95,8	98,9	99,5	99,9	99,9	99,9
Bacterias coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)	99,4	95,6	99,5	99,9	100	99	98,5	99,9	99,6	100	99,9	100

Tabla S4 (Capítulo 1): Registro de las intensidades de corrientes de reducción (μA) obtenida con biosensores SPE-TYR-Naf frente a hidroquinona durante 15 minutos mediante mediciones sucesivas por voltametría de pulso diferencial (DPV), empleando diferentes cargas de tirosinasa (25, 75, 125 y 200 U).

Tiempo (min)	Actividad de tirosinasa			
	25 U	75 U	125 U	200 U
1	3,3	4,4	2,7	2,1
2	3,4	4,6	2,8	2,2
3	3,6	4,7	2,9	2,3
4	3,7	4,8	2,9	2,4
5	3,7	4,9	2,9	2,4
6	3,8	5,0	2,9	2,6
7	3,8	5,1	3,0	2,6
8	3,9	5,1	3,1	2,6
9	3,9	5,2	3,3	2,7
10	4,2	5,3	3,4	2,7
11	4,2	5,4	3,5	2,9
12	4,3	5,5	3,5	2,9
13	4,4	5,5	3,6	2,8
14	4,4	5,6	3,7	2,8
15	4,5	5,7	4,1	3,1

Tabla S5 (Capítulo 1): Registro temporal de las intensidades de corrientes de reducción y potenciales de pico obtenidos por voltametría de pulso diferencial (DPV) con biosensores SPE-TYR-Naf modificados con distintas concentraciones de nanopartículas (CuNP) frente a hidroquinona (HQ) 2,3 μM (250 ppb) a lo largo de 15 min de medición. B3 = CuNP12-TYR-Naf; B4 = CuNP5-TYR-Naf; B5 = CuNP3-TYR-Naf; B6 = SPE-TYR-Naf.

Biosensor	Tiempo (min)	Potencial de reducción (mV)	Respuesta (μA)	Tasa de variación de la corriente ($\mu\text{A min}^{-1}$)
B3	1	116	0,37	-
	5	100	1,05	0,17
	10	100	1,36	0,06
	15	100	1,56	0,04
B4	1	120	0,13	-
	5	85	1,56	0,36
	10	85	1,93	0,07
	15	85	2,08	0,03
B5	1	110	0,71	-
	5	85	2,27	0,39
	10	85	2,82	0,11
	15	85	3,17	0,07
B6	1	98	0,12	-
	5	98	0,37	0,06
	10	98	0,44	0,01
	15	98	0,5	0,01

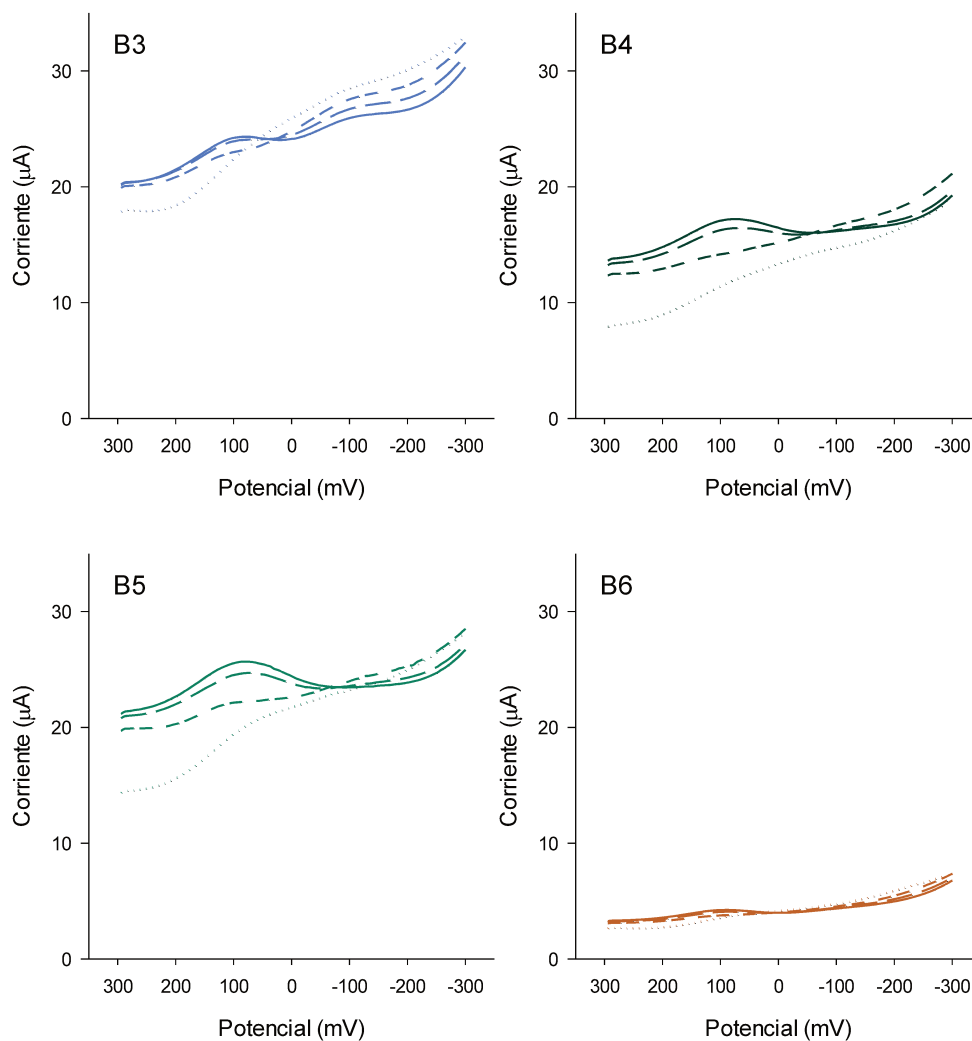


Figura S1 (Capítulo 1): Voltamogramas de pulso diferencial obtenidos con biosensores SPE-TYR-Naf modificados con distintas concentraciones de nanopartículas (CuNP) frente a hidroquinona (HQ) 2,3 μM (250 ppb). La línea punteada corresponde al ensayo blanco (BF6), la línea de trazos cortos a la medición a 1 min, la línea discontinua a la medición a 5 min y la línea continua corresponde a la medición a los 15 minutos. B3 = CuNP12-TYR-Naf; B4 = CuNP5-TYR-Naf; B5 = CuNP3-TYR-Naf; B6 = SPE-TYR-Naf.

Tabla S6 (Capítulo 1): Tabla completa de corridas correspondientes al diseño compuesto central (CCD, Design-Expert 7.0), junto con los valores de intensidad de corriente de pico catódico (IC, μA) obtenidos experimentalmente. FD = Factor de dilución.

Std	Run	Bloque	Nafion (%)	Tirosinasa (U)	Agente polimérico (FD)	Respuesta (μA)
7	1	Día 1	0,3	75	0,21	5,03
4	2	Día 1	0,159	67,93	0,18	6,1
6	3	Día 1	0,3	75	0,21	5,1
5	4	Día 1	0,3	75	0,21	5,93
2	5	Día 1	0,44	67,93	0,238	4,2
3	6	Día 1	0,159	82,07	0,238	4,96
1	7	Día 1	0,44	82,07	0,18	4,32
12	8	Día 2	0,3	75	0,17	5,07
9	9	Día 2	0,5	75	0,21	6,33
8	10	Día 2	0,1	75	0,21	5,43
11	11	Día 2	0,3	85	0,21	5,71
15	12	Día 2	0,3	75	0,21	7,98
16	13	Día 2	0,3	75	0,21	6,11
13	14	Día 2	0,3	75	0,25	5,02
14	15	Día 2	0,3	75	0,21	6,44
10	16	Día 2	0,3	65	0,21	4,61

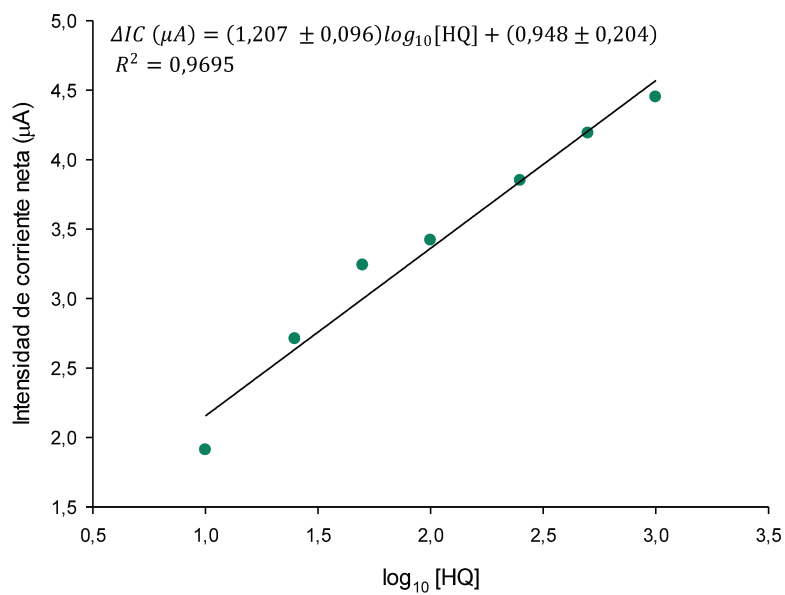


Figura S2 (Capítulo 1): Ajuste lineal y ecuación de la recta de la intensidad de corriente neta (ΔIC) en función de logaritmo de la concentración de hidroquinona ($\log_{10} [HQ]$) ($n = 3$). Las concentraciones ensayadas de HQ fueron: 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppb.

Tabla S7 (Capítulo 2): Valores propios de la matriz de correlación, porcentaje de varianza explicada y varianza acumulada por los componentes principales, producto del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Chlorella vulgaris* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU).

Valor propio	Porcentaje de varianza (%)	Varianza acumulada (%)
5,68422	56,84	56,84
2,20931	22,09	78,94
0,71357	7,14	86,07
0,565	5,65	91,72
0,43519	4,35	96,07
0,22657	2,27	98,34
0,12429	1,24	99,58
0,03072	0,31	99,89
0,01097	0,11	100,00
1,73E-4	0,00	100,00

Tabla S8 (Capítulo 2): Vectores propios extraídos: coeficientes de las variables en los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), producto del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Chlorella vulgaris* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU). DT = tiempo de duplicación; Cl-a = Clorofila-a; Cl-b = Clorofila-b; CAT = catalasa; GST = glutatión-S-transferasa; MDA = malondialdehído.

Variable	Coefficiente de PC1	Coefficiente de PC2
Densidad algal	0,40579	0,03848
Tasa de crecimiento	0,40268	0,01639
DT	-0,38676	0,01179
Cl-a	-0,36479	-0,00855
Cl-b	-0,36648	-0,05038
Carotenoides	0,18356	-0,51248
Proteínas	0,18423	-0,49989
CAT	0,01227	0,60574
GST	0,25446	0,27996
MDA	0,35167	0,1941

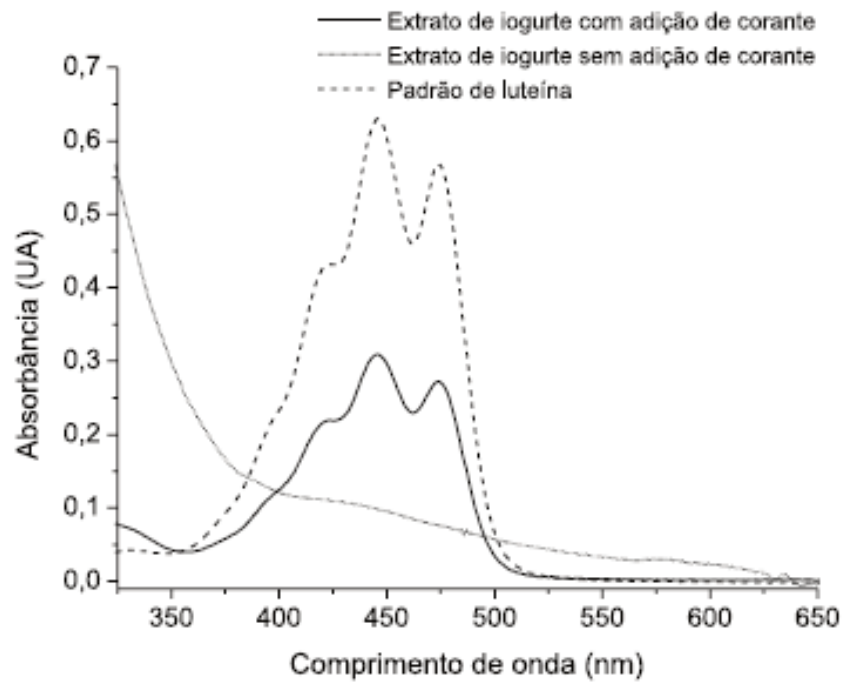


Figura S3 (Capítulo 2): Espectro de absorción UV-visible de un estándar de luteína ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) en línea de a rayas, y de dos extractos obtenidos de muestras alimenticias. Extraído de Xavier et al. (2012).

Tabla S9 (Capítulo 3): Valores propios de la matriz de correlación, porcentaje de varianza explicada y varianza acumulada por los componentes principales, producto del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Euglena gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU).

Valor propio	Porcentaje de varianza (%)	Varianza acumulada (%)
7,40618	46,29	46,29
2,84979	17,81	64,10
1,96063	12,25	76,35
1,1239	7,02	83,38
0,8443	5,28	88,66
0,65069	4,07	92,72
0,49586	3,10	95,82
0,24746	1,55	97,37
0,19867	1,24	98,61
0,12763	0,80	99,41
0,04336	0,27	99,68
0,04078	0,25	99,93
0,01022	0,06	100,00
3,82E-4	0,00	100,00
1,22E-4	0,00	100,00
3,5E-5	0,00	100,00

Tabla S10 (Capítulo 3): Vectores propios extraídos: coeficientes de las variables en los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), producto del análisis de componentes principales (PCA) de variables de crecimiento y estrés en *Euglena gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de aguas residuales urbanas (ARU). DT = tiempo de duplicación; Cl-a = Clorofila-a; Cl-b = Clorofila-b; CAT = catalasa; GST = glutatión-S-transferasa; MDA = malondialdehído.

Variable	Coefficiente de PC1	Coefficiente de PC2
Densidad algal	0,31202	-0,2729
Biomasa	0,28139	-0,11383
Tasa de crecimiento	0,3176	-0,2457
DT	-0,30979	0,21343
Biovolumen	0,2992	-0,30469
Volumen celular	-0,06864	-0,12087
Ancho celular	-0,17644	-0,06083
Longitud celular	0,23864	-0,11512
Cl-a	0,17267	0,48795
Cl-b	0,29054	0,31299
Carotenoides	0,07327	0,49527
Proteínas	0,17541	0,13561
CAT	0,2394	0,12409
GST	-0,24774	0,02372
MDA	-0,30889	-0,1216
Paramilon	-0,28255	-0,22752