



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE DOS TIPOS DE FLOCULANTES PARA LA
COSECHA DE BIOMASA DE MICROALGAS A ESCALA PILOTO

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía
Dra. Vivian Morera Córdova

Autora
Carolina Stephanie Cabrera Gaviño

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Carolina Stephanie Cabrera Gaviño

CI: 1714821269

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por todo el amor y el apoyo, en especial a mis padres por siempre estar presentes en cada etapa de mi vida y a mis hermanas que son mi motivación.

A la Corporación para la Investigación Energética, al Laboratorio de Biotecnología Energética y a sus directoras M.Sc. María Cristina Guamán y M.Sc. Nory González por su ayuda y conocimientos impartidos durante el desarrollo de mi tesis.

DEDICATORIA

Con todo mi amor para ustedes papitos que han hecho todo para darme lo mejor y convertirme en la persona que soy. Gracias por apoyarme en cada decisión tomada, por levantarme después de cada decepción y sobre todo por amarme incondicionalmente.

RESUMEN

El alto costo energético de los métodos convencionales de recuperación de biomasa microalgal para diferentes aplicaciones comerciales hace que la producción de las mismas no sea económicamente viable. Un nuevo método propuesto para solucionar este tipo de problema es la floculación biológica mediante extractos de origen vegetal.

Se probó la capacidad de floculación de tres cepas nativas del Ecuador: CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. del Parque Nacional Cotopaxi y CMIE-I.2-002 del género *Chlorella* sp.2 del Parque Nacional Llanganates. Los taninos empleados como floculantes biológicos fueron extraídos de la harina obtenida de las vainas de especie arbórea *Caesalpinia spinosa* mediante la disolución de 150 g de harina en 1500 mL de una solución al 50% de metanol y agua destilada. Los taninos fueron adicionados en tres volúmenes de 60 mL, 100 mL y 160 mL en el cultivo de microalgas a una concentración final de 0,5 g/mL, 0,3 g/mL y 0,188 g/mL respectivamente. Para obtener mayor cantidad de biomasa microalgal al momento de la cosecha, se ajustó el pH en tres rangos: 5, 8 y 11.

Los resultados obtenidos revelaron que de todos los tratamientos analizados, la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. ambas con 100 mL de taninos y pH 11 no muestran diferencias significativas respecto al control positivo que fue el sulfato de aluminio (floculante químico). Al analizar cada factor y sus interacciones, el pH y la combinación cepas*pH son altamente significativos respecto al control. La cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. presenta una mejor capacidad de floculación. Entre los volúmenes de taninos no existen diferencias significativas en los resultados. Sin embargo, los volúmenes de 100 mL y 160 mL son más efectivos. Finalmente, el pH 11 tuvo el mejor rendimiento en la floculación. A pesar de que todas las cepas de microalgas estudiadas floculan a pH 11 y volúmenes altos de taninos, la biomasa obtenida en gramos de peso seco fue menor en comparación a la biomasa obtenida con el control positivo.

ABSTRACT

The high energy cost of conventional harvesting methods for microalgal biomass for different commercial applications makes their production economically unfeasible. A new method proposed to solve this kind of problem is the biological flocculation using plant extracts.

Flocculation capacity of three native Ecuadorian strains were tested: CMIE-A1-004 of the genus *Chlorella* sp.1 and CMIE-A3-006 of the genus *Scenedesmus* sp. from Cotopaxi National Park and CMIE-I4.2-002 of the genus *Chlorella* sp.2 from Llanganates National Park. The tannins used as biologic flocculants were extracted from the flour obtained from the pods of the specie *Caesalpinia spinosa*, by dissolving 150 g of flour in 1500 mL of a solution 50% of methanol and distilled water. Tannins were added in the microalgae media culture in three different volumes of 60 mL, 100 mL and 160 mL at a final concentration of 0,5 g/mL, 0,3 g/mL y 0,188 g/mL respectively. In order to obtain more microalgal biomass at the harvest, the pH was adjusted into three ranges: 5, 8 and 11.

The results revealed than from all treatments analyzed, strain CMIE-A1-004 of the genus *Chlorella* sp.1 and CMIE-A3-006 of the genus *Scenedesmus* sp. both with 100 mL of tannins and pH 11 do not show significant differences compared to the positive control aluminium sulfate (chemical flocculant). By analyzing each factor and their interactions, the pH and the combination of strains*pH are highly significant. The stain CMIE-A3-006 of the genus *Scenedesmus* sp. has a better flocculation ability. Between tannin volumes there are no significant differences. However, volumes of 100 mL and 160 mL are more effective. Finally, pH 11 had the better yield in the flocculation. Although all strains of microalgae studied have a better flocculation with pH 11 and high volumes of tannins, biomass dry weight in grams obtained was lower compared to the biomass obtained with the positive control.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Formulación del problema.....	4
1.3 Justificación	6
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos	7
Capítulo II. Marco teórico	8
2.1 Microalgas	8
2.1.1 Generalidades de las microalgas.....	8
2.1.2 Aplicaciones tecnológicas y científicas de las microalgas	9
2.1.3 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo de microalgas	11
2.1.3.1 Luz.....	12
2.1.3.2. Temperatura	13
2.1.3.3 pH.....	13
2.1.3.4 Nutrientes	14
2.1.3.5 Oxígeno disuelto.....	15
2.1.3.6 CO ₂	15
2.1.3.7 Agitación.....	15
2.1.3.8 Salinidad.....	16
2.1.4 Sistemas de cultivo de microalgas	16
2.1.4.1 Sistemas de cultivo de microalgas abiertos	17
2.1.4.2 Sistemas de cultivo de microalgas cerrados.....	18
2.1.5 Métodos de cosecha	19
2.1.5.1 Sedimentación por gravedad	20
2.1.5.2 Flotación	20
2.1.5.3 Floculación.....	21
2.1.5.4 Centrifugación.....	22
2.1.5.5 Filtración	23

2.2 Guarango	24
2.2.1 Descripción de la especie	24
2.2.2 Taxonomía y morfología	25
2.2.3 Condiciones de hábitat natural y requerimientos edafoclimáticos.....	25
2.2.4 Subproductos del guarango	26
2.3 Taninos	27
2.3.1 Descripción de los taninos	27
2.3.2 Propiedades de los taninos.....	28
2.3.3 Clasificación de los taninos.....	28
2.3.3.1 Taninos condensados.....	29
2.3.3.2 Taninos hidrolizables	29
Capítulo III. Metodología	31
3.1 Selección de las cepas de microalgas y de las condiciones de cultivo	31
3.2 Aislamiento y purificación de los cultivos de microalgas.....	33
3.3 Evaluación del crecimiento de las microalgas.....	34
3.4 Cálculo de la tasa de crecimiento celular	35
3.5 Cultivo de las cepas de microalgas a escala piloto.....	36
3.6 Obtención del floculante biológico a partir de la harina de guarango.....	37
3.7 Cosecha y floculación de los cultivos de microalgas.....	38
3.8 Filtración y secado de la biomasa	38
3.9 Diseño experimental.....	39
3.10 Análisis estadístico	39
Capítulo IV. Resultados y discusión	40
4.1 Evaluación del crecimiento microalgal	40
4.1.1 Obtención de la concentración celular microalgal.....	40
4.1.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de las microalgas	42
4.2 Escalado de biomasa microalgal a nivel piloto.....	44
4.2.1 Cosecha y floculación del cultivo de microalgas.....	44

4.3 Evaluación del peso seco de la biomasa microalgal	47
4.3.1 Filtración y secado de la biomasa microalgal	47
4.4 Análisis estadístico.....	52
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones	62
5.1 Conclusiones	62
5.2 Recomendaciones	63
Referencias.....	64
ANEXOS	70

Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Las microalgas son un grupo diverso de algas microscópicas unicelulares que habitan principalmente en medios acuáticos, adheridos a superficies y también en diversos suelos. Generalmente, son organismos de vida libre ya sea de forma unicelular o en colonias, sin embargo algunas viven en simbiosis con varios organismos. Las células de las microalgas pueden ser eucariotas o procariotas, lo que ha permitido establecer más de 26000 especies distintas (Abalde, 2014). Las microalgas han sido consideradas como los primeros microorganismos fotosintéticos imprescindibles en el mantenimiento de la vida terrestre debido a que proporcionan compuestos orgánicos reducidos y oxígeno para soportar al resto de la vida del planeta (Albarracín, 2007).

Las microalgas ofrecen un gran número de posibilidades en cuanto a su uso gracias a la capacidad de convertir la energía solar en compuestos químicos útiles a una velocidad mucho mayor que cualquier otra fuente vegetal. Entre las aplicaciones más destacadas podemos mencionar la producción de aceites, combustibles y energía eléctrica, sirven como suplemento alimenticio humano y animal debido a su alto contenido de proteínas, se utilizan como abono y fertilizante agrícola y también son utilizadas en el tratamiento de aguas residuales ricas en nitrógeno y fósforo (Portilla, 2010).

El cultivo de las microalgas a escala piloto utiliza tecnología de mediana complejidad. Al ser organismos vivos, requieren una serie de parámetros como luz, temperatura, pH y medio de cultivo que deben ser evaluados y determinados según el tipo de cultivo y la especie a utilizar para obtener producciones eficientes. De igual forma, existe una gran variedad de diseños para estanques y reactores clasificados en sistemas abiertos y sistemas cerrados (Hernández y Labbé, 2014).

Los sistemas abiertos, en donde la biomasa está expuesta a las condiciones medioambientales han sido utilizados por varias décadas a escala industrial.

Los dos grupos de sistemas abiertos más conocidos son los estanques naturales y los sistemas en carrusel o raceway (por sus siglas en inglés), (Zitelli, Rodolfi, Biondi y Tredici, 2006). Los sistemas cerrados como los fotobiorreactores o photobioreactor (PBR por sus siglas en inglés) tienen poco o ningún tipo de contacto con el medio externo, lo que permite un mejor control de los parámetros y condiciones del medio de cultivo dando como resultado mayor productividad (Hernández y Labbé, 2014).

El proceso de cosecha de las microalgas tiene como objetivo eliminar el agua del medio de cultivo y recuperar grandes volúmenes de biomasa microalgal. Entre las principales técnicas utilizadas para la cosecha de microalgas se encuentra la centrifugación, la floculación, la filtración y la flotación (Peralta, Pardo, Chanchila y Kafarov, 2012). Las técnicas de cosecha de biomasa microalgal dependen de las características de cada microalga, por ejemplo la especie, el tamaño, la densidad celular, el tipo de cultivo y el valor de los productos finales que se desea obtener de las mismas (Palomino, Estrada y López, 2010).

En general, la cosecha de microalgas es un proceso que se realiza en dos fases. En primer lugar, la recolección masiva destinada a la separación de la biomasa del medio de cultivo. Esto dependerá de la concentración inicial de biomasa y de la tecnología aplicada que puede ser por flotación, sedimentación por gravedad o floculación. Por otra parte, la segunda fase en la cosecha de biomasa microalgal es el espesamiento, cuyo fin es concentrar la mezcla a través de las técnicas como la centrifugación y filtrado (Palomino et al., 2010).

La flotación es un proceso de separación por gravedad en el que el aire es agregado en forma de burbujas para llevar las partículas sólidas a la superficie del medio de cultivo líquido (Peralta et al., 2012). A pesar de ser mencionado como un potencial método de cosecha, existe evidencia limitada en cuanto a su viabilidad técnica o económica (Palomino et al., 2010).

La sedimentación por gravedad depende de características como la densidad y el radio de células de las microalgas y su velocidad de sedimentación. Esta técnica es la más común para el aprovechamiento de la biomasa de las algas en el tratamiento de aguas residuales debido al bajo valor de la biomasa y a los grandes volúmenes tratados. Sin embargo, este método es apropiado para microalgas grandes ($>70 \mu\text{m}$) (Palomino et al., 2010).

La floculación es la primera etapa en el proceso de recolección masiva. En este proceso se agrega un floculante a las células dispersas de las microalgas con el fin de aglomerar las células entre sí y formar partículas más grandes con una mayor tasa de sedimentación. Esto facilitará los siguientes procesos de cosecha como la separación de la biomasa del medio de cultivo (Peralta et al., 2012).

La floculación puede realizarse de diferentes maneras. La floculación química inducida por el uso de zinc (Zn^{+2}), aluminio (Al^{+3}) y hierro (Fe^{+3}) ha sido ampliamente estudiada. La mayoría de floculantes químicos se utilizan a escala industrial, principalmente en plantas de tratamiento de aguas residuales. La floculación también puede ser inducida mediante cambios en el medio de cultivo: pH, agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura y cambios del nivel de oxígeno disuelto (Salim, Bosma, Vermue y Wijffels, 2011).

Un nuevo método para la floculación de las microalgas es el empleo de bacterias o sustancias naturales. La biofloculación de las microalgas con bacterias requiere el uso de sustratos y fuentes adicionales de energía para el crecimiento bacteriano. Esto provocará la contaminación no deseada de la planta de producción de microalgas. Por otra parte, la principal ventaja de la biofloculación con sustancias naturales es que permite la recolección de las microalgas sin el uso de floculantes químicos y como resultado es posible la reutilización del medio de cultivo sin necesidad de tratamientos adicionales que aumenten los costos de producción (Salim et al., 2011).

Caesalpinia spinosa conocido comúnmente como guarango, es una especie arbórea perenne nativa de los valles semiáridos de la Sierra ecuatoriana. Con los frutos procesados del guarango se puede obtener una gran diversidad de productos y subproductos, de los cuales los más importantes son los extractos de los taninos, obtenidos de las cáscaras de las vainas molidas (Revelo, 2014). Los taninos son utilizados industrialmente para el curtido de pieles, clarificación de vinos y cerveza, agricultura, minería, cosmetología, elaboración de productos farmacéuticos, fabricación de plásticos y adhesivos (Cassel, 2006). Igualmente, son considerados como un potencial coagulante capaz de reemplazar las sales de hierro o aluminio actualmente utilizadas en el tratamiento físico-químico de las aguas residuales (Revelo, 2014).

La recuperación por centrifugación es el método más utilizado para la recolección de biomasa microalgal, es un proceso rápido y de gran consumo energético que depende de las características de sedimentación de las células, el tiempo de residencia y la solución del medio de cultivo. La principal desventaja de este proceso son los altos costos energéticos, el mantenimiento y debido a las fuerzas gravitacionales, algunas estructuras celulares pueden verse afectadas. No obstante, la eficiencia de recolección es superior al 80% (Peralta et al., 2012).

Finalmente, la filtración es un proceso de separación de sólidos en suspensión de un medio líquido a través de un medio poroso que retiene los sólidos y permite el paso del líquido. La filtración se realiza para la recolección de microalgas relativamente grandes, es decir $>70 \mu\text{m}$ (Peralta et al., 2012). Para células más pequeñas se realiza microfiltración de membrada y ultrafiltración (Palomino et al., 2010).

1.2 Formulación del problema

La cosecha de microalgas en plantas de producción comercial se realiza generalmente por centrifugación. Diferentes estudios han demostrado que se produce un aumento de los costos de cosecha a más del 30% del costo total en

el caso de la producción de algas en estanques abiertos (Salim et al., 2011). Dichos costos pueden ser justificados solamente en el caso de la producción de las microalgas para productos de alto valor comercial como el biodisel. Por otra parte, para los productos de bajo valor, tanto la inversión, como los gastos de funcionamiento deben disminuir drásticamente para hacer factible la producción comercial. Es por ello que para reducir al máximo el consumo de energía durante la cosecha de microalgas, es necesario un enfoque integrado (Salim et al., 2011).

Al considerar el potencial del cultivo de microalgas y las diversas aplicaciones de la biomasa microalgal, se puede decir que el cultivo de microalgas es una técnica ambientalmente atractiva. No obstante, los procesos de recuperación de biomasa todavía presentan una serie de dificultades que deben ser mejoradas, como la relación costo eficiencia en los actuales sistemas de cosecha donde ocurre la separación de biomasa desde el medio líquido (Hernández y Labbé, 2014).

Entre los productos químicos usados exitosamente como floculantes, se encuentra el sulfato de aluminio. No obstante, la mayoría de métodos de cosecha tienen inconvenientes económicos y técnicos como los altos costos de energía, la toxicidad del floculante y la no viabilidad de escalado. Estudios han reportado que la biomasa de microalgas recolectada mediante el empleo de sulfato de aluminio, contienen altas concentraciones de aluminio, lo que es tóxico para los animales (Lee, Kim, Kim, Kwon, Yoon y Oh, 2005).

La floculación química es un método fácil y eficaz. Sin embargo, no es un método apropiado para la cosecha sostenible y económica de las microalgas en plantas de producción a gran escala debido a que el exceso de floculante catiónico debe ser eliminado del medio de cultivo antes de que este pueda ser reutilizado para el crecimiento de nuevas células microalgales, lo que conlleva a costos operativos adicionales (Salim et al., 2011).

1.3 Justificación

Entre los aspectos biotecnológicos de la producción de biomasa de microalgas, el proceso de recuperación de las células de la solución del medio de cultivo es un factor importante en la determinación del costo y la calidad de los productos. La recuperación representa al menos entre el 20 y el 30% del costo total de la producción de biomasa (Lee et al., 2005).

La recolección de microalgas por floculación es un proceso más ventajoso que los métodos convencionales como la centrifugación y la filtración por gravedad, debido a que permite que las células dispersas de microalgas dentro del medio de cultivo se agrupen aumentando el tamaño de partícula lo que da como resultado una mayor tasa de sedimentación (Salim et al., 2011). En un estudio obtuvieron 90% de biomasa microalgal en peso seco luego de la floculación química con sulfato de aluminio y de la floculación biológica con *Pestis*. La floculación es un método más económico debido a que utiliza la luz solar para el crecimiento de los cultivos, no altera la composición del agua, ni contamina el medio ambiente y facilita el tratamiento de grandes cantidades de medio de cultivo (Lee et al., 2005).

La principal desventaja que presentan estos métodos convencionales es el elevado consumo de energía, lo que puede llegar a ser una limitación económica. Por esta razón, es necesario probar diferentes métodos de cosecha que resulten económicamente viables y remuevan la biomasa microalgal a niveles considerables que justifiquen el costo de producción (Romero y Ferrán, 2011).

Los taninos poseen en su composición sales de hierro que generan una sedimentación del contenido de los coloides de las aguas, debido a que aportan cargas positivas al contenido de los coloides, que a su vez contienen cargas negativas. La presencia de ambas cargas en el medio, generan atracción formando partículas de mayor tamaño (Revelo, 2014). Los extractos

de tanino de guarango han sido utilizados con gran eficiencia en el tratamiento de aguas para remoción de compuestos contaminantes (Játiva, 2011).

Como se mencionó anteriormente, mediante la implementación de métodos biológicos y eficaces en la cosecha de biomasa microalgal, se puede evitar los costos adicionales de producción, las contaminaciones no deseadas y disminuir el impacto ambiental. Es por esto que se ha utilizado los extractos de taninos de harina de guarango como un nuevo tipo de floculante biológico en la cosecha de biomasa microalgal debido a sus propiedades coagulantes con el fin de evaluar si se obtiene la misma cantidad de biomasa que en la floculación química con sulfato de aluminio.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el tipo de floculante óptimo para la cosecha de biomasa de microalgas a escala piloto.

1.4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar las cepas de microalgas nativas óptimas para el crecimiento a escala piloto
- Escalar a nivel piloto la producción de biomasa de microalgas
- Cuantificar la cantidad de biomasa microalgal obtenida con cada tipo de floculación

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Microalgas

2.1.1 Generalidades de las microalgas

Las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos que aprovechan la energía solar para sintetizar materia orgánica a partir de sustratos inorgánicos como las sales solubles, el dióxido de carbono y el agua. A diferencia de las plantas superiores, su maquinaria fotosintética posee una capacidad para convertir energía solar en biomasa con una eficiencia de 2 a 5 veces mayor. Se adaptan a condiciones ambientales y se encuentran en cualquier medio donde existan fuentes de carbono, nutrientes, luz y temperatura apropiada (Fernández, 2009, pp.28-34).

Existe una gran diversidad de microalgas representada por miles de especies de medios acuáticos, marinos o limnológicos y también de medios terrestres. Estos microorganismos constituyen una gran variedad de especies vivientes en una amplia gama de condiciones ambientales. Se estima que existen alrededor de 50,000 especies, de las cuales solo se han estudiado y analizado 30,000 (Mata, Martins y Caetano, 2010).

Al ser organismos fijadores de carbono y generadores de biomasa, las microalgas son consideradas uno de los tres principales grupos de microorganismos fotosintéticos dentro del ambiente de agua dulce. Las microalgas se distinguen de las plantas superiores conocidas como macrófitas principalmente en el tamaño y la taxonomía. Por otra parte, se distinguen de las bacterias fotosintéticas por su bioquímica (Bellinger y Sigeo, 2010, pp. 1-40). La composición bioquímica de las microalgas es compleja y varía en función de la especie (Fernández, 2009, pp.28-34).

Las microalgas constituyen una gran potencia como fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos simples o complejos, vitaminas y minerales. En condiciones normales de producción de biomasa microalgal, los valores de

proteína pueden alcanzar el 60% de su peso seco, de 7 a 23% de su peso seco en lípidos y de 5 a 23% de su peso seco en carbohidratos. Los niveles de producción de proteínas, lípidos y carbohidratos pueden ser manipulados al variar los parámetros como la tasa de crecimiento de las microalgas, la luz, la concentración de nutrientes y la temperatura del cultivo (Fernández, 2009, pp.28-34).

Las microalgas no necesitan generar estructuras reproductoras para crecer y generar biomasa y se duplican en pocas horas. A pesar de ser organismos fundamentalmente autótrofos, algunas microalgas se han convertido secundariamente en heterótrofas, utilizando moléculas orgánicas complejas por organotrofos o heterótrofos (Bellinger y Sigee, 2010, pp. 1-40).

Estos microorganismos unicelulares son captadores de CO₂ y asimiladores de nitrógeno, lo que les permite ser una fuente sostenible de biocombustibles y biofertilizantes. Su crecimiento en suspensión favorece el acceso ilimitado al agua, al CO₂ y a los nutrientes. De igual forma, se puede cultivar microalgas cerca de lugares contaminados debido a que obtendrán el CO₂ o los óxidos nítricos de aquellos sitios, lo que facilita y permite reducir los niveles de contaminación (Portilla, 2010).

2.1.2 Aplicaciones tecnológicas y científicas de las microalgas

Durante las pasadas décadas, se han creado colecciones de microalgas en diferentes países. Por ejemplo, la colección de microalgas de la Universidad de Coimbra en Portugal es considerada la más amplia al contener más de 1000 especies, lo que prueba que al existir tanta diversidad de microalgas, las aplicaciones para las mismas son amplias ya sea como productos farmacéuticos, productos para el consumo humano o como fuentes de energía (Mata et al., 2010).

Las microalgas poseen una gran variedad de características útiles que les ha permitido ser empleadas de diversas formas. Los lípidos, carbohidratos y el

elevado contenido proteínico de algunas especies de microalgas han promovido su investigación en diferentes áreas. Actualmente las microalgas son consideradas una fuente potencial de sustancias bioactivas de interés en la industria farmacéutica y alimentaria. El cultivo de microalgas alcanza un gran valor en el mercado internacional y su demanda aumenta a la par con el desarrollo de la tecnología industrial, la biotecnología y la demanda internacional de nuevos medicamentos y compuestos alimenticios (Mendoza, De la Jara y Portillo, 2011).

La aplicación biotecnológica de las microalgas está siendo considerada con mayor seriedad, no solo como una nueva fuente alimenticia sino como producto energético, agrícola, acuícola y nutricional debido a la que la productividad de las microalgas es de 30 a 100 veces superior a la productividad de cultivos como el de soja. El cultivo de microalgas no compite con la agricultura y no requiere emplear grandes terrenos agrícolas por lo que usan 99% menos cantidad de agua que la agricultura convencional (Portilla, 2010).

Las microalgas actualmente son consideradas una fuente de producción de biomasa alternativa, renovable y ecológica bastante eficiente, gracias a su capacidad de transformar la energía solar en compuestos químicos útiles a grandes velocidades, principalmente para el empleo de su aceite en la elaboración de biodiesel. De igual forma, las microalgas pueden ser implementadas en la elaboración de diversos productos industriales a base de carbohidratos como etanol o suplementos proteínicos, colorantes, biofertilizantes y antioxidantes (Portilla, 2010).

Las microalgas han sido utilizadas por los humanos en su forma viva y muerta. Los depósitos fósiles de diatomeas han sido utilizados como material de construcción y como un nuevo método de filtración y purificación del agua de las piscinas. Algunas algas fósiles como *Botryococcus* dan lugar a yacimientos ricos en petróleo. Las algas verdes son cultivadas con el propósito de extraer sus productos bioquímicos claves para emplearlos en medicina y cosmetología. Las algas verde azuladas son considerados organismos molestos, formadores

de densas floraciones que producen toxinas y obstruyen los cursos de agua. No obstante, estas especies de microalgas tienen grandes beneficios como es el caso de la *Spirulina* utilizada como suplemento dietético (Bellinger y Sigee, 2010, pp. 1-40).

Otro gran mercado para los productos obtenidos a partir de las microalgas corresponde a los alimentos dietéticos y funcionales, así como también al mercado de los aditivos alimentarios, especialmente carotenoides como la astaxantina y el β -caroteno (Mendoza et al., 2011).

Las microalgas también han sido utilizadas como indicadores de toxicidad en plantas de revestimiento de aluminio y en plantas farmacéuticas. La correlación entre el crecimiento de las microalgas y la toxicidad ha proporcionado una forma simple y barata de medir los contaminantes en los flujos de los residuos para determinar si los efluentes estaban dentro del rango permitido por el gobierno de Turquía (Ley de control de la contaminación de agua Turquía). Igualmente, las microalgas han sido utilizadas para evaluar el grado de estabilización de los efluentes industriales de una refinería de petróleo (Sacan y Balcioglu, 2006).

En cuanto a las aplicaciones energéticas de las microalgas, estas pueden ser utilizadas para reducir las emisiones de CO_2 de las centrales eléctricas. El CO_2 producido en la planta energética puede ser utilizado por las microalgas como fuente de carbono. Mediante el metabolismo fotosintético, las microalgas absorben el CO_2 y liberan oxígeno dando como resultado la reducción de las emisiones de carbono (Johnson, 2009).

2.1.3 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo de microalgas

Cada especie y subespecie de microalga posee sus propias características respecto a las condiciones óptimas de crecimiento. La productividad y la composición de las microalgas están determinadas principalmente por la alcalinidad del medio de cultivo, el pH, la temperatura, la disponibilidad y

concentración de los nutrientes, la intensidad y tipo de luz, la densidad celular del cultivo y la contaminación o depredación por parte de otros organismos. En promedio las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial algunas microalgas pueden doblar su biomasa en un tiempo menor de 3,5 horas (Brenan y Owende, 2010).

2.1.3.1 Luz

Uno de los principales factores a considerar en un cultivo de microalgas es la intensidad lumínica. La luz es la fuente de energía que permite que se lleven a cabo las reacciones fotosintéticas. Es por esto que se debe considerar la cantidad, calidad y fotoperiodo según la especie de microalga a ser cultivada para no afectar el crecimiento y síntesis de compuestos orgánicos como lípidos, carbohidratos y proteínas (Portilla, 2010).

Los organismos fotosintéticos, utilizan la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción fotosintética activa supone 40% de la radiación total del sol. La mayoría de ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de 1% de conversión de energía lumínica en biomasa. Se ha demostrado que las microalgas presentan una eficiencia de conversión luz/biomasa entre 1 y 4% en sistemas abiertos y en sistemas cerrados como los fotobiorreactores el porcentaje de conversión es aún mayor (Stephens, Ross, Mussnug, Wagner, Borowitzka, Posten, Kruse y Hankamer, 2010).

En el caso de las microalgas, la fotosíntesis es saturada a niveles lumínicos sobre el 30% de la radiación total que la tierra recibe del sol, lo que supone alrededor de 1700 a 2000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Las microalgas adaptadas a bajos niveles de luminosidad poseen una respuesta más rápida a los cambios en la intensidad lumínica que las microalgas que están adaptadas a intensidades de luz más elevadas. Las microalgas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila a de sus células, es decir las microalgas que se adaptan a bajas intensidades lumínicas poseen mayor cantidad de clorofila (Ruiz, 2011).

La luz es considerada un factor limitante en la producción de microalgas al aire libre. Las concentraciones óptimas de biomasa difieren para cada nivel de irradiación solar, esta irradiación cambia a lo largo del día haciendo que la biomasa se adecue a dicho cambio. Por otra parte, la iluminación artificial atribuye una producción de biomasa microalgal continua pero con mayor costo económico y energético. En este caso es importante conocer el espectro de absorción de las algas cultivadas, que depende de los pigmentos mayoritarios presentes en cada especie (Ruiz, 2011).

2.1.3.2. Temperatura

La temperatura es un factor importante a considerar en el crecimiento de las microalgas debido a que influye directamente sobre la velocidad de las reacciones biosintéticas (Malgas, 2013). La relación temperatura y velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente hasta alcanzar la temperatura óptima que fluctúa entre 28° y 35°C (Hernández y Labbé, 2014). Gran variedad de microalgas son capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas. Asimismo, todas ellas presentan un rango fuera del cual se inhibe su crecimiento y mueren (Malgas, 2013).

Sobre los niveles óptimos de temperatura, aumenta la respiración y se reduce la producción global del cultivo (Hernández y Labbé, 2014). En sistemas abiertos de cultivo el incremento de la temperatura se ve compensado con la evaporación del agua, regulándose de este modo la temperatura máxima. En sistemas cerrados de cultivo es necesaria la refrigeración adicional debido a que el nivel de luz y la temperatura pueden afectar a la biomasa microalgal (Ruiz, 2011).

2.1.3.3 pH

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad de biomasa micoalgal, la respiración, la alcalinidad y la composición iónica del

medio de cultivo, la actividad microbiana autótrofa y heterotófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂ (Hernández y Labbé, 2014).

En la mayoría de cultivos de microalgas el pH se encuentra entre 7 y 9, cuyo valor óptimo está entre 8,2 - 8,7. El pH puede ser controlado mediante aireación o adición de CO₂ (Malgas, 2013). Los valores ácidos generalmente causan la muerte de las microalgas y afectan la solubilidad de varios compuestos en el medio de cultivo (Portilla, 2010).

2.1.3.4 Nutrientes

Después del carbono, que representa alrededor del 50% del peso seco de la biomasa microalgal, el nitrógeno es el nutriente más importante para el crecimiento de las microalgas y es incorporado como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺). Asimismo, es un factor crítico en la regulación del contenido de lípidos de las microalgas. Generalmente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, no obstante, cuando el nitrógeno se vuelve el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta a más del 40%. Por otra parte, el fósforo incorporado como HPO₄³⁻ o HPO₄¹⁻ es fundamental para varios procesos celulares como la síntesis de ácidos nucleicos y la transferencia de energía. A pesar de que el contenido de fósforo de las microalgas es menor al 1%, la deficiencia del mismo en el medio de cultivo es una de las limitaciones para el crecimiento (Hernández y Labbé, 2014).

Existen otros macronutrientes utilizados por las microalgas para su crecimiento como el azufre, calcio, magnesio y potasio. De igual forma, micronutrientes como molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro (Ruiz, 2011).

2.1.3.5 Oxígeno disuelto

La fotosíntesis realizada durante el día por parte de las microalgas, puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto a una saturación mayor al 200% causando la inhibición de fijación de carbono. Muchas especies de microalgas no sobreviven a un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 horas. La producción fotosintética de oxígeno en cultivos de alta densidad celular puede alcanzar hasta 40 mg/L, por lo que mediante la radiación adecuada pueden desarrollarse radicales de oxígeno que resultan tóxicos para las células y causarían daños en las membranas celulares. La presión parcial en el medio de cultivo puede ser disminuida aumentando la agitación dentro del medio de cultivo (Ruiz, 2011).

2.1.3.6 CO₂

El consumo normal de carbono en forma de CO₂ de las microalgas se encuentra entre 200 y 600 mg/L. En promedio, las microalgas son capaces de tolerar hasta 150,000 ppmv de CO₂ en aire. Especies como *Chlorella* han demostrado tolerar hasta 4000,000 ppmv de CO₂ (Ruiz, 2011).

2.1.3.7 Agitación

Dentro del medio de cultivo, la agitación es de gran importancia debido a que permite la distribución homogénea de las microalgas en su respectivo medio, facilita la asimilación de los nutrientes y la captación de luz, mejora el intercambio gaseoso y posee una función termorreguladora (Portilla, 2010). La correcta agitación del medio de cultivo permite que las microalgas entren en ciclos rápidos de mezclado en lo que pasan de una zona oscura a una zona iluminada en cuestión de milisegundos (Ruiz, 2011).

2.1.3.8 Salinidad

Otro factor de gran influencia en el crecimiento y productividad de los cultivos de microalgas es la salinidad del medio de cultivo. Tanto en sistemas abiertos como en sistemas cerrados, la salinidad afecta el crecimiento y la composición celular de las microalgas. Cada especie de microalga posee un rango óptimo de salinidad que puede aumentar con las altas temperaturas ambientales. La salinidad causa estrés osmótico, estrés salino iónico y produce cambios en los radios iónicos celulares debido a la permeabilidad selectiva iónica de las membranas celulares. La salinidad en el cultivo de microalgas puede ser controlada mediante la adición de agua dulce o agua salada según los requerimientos de la especie (Mata et al., 2010).

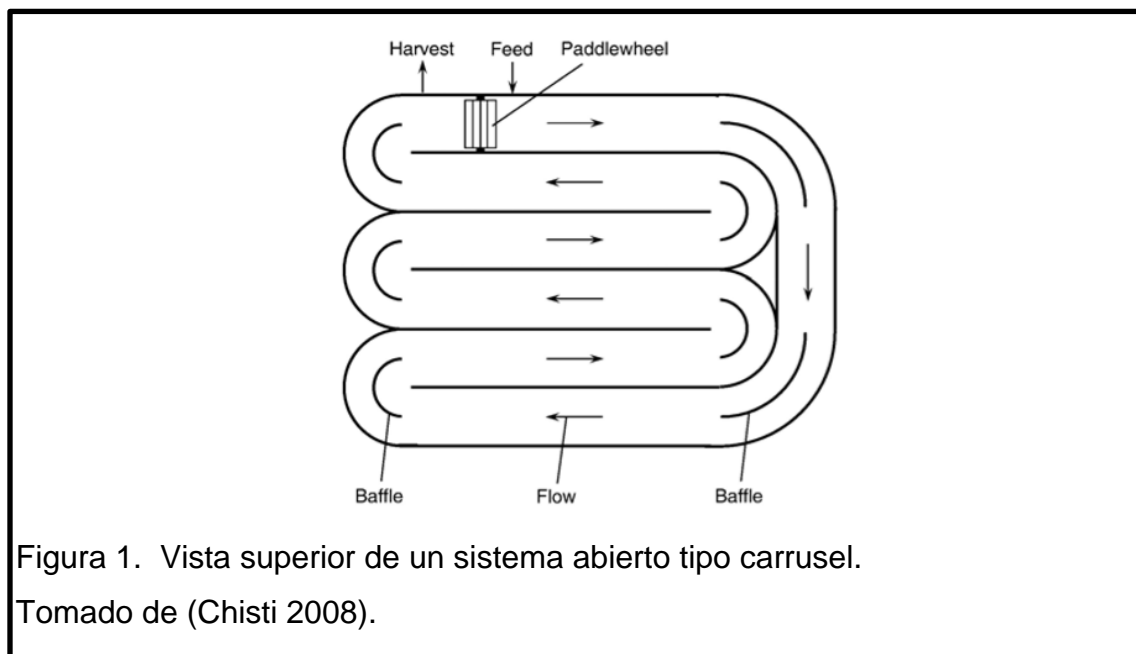
2.1.4 Sistemas de cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas ha sido desarrollado desde los años 40, sin embargo en las dos últimas décadas se ha intensificado la investigación respecto a mejorar los sistemas de producción (Albarracín, 2007). La elección del tipo de sistema de cultivo es compleja y depende de diferentes criterios como la biología de la especie a cultivar, la forma del cultivo, los requerimientos nutricionales, lumínicos y la resistencia al estrés de la especie, la relación de la superficie iluminada/volumen del reactor que determina la velocidad de crecimiento, la orientación e inclinación, el tipo de sistema de mezcla y dispersión de gases, el sistema de limpieza y de regulación de temperatura, la transparencia y la durabilidad del material del estanque o reactor, la capacidad de escalado, los costos de construcción y de operación para fines comerciales (Hernández y Labbé, 2014).

Existen dos sistemas básicos de cultivos para la producción de biomasa de microalgas: los sistemas abiertos donde la biomasa está expuesta a condiciones medioambientales y los sistemas cerrados denominados fotobiorreactores con reducido o ningún tipo de contacto con el medio exterior (Hernández y Labbé, 2014).

2.1.4.1 Sistemas de cultivo de microalgas abiertos

Los sistemas de cultivo de microalgas abiertos constituyen estanques horizontales. El sistema abierto más común es el tipo carrusel o raceway (por sus siglas en inglés) que permite alcanzar densidades celulares hasta de 0,7 g de biomasa seca por litro. Este tipo de sistema está compuesto por canales poco profundos de 2 a 10 cm de ancho y de 15 a 20 cm de profundidad. Tiene forma de circuito cerrado por donde el medio de cultivo y la suspensión celular son impulsados a través de los canales mediante paletas rotatorias, hélices o bombas a una velocidad de 0,2 a 0,5 m s⁻¹ con el fin de evitar la sedimentación de las microalgas (Contreras, Peña, Flores y Cañizares, 2003).



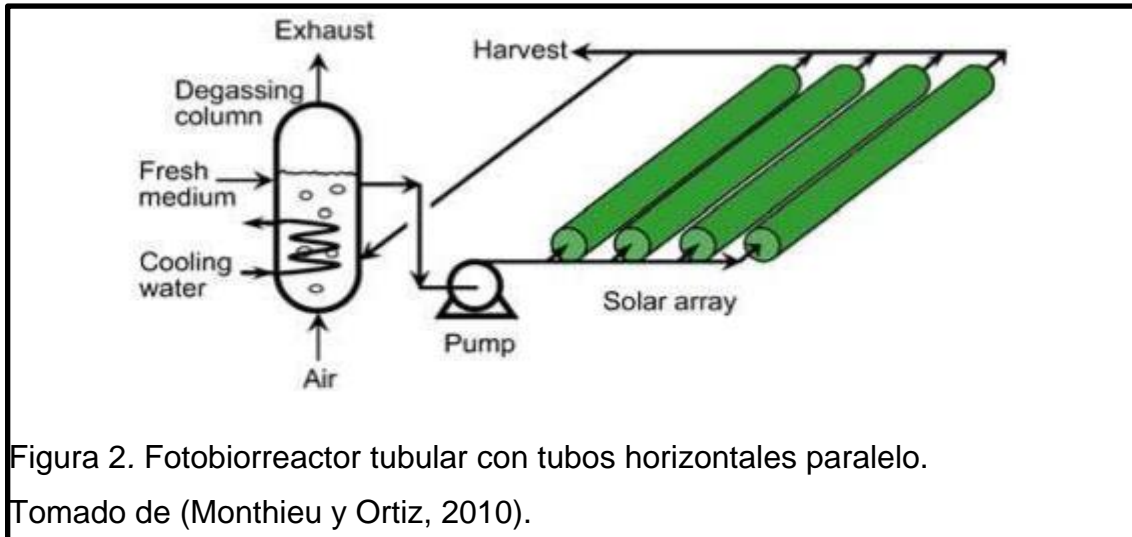
Otro tipo de sistema abierto son los sistemas de cultivo de capa fina. Su diseño se basa en estanques inclinados en los que el cultivo de microalgas circula por una delgada lámina de 1 cm de espesor. El sistema de capa fina es extremadamente productivo, sin embargo los costos de bombeo aumentan su valor económico (Mendoza et al., 2011).

Los sistemas abiertos en la actualidad son los más empleados en la producción industrial de microalgas. No obstante, en este tipo de sistema no es posible el

control efectivo de las condiciones del cultivo debido a la exposición con el medio ambiente lo que da como resultado altos riesgos de contaminación del cultivo. Estas desventajas dificultan el mantenimiento en el tiempo de los cultivos por lo que su uso ha reducido el número de especies extremófilas capaces de mantener elevadas tasas de crecimiento en condiciones limitadas para la mayoría de microorganismos y a ambientes con un clima templado y una alta cantidad de horas de luz solar (Mendoza et al., 2011).

2.1.4.2 Sistemas de cultivo de microalgas cerrados

Por otro lado, el cultivo de microalgas en sistemas cerrados se ejecuta mediante reactores cerrados tubulares que reducen el riesgo de contaminación y es un sistema más robusto. Los fotobiorreactores tubulares varían de simples estructuras cilíndricas a extensos sistemas con kilómetros de tubería transparente de poco diámetro (30 a 200 mm). El diseño de fotobiorreactor más empleado es el tubular denominado Biocoil que consiste en una estructura helicoidal de tubo flexible transparente de polietileno, en la cual el cultivo se mantiene en circulación permanente mediante bombas o sistemas de impulsión neumática (airlift). Los fotobiorreactores planos o alveolares consisten en estructuras planas transparentes en las que se mantiene una elevada relación superficie volumen. La agitación de los cultivos de microalgas en este tipo de fotobiorreactor se realiza mediante sistemas de burbujeo (Mendoza et al., 2011).



Los sistemas cerrados poseen mayor productividad en comparación con los sistemas abiertos debido a que se obtienen cultivos de alta densidad celular, hay mayor eficiencia en la utilización y fijación del CO_2 inyectado, facilitan la cosecha de biomasa, los niveles de contaminación del cultivo son bajos, se puede controlar de mejor manera las condiciones de crecimiento del cultivo y hay menor inversión de capital en la construcción de los fotobiorreactores (Albarracín, 2007).

2.1.5 Métodos de cosecha

La separación de la biomasa microalgal del medio de cultivo dispone entre el 20 y 30% del coste total de la producción de microalgas. Esto quiere decir que la separación es una etapa determinante en la rentabilidad y en el balance energético del proceso. Las microalgas son difíciles de separar del medio de cultivo donde se encuentran creciendo principalmente por su pequeño tamaño. Algunas microalgas, como las cianobacterias, se sedimentan por su tamaño (decantación espontánea) o flotan. Otras forman agregados (floculación) lo que facilita su decantación (Ruiz, 2011).

Un método de extracción o de cosecha apropiado involucra una o más etapas y se realiza en sistemas físicos, químicos o biológicos, con el fin de remover mayor cantidad de agua y procesar grandes volúmenes de biomasa microalgal.

Actualmente no existe un método de separación universal por lo que es un área bastante importante de investigación y desarrollo (Malgas, 2013).

La mayoría de técnicas de cosecha de biomasa microalgal comprenden centrifugación, sedimentación, filtración, ultrafiltración; algunas veces con la adición de un floculante o combinando floculación y flotación. La técnica de separación dependerá de varios aspectos como la especie de microalga, la densidad del cultivo, el uso posterior de la biomasa y factores económicos, como el precio del subproducto obtenido (Mata et al., 2010).

Generalmente, el proceso de separación de biomasa se lleva a cabo en dos etapas: en la primera etapa la concentración de microalgas alcanza entre el 2 y 7% del peso seco mediante técnicas como floculación, sedimentación por gravedad o flotación. En la segunda etapa, el secado es más fino y de mayor costo energético y se realiza mediante técnicas como centrifugación, filtración o ultrasonidos (Malgas, 2013).

2.1.5.1 Sedimentación por gravedad

En la decantación o sedimentación por gravedad, la eficacia del proceso depende del radio y la densidad celular de las microalgas. Este método es mayormente empleado en el tratamiento de aguas residuales, debido a los grandes volúmenes de biomasa que se manejan y a su bajo valor añadido. Con la aplicación previa de ultrasonido a la decantación se optimiza la eficiencia de agregación y el factor de concentración del proceso (Malgas, 2013).

2.1.5.2 Flotación

La flotación es un proceso de separación por gravedad mediante el cual se agrega aire en forma de burbujas en el medio de cultivo para transferir las partículas sólidas a la superficie del medio líquido (Peralta et al., 2012). La flotación es un proceso viable en el caso de especies que flotan de manera

natural. Con este método no es necesario emplear reactivos químicos como es el caso de la floculación (Palomino, 2010).

2.1.5.3 Floculación

La floculación es un método empleado para aumentar el tamaño de las células de las microalgas y facilitar los procesos posteriores de cosecha como son la sedimentación, centrifugación y filtración. Las células de las microalgas poseen carga negativa lo que evita la formación de agregados en la suspensión. La carga del medio de cultivo puede ser neutralizada o reducida mediante la adición de floculantes como cationes multivalentes o poliméricos. Los floculantes poseen la capacidad de aglomerar las células de las microalgas que se encuentran dispersas en el medio de cultivo dando como resultado el aumento de su tamaño celular. Los floculantes a utilizar deben ser de bajo costo, eficaces en baja concentración y no deben ser tóxicos (Molina, Belarbi, Acién, Robles y Yusuf, 2003).

La floculación puede ser inducida de diferentes formas. La floculación química ha sido ampliamente estudiada. Algunos compuestos químicos han sido utilizados a escala industrial principalmente en el tratamiento de aguas residuales y plantas de tratamiento (Lee et al., 2005). Las sales de metales multivalentes mayormente utilizadas en la floculación de las microalgas son el cloruro férrico (FeCl_3), el sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) y el sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) (Molina et al., 2003).

La floculación también puede lograrse sin la adición de otros floculantes cambiando el pH del medio de cultivo de las microalgas. Mediante este método se ha logrado separar el 95% de la biomasa de las microalgas en la suspensión. Sin embargo, los pH extremos pueden causar efectos adversos (Monthieu y Ortiz, 2010).

Las microalgas son capaces de generar un proceso denominado autofloculación, es decir, se agregan de forma espontánea lo que da como

resultado la sedimentación de las células microalgales. Esto puede suceder de forma natural o inducida limitando suministro de carbono u otros factores abióticos en el cultivo de microalgas (Hernández y Labeé, 2014).

Existen otros métodos donde se utilizan agentes floculantes como arcillas modificadas, sedimentos o biopolímeros como el quitosan. La eficiencia del proceso de floculación varía según el agente empleado, la concentración del agente, el pH, la temperatura y la fuerza iónica y la naturaleza orgánica de las superficie celular (Cuéllar, Alonso, Voltolina y Morquecho, 2015).

Igualmente, la biofloculación es un método que permite la recolección de microalgas sin la adición de floculantes químicos, permite la reutilización del medio de cultivo sin necesidad de tratamientos adicionales y evita contaminaciones no deseadas. La biofloculación de microalgas no floculantes con microalgas floculantes ha sido evaluada como un método alternativo eficaz en la cosecha de biomasa microalgal debido a que no necesita diferentes condiciones de cultivo y el contenido de lípidos es más del 25% del peso seco de la biomasa (Salim et al., 2011).

2.1.5.4 Centrifugación

La centrifugación es el método más extendido en el caso de productos con alto valor añadido pero presenta inconvenientes como el elevado consumo energético de mantenimiento del equipo, y el peligro de dañar las células debido al esfuerzo constante. Es un método rápido y que alcanza grados de sequedad del 85%. Sin embargo, no siempre es un sistema rentable (Malgas, 2013).

La centrifugación es el método más empleado en la recuperación de células de microalgas. La recuperación de biomasa mediante centrifugación dependerá de las características de sedimentación de las células, el tiempo de residencia de la suspensión celular en la centrifugadora y la profundidad de sedimentación. La profundidad de sedimentación puede ser controlada mediante el diseño de

la centrífuga mientras que el tiempo de residencia de la suspensión en la centrífuga puede ser controlado mediante la regulación de la velocidad de flujo (Molina et al., 2003).

2.1.5.5 Filtración

Por su parte, la filtración puede ser un método más competitivo en comparación con otros sistemas de separación. Para volúmenes menores a 2 m³/día, la rentabilidad es mayor que en el caso de la centrifugación. Para volúmenes mayores a 20 m³/día los costes de bombeo y de reemplazo de las membranas pueden afectar la competitividad. La filtración puede realizarse mediante flujo tangencial (membranas externas) o fibra hueca (membranas sumergidas), en modo de microfiltración, ultrafiltración y filtración al vacío. Las microalgas pueden causar un importante efecto de fouling (acumulación indeseada de material en superficies sólidas, como organismos vivos o una sustancia no viva) en las membranas debido a que segrega materia orgánica extracelular que aumenta la resistencia a la filtración. No obstante, existen pretratamientos para evitar este efecto (Ruiz, 2011).

Una vez que se ha separado el medio de cultivo de la biomasa microalgal, esta debe ser rápidamente procesada debido a que es altamente perecible y se puede dañar en poco tiempo dependiendo de la temperatura ambiental. Por estas razones, la biomasa obtenida suele ser deshidratada y así se evitan reacciones de descomposición. La deshidratación puede realizarse mediante secado al sol, con spray, en tambores, por baja presión, en lecho fluidizado o por congelación (Malgas, 2013).

En el caso de extracción de lípidos para obtención de biodiesel se debe encontrar el equilibrio entre el grado de secado y la rentabilidad del proceso. En caso de extracción de otros productos de interés, es común romper las células para recuperar los productos intracelulares como los aceites. En su mayoría, los métodos de ruptura de células aplicadas a las microalgas fueron adaptados de aquellos empleados en microorganismos no fotosintéticos y de plantas

oleaginosas, lo que incluye el prensado, el uso de solventes, la homogeneización a alta presión, el autoclavado y el uso de enzimas (Malgas, 2013).

2.2 Guarango

2.2.1 Descripción de la especie

Caesalpinia spinosa conocida comúnmente como guarango, es una especie originaria de las regiones interandinas, nativa de Bolivia, Perú, Venezuela, Ecuador, Colombia, Chile y Cuba (Paredes, 2015). En el Ecuador existen registros de su existencia en las provincias de la Sierra, dentro de formaciones boscosas xerofíticas como el valle del Chota, Guayllabamba, Nizag y Vilcabamba (Játiva, 2011).

El guarango es una especie arbórea cultivada que mide de 2 a 3 metros de altura. Su tronco posee una corteza gris espinosa con ramillas altamente pobladas. La copa del guarango es irregular, aparasolada y poco densa con ramas ascendentes. Sus hojas compuestas bipinnadas ligeramente espinosas son de color verde oscuro y miden 1,5 cm de largo. Los frutos son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja de 8 cm a 10 cm de largo y 2 cm de ancho que contienen de 4 a 7 granos de semillas redondas, que son de color pardo negruzco cuando se encuentran maduras. Las flores del guarango son de color amarillo rojizo y se encuentran dispuestas en racimos de 8 cm a 15 cm de largo (De la Cruz, 2004).



Figura 3. Árbol *Caesalpinia spinosa* (guarango) y sus vainas. Tomado de (Revelo, 2014).

2.2.2 Taxonomía y morfología

El nombre genérico de esta especie fue propuesta por Lineo en 1753 con base al nombre de Andrea Cesalpino (1519-1603), el nombre específico spinosa se debe a la presencia de espinas en toda su estructura. El botánico Kuntze lo clasificó en el género *Caesalpina* (Játiva, 2011).

Dependiendo de la zona geográfica donde se encuentra ubicada esta especie es conocida como: Tara, Taro, Taya, Guarango, Vinillo, Espino, Changue, Campeche, Cuica, Serrano y Divi divi de tierra fría (Revelo, 2014).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del guarango

Reino	Vegetal
División	Espermatofita
Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledónea
Orden	Fabales
Familia	Caesalpinacea
Género	Caesalpina
Especie	<i>C.spinosa</i>

2.2.3 Condiciones de hábitat natural y requerimientos edafoclimáticos

El guarango se encuentra en un rango de altitud comprendido desde los 800 a los 2800 msnm en la cordillera occidental y en la cordillera oriental desde los 1500 a 3000 msnm. Igualmente se encuentra en zonas con microclimas especiales a 3200 msnm desarrollándose de forma normal pero con menor tamaño. En el Ecuador el guarango se ubica a los 1500 a 3000 msnm (Játiva, 2011).

El guarango es una especie resistente a sequias, plagas y enfermedades. Para lograr su óptimo desarrollo, esta especie requiere lugares con una precipitación promedio anual de 400 a 600 mm. En cuanto a los suelos, no requiere suelos de buena calidad, se adapta a suelos pedregosos, degradados, arenosos, calcáreos y sueltos con pH de 6 a 7,5. La temperatura ambiental de crecimiento

de esta especie varía entre 12 y 18°C, adaptándose hasta los 20°C (Játiva, 2011).

2.2.4 Subproductos del guarango

El guarango es una especie que forma una cadena agroindustrial interesante debido a que sus frutos no son negociados directamente como materia prima; los mismos deben pasar por varios procesos de acopio, procesamiento y comercialización para darles un valor agregado (Játiva, 2011).

Se han realizado investigaciones acerca de los compuestos bioactivos de esta especie donde se ha reportado el contenido de taninos gálicos, mucílagos y glicósidos en las hojas, taninos hidrolizables galotaninos en las vainas y goma o hidrocoloide galactomananico en las semillas. Cada grupo tiene una variedad de sustancias que les confieren características específicas de interés para aplicaciones industriales alimenticias, químicas y farmacéuticas (Paredes, 2015).

La principal fuente de interés industrial en el caso del guarango son sus vainas, de las cuales se obtiene un 60 a 65% de harina, 33% a 38% de semilla y 3% de fibra (Játiva, 2011). La vaina de *Caesalpinia spinosa* contiene de 60 a 70% de taninos dependiendo de su ubicación geográfica, la edad de la especie y las condiciones climáticas (Paredes, 2015). Los taninos contenidos en la harina del guarango son utilizados en la industria de la curtiembre por no poseer colorantes que al ser combinados con las pieles producen un cuero claro, firme y resistente. Igualmente, son utilizados en la fabricación de plásticos y adhesivos, en el galvanizado, en la conservación de aparejos de pesca, como clarificadores de vinos y sustituto de malta para elaboración de cerveza, en la industria farmacéutica por su uso terapéutico, en la protección de metales, en la cosmetología, en la industria del caucho, en la perforación petrolífera y en el mantenimiento de petróleo (Játiva, 2011). Asimismo, los taninos son considerados como un potencial coagulante capaz de reemplazar las sales de

hierro o aluminio actualmente empeladas en el tratamiento físico químico de las aguas residuales (Revelo, 2014).

Por otra parte, de la harina del guarango también se puede extraer ácido gálico que es utilizado como antioxidante en la industria del aceite y de la cerveza, así como en la fotografía, tintes y manufactura de papel. De las semillas de las vainas se extraen gomas hidocoloides para la industria alimenticia como espesantes o estabilizantes y sustitutos de gomas vegetales. Los cotiledones también son aprovechados gracias a su alto contenido de proteínas, grasas y aceites para la elaboración de balanceados (Játiva, 2011).



Figura 4. Vainas de guarango y harina de guarango.
Tomado de (Revelo, 2014).

2.3 Taninos

2.3.1 Descripción de los taninos

Los taninos son productos naturales que se encuentran en pequeñas o grandes cantidades en casi todas las plantas. Están contenidos en las hojas, frutos y corteza de la madera. Asimismo, están presentes en los frutos inmaduros y desaparecen en la maduración. A pesar de que no se conoce con exactitud la función de los taninos en las plantas, se puede asegurar que los taninos forman parte del mecanismo de defensa contra el pastoreo y la invasión de virus, bacterias y hongos (Játiva, 2011).

Los taninos son compuestos polifenólicos de peso molecular alto, entre 500 y 3000 Da, conformados por grupos hidroxifenólicos y carboxilos. Son sustancias amorfas de forma coloidal, acuosas, ácidas con sabor astringente. Una de las principales características de los taninos es la formación de complejos con proteínas y otras macromoléculas, los cuales ligan y precipitan proteínas, alcaloides y enlaces de hidrógeno, entre los grupos hidroxil fenólicos del tanino y los grupos carbonílicos peptídicos de las proteínas (Paredes, 2015).

2.3.2 Propiedades de los taninos

Los taninos son aplicados en la industria y en la medicina principalmente en la curación de heridas y cuidado de la piel, gracias a la capacidad de eliminar radicales libres y consumir oxígeno, lo que les atribuye una función cicatrizante. La función antibacteriana de los taninos evita el desarrollo de microorganismos del medio para permitir su desarrollo. Los taninos también tienen la capacidad de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo en el caso de ingestión de productos venenosos (Játiva, 2011).

Los taninos que poseen en su composición sales de hierro, forman compuestos solubles de color azul oscuro o negro verdoso que precipitan con otras sales de metales como el cobre, plomo y estaño. La presencia de sales de hierro y otros metales en la composición de los taninos aportan cargas positivas al contenido de los coloides de las aguas residuales que a su vez presentan cargas negativas. Al existir ambas cargas, se genera una atracción y se forman partículas de mayor tamaño. Es por esto que los taninos de harina de guarango han sido considerados como un potencial coagulante de origen natural para ser empleado en el tratamiento físico químico de las aguas residuales (Revelo, 2014).

2.3.3 Clasificación de los taninos

Según su estructura, los taninos se clasifican en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables.

2.3.3.1 Taninos condensados

Los taninos condensados son polímeros complejos. Cuando son sometidos a tratamientos ácidos o enzimáticos se obtiene como resultado productos complejos e insolubles. La construcción en bloque de los taninos condensados incluye catequinas y flavonoides que generalmente se esterifican con ácido gálico (Játiva, 2011).

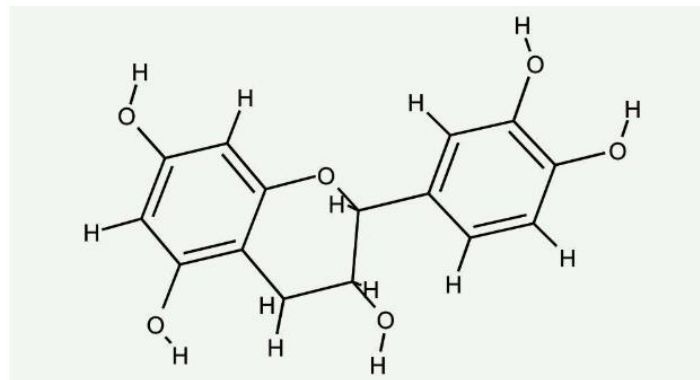
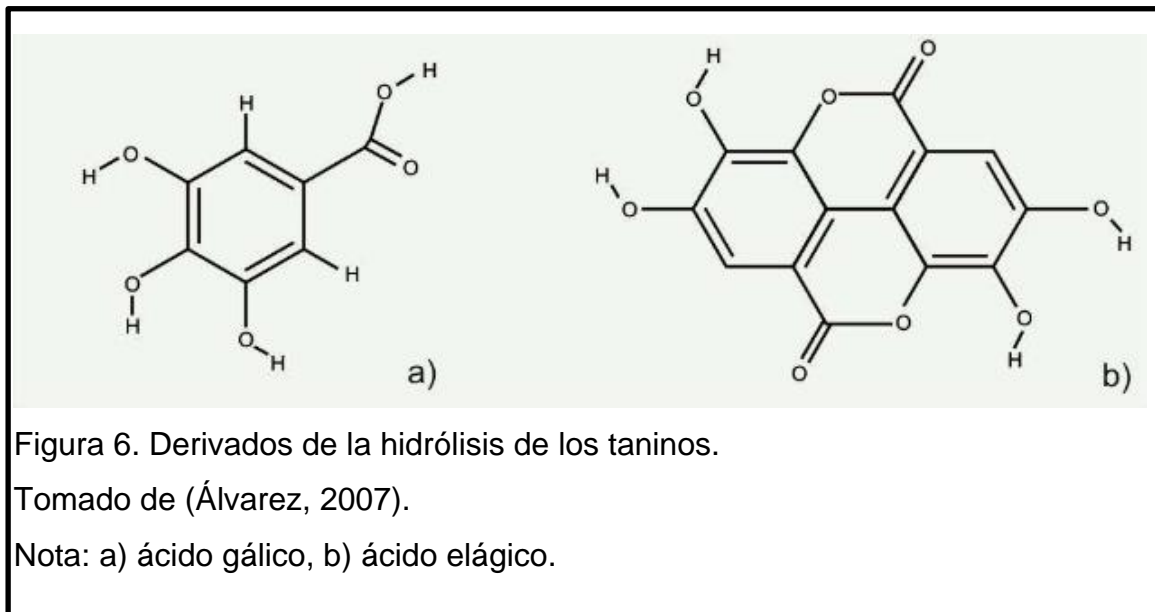


Figura 5. Monómero estructural del que se derivan los taninos condensados. Tomado de (Álvarez, 2007).

2.3.3.2 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables se hidrolizan fácilmente con ácido, agua caliente o enzimas que liberen ácidos fenólicos. El ácido tánico es el tanino mayormente conocido, no obstante, como resultado de la división en las moléculas más simples con tratamientos ácidos o enzimáticos, se obtiene los galotaninos responsables de producir azúcar, el ácido gálico en la hidrolisis y los elagitaninos que además de producir azúcar y ácido gálico, liberan ácido elágico (Játiva, 2011).



Capítulo III. Metodología

3.1 Selección de las cepas de microalgas y de las condiciones de cultivo

Las cepas de microalgas utilizadas en este trabajo fueron colectadas en diferentes sistemas lacustres de la Sierra y la Amazonía del Ecuador con el permiso de investigación No. 002-14 IC-MC-DNB/MA emitido por el Ministerio del Ambiente Ecuador (MAE); las mismas que pertenecen a la Colección de Microalgas para la investigación Ecuador (CMIE) del Laboratorio de Biotecnología Energética, BIOTEC de la Corporación para Investigación Energética.

Diez cepas de microalgas fueron aisladas y purificadas con el fin de seleccionar aquellas con una tasa de crecimiento (μ) elevada para obtener mayor cantidad de biomasa al momento de la cosecha (Tabla 2). Las microalgas fueron cultivadas en medio Bold Basal (Bischoff and Bold, 1963) y BG-11 (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman y Stranier, 1979), que contienen los micronutrientes y macronutrientes necesarios para el crecimiento de las mismas (Anexo 1 y 2), a un pH entre 6,6 y 7. Cada medio de cultivo fue autoclavado a 121°C y 104kPa durante 15 minutos.

Tabla 2. Cepas de microalgas aisladas y purificadas para la evaluación de la tasa de crecimiento.

Código de la cepa	Género de la cepa de microalga	Lugar de colecta	Medio de cultivo
CMIE-A1-004	<i>Chlorella</i> sp. (Beijerinck, 1890).	Parque Nacional Cotopaxi Laguna Santo Domingo	BG-11
CMIE-A3-006	<i>Scenedesmus</i> sp. (Meyen, 1829).	Parque Nacional Llanganates Laguna Chaloacocha	BG-11
CMIE-D6-006	<i>Chlorococcum</i> sp. (Meneghini, 1842).	Reserva Ecológica Cayambe Coca Laguna Oyacachi	BB
CMIE-H1-001	<i>Chlorella</i> sp. (Beijerinck, 1890).	Parque Nacional Sangay Laguna Magdalena	BG-11
CMIE-H4-003	<i>Chlorococcum</i> sp. (Meneghini, 1842).	Parque Nacional Snagay Laguna Ozogoche	BB
CMIE-I-1	<i>Selenastrum</i> sp. (Reinsch, 1867).	Parque Nacional Llanganates Laguna Antejos	BB
CMIE-I4-003	<i>Klebsormidium</i> sp. (Silva, Mattox y Blackwell, 1972).	Parque Nacional Llanganates Laguna Chaloacocha	BG-11
CMIE-I4.2-002	<i>Chlorella</i> sp. (Beijerinck, 1890).	Parque Nacional Llanganates Laguna Chaloacocha	BB
CMIE-I5-002	<i>Klebsormidium</i> sp. (Silva, Mattox y Blackwell, 1972).	Parque Nacional Llanganates Laguna Pisayambo	BG-11
CMIE-I8.1	Consortio <i>Chlorella</i> sp. (Beijerinck, 1890). y <i>Scenedesmus</i> sp. (Meyen, 1829).	Parque Nacional Llanganates Laguna Rodeococha	BB

3.2 Aislamiento y purificación de los cultivos de microalgas

El crecimiento inicial de las microalgas se realizó mediante estrías discontinuas en cajas Petri autoclavadas con medio de cultivo en agar tanto de Bold Basal como de BG-11. Las cepas de microalgas fueron cultivadas a una temperatura aproximada de 22 ± 3 °C y luz artificial de 839 lux (Anexo 3). Luego de 5 días, se observó al microscopio óptico (Sogeresa[®], España) la pureza de las cepas. Las cepas axénicas fueron transferidas a tubos de centrifuga (Falcon[®], Estados Unidos) de 50 mL con 15 mL de medio líquido para su crecimiento a las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas anteriormente (Anexo 4). Cuando se observó la presencia de más de una cepa de microalga, se repitió el proceso de purificación hasta obtener una cepa pura.

A continuación se escaló el cultivo en botellas de vidrio de 500 mL previamente autoclavadas con un volumen final de 200 mL (Anexo 5). El volumen del inóculo se calculó utilizando la siguiente fórmula descrita por Bastidas, 2008:

$$Vol. inóculo = \frac{V final * 1x10^6}{DC inóculo} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde V inóculo = volumen total requerido, DC = densidad celular del inóculo.

Luego de la inoculación, las botellas de vidrio fueron colocadas en estanterías iluminadas con una intensidad de luz de 839 lux. Los cultivos fueron agitados de manera periódica pasando un día y sutilmente en forma circular con el fin de variar la posición de las células.

Para eliminar microorganismos contaminantes como hongos y bacterias, se realizaron tres lavados a cada cultivo de microalga. Se agregó agua destilada esterilizada al medio de cultivo y se centrifugó en tubos (Falcon[®], Estados Unidos) de 50 mL a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se repuso el medio de cultivo autoclavado al volumen que se tenía inicialmente.

Luego de 30 días aproximadamente, basándose en la coloración de los cultivos de microalgas, se preseleccionaron aquellos que se encontraban de un color similar al verde botella. Se observó al microscopio óptico (Sogeresa[®], España) cada cultivo y finalmente se seleccionaron aquellos cultivos que no presentaban ningún tipo de contaminación ya sea con otra cepa de microalgas o con microorganismos como hongos y bacterias. Las tres cepas de microalgas seleccionadas fueron:

- Cepa CMIE-A1-004 del Parque Nacional Cotopaxi, Laguna Santo Domingo, género *Chlorella* sp.1 (Anexo 6).
- Cepa CMIE-A3-006 del Parque Nacional Cotopaxi, Laguna Limpiopungo, género *Scenedesmus* sp (Anexo 7).
- Cepa CMIE-I4.2-002 del Parque Nacional Llanganates, Laguna Chaloacocha, género *Chlorella* sp.2 (Anexo 8).

3.3 Evaluación del crecimiento de las microalgas

Para la evaluación del crecimiento y la determinación de la concentración celular de las tres cepas de microalgas seleccionadas, se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) durante treinta días. El recuento se realizó sobre los cuatro cuadrantes denominados A, B, C y D (Figura 7).

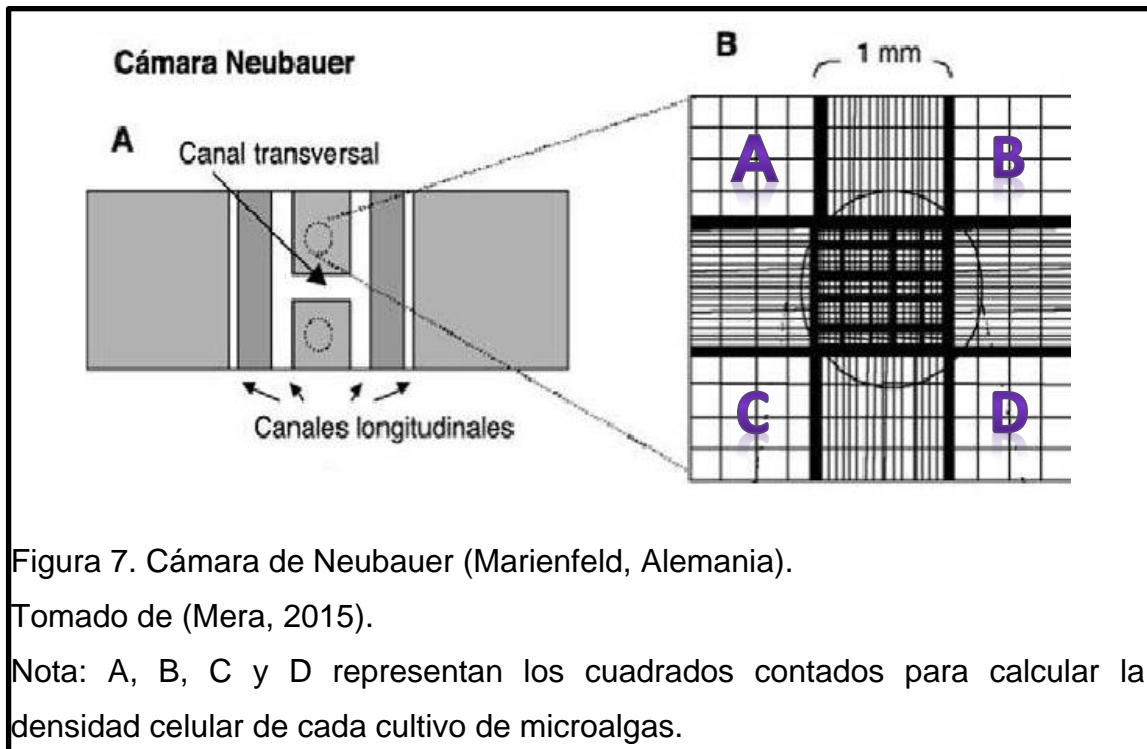


Figura 7. Cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania).

Tomado de (Mera, 2015).

Nota: A, B, C y D representan los cuadrados contados para calcular la densidad celular de cada cultivo de microalgas.

Con una pipeta Pasteur se dispensó el cultivo en un extremo del cubre objetos colocado sobre la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) y se observó al microscopio óptico (Sogeresa[®], España) con el lente de 40X para tener un mejor campo óptico. Se registró el número de células contadas en los cuatro cuadrantes de las cámaras superior e inferior y se aplicó la siguiente fórmula descrita por Guillard, 1973, pp. 69-85:

$$DC = N * 10^4 * (F.d) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde DC = densidad celular (* 10^4 cel/mL), N = promedio de células presentes en 1 mm^3 ($0,1 \mu\text{L}$). Este número de células se divide de acuerdo al número de cuadrantes contados, 10^4 = factor de conversión de $0,1 \mu\text{L}$ a 1 mL, F.d = factor de dilución (1:10; 1:100).

3.4 Cálculo de la tasa de crecimiento celular

El cálculo de la tasa de crecimiento celular de los tres cultivos de microalgas seleccionados se realizó a partir de los datos obtenidos al finalizar el conteo celular. Se empleó la ecuación descrita por Eta, Saila y Fakultatea, 2014:

$$\mu = \frac{\log N_t - \log N_o}{0.310 * t} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde μ = tasa de crecimiento (d^{-1}), $\log N_t$ = logaritmo en base 10 de la densidad celular en un tiempo "t" (cél. mL^{-1}), $\log N_o$ = logaritmo en base 10 de la densidad celular inicial (cél. mL^{-1}), t = tiempo (días).

3.5 Cultivo de las cepas de microalgas a escala piloto

Luego de 7 días aproximadamente, cuando el volumen de cada cultivo de microalgas fue de 1 L, se proporcionó agitación constante mediante bombas de aire acuáticas (JAD[®], China) y se administró CO_2 durante 1 minuto a una presión de 500 PSI tres veces a la semana. Para determinar la concentración de saturación de CO_2 dentro de cada fotobiorreactor se aplicó la Ley de Henry:

$$C_s = K_D * P \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde C_s = concentración de saturación del gas, K_D = coeficiente de distribución: $4,3 \times 10^{-2}$ mol/L.atm a $25^\circ C$ para el caso del CO_2 , P = presión parcial del gas: 500 PSI.

El tiempo de suministro de CO_2 a una concentración de 508,64 g CO_2/L dentro de cada fotobiorreactor se calculó tomando en cuenta que el caudal de la válvula del tanque de CO_2 proporciona 5 L CO_2 /minuto para tres fotobiorreactores al mismo tiempo:

$$Q = \frac{V}{T} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde Q = caudal de la válvula de CO_2 , V = volumen de cada fotobiorreactor: 30 L, T = tiempo en minutos de suministro de CO_2 .

A continuación, se escaló por duplicado a 3 L cada cepa en botellones de plástico de 5 L de capacidad. A medida que aumentaba la biomasa microalgal,

se adicionó 1 L de agua con 1 mL de Nitrofoska® foliar (Ecuador) para adaptarlas a un nuevo medio de cultivo (Anexo 9).

Para escalar a nivel piloto los cultivos, se construyeron 30 fotobiorreactores artesanales en forma de V con 1,40 m de plástico de polietileno de 280 µm con capacidad máxima de 15 L, los mismos fueron colocados en un soporte de metal a la intemperie. Se realizó un nuevo conteo celular de cada cepa de microalgas seleccionada en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) para conocer la concentración celular y calcular el volumen de inóculo necesario para que cada fotobiorreactor contenga una concentración celular inicial de 1×10^6 cél.mL⁻¹. Se adicionó 10 L de agua potable a cada fotobiorreactor, 10 mL de Nitrofoska® foliar (Ecuador) y se inoculó con cada cepa de microalga (Anexo 10). Se administró CO₂ durante 6 minutos a 500 PSI y aire mediante un compresor durante 10 minutos (Ecuación 5), tres veces a la semana durante 15 días.

3.6 Obtención del floculante biológico a partir de la harina de guarango

La especie vegetal utilizada para la obtención del floculante biológico cuyas propiedades permitan la recuperación de biomasa microalgal fue *Caesalpinia spinosa*, conocida comúnmente como guarango. Para ello, es necesaria una serie de procesos como la recolección de las vainas del guarango, la selección de las mejores vainas, la molienda gruesa, molienda fina y el tamizado para obtener el tamaño óptimo de partícula para la extracción de los taninos (Játiva, 2011). Para la presente investigación, la harina de guarango fue donada por el Cnel. Jorge Terán y el Ing. Diego Proaño.

La extracción de los taninos contenidos en la harina de guarango se realizó mediante la metodología descrita por Revelo (2014) con algunas modificaciones en una solución al 50% de solvente alcohólico y agua destilada. En una balanza electrónica (Boeco®, Alemania) se pesaron 150 g de harina de guarango los cuales fueron disueltos en una solución que contenía 750 mL de metanol y 750 mL de agua destilada. Se procedió a calentar la solución en una

plancha de calentamiento a 210 RPM y 135°C durante 30 minutos (Anexo 11). Una vez concluido el tiempo, se filtró al vacío la solución con papel filtro de 125 mm (Anexo 12). En cada proceso de extracción se obtuvieron 3000 mL de extracto de taninos de guarango a una concentración de 0,1 g/mL.

3.7 Cosecha y floculación de los cultivos de microalgas

La cosecha de cada cepa de microalgas se realizó una vez finalizado el tiempo total de cultivo, a las dos semanas de la inoculación. Se colectó el cultivo microalgal de cada fotobiorreactor en contenedores de plástico. El pH de cada fotobiorreactor se encontró en un rango de 9,4 a 9,7. A continuación se ajustó el pH de cada fotobiorreactor a 5, 8 y 11 con H₂SO₄ puro y una solución de KOH a una concentración de 0,031 g/mL. Se adicionó los extractos de taninos de harina de guarango en volúmenes de 60 mL, 100 mL y 160 mL a una concentración final de 0,5 g/mL, 0,3 g/mL y 0,188 g/mL respectivamente para cada rango de pH y se agitó durante 30 segundos para distribuir el floculante biológico en todo el medio de cultivo (Anexo 13). Se realizó el mismo procedimiento con el control positivo que fue Al₂(SO₄)₃. Por cada litro de cultivo microalgal se añadió directamente 1 g de Al₂(SO₄)₃ sin ajustar el pH.

3.8 Filtración y secado de la biomasa

A las 24 horas de la floculación biológica con los taninos de harina de guarango y de la floculación química con sulfato de aluminio, el medio de cultivo que se encontraba separado de la biomasa microalgal fue eliminado (Anexo 14 y 15). A continuación, la biomasa obtenida de cada fotobiorreactor fue colocada en una tela de seda de 180 µm (doblada en la mitad) para su posterior secado en un secador solar (Anexo 16). Luego de 5 horas aproximadamente, la biomasa se encontraba completamente seca. La biomasa seca fue pesada en una balanza analítica (Boeco[®], Alemania) para determinar la cantidad de biomasa recuperada luego de cada floculación.

3.9 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental de tipo factorial completamente aleatorio aumentado (DCA) de tres factores más un control, con el fin de determinar si existe una diferencia significativa en la obtención de biomasa de microalgas luego de la floculación biológica posterior al ajuste de pH de cada cultivo. Los rangos de pH y la concentración g/mL de floculante biológico fueron establecidos de acuerdo con la experimentación previa. Se ejecutaron 30 experimentos, los cuales se realizaron por triplicado.

Tabla 3. Variables del estudio propuestas

Nombre del experimento	Factores			Control
	Cepa de microalga	Rangos de pH	Volumen de taninos (mL)	Cantidad de $Al_2(SO_4)_3$ (g.L)
A	CMIE-A1-004	5	60 mL	10 g
		8	100 mL	
		11	160 mL	
B	CMIE-I4.2-002	5	60 mL	10 g
		8	100 mL	
		11	160 mL	
C	CMIE-A3-006	5	60 mL	10 g
		8	100 mL	
		11	160 mL	

3.10 Análisis estadístico

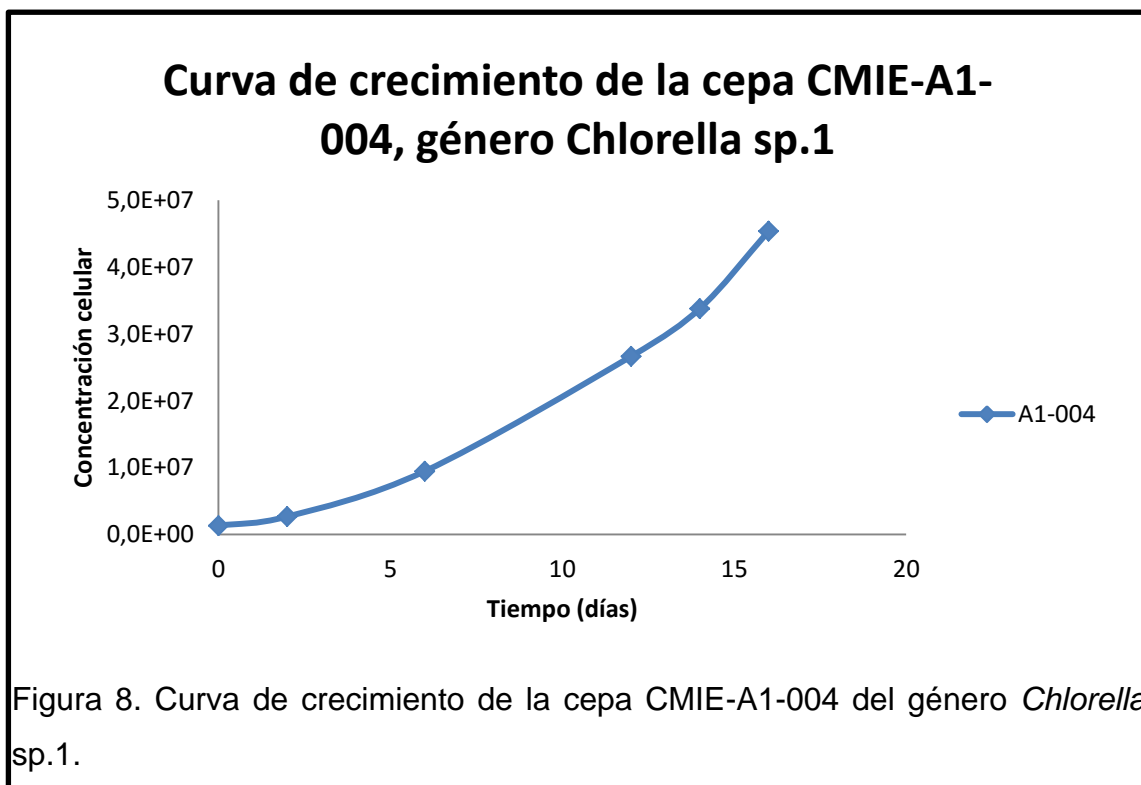
Los datos obtenidos del conteo celular fueron empleados para construir las curvas de crecimiento celular y para calcular la velocidad de crecimiento de cada microalga. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 23.0 mediante el cual se realizaron pruebas de Levene, ANOVA de un factor, prueba post hoc de Dunnett y prueba de Tukey.

Capítulo IV. Resultados y discusión

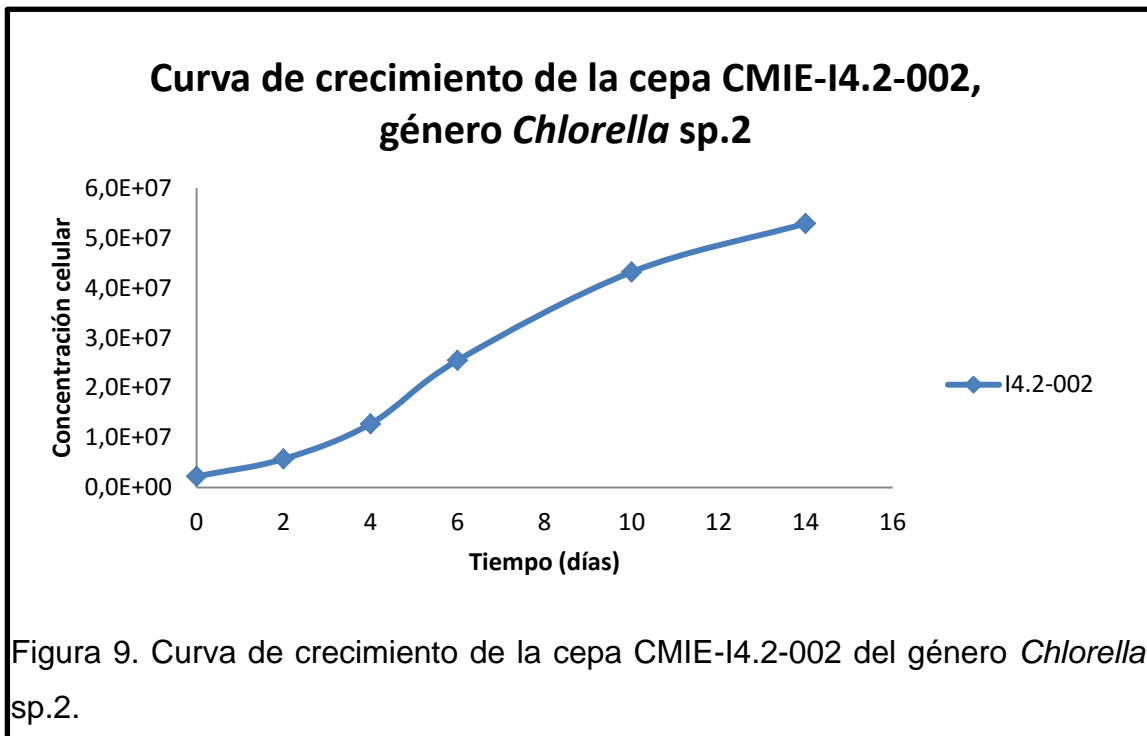
4.1 Evaluación del crecimiento microalgal

4.1.1 Obtención de la concentración celular microalgal

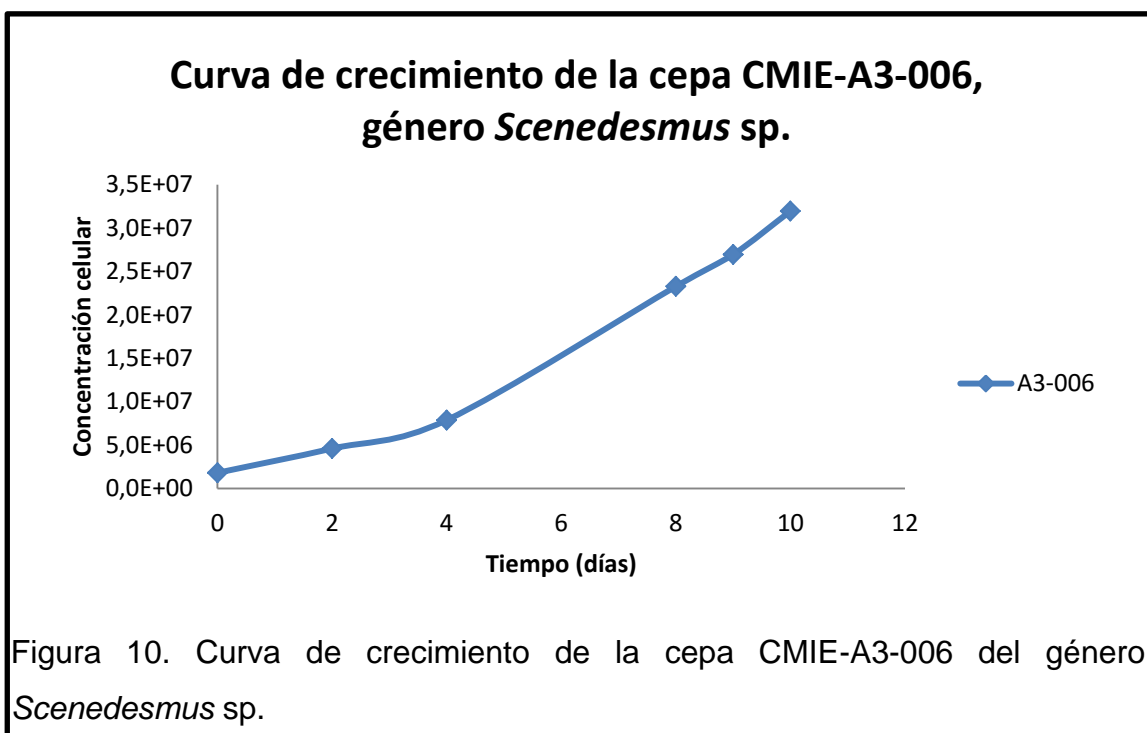
A partir del conteo celular realizado en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania), se obtuvo la gráfica de la velocidad de crecimiento para cada cepa de microalgas. La concentración inicial de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 fue de $1,3 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. La fase de latencia duró dos días desde la inoculación y presentó una concentración celular de $2,7 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. La fase exponencial comenzó a partir del sexto día de crecimiento y duró diez días. La concentración celular en esta fase fue de $4,5 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ (Figura 8).



La concentración celular inicial de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 fue de $2,2 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. La fase de latencia duró tres días aproximadamente y la concentración fue de $1,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. A partir del sexto día inició la fase de crecimiento exponencial que duró ocho días y presentó una concentración celular de $5,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ (Figura 9).



Finalmente, la concentración celular inicial de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. fue de $1,8 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. La fase de latencia duró dos días y la concentración celular fue de $4,6 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. La fase de crecimiento exponencial inició a partir del cuarto día y duró seis días. La concentración celular en la fase exponencial fue de $3,2 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ (Figura 10).



4.1.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de las microalgas

Mediante los datos obtenidos anteriormente, se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de cada cepa de microalga. La velocidad de crecimiento de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 fue de 0,381 cél.día⁻¹ con un tiempo de duplicación de 1,81 días⁻¹. La velocidad de crecimiento de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 fue 0,340 cél.día⁻¹ con un tiempo de duplicación de 2,03 días⁻¹. Finalmente, la velocidad de crecimiento de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. fue 0,308 cél.día⁻¹ con un tiempo de duplicación de 2,24 días⁻¹.

Las curvas de crecimiento celular obtenidas en este trabajo indican que para todas las cepas de microalgas, la fase de latencia dura dos días y la fase exponencial comienza a partir del quinto día y dura de diez a dieciséis días. De las tres cepas estudiadas, la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 obtuvo la mayor concentración celular en la fase exponencial: $5,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ y la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. la concentración celular más baja: $3,2 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. La velocidad de crecimiento celular de las tres cepas estudiadas se encontró en un rango de 0,308 a 0,381 cél.día⁻¹ y el tiempo de duplicación entre 1,81 a 2,24 días⁻¹. La cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 tiene una velocidad de crecimiento mayor en un menor tiempo, al contrario de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp.

Tomando en cuenta los días de duración de la fase exponencial y que en ese punto las microalgas alcanzan su máxima concentración celular, el inóculo para los posteriores escalados de cultivo a nivel de laboratorio y a nivel piloto se tomaron a partir del sexto día de crecimiento. Al obtenerse valores similares de la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación de las tres cepas de microalgas estudiadas, todos los cultivos fueron manejados a las mismas condiciones de crecimiento.

Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Serrano (2012), donde las curvas de crecimiento de las microalgas de agua dulce *Scenedesmus*

ovalternus y *Chlorella vulgaris* mostraron que la fase exponencial dura seis días. Por otra parte, la densidad celular de la microalga *Scenedesmus* sp. aumenta de 7 a 15 días mientras que la densidad celular de la microalga *Chlorella* sp. aumenta de 14 a 24 días. La fase de latencia de ambas microalgas dura entre 12 a 24 horas debido a que el inóculo utilizado en este estudio se encontraba en las fases posteriores a la del crecimiento exponencial. Para las cepas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. se recomienda edad de inóculo superior a 4 días para evitar que las cepas de microalgas pase nuevamente por la fase de latencia.

Rodas, Rodríguez, Flores, Vidales, Aranda y Luna (2012) evaluaron tres tipos de densidades celulares de inoculación en medio de cultivo Bold Basal ajustado a pH 6.8 de la especie *Chlorella vulgaris*: 1×10^6 cél.mL⁻¹ (tratamiento 1), 2×10^6 cél.mL⁻¹ (tratamiento 2) y 5×10^6 cél.mL⁻¹ (tratamiento 3). La fase de latencia registrada en el tratamiento 1 fue de 7 días. En el segundo tratamiento, la fase de latencia duró 18 horas y la fase exponencial fue alcanzada a las 41 horas. En tercer tratamiento la fase de latencia duró 41 horas y se llegó a la fase exponencial a las 30 horas luego de la inoculación. La concentración celular máxima alcanzada en un menor tiempo (30 horas) fue con el tratamiento 3 donde se obtuvo una concentración celular de $1,66 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. Las concentraciones celulares máximas obtenidas en el presente trabajo fueron mayores: $4,5 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ para la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y $5,3 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ para la cepa CMIE-I4,2-002 del género *Chlorella* sp.2.

Según Hodaifa, Pacheco, Martínez y Sánchez (s.f.), el crecimiento celular de una cepa de microalgas *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactores de 0,5 dm³ de capacidad ocurrió directamente sin pasar por la fase de latencia. La fase exponencial fue alcanzada a las 40 horas luego de la inoculación donde la concentración celular máxima se encontró en un rango de $1,48 \pm 3,05 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ a $5,75 \times 10^4$ cél.mL⁻¹. En el presente trabajo se obtuvieron valores mayores de concentración celular de la cepa de microalga CMIE.A3-006 del género *Scenedesmus* sp.: $3,2 \times 10^7$ cél.mL⁻¹.

Los resultados obtenidos con las microalgas empeladas en la presente investigación son diferentes en comparación a otros estudios. Las principales diferencias en el crecimiento de las microalgas se deben a las especies de microalgas y a las condiciones en las que han sido trabajadas. Conforme cada cepa se adapta al medio de cultivo, la tasa de crecimiento es menos dependiente de la composición de este y se ve influenciada por otros factores como el pH, la luz, la temperatura o la disponibilidad de nutrientes (Jaramillo, 2011).

4.2 Escalado de biomasa microalgal a nivel piloto

El conteo celular en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) permitió calcular el volumen de inóculo necesario para iniciar el crecimiento microalgal a una concentración de 1×10^6 cél.mL⁻¹ en cada fotobiorreactor que contenía 10 L de agua potable. En la primera repetición, el inóculo de la cepa CMIE-A1-001 del género *Chlorella* sp.1 fue de 129 mL, el inóculo de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 fue de 24,59 mL y el inóculo de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. fue de 20 mL.

En la segunda repetición el inóculo de la cepa CMIE-A1-001 del género *Chlorella* sp.1 fue de 225 mL, el inóculo de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 fue de 129 mL y el inóculo de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. fue de 373 mL. Finalmente, el inóculo de la tercera repetición fue de 100 mL para las tres cepas de microalgas.

4.2.1 Cosecha y floculación del cultivo de microalgas

La determinación del día óptimo de cosecha se basó en los datos obtenidos en las curvas de crecimiento de cada cepa de microalgas. La cosecha de cada fotobiorreactor se realizó a los 15 días de la inoculación. A las 24 horas se logró la floculación biológica combinada con el ajuste de pH y la floculación química de cada cepa microalgal (control positivo). Los cultivos microalgales

que fueron floculados biológicamente cambiaron su color verde claro a café debido a la coloración que presentan los extractos de taninos (Anexo 14).

El volumen de inóculo de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 fue mayor a las demás cepas de microalgas en la primera repetición debido a la baja concentración celular del cultivo madre de 5 L. Esto puede deberse a la falta de suministro de CO₂ para aumentar el crecimiento celular del cultivo y a la falta de agitación dentro del cultivo para variar la disposición de las células y evitar la muerte celular. En la segunda repetición ocurre lo opuesto con el volumen de inóculo de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2, el volumen de inóculo es menor debido a la alta concentración celular del cultivo de 5 L. En la tercera repetición el volumen de inóculo fue igual para todas las cepas de microalgas, pero menor al volumen de inóculo de la repetición anterior debido a la elevada concentración celular del cultivo madre de 5 L. En este caso, las microalgas continúan su crecimiento sin pasar por la fase de latencia debido a que se encuentran en su máxima concentración celular. El crecimiento exponencial de las tres cepas de microalgas empleadas en este trabajo duró de diez a quince días por lo que la cosecha de cada fotobiorreactor se realizó luego de los 15 días de la inoculación.

Rodas, et al. (2012), realizaron tres tratamientos con diferentes concentraciones celulares para la especie *Chlorella vulgaris*. El volumen de inóculo necesario para iniciar el crecimiento celular en un frasco Enlermeyer de 500 mL a una concentración de 1×10^6 cél.mL⁻¹ fue de 367,5 mL. En el segundo tratamiento, el volumen de inóculo necesario para iniciar el crecimiento celular a una concentración de 2×10^6 cél.mL⁻¹ fue de 183,8 mL y finalmente el volumen de inóculo necesario para iniciar el crecimiento celular a una concentración de 5×10^6 cél.mL⁻¹ fue de 73,5 mL. A diferencia del presente trabajo, el volumen de inóculo para la cepa CMIE-A1-001 y CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.1 y *Chlorella* sp.2 fueron menores en todas las repeticiones debido a que las concentraciones celulares de cada cultivo madre de 5 L fueron mayores.

Hernández, Travieso y Rojas (2000), emplearon la microalga *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en un soporte de copolímero de estireno (resina de poliestireno di-vinil benceno) para determinar la remoción de nutrientes de aguas residuales en un reactor que contenía 17 L. El inóculo de *Scenedesmus obliquus* para el reactor fue de 25 mL. Este volumen de inóculo es mayor al volumen de inóculo adicionado en la primera repetición del presente estudio y menor al volumen de inóculo en las siguientes repeticiones de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedespus* sp. debido a que la concentración celular del cultivo madre de 5 L era baja.

Valladares (2014), empleo una relación 3:1 de cultivo de microalgas y agua destilada respectivamente para inocular bidones plásticos de 20 L con la especie *Chlorella* sp. Semanalmente adicionó 5 mL de inóculo por cada 10 L de agua destilada. La densidad celular inicial del cultivo se calculó mediante el conteo celular en la cámara de Neubauer mientras que la densidad celular final se calculó después de tres centrifugaciones del cultivo microalgal a 1000 y 2000 rpm durante 5, 10 y 15 minutos. A diferencia de este estudio, el conteo celular en la cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) se realizó previamente a cualquier escalado para que el volumen de inóculo adicionado en cada fotobiorreactor inicie su crecimiento celular microalgal a una concentración celular de 1×10^6 cél.mL⁻¹. El volumen de inóculo en 10 L de agua potable durante las tres repeticiones de las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1, CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. fue mayor al mencionado anteriormente.

Según Lee et al. (2005), los resultados obtenidos luego de la floculación con sulfato de aluminio, ajuste de pH y Pestan como floculante biológico sugieren que el momento óptimo de cosecha de biomasa microalgal es luego de dos semanas de inoculación. Bajo estas condiciones, se produjo un máximo de 90% en peso seco en recuperación de biomasa microalgal. Contreras et al., (2003), menciona que es importante tomar en cuenta que para que los cultivos crezcan de manera correcta durante este periodo de tiempo, es necesaria la administración de CO₂ así como la agitación periódica del cultivo para evitar la

sedimentación de las microalgas en el fondo de reactor y permitir que las células microalgales accedan a zonas iluminadas.

Molina et al., (2003) afirman que *Chlorella* sp. flocula con polímeros catiónicos pero no con polímeros aniónicos y los cambios de pH del rango 4 a 7 no afectan el comportamiento de la floculación. Además, mencionan que el quitosano empleado como floculante biológico ha demostrado ser eficiente en la floculación de las microalgas con cantidades bajas de 40 mg.L⁻¹ y 150 mg.L⁻¹ independientemente del grupo taxonómico de cada microalga. En el presente trabajo los floculantes de origen vegetal como los taninos de harina de guarango actúan de forma similar a los floculantes químicos permitiendo la sedimentación de las células microalgales de las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2. Por el contrario, el ajuste de pH 5 afectó el proceso de floculación permitiendo obtener el segundo mejor resultado de biomasa seca microalgal en gramos (Tabla 4.12).

Por otra parte, Mendoza, et al. (2011), realizaron la floculación de la microalga *Dunaliella salina* y *Chlorella* sp. donde los resultados mostraron una alta eficiencia en los ensayos realizados con sales férricas. Lo mismo sucede en un estudio realizado por Molina, et al. (2003), donde el alumbre es un floculante eficaz para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. No obstante, en ambos casos las altas concentraciones de residuos detectadas en la biomasa de las microalgas no permiten el uso de las mismas para fines alimentarios.

4.3 Evaluación del peso seco de la biomasa microalgal

4.3.1 Filtración y secado de la biomasa microalgal

La tela de seda empleada para filtrar cada cultivo, eliminó el exceso de medio líquido permitiendo recoger solo células de microalgas. La biomasa obtenida en forma de una pasta espesa verdosa fue colocada dentro del secador solar. Las condiciones climáticas fueron favorables para todos los experimentos, luego de

5 horas la biomasa se encontraba seca. A continuación se retiró la biomasa seca de la tela para ser pesada.

Durante la primera repetición de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 los valores de biomasa seca en gramos más altos se obtuvieron con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5: 1,51 g, con el volumen de 100 mL de taninos a pH 8: 1,77 g y con el volumen de 60 mL de taninos a pH 11: 4,04 g. Todos los valores de biomasa en peso seco obtenidos luego de la floculación biológica son bastante bajos en comparación a la biomasa obtenida con el control: 10,05 g (Tabla 4).

En la segunda repetición se obtuvo 1,57 g de biomasa seca con el volumen de 60 mL de taninos a pH 5, 1,22 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 8 y 2,61 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11. Todos los resultados en peso seco de biomasa fueron menores a los valores obtenidos con el control: 6,12 g (Tabla 4)

En la tercera repetición se obtuvo 2,33 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5, 1,11 g de biomasa seca con el volumen de 60 mL de taninos a pH 8 y 2,52 g de biomasa seca con el volumen de 100 mL de taninos a pH 11. Todos los resultados en peso seco de biomasa fueron menores a los valores obtenidos con el control: 4,54 g (Tabla 4)

Tabla 4. Peso seco en gramos obtenido luego de la floculación biológica y química de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1.

		Primer experimento	Segundo experimento	Tercer experimento
pH	Volumen de tanino (mL)	Peso seco de la biomasa (g)		
5	60 mL	1,3161	1,5777	1,335
	100 mL	0,6965	0,7846	2,2519
	160 mL	1,5109	0,2311	2,3323
8	60 mL	0,9961	0,4439	1,1151
	100 mL	1,7744	0,7972	0,9601
	160 mL	0,8232	1,2297	0,59
11	60 mL	4,0449	1,167	1,6286
	100 mL	3,936	1,5853	2,5286
	160 mL	2,988	2,6119	1,8943
Control: Al ₂ (SO ₄) ₃		10,0551	6,1224	4,5428

En la primera repetición de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 los valores de biomasa seca en gramos más altos se obtuvieron con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5 y pH 11 los cuales fueron 1,38 g y 2,30 g respectivamente y con el volumen de 100 mL de taninos a pH 8: 0,5 g. Los valores de biomasa en peso seco obtenidos luego de la floculación biológica fueron menores en comparación a la biomasa obtenida con el control: 3,96 g (Tabla 5).

En la segunda repetición se obtuvo 1,8 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5, 1,36 g de biomasa seca con el volumen de 100 mL de taninos a pH 8 y 0,8 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11. Todos los resultados en peso seco de biomasa fueron menores a los valores obtenidos con el control: 3,62 g (Tabla 5).

En la tercera repetición se obtuvo 3,89 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5, 2,06 g de biomasa seca con el volumen de 100 mL de taninos a pH 8 y 1,68 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11. Los resultados en peso seco de biomasa con pH 8 y pH 11 fueron menores a los valores obtenidos con el control: 4,41 g, mientras que los

resultados de peso seco de biomasa con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5 se acercan al control (Tabla 5).

Tabla 5. Peso seco en gramos obtenido luego de la floculación biológica y química de la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2.

		Primer experimento	Segundo experimento	Tercer experimento
pH	Volumen de tanino (mL)	Peso seco de la biomasa (g)		
5	60 mL	1,005	1,6	0,8975
	100 mL	0,965	1	3,5856
	160 mL	1,3834	1,8	3,8938
8	60 mL	0,2	0,6234	0,5451
	100 mL	0,5	2,364	2,0684
	160 mL	0,3	1,1225	0,5579
11	60 mL	0,586	0,4	0,9702
	100 mL	0,4495	0,8	1,4568
	160 mL	2,3086	0,6	1,6879
Control: Al ₂ (SO ₄) ₃		3,9667	3,6214	4,41

En la primera repetición de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. los valores de biomasa seca en gramos más altos se obtuvieron con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5: 1,80 g y pH 11: 2,52 g y con el volumen de 60 mL de taninos a pH 8: 1,80 g. Los valores de biomasa en peso seco obtenidos luego de la floculación biológica fueron menores en comparación a la biomasa obtenida con el control: 5,84 g (Tabla 6).

En la segunda repetición se obtuvo 1,78 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5, 1,57 g de biomasa seca con el volumen de 60 mL de taninos a pH 8 y 3,06 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11. Todos los resultados en peso seco de biomasa a pH 5 y pH 8 fueron menores a los valores obtenidos con el control: 2,51 g. El valor de biomasa seca obtenida con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11 es mayor cantidad de biomasa con el control: 2,51 g (Tabla 6).

En la tercera repetición se obtuvo 3,00 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 5, 2,23 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 8 y 3,21 g de biomasa seca con el volumen de 160 mL de taninos a pH 11. Los resultados en peso seco de biomasa fueron menores a los valores obtenidos con el control: 6.22 g (Tabla 6).

Tabla 6. Peso seco en gramos obtenido luego de la floculación biológica y química de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp.

		Primer experimento	Segundo experimento	Tercer experimento
pH	Volumen de tanino (mL)	Peso seco de la biomasa (g)		
5	60 mL	1,3319	0,9699	1,1771
	100 mL	2,2947	1,616	2,2938
	160 mL	2,419	1,781	3,0052
8	60 mL	1,8015	1,5807	1,1944
	100 mL	1,1395	0,6775	0,9327
	160 mL	1,3632	1,4026	2,2339
11	60 mL	2,1067	2,1018	1,6283
	100 mL	2,2681	2,9571	3,2155
	160 mL	2,5235	3,0646	1,3284
Control: Al ₂ (SO ₄) ₃		5,8469	2,5124	6,2204

Las células de microalgas empleadas en este trabajo del género *Chlorella* sp. miden alrededor de 2 a 10 µm y las células de microalgas del género *Scenedesmus* sp. miden de 12 a 20 µm. Las células microalgales del género *Scenedesmus* sp. al ser más grandes que las células del género *Chlorella* sp. obtuvieron valores más altos de biomasa en peso seco luego de la floculación biológica con taninos. Esto se debe a que al momento de la filtración con la tela de seda de 180 µm, se pudo haber perdido biomasa de cada cultivo microalgal.

La filtración realizada en este estudio para obtener biomasa seca de microalgas luego de la floculación biológica con taninos fue similar a los procesos de filtración de la biomasa microalgal descrito por Molina et. al, (2003), donde las células de microalgas fueron filtradas a través de una tela de filtro (tamaño de poro desconocido) para formar una torta o capa. La biomasa sedimentada se

recuperó de la tela de filtro mediante raspado. Unduman, Qi, Danquah, Forde y Hoadley (2010), mencionan que se debe tomar en cuenta el tamaño de poro del medio para filtrar. Las partículas de microalgas deben ser mayores que dicho poro para que la recuperación de biomasa sea correcta.

4.4 Análisis estadístico

A continuación se presenta la estadística descriptiva de la biomasa microalgal seca obtenida con cada tratamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Estadística descriptiva de la biomasa microalgal seca obtenida con cada tratamiento.

T	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	1.4133	.14468	.08353	1.0539	1.7727	1.32	1.58
2	3	.8533	.36295	.20955	-.0483	1.7550	.44	1.12
3	3	2.2800	1.54146	.88996	-1.5492	6.1092	1.17	4.04
4	3	1.2433	.87272	.50386	-.9246	3.4113	.70	2.25
5	3	1.1767	.52003	.30024	-.1152	2.4685	.80	1.77
6	3	2.6867	1.18281	.68289	-.2516	5.6249	1.59	3.94
7	3	1.3567	1.05836	.61105	-1.2725	3.9858	.23	2.33
8	3	.8800	.32419	.18717	.0747	1.6853	.59	1.23
9	3	2.4967	.55869	.32256	1.1088	3.8845	1.89	2.99
10	3	1.1700	.37643	.21733	.2349	2.1051	.90	1.60
11	3	.4567	.22502	.12991	-.1023	1.0156	.20	.62
12	3	.6533	.29023	.16756	-.0676	1.3743	.40	.97
13	3	1.8533	1.50407	.86838	-1.8830	5.5897	.97	3.59
14	3	1.6433	1.00072	.57776	-.8426	4.1293	.50	2.36
15	3	.9033	.51287	.29610	-.3707	2.1774	.45	1.46
16	3	2.3567	1.34441	.77619	-.9830	5.6964	1.38	3.89
17	3	.6600	.41905	.24194	-.3810	1.7010	.30	1.12
18	3	1.5333	.86570	.49981	-.6172	3.6838	.60	2.31
19	3	1.1600	.18083	.10440	.7108	1.6092	.97	1.33
20	3	1.5233	.30892	.17836	.7559	2.2907	1.19	1.80
21	3	1.9467	.27429	.15836	1.2653	2.6280	1.63	2.11
22	3	2.0667	.38682	.22333	1.1057	3.0276	1.62	2.29

23	3	.9167	.23029	.13296	.3446	1.4887	.68	1.14
24	3	2.8167	.49095	.28345	1.5971	4.0363	2.27	3.22
25	3	2.4033	.61517	.35517	.8752	3.9315	1.78	3.01
26	3	1.6633	.49116	.28357	.4432	2.8834	1.36	2.23
27	3	2.3033	.88512	.51102	.1046	4.5021	1.33	3.06
28	9	5.0544	2.16873	.72291	3.3874	6.7215	2.51	10.06
Total	90	1.9193	1.50606	.15875	1.6039	2.2348	.20	10.06

Nota: T. 1-27 tratamientos realizados con el floculante biológico, 28 controles. N. número de repetición experimental. Mínimo representa el valor más bajo en gramos de peso seco de biomasa microalgal. Máximo representa el valor más alto en gramos de peso seco de biomasa microalgal.

Para contrastar la hipótesis planteada en este estudio, se calculó el estadístico de Levene donde se observa que el nivel crítico (sig.) es menor que 0,05. Por lo tanto este resultado nos permite concluir que las medias de cada tratamiento son diferentes (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,765	27	62	,034

Nota: Estadístico de Levene comprueba la igualdad de las varianzas de los tratamientos realizados. gl 1 y gl 2 son los grados de libertad utilizados en esta prueba. Sig. es el nivel crítico.

Se realizó el ANOVA de un factor para calcular las medias de los tratamientos realizados experimentalmente. El resultado estadístico de la prueba muestra que el valor de F es 4,542 que es significativamente distinto de 1 y que el nivel crítico es menor que 0,05. Lo que indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 9).

Tabla 9. ANOVA de un factor de los tratamientos realizados

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	134,079	27	4,966	4,542	,000
Dentro de grupos	67,793	62	1,093		
Total	201,872	89			

Nota: F en el ANOVA permite verificar la igualdad de medias. Gl grados de libertad. F prueba de F (significación del ANOVA). Sig. nivel crítico.

A continuación se realizó la prueba post hoc para conocer cuáles son las medias que difieren. La prueba t de Dunnett se realizó con el fin de comparar el control con todos los demás tratamientos. Los valores obtenidos de significación de esta prueba muestran que el tratamiento 6 que corresponde a la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y el tratamiento 24 que corresponde a la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp., ambos con volumen de 100 mL de taninos y pH 11, son los mejores tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba T de Dunnett. Comparaciones múltiples de los tratamientos frente al control.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	28	-,87687	,16915	,000	-1,4179	-,3359
2	28	-1,07316	,16915	,000	-1,6142	-,5322
3	28	-,64996	,16915	,007	-1,1910	-,1090
4	28	-,94964	,16915	,000	-1,4906	-,4086
5	28	-,96124	,16915	,000	-1,5022	-,4202
6	28	-,52631	,16915	,063	-1,0673	,0147
7	28	-,92384	,16915	,000	-1,4648	-,3828
8	28	-1,06212	,16915	,000	-1,6031	-,5211
9	28	-,56407	,16915	,034	-1,1051	-,0231
10	28	-,96037	,16915	,000	-1,5014	-,4194
11	28	-1,22549	,16915	,000	-1,7665	-,6845
12	28	-1,14732	,16915	,000	-1,6883	-,6063
13	28	-,77650	,16915	,001	-1,3175	-,2355
14	28	-,82660	,16915	,000	-1,3676	-,2856
15	28	-1,05849	,16915	,000	-1,5995	-,5175
16	28	-,62077	,16915	,013	-1,1618	-,0798
17	28	-1,14817	,16915	,000	-1,6892	-,6072
18	28	-,85511	,16915	,000	-1,3961	-,3141

19	28	-,96107	,16915	,000	-1,5021	-,4201
20	28	-,84343	,16915	,000	-1,3844	-,3024
21	28	-,71459	,16915	,002	-1,2556	-,1736
22	28	-,68113	,16915	,004	-1,2221	-,1401
23	28	-1,04715	,16915	,000	-1,5881	-,5061
24	28	-,47905	,16915	,129	-1,0200	,0619
25	28	-,59018	,16915	,022	-1,1312	-,0492
26	28	-,80235	,16915	,000	-1,3433	-,2614
27	28	-,62405	,16915	,012	-1,1650	-,0831

Nota: La prueba de Dunnett trata un grupo como control y lo compara con los demás tratamientos. *La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05. Sig. nivel crítico.

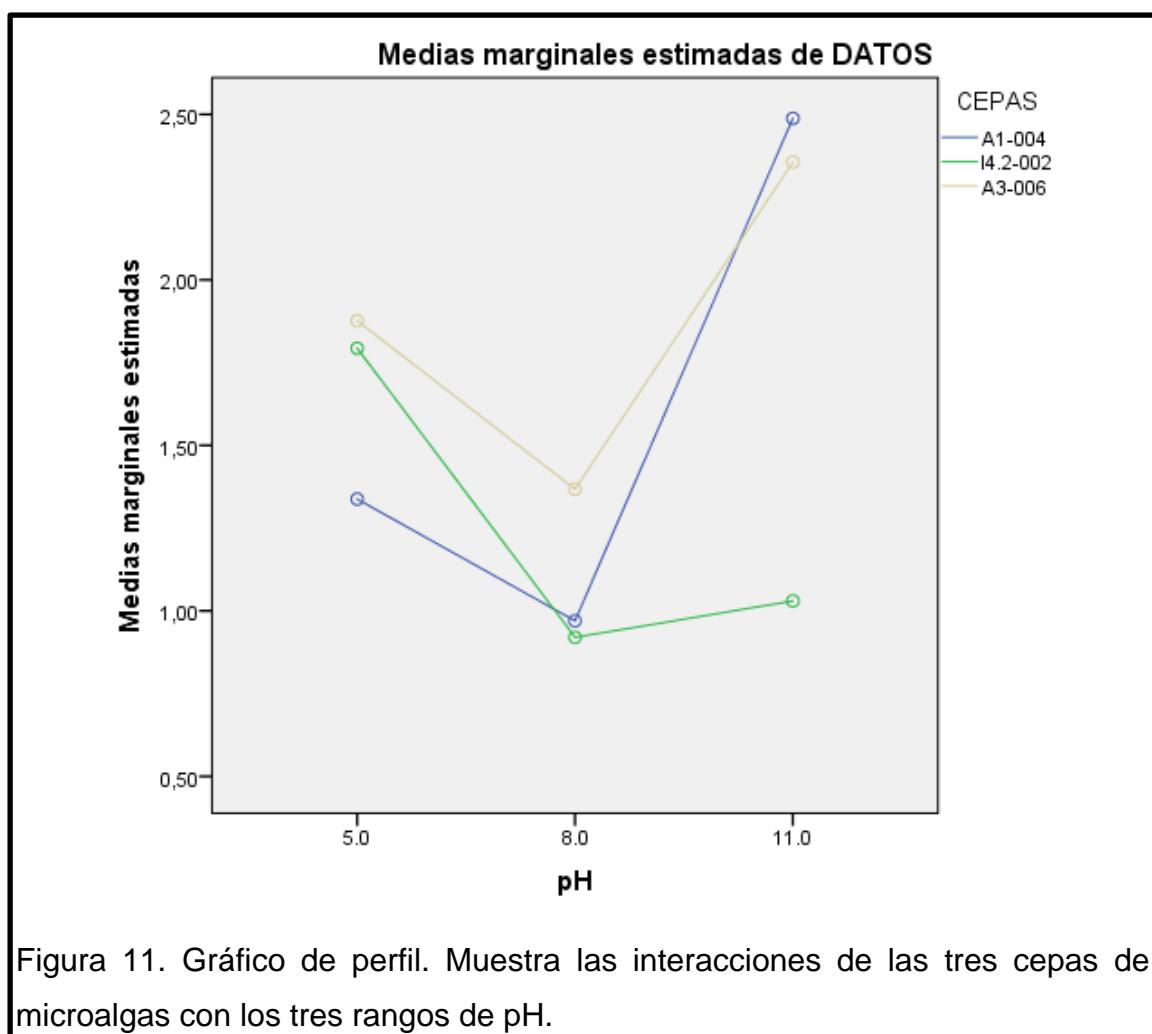
En el análisis univariado de los tratamientos se realizó las pruebas de significación de las cepas de microalgas, los volúmenes de taninos y del rango de pH, así como de sus interacciones para observar las diferencias independientemente del control. En la tabla 11 se puede observar que existen diferencias significativas entre las cepas y entre los volúmenes de taninos y diferencias altamente significativas entre el pH. En cuanto a las combinaciones, entre cepas*volumen no existen diferencias significativas, entre cepa*pH existen diferencias altamente significativas y entre volumen*pH no hay diferencias significativas. En la combinación de los tres factores: cepas, volumen de tanino y pH no existen diferencias significativas.

Tabla 11. Pruebas de efectos entre los factores analizados.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	205,609 ^a	27	7,615	155,690	,000
CEPAS	,588	2	,294	6,015	,004
VOLUMEN	,324	2	,162	3,315	,044
pH	,985	2	,492	10,065	,000
CEPAS * volumen	,137	4	,034	,699	,596
CEPAS * pH	,800	4	,200	4,088	,006
volumen * pH	,086	4	,021	,439	,780
CEPAS * volumen* pH	,497	8	,062	1,269	,279
Error	2,641	54	,049		
Total	208,250	81			

Nota: Gl grados de libertad. F prueba de F. Sig. nivel crítico (0,05).

Las interacciones de los factores estudiados que presentaron diferencias altamente significativas independientemente del control, fueron cepa*pH. Este resultado indica que las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y CMIE-A3-003 del género *Scenedesmus* sp. flocculan mejor con el pH 11 sin importar el volumen de tanino utilizado como floculante biológico. En la figura 11 no se observan unas tendencias claras en la floculación biológica con el pH 5 y pH 8. Esto puede deberse a los bajos niveles de pH estudiados o a errores de manipulación durante la cosecha, floculación, filtrado y secado de biomasa microalgal.



La prueba de Tukey se realizó para comparar las medias de cada uno de los factores analizados experimentalmente. Esta prueba indica que entre las cepas, la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. posee una mejor

capacidad de floculación debido a que presenta un promedio de 1,8667 y la cepa menos eficiente es la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2. Esto puede deberse al que el tamaño celular de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. es mayor al de las cepas CMIE-A1-004 y CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.1 y sp.2 respectivamente, lo que aumenta la capacidad de sedimentación de las células microalgales (Tabla 12).

Tabla 12. Prueba de Tukey para las cepas de microalgas.

CEPAS	N	Subconjunto	
		1	2
I4.2-002	27	1.2478	
A1-004	27	1.5985	1.5985
A3-006	27		1.8667
Sig.		,206	,391

Nota: La prueba se basa en las medias observadas. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 27,000. Sig. nivel crítico (0,05).

La prueba de Tukey para el volumen de tanino muestra que no existen diferencias entre los volúmenes y que los resultados forman parte de un solo rango. Esto puede ser debido a que la concentración de los taninos no fue suficiente para el volumen de cultivo manejado. No obstante, la floculación es más eficiente con 100 mL y 160 mL de tanino (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de Tukey para los volúmenes de taninos.

Volumen de Tanino	N	Subconjunto
		1
60 ml	27	1.2730
100 ml	27	1.7007
160 ml	27	1.7393
Sig.		,065

Nota: La prueba se basa en las medias observadas. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 27,000. Sig. nivel crítico (0,05).

Finalmente, la prueba de Tukey para los rangos de pH indica que el pH 11 presenta el mejor rendimiento, mientras que el pH 8 posee el menor rendimiento, a pesar de que a este valor se encuentran la mayoría de cultivos de microalgas. El pH 5 mostró el segundo mejor resultado en la floculación. No obstante, estos resultados no son convincentes debido a que los pH muy ácidos causan la muerte del cultivo microalgal (Tabla 14).

Tabla 14. Prueba de Tukey para los rangos de pH.

pH	N	Subconjunto	
		1	2
8.0	27	1.0859	
5.0	27		1.6693
11.0	27		1.9578
Sig.		1,000	,339

Nota: La prueba se basa en las medias observadas. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica= 27,000. Sig. nivel crítico (0,05).

Según González y Ballesteros (2013), la sedimentación de las microalgas también es atribuido a la mayor densidad celular alcanzada dentro del medio de cultivo, es decir la capacidad de floculación de las microalgas está relacionada con su condición fisiológica. El final de la fase de crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria son los rangos óptimos para que las microalgas comiencen a flocular. En el presente estudio la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. presentó una mejor capacidad de floculación debido a que llega a la fase estacionaria a los 11 días, tiempo menor en comparación a tiempo que tarda la cepa CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 en llegar a esta fase.

Además, González y Ballesteros (2013), mencionan que uno de los principales nutrientes implicados en la fotosíntesis de las microalgas es el carbono que afecta directamente al proceso de floculación. El carbono es asimilado 6,5 y 100 veces más que el nitrógeno y el fósforo respectivamente, por lo que el suministró de CO₂ al cultivo de *Scenedesmus* sp. aumenta el crecimiento y

acelera la capacidad de floculación. En este estudio, a todos los cultivos microalgales se les suministro la misma cantidad de CO₂ a 500 PSI durante 6 minutos tres veces a la semana a una solubilidad de 508,64 g CO₂/L. La diferencia de crecimiento celular y de capacidad floculante puede estar relacionada a la morfología de las células microalgales es por esto que la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. obtuvo mejores resultados en relación a las demás cepas.

Los resultados obtenidos por Lee et al., (2005) de la floculación de la microalga *Botryococcus braunii* cultivada durante dos semanas muestran que el pH más efectivo fue el pH 11 y las concentraciones óptimas de sulfato de aluminio y Pestan (floculante biológico) fueron 200 mg.L⁻¹ y 100 mg.L⁻¹, respectivamente. A pesar de que el sulfato de aluminio es uno de floculantes más empleados en la floculación de microalgas también necesitan del ajuste de pH para obtener una mayor actividad de floculación. En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo, en todos los casos donde se realizó la floculación química con sulfato de aluminio no se necesitó del ajuste de pH debido a que el sulfato de aluminio actuó rápida y eficientemente a cualquier concentración. Lee et al. (2005) también mencionan que en la floculación de la microalga *Chlorella* sp., el sulfato de aluminio fue más eficaz que el ajuste de pH 11. Resultados similares fueron obtenidos en esta investigación. Para todos los casos, la floculación con sulfato de aluminio fue más eficiente que la floculación con pH combinada con taninos (floculante biológico).

Para Padilla (2015), las cantidades óptimas de los floculantes biológicos de origen vegetal Tanfloc, un polímero orgánico con cargas positivas y Ecotan de carácter catiónico fueron de 20 mg/L a 40 mg/L. También se ha demostrado que estos dos tipos de floculantes aumentan la velocidad de sedimentación de las microalgas (4 días). Dichos datos se ven observados en la creación de flóculos más grandes, con mayor superficie y mayor peso. En contraste, en este estudio la velocidad de floculación no es influenciada por la cantidad de floculante biológico utilizado. La eficacia de cualquier tipo de floculante depende fuertemente del pH del medio de cultivo.

Otros estudios mencionados por Ramírez y Jaramillo (2015) donde se evaluó el uso de Tanfloc como coagulante vegetal para el tratamiento de aguas destinadas al consumo humano, establecen que el mejor resultado de turbidez obtenido fue de 1,18 NTU luego de filtrar 1,13 NTU a un pH de 8,19 con 0,80 mL de coagulante para 1 L de agua con turbidez inicial de 20,5 NTU. Los resultados para la misma muestra de agua con sulfato de aluminio fueron de 0,35 NTU luego de la filtración de 0,18 NTU a un pH de 8,23 con 0,70 mL de coagulante. En comparación con este estudio, las propiedades de coagulación de los taninos de harina de guarango permitieron obtener una cantidad de biomasa microalgal aceptable, a pesar de no ser lo suficientemente eficiente en comparación al sulfato de aluminio que obtuvo mejores resultados en la floculación de biomasa microalgal.

Los polielectrolitos catiónicos pueden ser menos eficientes en la floculación comparada con las sales de metales como el sulfato de aluminio. El estudio realizado por Molina et al., (2003) con *Chlorella* sp. a una concentración de biomasa de $0,05 \text{ kg.m}^{-3}$ y concentración de polímero de 1×10^5 para 1 kg.m^{-3} ha demostrado ausencia de floculación en la concentración del polímero hasta $0,2 \text{ kg.m}^{-3}$. Por otra parte, *Chlorella* sp. flocula con polímeros catiónicos pero no con polímeros aniónicos y los cambios de pH del rango 4 a 7 no afectan el comportamiento de la floculación. En este estudio se obtuvieron resultados similares donde la floculación no se ve influenciada por la cantidad del floculante independientemente de su origen. El ajuste de pH del medio de cultivo en rangos entre 9 y 12 permite obtener una máxima actividad de floculación.

La floculación de microalgas también se puede lograr cambiando el pH del medio de cultivo. En el estudio realizado por Molina et al., (2003), la floculación eficaz se logra cambiando el pH entre 11,8 y 12 sin necesidad de añadir otros floculantes recuperando del 80 al 95% de biomasa. En otros casos los valores extremos de pH pueden causar efectos adversos como la liberación del contenido intracelular microalgal. Al igual que este estudio, la floculación

biológica con taninos de harina de guarango con el ajuste de pH 11 fue efectiva.

La floculación se lleva a cabo en estanques cerrados con un pH alto debido al agotamiento de dióxido de carbono por la actividad fotosintética de las microalgas. Según González y Ballesteros (2013), en el caso de la microalga *Scenedesmus dimorphus*, la floculación se lleva a cabo con pH mayores a 8,5 mientras con *Chlorella* sp. el rango de pH óptimo es 12. Resultados similares se obtuvieron en este estudio, la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* flocula mejor con pH 11 al igual que con las cepas CMIE-A1-004 y CMIE-I4.2-022 del género *Chlorella* sp1 y sp2 respectivamente.

Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Las cepas de microalgas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1, CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. se adaptan rápidamente a los medios de cultivo alcanzando la máxima concentración celular a los 15 días después de la inoculación, lo que las convierte en microorganismos fácilmente producibles a escala piloto.

La recuperación en peso seco de la biomasa de las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1, CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. con sulfato de aluminio es mayor que la biomasa recuperada con taninos de harina de guarango.

Las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. reflejan valores de peso seco similares a la biomasa obtenida con sulfato de aluminio a pH 11 y 100 mL de taninos.

La cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. posee mayor capacidad de floculación.

Los volúmenes de taninos de harina de guarango empleados para la floculación biológica no fueron eficientes en la recuperación de biomasa de microalgas.

Las cepas CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 y CMIE-A3-003 del género *Scenedesmus* sp. floculan mejor con el pH 11.

El sulfato de aluminio es el floculante óptimo en la cosecha de biomasa microalgal a escala piloto. Sin embargo, los taninos de harina de guarango poseen propiedades coagulantes que les permite actuar como floculante biológico.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda para futuras investigaciones establecer un diseño experimental manejable tomando en cuenta que las fuentes de producción de agentes naturales dependen altamente de la disponibilidad de recursos.

Es importante tomar en cuenta el empleo de floclulantes biológicos para la recuperación biomasa microalgal debido a que existe una gran cantidad de extractos vegetales con capacidades coagulantes que pueden minimizar el impacto generado por los coagulantes químicos y reducir representativamente los costos de producción de biomasa microalgal.

Se recomienda implementar otras metodologías para la obtención de extractos de taninos de guarango para obtener una mayor concentración de los mismos y de esta manera aumentar la capacidad de floclulación de las células de los cultivos microalgales.

Igualmente, se podría emplear dosis de floclulante biológico en concentraciones más altas, así como también analizar y estudiar los tiempos óptimos de floclulación para lograr recuperar completamente la biomasa microalgal.

Se recomienda reducir las dosis de floclulantes químicos empleados para la floclulación de células de microalgas mediante la combinación con floclulantes biológicos o mediante el ajuste de pH que es un método eficaz y sencillo, que minimiza los cambios en el medio de cultivo causados por la adicción de floclulantes.

Referencias

- Abalde. (2014). Generalidades de las microalgas. Recuperado el 1 de enero del 2016 de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20804/Capitulo1.pdf>.
- Albarracín, I. (2007). *Microalgas: Potenciales productoras de biodiesel*. XV Simposio electrónico internacional. Recuperado el 4 de enero del 2016 de http://www.ceid.edu.ar/biblioteca/biocombustibles/isabel_albarracin_microalgas_potenciales_productoras.pdf.
- Álvarez, J. (2007). *Tanino: la revolución enológica mito o realidad*. Enología. Recuperado el 4 de febrero del 2016 de http://aebiberica.es/temas/taninos/info_taninos_jmalvarez.pdf.
- Bastidas, O. (2008). *Celeromics*. Recuperado el 16 de febrero del 2016 de <http://www.celeromics.com/es/Sobre-nosotros/La-empresa.php>.
- Bellinger, E. y Sigee, D. (2010). *Freshwater Algae: identification and use as bioindicators*. Gran Bretaña: Jonh Wiley & Sons, Ltd.
- Bischoff, H. y Bold, H. (1963). *Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*. Phycological studies. University of Texas Publications. Vol. 6318: 1-95.
- Brenan, M., Owende, P. (2010). *Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 557-577.
- Cassel, E. (2006). *Aplicaciones Industriales de los taninos vegetales*. Recuperado el 6 de enero del 2016 de http://www.feng.pucrs.br/laboratorios/taninos/informe_ejecutivo_reunion_arranque.pdf.
- Chisti, Y. (2008). *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. Trends in Biotechnology. Vol. 26 (3): 126-131.
- Contreras, C., Peña, J., Flores, L. y Cañizares, R. (2003). *Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas*. Inverciencia. Recuperado el 15 de febrero del 2016 de https://www.researchgate.net/profile/Julian_Pena-Castro/publication/237243095_AVANCES_EN_EL_DISEO_CONCEPT

UAL_DE_FOTOBIOREACTORES_PARA_EL_CULTIVO_DE_MICR
OALGAS/links/54a242a70cf257a636037e7f.pdf.

- Cuéllar, T., Alonso, R., Voltolina, D. y Morquecho, L. (2015). *Effectiveness of coagulants-flocculants for removing cells and toxins of *Gymnodinium catenatum**. *Aquaculture*. Vol 453: 188-193.
- De la Cruz, P. (2004). *Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa-caesalpinia tinctoria**. Recuperado el 15 de febrero del 2016 de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/733/584>.
- Eta, M., Saila, P. y Fakultatea, F. (2014). *Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano*. Recuperado el 8 de marzo del 2015 de <http://testak.org/microbiologia/crecimiento/cinetica.pdf>.
- Fernández, P. (2009). *Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797), alimentados con juveniles de *Artemia* enriquecidos con microalgas y otros suplementos*. España: Universidad de Santiago de Compostela.
- González, C. y Ballesteros, M. (2013). *Microalgae autoflocculation: An alternative to high energy consuming harvesting methods*. *Journal of Applied Phycology*. Vol. 25(4): 991-999.
- Guillard, R. (1973). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Inglaterra: Cambridge University Press.
- Guiry, M. y Guiry, G. (2016). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado el 4 de febrero de <http://www.algaebase.org>.
- Hernández, A. y Labbé, J. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios*. *Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 49 (2): 157-173.
- Hernandez, M., Travieso, J. y Rojas, J. (2000). *Efecto de la inmovilización de la microalga *Scenedesmus obliquus* en diferentes matrices para la captación de nutrientes*. Recuperado el 5 de marzo del 2016 de <http://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/192>.
- Hodaifa, G., Pacheco, R., Martínez, M. y Sánchez, S. (s.f.). *Aprovechamiento de apechines en la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus**.

Disminución del efecto inhibitor. Recuperado el 20 de febrero del 2016 de <http://www.expoliva.com/expoliva2005/symposium/comunicaciones/OLI-36.pdf>.

Jaramillo, J. (2011). *Evaluación tecno económica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas.* Recuperado el 25 de febrero de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6751/1/8110005.2012.pdf>.

Játiva, S. (2011). *Determinación del contenido de tanino procedente del guarango (Caesalpinia spinosa) y evaluación de su uso como fungicida.* Recuperado el 11 de febrero del 2016 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4372/1/CD-3971.pdf>.

Johnson, M. (2009). *Microalgal biodiesel production through a novel attached culture system and conversión parameters.* Recuperado el 15 de febrero del 2016 de <https://theses.lib.vt.edu/theses/available/etd-04292009-160208/unrestricted/ETD2.pdf>.

Lee, S., Kim, J., Kim, G., Kwon, B. Yoon y Oh, M. (2005). *Effects of havervesting method and growth stage on the flocculation of the green alga Botryococcus braunii.* Letters in Applied Microbiology. Vol. 27 (1): 14-18.

Malgas. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica.* Recuperado el 17 de enero del 2016 de <http://www.ast-ingenieria.com/guia-malgas-1>.

Mata, T. Martins, A. y Caetano, N. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications.* Renewable and sustainable energy reviews. Vol. 14 (1): 217-232.

Mendoza, H., De la Jara, A. y Portillo, E. (2011). *Planta piloto de cultivo de microalgas.* Recuperado el 4 de febrero del 2016 de <http://www.cienciacanaria.es/files/Planta-piloto-de-cultivo-de-microalgas.pdf>.

Mera, S. (2015). *Optimización del proceso de centrifugación para separar biomasa proveniente de microalgas.* Recuperado el 17 de febrero del 2016 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3790/1/T-UCE-0017-104.pdf>.

- Molina, E., Belarbi, E., Ación, F., Robles, A y Yusuf, C. (2003). *Recovery of microalgal biomass and metabolites process options and economics*. Biotechnology Advances. Vol. 20 (7-8): 491–515.
- Monthieu, C. y Ortiz, S. (2010). *Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biosiesel*. Recuperado el 25 de enero del 2015 de <http://www.iit.comillas.edu/pfc/resumenes/4c2200f964f8e.pdf>.
- Padilla, A. (2015). *Estudio del uso de floculantes naturales en biomasa algal producida en lagunas de alta carga mediante ensayos de sedimentación dinámica*. Recuperado el 1 de marzo de 2016 de http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/79150/TESINA_AITOR-PADILLA.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Palomino, A., Estrada, C. y López, J. (2010). *Microalgas: potencial para la producción de biodiesel*. Recuperado el 21 de enero del 2016 de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/855024/1/BID07.pdf>.
- Paredes, L. (2015). *Biocoagulación: tratamiento de aguas residuales de la industria de curtiembre*. Recuperado el 30 de enero del 2016 de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2504>.
- Peralta, Y., Pardo, Y., Canchila, D. y Kafarov, V. (2012). *Implementación de la metodología de síntesis y análisis de procesos a la etapa de cosecha de microalgas para la producción de biodiesel*. Recuperado el 19 de febrero del 2016 de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6778/2/140817.pdf>.
- Portilla, A. (2010). *Evaluación del rendimiento de un producto de aceite en cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio*. Recuperado el 17 de diciembre del 2016 de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/427>.

- Ramírez, H. y Jaramillo, J. (2015). *Agentes naturales como alternativa para el tratamiento del agua*. Recuperado el 21 de febrero del 2016 de <http://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/1303/1359>.
- Revelo, A. (2014). *Diseño de un proceso de remediación para aguas de lavado provenientes de la planta de jeans DAYANTEX, Pelileo Tunguragua*. Recuperado el 1 de junio del 2015 de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2271/1/UDLA-EC-TIAM-2014-02.pdf>.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M. y Stanier, R. (1979). *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. *Journal of General Microbiology*. Vol. 111: 1-61.
- Rodas, H., Rodríguez, H., Flores, G., Vidales, J., Aranda, J. y Luna, A. (2012). *Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de Chlorella vulgaris CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas*. Recuperado el 28 de febrero del 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/610/61024388015.pdf>.
- Romero, T. y Ferrán, C. (2011). *Floculación de Chlorella sp. con la utilización de quitosana*. Vol. 22 (1): 57-62.
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. Recuperado el 29 de febrero del 2016 de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>.
- Sacan, M. y Balcioglu, I. (2006). *A case study on algal response to raw and treated effluents from an aluminum plating plant and a pharmaceutical plant*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 64(2): 234-243.
- Salim, S., Bosma, R., Vermue, M. y Wijffels, R. (2011). *Harvesting of microalgae by biofloculation*. *Journal of Applied Phycology*. Vol 23 (5): 849-855.
- Serrano, L. (2012). *Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel*. Recuperado el 6 de enero del 2016 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/7825/1/299883.2012.pdf>.

- Stephens, E., Ross, I. Mussnug J., Wagner, L., Borowitzka, M. Posten, C. Kruse, O. y Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuels production systems. *Trends in plant science*. Vol 15 (10): 554-564.
- Unduman, N., Qi, Y., Danquah, M., Forde, G. y Hoadley, A. (2010). *Dewetering of microalga cultures: A major bottleneck to algae based fuels*. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. Vol.2 (1): 3-7.
- Valladares, F. (2014). *Diseño de una planta de extracción de aceite a partir de microalgas (Chlorella sp.)*. Recuperado el 5 de febrero del 2016 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8879/3/CD-5954.pdf>.
- Zitelli GC, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR (2006). *Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of Tetraselmis suecica in annular columns*. *Aquaculture* 26: 932–943.

ANEXOS

Anexo 1. Composición química del medio de cultivo Bold Basal.

Componente	Solución Stock (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad mL para 1 L
Macronutrientes	25.00	10 mL
NaNO ₃		
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	2.00	10 mL
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	7.50	10 mL
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL
NaCl	2.50	10 mL
Solución Alcalina EDTA	50.00	1 mL
EDTA		
KOH	31.00	
Solución Ácida Hierro	4.98	1 mL
FeSO ₄ . 7H ₂ O		
Solución Boro	11.42	1 ml
H ₃ BO ₃		
Solución metales traza	8.82	1 mL
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O		
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1.44	
MoO ₃	0.71	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1.57	
Co(NO ₃) ₂ . 6 H ₂ O	0.49	

Tomado de (Bischoff y Bold, 1963).

Anexo 2. Composición química del medio de cultivo BG-11.

Solución 1 (para 1 L) 10 mL/L

Reactivo	Cantidad (g)
NaNO ₃	150
MgSO ₄ .7 H ₂ O	7
CaCl ₂ .2 H ₂ O	3.6

Solución 2 (para 1 L) 10 mL/L

Reactivo	Cantidad (g)
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	4
EDTA	0.1
Na_2CO_3	2

Solución 3 (para 1 L) 10 mL/L

Reactivo	Cantidad (g)
Ácido cítrico	0.6
Citrato de sodio	0.6

Solución 4 (para 1 L) 1 mL/L

Reactivo	Cantidad (g)
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1.81
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.22
$NaMoO_4 \cdot 5 H_2O$	0.39
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.8
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	0.005
$FeCl_3$	0.22

Tomado de (Rippka et al., 1979).



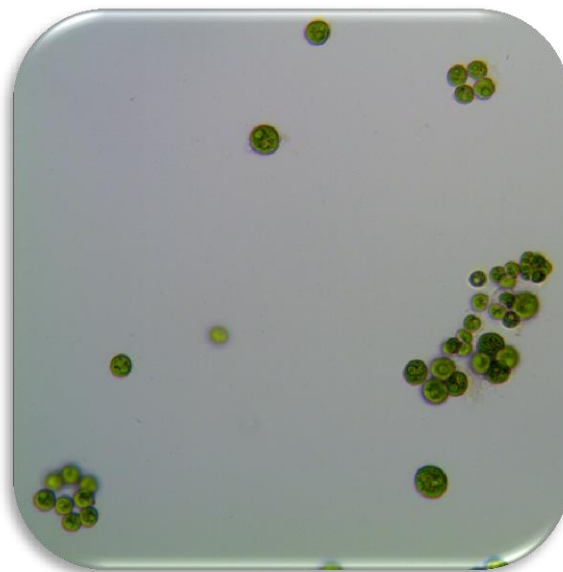
Anexo 3. Cultivo en cajas Petri con medio BG-11 y Bold Basal para la cepa CMIE-D6-001 del género *Chlorococcum* sp. obtenida de la Reserva Ecológica Cayambe Coca, Laguna Oyacachi.



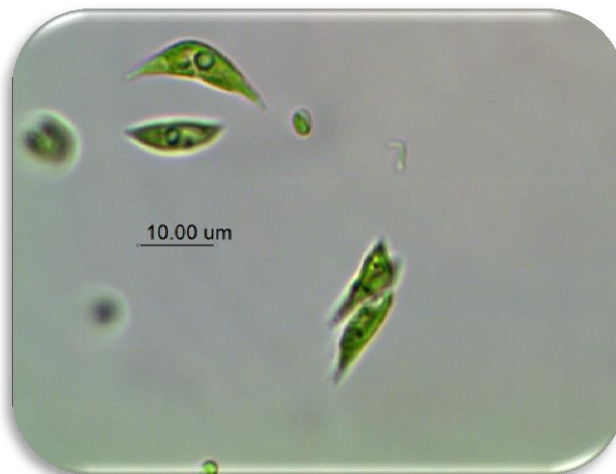
Anexo 4. Crecimiento en 15 mL de medio líquido de la cepa CMIE-IA.2-002 del género *Chlorella* sp.2 obtenida del Parque Nacional Llanganates, Laguna Chaloacochoa.



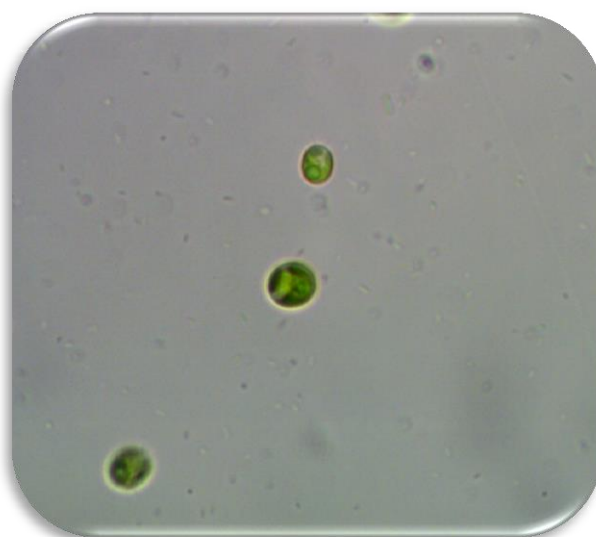
Anexo 5. Cultivo escalado a 200 mL de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. obtenida del Parque Nacional Llanganates, Laguna Chaloacocha y la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1 obtenida del Parque Nacional Cotopaxi, Laguna Santo Domingo.



Anexo 6. Foto microscópica (40x) de la cepa CMIE-A1-004 en medio BG-11.



Anexo 7. Foto microscópica (100x) de la cepa CMIE-A3-006 en medio BG-11.



Anexo 8. Foto microscópica (100x) de la cepa CMIE-I4.2-002 en medio BB.



Anexo 9. Escalado por duplicado de las tres cepas de microalgas seleccionadas: CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1, CMIE-I4.2-002 del género *Chlorella* sp.2 y CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp.



Anexo 10. Fotobiorreactores de 10 L inoculados con 130 mL de la cepa CMIE-A1-004 del género *Chlorella* sp.1.



Anexo 11. Extracción de los taninos de harina de guarango. Calentamiento de la solución al 50% de solvente alcohólico y agua destilada con 150 g de harina de guarango a 135°C, 210 RPM durante 30 minutos.



Anexo 12. Filtración al vacío de los extractos de taninos de harina de guarango.



Anexo 13. Floculación biológica de la cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. Izq. Cultivo con pH 5 antes de la floculación biológica. Der. Cultivo con pH 5 luego de adicionar 160 mL de floculante biológico.



Anexo 14. Cepa CMIE-A3-006 del género *Scenedesmus* sp. después de la floculación biológica (24 h). El medio de cultivo se encuentra en la superficie y la biomasa en el fondo del contenedor de plástico.



Anexo 15. Cepa CMIE-14.2-002 del género *Chlorella* sp. después de la floculación química con sulfato de aluminio (24h). El medio de cultivo se encuentra en la superficie y la biomasa en el fondo del contenedor de plástico.



Anexo 16. Secador solar donde se realizó el secado de la biomasa obtenido luego de la floculación biológica y química.