



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPARACIÓN DE LOS PROCESOS DE  
RECUPERACIÓN DE BIOMASA MICROALGAL Y  
BIOCOMPUESTOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA QUÍMICA  
POR MÉTODO DE TESIS**

**PRESENTA  
MARÍA JOSÉ ROMERO PINEDA**

**CDMX**

**2025**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

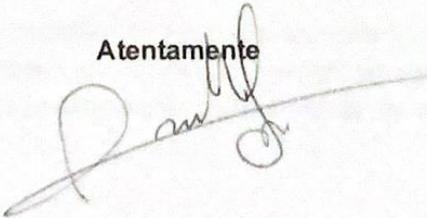
**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Comparación de los procesos de recuperación de biomasa microalgal y biocompuestos” que presenté para obtener el título/grado de Ingeniero Químico, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente



María José Romero Pineda No. De cuenta 314066833

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO  
VOCAL: Profesor: ZURISADAI PADILLA GOMEZ  
SECRETARIO: Profesor: JESSICA KARINA SUASTES RIVAS  
1er. SUPLENTE: Profesor: ANDRÉS ADOLFO VELASCO MEDINA  
2° SUPLENTE: Profesor: IVAN DARIO ROJAS MONTOYA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Instituto de Ingeniería UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**



Dra. Jessica Karina Suastes Rivas

**SUPERVISOR TÉCNICO:**



Dra. María Teresa Orta Ledesma

**SUSTENTANTE:**



María José Romero Pineda



**El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015**

**No. de Certificado CMX C SGC 285 2023, válido en el período del  
12 de octubre de 2023 al 11 de octubre de 2026**

La investigación que condujo a la conclusión de esta tesis recibió financiamiento del Instituto de Ingeniería UNAM. En el marco de la convocatoria 2023 – Grupos interdisciplinarios de investigación (GII-IIUNAM). Proyecto 3307: “Intensificación de los procesos para la obtención de biocompuestos a partir de agua residual” bajo la dirección de la Dra. María Teresa Orta Ledesma, Investigadora titular C, T.C. Coordinación de Ingeniería Ambiental. Subdirección Hidráulica y Ambiental.

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO .....	10
1.1 SITUACIÓN ACTUAL.....	11
1.2 BIOMASA MICROALGAL COMO FUENTE DE ENERGÍA.....	11
1.3 MICROALGAS, CARACTERÍSTICAS Y CRECIMIENTO .....	12
1.4 COSECHA MICROALGAL MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y LA BIOFLOCULACIÓN .....	16
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 ESTRATEGIA METODOLÓGICA .....	28
2.2 ETAPA 1.....	29
i. DETERMINACIÓN DE BIOMASA .....	29
ii. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS .....	30
iii. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS .....	30
2.3 ETAPA 2.....	31
i. DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN .....	31
2.3.1 BIOFLOCULACIÓN .....	33
2.4 ETAPA 3.....	34
i. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE BIOMASA.....	38
ii. CREACIÓN DE GRÁFICOS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA.....	39
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	40
3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS INICIALES.....	40
3.2 COSECHA DE BIOMASA POR MÉTODO DE JARRAS, PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE BIOMASA Y DE METABOLITOS, CREACIÓN DE GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	44
3.2.1 FeCl <sub>3</sub> y Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	45
3.2.2 QUITOSANO.....	53
3.2.3 BIOFLOCULACIÓN CON LEVADURA <i>Candida sp.</i> .....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de una célula eucarionte (Castillejos Salazar, 2010).....	13
Figura 2 Diagrama de flujo que muestra las fases comunes del proceso de biorrefinería y los productos derivados de la biomasa de algas (Narayanan, 2024) .....	15
Figura 3 Diagrama esquemático del sistema de reactor por lotes (S. Gao et al., 2010).....	19
Figura 4 Mecanismo del sistema de cultivo binario para inducir diversas funciones en el procesamiento de biomasa de microalgas (Rashid et al., 2018) .....	22
Figura 5. Estrategia metodológica.....	28
Figura 6. Tratamiento de la levadura <i>Candida sp.</i> .....	34
Figura 7 Cinética de crecimiento microalgal en términos de número de células ....	41
Figura 8 Cinética de crecimiento microalgal en términos de gramos de biomasa por litro de mezcla.....	42
Figura 9. Fotobiorreactores de 10L con aireación y luz led.....	43
Figura 10. a) Volumen recuperado de biomasa sedimentada de las jarras con FeCl <sub>3</sub> . b) Determinación de sólidos suspendidos totales. c) Determinación de proteínas. d) Determinación de carbohidratos.....	44
Figura 11. Equipo de jarras con biomasa microalgal y FeCl <sub>3</sub> .....	45
Figura 12. Equipo de jarras con biomasa microalgal más Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	45
Figura 13. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando FeCl <sub>3</sub> para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando FeCl <sub>3</sub> para el porcentaje de recuperación de carbohidratos.	50
Figura 14. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> para el porcentaje de recuperación de carbohidratos. c) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> para el porcentaje de recuperación de proteínas.....	52
Figura 15. Equipo de jarras con biomasa microalgal más quitosano.....	53
Figura 16. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de carbohidratos. c) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de proteínas.....	56
Figura 17. Equipo de jarras con biomasa microalgal más <i>Candida sp.</i> .....	57
Figura 18. Fotobiorreactores con co-cultivo (microalga-levadura-glucosa-agua residual) después de 24hrs.....	58
Figura 19. a) Efecto de la velocidad de floculación a 20rpm, concentración de glucosa y volumen de levadura para el porcentaje de recuperación de biomasa con <i>Candida sp.</i> b) Efecto de la concentración de glucosa a 10g L <sup>-1</sup> , velocidad de floculación y volumen de levadura para el porcentaje de recuperación de biomasa con <i>Candida sp.</i> c) Efecto del volumen de levadura a 10mL, velocidad de floculación y concentración de glucosa para el porcentaje de recuperación de biomasa con <i>Candida sp.</i> .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparativo de cepas y sus tamaños.....	18
Tabla 2. Condiciones de operación del proceso de coagulación – floculación y eficiencias reportadas para diferentes compuestos químicos.....	25
Tabla 3. Matriz para FeCl <sub>3</sub> y Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .....	31
Tabla 4. Matriz para quitosano.....	32
Tabla 5. Matriz para <i>Candida sp.</i> ....	32
Tabla 6. Cuadro de 15 experimentaciones a diferentes combinaciones de parámetros para FeCl <sub>3</sub> , Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , quitosano y <i>Candida sp.</i> ....	36
Tabla 7 <i>Parámetros iniciales de la biomasa después de 15 días de cinética de crecimiento</i> .....	43
Tabla 8. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con FeCl <sub>3</sub> y Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . ....	47
Tabla 9. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con quitosano. ....	54
Tabla 10. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con <i>Candida sp.</i> ....	59
Tabla 11 Cuadro comparativo de los resultados obtenidos experimentalmente como los obtenidos con el software Design-Expert. ....	65

## INTRODUCCIÓN

Debido al crecimiento poblacional a nivel mundial y al aumento en el consumo de energía convencional, se han tenido como resultados un impacto negativo a la sociedad y al ambiente, como lo son el cambio climático y el calentamiento global (Hadiyanto et al., 2023). Por esta razón, organizaciones como la ONU han destinado una fecha límite y una agenda con objetivos de desarrollo sostenible para frenar esta problemática.

Por lo tanto, la tendencia a nivel mundial sigue hacia una transición a una bioeconomía con el uso de energías renovables como la biomasa, dejando atrás el uso de combustibles fósiles como fuente de energía principal y materia prima para los diferentes sectores.

Un tipo de biomasa alternativo son las microalgas, los cuales son microorganismos que han atraído la atención en los últimos años debido a que son consideradas como una fuente de combustible alternativo, derivado del procesamiento de los compuestos producidos en el cultivo de estos microorganismos (Chatsungnoen et al., 2016). Sin embargo, para el procesamiento de la biomasa se ha reportado la etapa de cosecha como el cuello de botella. Uno de los retos más grandes en el campo de la biotecnología microalgal, es incrementar la eficiencia del proceso de cosechado a bajos niveles de energía (Bleeke et al., 2015).

El proceso de cosecha se refiere a la separación de la biomasa del medio de cultivo. Algunas de las razones para su difícil recuperación se deben al pequeño tamaño de las microalgas y los grandes volúmenes de agua donde se encuentran. Resultando en un gran consumo energético para su recuperación (Orta Ledesma et al., 2017).

Por esta razón, los procesos de separación y cosecha de las microalgas son costosos. Algunos de ellos incluyen el proceso de centrifugación, diferentes tipos de filtración, métodos eléctricos como la electrocoagulación y la ósmosis entre otros (Chatsungnoen et al., 2016). Uno de los métodos menos costosos y efectivos es la coagulación-floculación seguida de sedimentación por gravedad, en dicho proceso se forman flóculos que son de fácil remoción.

Existen diversos factores que intervienen en la efectividad del proceso de recolección de biomasa por coagulación-floculación. Uno de estos factores es el pH, el cual llega a mejorar el porcentaje de eficiencia de la cosecha (Das et al., 2016). La concentración y naturaleza del coagulante-floculante empleado es otro factor que interviene en el proceso, obteniéndose porcentajes de eficiencia de hasta 97.9% (Reyes et al., 2014).

Algunos coagulantes-floculantes provenientes de sales metálicas llegan a ser muy efectivos; sin embargo, la alta concentración de metales encontrados en las microalgas después de la cosecha impide ciertas aplicaciones para la biomasa. Mientras que los polímeros con alta carga catiónica como por ejemplo CFL217, CFL229 y CFL25 pertenecientes al grupo de poliDADMACS (cloruro de dialildimetilamonio); son considerados los más efectivos para este tipo de proceso (Bleeke et al., 2015).

También existen otros métodos como la biofloculación donde se utiliza un agente biológico como coagulante-floculante. Algunos ejemplos son hongos o levaduras. El proceso de biofloculación se lleva a cabo por medio de la absorción de cargas. Dado que la pared celular de las microalgas tiene cargas negativas, gracias a los grupos funcionales carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) y amino ( $-\text{NH}_2$ ); al añadirse un floculante de carga opuesta al cultivo, las fuerzas iónicas del medio y la concentración de contraiones aumentan, pero las cargas de las partículas y el potencial zeta disminuyen, lo que da como resultado frecuencias de colisión más altas entre las células de microalgas y una mayor eficiencia de colisión (Yin et al., 2021). A su vez los agentes biológicos atraen los iones con carga de negativa lo que lleva a neutralizar estas cargas. Así es como se explica el contacto levadura-microalga, hongo-microalga o bacteria-microalga; generando finalmente la formación de flocs de fácil remoción (Hadiyanto et al., 2023).

Por lo tanto, esta tesis pretende generar un diseño experimental mediante el uso de superficies de respuesta para identificar las mejores condiciones de cosecha, en el proceso de coagulación-floculación por el método de jarras con diferentes compuestos químicos; así como establecer un proceso de biofloculación. Y finalmente que a través de la variación de los parámetros (dosis, pH, velocidad de agitación y tiempo de sedimentación) se recupere la mayor concentración de biomasa que pueda tener un efecto positivo en los biocompuestos; aquellos compuestos químicos presentes en los seres vivos tales como lípidos, carbohidratos, proteínas, así como compuestos de valor agregado (Pereira et al., 2024)

# CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 SITUACIÓN ACTUAL

Actualmente el uso de los combustibles fósiles ha sido extenso con la finalidad de cubrir las necesidades energéticas a nivel global. Sin embargo, su sobre demanda ha conllevado al declive de estos, generando consecuencias negativas como el desbalance del medio ambiente tal como la contaminación por la emisión de gases de efecto invernadero (SO<sub>x</sub> (SO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>), NO<sub>x</sub> (NO, NO<sub>2</sub>), N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> O<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>), los cuales son los principales causantes del cambio climático. Esta problemática a nivel mundial demanda satisfacer las necesidades energéticas utilizando otras fuentes fuera de las convencionales, las cuales cumplan a su vez con los estándares ambientales requeridos para ser verdes y amigables con el planeta (Rashid et al., 2018).

Debido a la quema de combustibles fósiles, una gran cantidad de dióxido de carbono CO<sub>2</sub> es emitido en la atmósfera. Se señala que los combustibles fósiles han sido consumidos en una tasa de los 0.001 megabytes (MB) por segundo, lo que anualmente resulta en 29 Gigatoneladas (GT) de CO<sub>2</sub> y solo el 40% logra ser absorbido por procesos naturales. Este fenómeno contribuye al calentamiento global y destaca la importancia de abordar las emisiones de gases de efecto invernadero (Li et al., 2020). Por tales razones, el uso de energías renovables ha venido en aumento.

## 1.2 BIOMASA MICROALGAL COMO FUENTE DE ENERGÍA

Dentro de los diferentes tipos de energías renovables se encuentra la biomasa de las microalgas, las cuales han sido reconocidas en los últimos años como una promesa para la generación de biocombustibles de tercera generación; denominados así a aquellos biocombustibles que se producen a partir de algas (Wan et al., 2015). Las microalgas son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> y transformarlo por medio de la fotosíntesis en moléculas útiles; lo cual es atractivo para la producción de

biocombustibles y biocompuestos. Una de sus grandes ventajas es la producción de biomasa a partir de su fuente de carbono; la cuál es utilizada para el tratamiento de aguas residuales. (Nitsos et al., 2020).

Por tal motivo la biomasa microalgal tiene ventajas sobre los combustibles fósiles; ya que las microalgas son consideradas neutras en emisión de carbono o también conocidas como cero en carbono.

Otra de las ventajas en comparación con cultivos energéticos es que las microalgas no utilizan de tierras cultivables por lo que el rendimiento es mayor por unidad de área. Además, de ofrecer una alta rotación de cultivos y de requerir menos agua para su crecimiento (Zhou et al., 2013). Es importante también mencionar que las áreas dependen mucho del tipo de cultivación que se elija; por ejemplo, si es en sistema abierto usualmente para gran escala sabemos que se necesitará un área mayor a si es un sistema cerrado como en fotobiorreactores, por ejemplo. Y dado que los fotobiorreactores pueden ser colocados de forma vertical; podremos tener una mayor producción que si cultiváramos algo de manera horizontal como en la tierra (Yin et al., 2020).

Así mismo, cuentan con una alta capacidad para florecer en diversas condiciones ambientales, lo que las hace fácilmente disponibles y el cultivarlas no representa un gasto mayor debido a que también pueden crecer en aguas residuales (Mohd Yunus et al., 2017; Rashid et al., 2018).

### 1.3 MICROALGAS, CARACTERÍSTICAS Y CRECIMIENTO

Las microalgas son células eucarióticas, fotosintéticas; esto quiere decir que tienen un núcleo y organelos que son cubiertos por una membrana. Para su desarrollo necesitan de luz (solar o artificial), una fuente de carbono como el CO<sub>2</sub> y nutrientes como el fósforo, nitrógeno, potasio, magnesio y algunos metales que actúan como cofactores de enzimas los cuales son importantes para el metabolismo de las microalgas. Esto indica que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica.

A continuación en la Figura 1 se muestra la estructura de lo que compone a una célula eucariota. Donde corroboramos que los eucariontes contienen su material genético encerrado en una envoltura llamada membrana

## Célula eucarionte

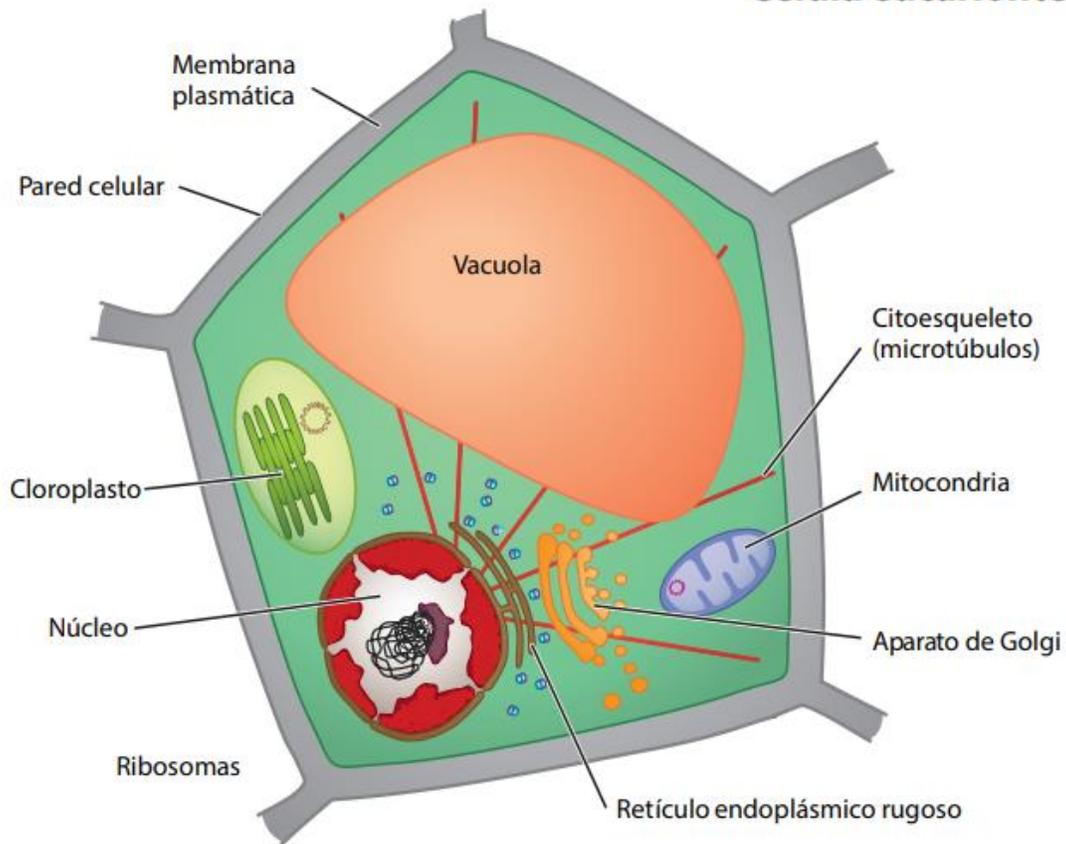


Figura 1 Diagrama de una célula eucarionte (Castillejos Salazar, 2010)

Castillejos Salazar, 2010 menciona que los eucariontes pertenecen al dominio Eukarya que incluye a los reinos de los hongos, plantas y animales. La célula eucarionte se compone de más compartimentos como organelos, el núcleo, la mitocondria, el cloroplasto, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas. Existe una hipótesis sobre el origen de los eucariontes que sugiere que las mitocondrias y cloroplastos provienen de la fusión de diversas bacterias. Un tipo de bacteria aerobia habría ingresado en un eucarionte primitivo, que ya contaba con un núcleo y un sistema rudimentario de endomembranas. Estas bacterias aeróbicas, al establecerse en el interior del eucarionte, le proporcionaban energía a cambio de alojamiento y nutrientes. Y a su vez un grupo de procariontes fotosintetizadores desarrolló la capacidad de aprovechar la energía solar y utilizar una fuente de carbono inorgánica. Se cree que estos procariontes fotoautótrofos

fueron los antecesores de los cloroplastos, los organelos responsables de la fotosíntesis en las algas unicelulares y en las plantas. Y es por ello que las microalgas suelen requerir estas fuentes de carbono, así como luz (Castillejos Salazar, 2010)

Una de las diferencias más puntuales entre un proceso autotrófico y heterotrófico de las microalgas se encuentra en las fuentes de carbono y energía que las microalgas utilizan para su crecimiento. La microalga autotrófica toma como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> que se encuentra en la atmósfera y la luz del día como su principal fuente de energía mientras que la heterotrófica utiliza alguna fuente orgánica como la glucosa u otra fuente de carbono para satisfacer su necesidad energética (Zhou et al., 2013).

Así mismo Zhou et al., 2013 hace hincapié en la capacidad de bioabsorción que las microalgas tienen sobre una alta variedad de iones metálicos. Por lo que las microalgas además de tener potencial en la producción de biocombustibles se han utilizado para la eliminación de metales pesados durante décadas, ya sea por acumulación o absorción.

De hecho, la biomasa de microalgas ha sido reconocida como una materia prima competente para la extracción de diversos productos valiosos, como triacilglicerol (TAG) para la producción de biodiésel, y carbohidratos para la producción de (etanol y butanol), ácidos grasos poliinsaturados (EPA y DHA), y pigmentos (luteína y clorofila), otros metabolitos como las proteínas y aditivos alimentarios, así como otros productos a través de la biorrefinería. (Wan et al., 2015).

A lo largo del tiempo, las refinerías de petróleo han sido pioneras en el concepto de biorrefinería, que no solo produce combustibles, sino también otros productos útiles para la industria química. En los últimos años, se ha descubierto que la biomasa microalgal puede usarse antes de convertirse en biocombustible para producir macromoléculas como lípidos, ácidos grasos omega-3 y aminoácidos esenciales. En la siguiente Figura 2 observamos de manera muy general los procesos y las fases de una biorrefinería de algas; donde se llegan a generar productos valiosos como vitaminas, minerales, pigmentos y los biocombustibles de los que ya hemos hablado.

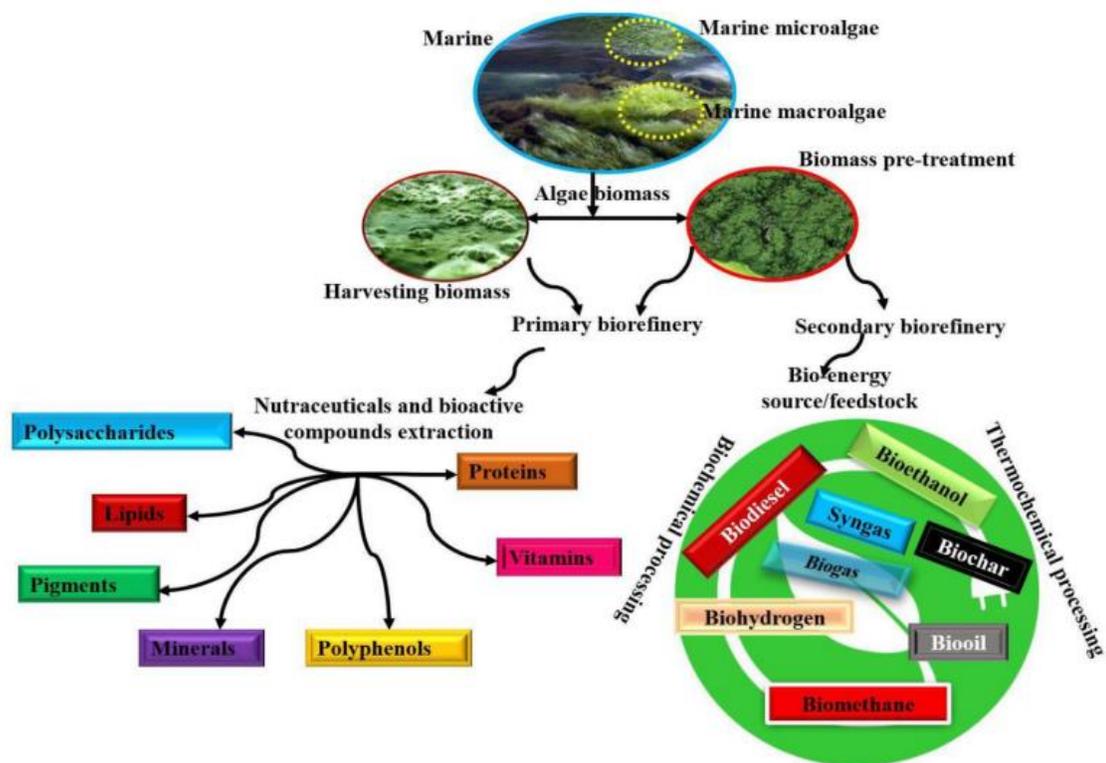


Figura 2 Diagrama de flujo que muestra las fases comunes del proceso de biorrefinería y los productos derivados de la biomasa de algas (Narayanan, 2024)

Sin embargo, (Narayanan, 2024) nos dice que desarrollar una biorrefinería de algas que sea sostenible y rentable representa un gran desafío, ya que, para transformar esta biomasa en biocombustibles, se emplean procesos térmicos como combustión, licuefacción hidrotermal, gasificación y pirólisis, donde la producción varía según el tipo de microalgas debido a sus diferentes contenidos lipídicos.

Continuando con el proceso de crecimiento de las microalgas heterotróficas, hasta el momento se conoce que se produce una importante cantidad de CO<sub>2</sub> durante el metabolismo oxidativo de la microalga; sin embargo, este gas invernadero puede ser utilizado más adelante en la cultivación en régimen autotrófico (Zhou et al., 2013).

El cultivo de algunas cepas microalgales como *Chlorella vulgaris* han demostrado ser cepas con alto potencial de crecimiento tanto heterotrófico como autotrófico. Para el cultivo de microalgas se han implementado diferentes medios como el BG-

11 (Zhou et al., 2013). Existen algunas otras cepas como *Auxenochlorella protothecoides* que de igual forma puede ser cultivada primero de manera heterotrófica en aguas residuales y luego de manera autotrófica con suplementación de CO<sub>2</sub> como nos menciona Zhou et al., 2012.

El crecimiento de la biomasa microalgal depende de varios factores; tales como fuente de nutrientes, iluminación, así como el tiempo de crecimiento. Respecto a este último parámetro, varios artículos reportan el uso de biomasa microalgal en fase estacionaria como un tiempo óptimo para el proceso de cosechado (Gao et al., 2020). Dicho lo anterior, en diferentes investigaciones se han probado diferentes combinaciones de estos parámetros para mejorar la producción de biomasa. Sin embargo, esto no asegura su cosecha.

Para la producción de biomasa microalgal se han reportado estudios de cultivos de biomasa microalgal en estanques abiertos a gran escala, dichos sistemas han sido utilizados en su mayoría para la comercialización y producción de suplementos alimenticios y reactivos con algún valor añadido. Por otro lado, se ha reportado que en sistemas cerrados o fotobiorreactores se puede alcanzar una mayor producción de biomasa, obteniéndose una mayor concentración debido al mejor control de los parámetros en el cultivo. Sin embargo, el costo de operación de estos sistemas también es alto.

En ambos sistemas, se ha encontrado un limitante, referente a la difícil recuperación de biomasa (cosecha de biomasa), lo cual ha implicado el alto costo energético y por tanto económico para la producción de biocombustibles (Zhang & Hu, 2012).

#### 1.4 COSECHA MICROALGAL MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y LA BIOFLOCULACIÓN

La cosecha de microalgas se comprende como la separación de las células del medio de cultivo, siendo estas la materia prima que posteriormente será tratada para obtención de biocompuestos. Este proceso comienza por la concentración de biomasa microalgal seguido de su deshidratación.

La cosecha de biomasa microalgal simboliza del 20-30% del total del costo de producción. La principal dificultad se debe a la baja concentración y diminuto tamaño que presentan las células microalgales (Wan et al., 2013). Dependiendo del tipo de especie pueden variar entre 1 y 70µm y con una baja densidad celular usualmente de 0.5 y 5g/L (Zhou et al., 2013).

Así mismo, la carga superficial negativa que tienen las microalgas, presenta desafíos adicionales en el proceso de recolección; señalando un cuello de botella importante para el proceso (Nitsos et al., 2020).

Algunas tecnologías que han sido aplicadas para este paso en específico de la recuperación de biomasa microalgal han sido métodos mecánicos como la filtración, flotación, centrifugación y floculación (Wan et al., 2013). Así mismo, existen otros métodos tales como los eléctricos, químicos y biológicos. En este sentido, una de las grandes motivaciones actuales para mejorar este proceso de producción de biomasa microalgal es encontrar el método más eficiente de cosecha. Por esta razón, se evalúan diferentes parámetros para poder comparar la efectividad de los diferentes métodos que existen. Algunos de estos parámetros importantes son la eficiencia y la demanda energética. A continuación, se describen algunos de ellos.

#### **a. Mecánicos**

El distintivo de la cosecha basada en este tipo de métodos radica en separar la biomasa de algas del medio de cultivo mediante un trabajo mecánico, como la fuerza de gravedad (Ghazvini et al., 2022).

La flotación es uno de los procesos de cosecha más utilizados y comúnmente integrados al diseño de fotobiorreactores para la cultivación y cosechado simultáneo de microalgas; sin embargo, la viabilidad económica y la ejecución técnica representan importantes desventajas en este método.

Mientras tanto el método de cosecha por filtración sólo considera biomasa de cultivos cuya microalga sea de gran tamaño lo cual representa un problema si tomamos en cuenta que la unidad de tamaño microalgal se encuentra en µm.

La centrifugación comparada con los procesos de flotación, floculación y filtración; es uno de los métodos más eficientes pues reporta resultados de eficiencia de más de 95% para la separación de biomasa y es utilizado en cultivos microalgales piloto o a nivel laboratorio. Sin embargo, tiene un alto costo operacional y un gasto energético que complica su aplicación en cultivos a gran escala (Zhou et al., 2013).

Los métodos de separación convencionales y económicos, como la filtración y la sedimentación gravitacional, se aplican ampliamente en instalaciones de tratamiento de aguas residuales para cosechar microalgas relativamente grandes (>70  $\mu\text{m}$ ) como *Coelastrum* y *Spirulina*. Sin embargo, no pueden utilizarse para cosechar especies de algas que se acercan a dimensiones bacterianas (<30  $\mu\text{m}$ ) como *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Chlorella*. En la siguiente Tabla 1 se presentan algunas cepas y su tamaño.

**Tabla 1 Comparativo de cepas y sus tamaños.**

Cepa	Tamaño	Referencia
Scenedesmus sp.	5 – 7 $\mu\text{m}$	(Nitsos et al., 2020)
Chlorella sp.	2 – 15 $\mu\text{m}$	(Sanyano et al., 2013)
Clorella vulgaris.	2 – 20 $\mu\text{m}$	(Ma et al., 2023)
Arthrospira platensis	8 $\mu\text{m}$	(Nitsos et al., 2020)
Isochrysis galbana	5 – 6 $\mu\text{m}$	(Nitsos et al., 2020)
Dunaliella salina	5 – 25 $\mu\text{m}$	(Nitsos et al., 2020)

Por otro lado, la centrifugación se utiliza para recuperar células de algas de pequeño tamaño; sin embargo, su aplicación está limitada a cultivos de algas destinados a metabolitos de alto valor debido a las demandas intensivas de energía y los requisitos elevados de mantenimiento del equipo (Zhang & Hu, 2012). Por ejemplo, (Tripathi et al., 2024) expone algunos costos de cosecha de algas según el método utilizado; por ejemplo, centrifugación (US\$12,500/ha), filtración (US\$9884/ha), sedimentación (US\$7000/ha) y floculación (US\$2000/ha). Al mismo tiempo en cuanto al consumo energético, la centrifugación y filtración requieren de 3.29 kWh/m<sup>3</sup> y entre 0.5-5.9 kWh/m<sup>3</sup>, respectivamente, mientras que la floculación consume casi nula energía.

#### **b. Eléctricos**

Dentro de estos existen la electrocoagulación-floculación, la floculación se induce mediante la electrólisis de iones metálicos provenientes de ánodos. Estos iones, como  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$ , liberados por electrodos de aluminio y hierro, provocan que las células de microalgas cargadas negativamente se desplacen hacia el ánodo, perdiendo su carga y formando agregados o flóculos que pueden ser fácilmente eliminados. Estos iones se hidrolizan espontáneamente para formar hidróxidos o compuestos polihidróxidos, que actúan como superficies activas para adsorber las células de microalgas. Factores como la densidad de corriente, la fuerza iónica, el pH y la temperatura del medio influyen en la eficiencia de recuperación de las microalgas (Li et al., 2020b). A continuación en la Figura 3 se presenta un diagrama donde se observa el proceso llevado a cabo en un reactor batch.

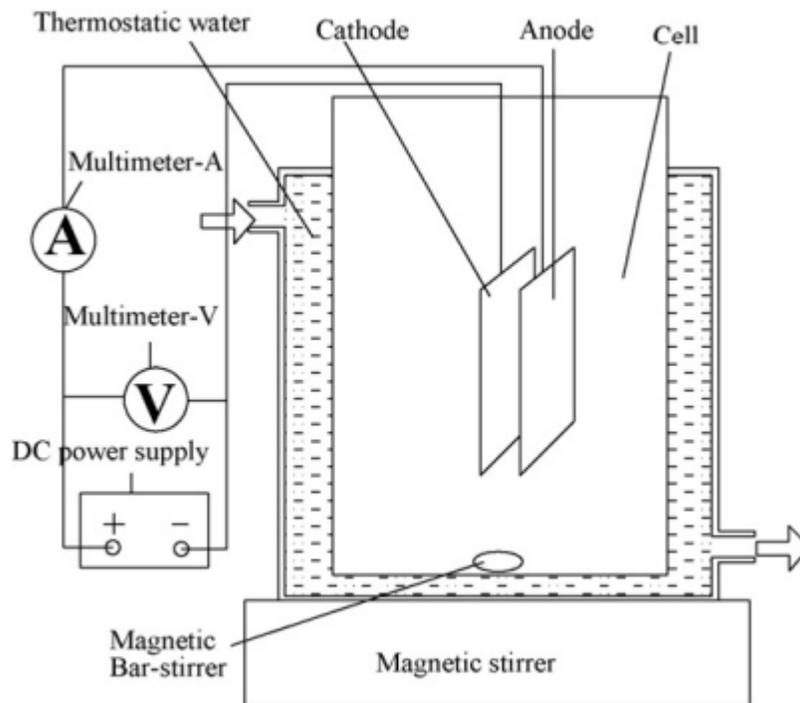


Figura 3 Diagrama esquemático del sistema de reactor por lotes (S. Gao et al., 2010)

### c. Químico (coagulación-floculación)

La atracción mutua entre microalgas y células filamentosas puede atribuirse a diversas razones, siendo la carga superficial la principal. La mayoría de las células de microalgas tienen cargas negativas en sus superficies celulares, lo que les

permite formar suspensiones estables en el agua de estanques de cultivo. Por lo tanto, se consideran bio-coloides hidrofílicos (Zhang & Hu, 2012).

La floculación se ha llegado a realizar con la ayuda de polímeros químicos/sintéticos como acrilamida y poliuretano antes de la cosecha. El uso de estos polímeros disminuye significativamente el valor de la tecnología de floculación debido a problemas tóxicos, costosos, corrosivos y de seguridad ambiental asociados con estos polímeros (Zhou et al., 2013).

La floculación suele ser sensible al pH, y al mismo tiempo, los residuos de floculantes químicos pueden presentar un riesgo de contaminación para la calidad del producto a separarse (Wan et al., 2013).

El método actual de floculación para cosechar microalgas implica agregar floculantes, que contienen iones metálicos como sales de aluminio y hierro, o polímeros orgánicos como el quitosano, para lograr neutralización de cargas y formación de puentes poliméricos. Posteriormente, se permite que las células se agreguen para formar flóculos (Wan et al., 2013).

El concepto básico de la floculación de microalgas implica la desestabilización de cargas del cultivo mediante la inducción de contra-iones y la neutralización de cargas. La neutralización de cargas disminuye el potencial zeta y aumenta las fuerzas atractivas de Van Der Waals, lo que resulta en la agregación celular (*Rashid et al., 2018*).

La floculación se utiliza para cosechar células microalgales de tamaño pequeño y constituye un paso preparatorio para agregar las células de microalgas y aumentar el tamaño de las partículas. Esto facilita la aplicación de otros métodos de cosecha, como la filtración, centrifugación o sedimentación por gravedad. Sin embargo, las reacciones químicas son altamente sensibles al pH y las altas dosis de floculantes pueden dejar residuos en el efluente tratado (Zhang & Hu, 2012).

#### **d. Biológicos**

La auto-floculación como un concepto fue introducido inicialmente por Golueke, C. G., & Oswald, W. J. (1970). Su investigación se centró en la floculación de microalgas inducida por la captación de carbono fotosintético y un aumento en el pH.

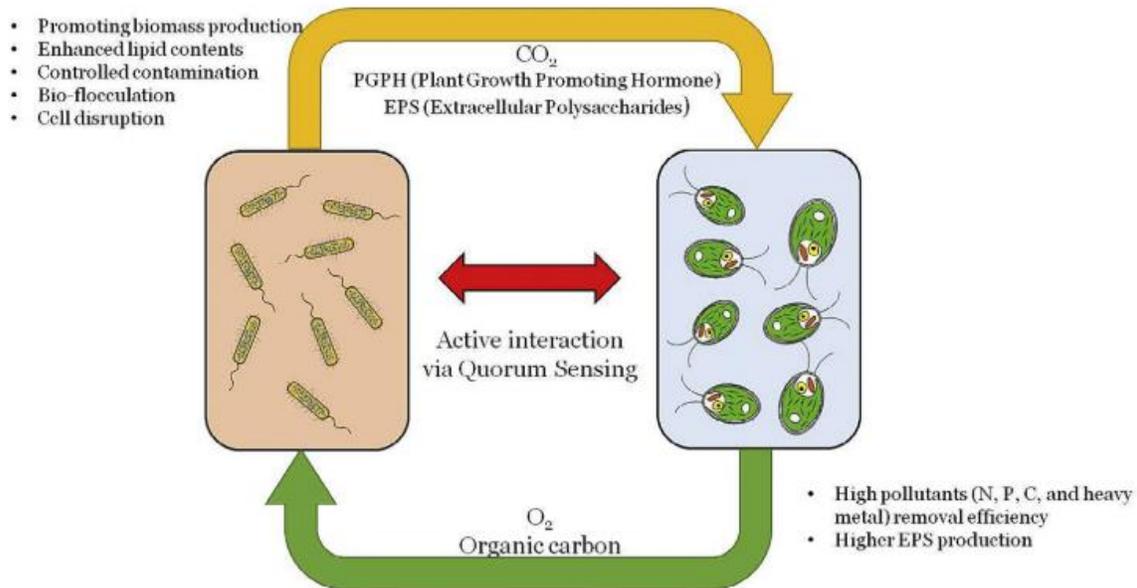
Recientemente se han realizado estudios que reportan relaciones simbióticas existentes de algunas especies de algas con otros microorganismos como hongos, en muchos casos levaduras. En un consorcio microalgal, coexisten diferentes microorganismos como bacterias, hongos, al igual que microalgas heterotróficas; los cuales desarrollan una relación sinérgica que les permite beneficiarse entre ellos mismos (Rashid et al., 2018). En esta simbiosis las algas aún son capaces de realizar la fotosíntesis para fijar el dióxido de carbono y producir compuestos orgánicos mientras a su vez se estimula el crecimiento de los hongos. Algunos de estos microorganismos, tienen la capacidad de inmovilizar o encapsular sólidos en lodos activados mediante biofloculación-coagulación fortaleciendo la estructura de floculación.

La biofloculación es un fenómeno que provoca la floculación en el sistema de cultivo binario de microorganismos. En el sistema de cultura binaria, las microalgas y las bacterias mantienen una relación simbiótica, que varía según las especies. Las microalgas son fotoautótrofas, produciendo oxígeno y carbono orgánico, mientras que las bacterias asimilan este carbono de manera heterotrófica y también se alimentan de células muertas de microalgas. Este fenómeno también se puede observar al cultivar microalgas con hongos. Aunque ofrece ventajas sobre los sistemas de cultivo de microalgas únicas, también presenta desafíos y por el momento no se puede asegurar que todas las especies de hongos sean capaces de lograr este proceso de biofloculación (Rashid et al., 2018).

En un sistema de cultivo binario, la floculación puede ocurrir de dos maneras: (1) basada en la estructura celular y (2) basada en los polisacáridos extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés). Los microorganismos que crecen en un cultivo binario pueden tener propiedades en la superficie que les permiten adsorberse físicamente entre sí y formar flóculos. Por otro lado, en la floculación basada en

EPS, un microorganismo flocula al otro al producir una cantidad excesiva de EPS. Este proceso se ve un poco representado en la Figura 4 a continuación.

*N. Rashid et al. / Chemosphere 194 (2018) 67–75*



**Figura 4 Mecanismo del sistema de cultivo binario para inducir diversas funciones en el procesamiento de biomasa de microalgas** (Rashid et al., 2018)

La biofloculación entre microalgas y hongos se atribuye principalmente a la producción de hifas cargadas positivamente por parte de los hongos. Estas hifas interactúan naturalmente con las microalgas cargadas negativamente para formar flóculos. Este proceso ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales de cosecha de microalgas, como la reducción del consumo de energía, que puede disminuir de 13.5 MJ a 12 MJ/kg de biomasa al sustituir la centrifugación por biofloculación. El conocimiento existente de este proceso se basa principalmente en conceptos teóricos, y hay una brecha considerable en la investigación para explorar el proceso de biofloculación. La manipulación de las condiciones de cultivo en cultivos binarios, la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) y la interacción célula a célula pueden contribuir a mejorar la comprensión de la biofloculación (Rashid et al., 2018).

La floculación de levaduras se ha utilizado como un método eficiente y sencillo para la recuperación de biomasa de levaduras. Aparentemente, esta estrategia es más económicamente competitiva y respetuosa con el medio ambiente. Sin embargo, la

floculación célula-célula para la recuperación de biomasa de microalgas ha sido muy poco estudiada (Wan et al., 2013).

En consorcios de microalgas-hongos, las microalgas suministran oxígeno a los hongos mediante la fotosíntesis, y las levaduras proporcionan carbono inorgánico para promover el crecimiento de las microalgas. Las microalgas también generan oxígeno en exceso, el cual es consumido por los hongos, facilitando así el crecimiento óptimo de las microalgas. El cultivo binario de microalgas-levaduras tiene un alto potencial para la eliminación de contaminantes en comparación con el sistema uni-algal (Rashid et al., 2018).

En el proceso de pelletización fúngica, se han categorizado dos tipos de mecanismos. El primero es el mecanismo coagulativo, donde las esporas se coagulan en las etapas iniciales del cultivo y se desarrollan en gránulos a través de la interconexión de sus hifas. En el segundo mecanismo no coagulativo, las esporas germinan formando hifas que posteriormente se entrelazan para crear gránulos (Zhang & Hu, 2012).

En un estudio realizado. Se reportó que la concentración inicial de glucosa como fuente de alimento para las levaduras, afecta en la formación de pellets o flocs (Liao et al., 2007). A concentraciones más altas de glucosa se acelera la formación de flocs aunque se reduce el pH; lo que a su vez tiene un efecto en la pelletización. Algunos de los mejores parámetros que se han encontrado para favorecer la separación de biomasa microalgal por medio de la biofloculación son una concentración de glucosa 20g/L y pH entre 4 y 5. Otro parámetro importante es el de agitación, se ha demostrado que los pellets hongo-alga, levadura-alga no logran formarse sin haber agitación de por medio (Zhou et al., 2013).

Algunos estudios reportan un incremento en la formación de pellets al aumentar la velocidad de mezcla arriba de 140rpm y disminuirla después de 1hr. Lo que representa un gasto energético alto.

Otro factor que contribuye a la formación de pellets fúngico-algales son las cargas superficiales de las células microalgales y fúngicas. De igual forma el que las

proteínas hidrofóbicas en la superficie de las micelias filamentosas se adhieran a superficies sólidas promueve la formación de estos flocs (Z. Gao et al., 2020).

Una fotografía microscópica de los co-pellets de hifas de *A. niger* y *C. vulgaris* trituradas mostró que las células de microalgas se adhieren a las hifas filamentosas. Esta atracción mutua podría deberse principalmente a la carga superficial. Las células de microalgas suelen tener cargas negativas en sus superficies, lo que les permite formar suspensiones estables en el agua del cultivo. En comparación, las hifas fúngicas contienen polisacáridos con sitios activos que facilitan la bioadsorción y pueden cargar a estas células. Un estudio similar con *A. flavus* demostró que los pellets de células fúngicas absorbieron células de microalgas, y la diferencia en el potencial zeta (23.7 mV para las microalgas y +46.1 mV para *A. flavus*) sugiere que la diferencia de carga superficial podría ser responsable de la co-pelletización de microalgas y células fúngicas. (Zhang & Hu, 2012).

Estos dos últimos métodos de coagulación-floculación y biofloculación son prometedores por su amplia diversidad de aplicación de compuestos que puedan generar un menor impacto al medio ambiente y por su posibilidad para alcanzar altas eficiencias a partir de ellos. Lo que es una parte fundamental de los bioprocesos, por tal razón; esta tesis pretende estudiar y comparar por medio de método de jarras; diferentes coagulantes-floculantes para el cosechado de biomasa microalgal, así como sus efectos en los metabolitos.

A continuación, se muestra un cuadro de las diferentes condiciones de operación del proceso de coagulación-floculación y las eficiencias reportadas para diferentes compuestos químicos.

Tabla 2. Condiciones de operación del proceso de coagulación – floculación y eficiencias reportadas para diferentes compuestos químicos.

			FASE 1			FASE 2		FASE DE SEDIMENTACIÓN		
Cepa	Coagulante-floculante	pH	t Coagulación (min)	V. Coagulación (rpm)	Dosis coagulante-floculante (mg/L)	t Floculación (min)	V. Floculación (rpm)	t sedimentación (min)	% de Recuperación	Referencia
<i>Scenedesmus sp</i>	FeCl <sub>3</sub>	6.5	1	120	72	12	25	30	97.20	(Oliveira et al., 2018)
		7.2	1	120	7000	1	25	12	98.7	(Reyes & Labra, 2016)
<i>Scenedesmus consortia</i>		4	1	120	560	10	<30	10	99.60 ± 0.003	En este estudio
<i>Chlorella Vulgaris</i>				200	160				77	(Vu et al., 2020)
<i>Chlorella Vulgaris</i>	Al <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	entre 4 y 11	1	200	180	15	50	60	77	(Reyes & Labra, 2016)
			1	150	2500	15	25	10	92.4	(Zhu et al., 2018)
<i>Scenedesmus consortia</i>		>10	1	120	5000	30	20	10	93.33 ± 0.001	En este estudio

<i>Chlorella sp</i>	Quitosano	entre 4 y 9			10	20	150	20	99.40	(Ahmad et al., 2011)
		7.4-7.8	5	150	30	30	10	30	98	(Mohd Yunus et al., 2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>			1	150	250	15	25	10	92.3	(Zhu et al., 2018)
<i>Scenedesmus consortia</i>		8			20	23	10	10	96.79 ± 0.026	En este estudio
<b>BIOFLOCULACIÓN</b>					<b>FASE 1</b>		<b>FASE DE SEDIMENTACIÓN</b>	<b>BIOFLOCUALACIÓN</b>		
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Concentración de levadura</b>	<b>pH</b>	<b>Concentración de glucosa (g L-1)</b>	<b>t coagulación-floculación (min)</b>	<b>V coagulación-floculación (rpm)</b>	<b>t sedimentación (min)</b>	<b>% de Recuperación</b>	<b>Referencias</b>	
	W01 Solibacillus silvestris	radio de levadura en medio 3:1	7 en medio de cultivo		1	“gently mixing”	10	90	(Wan et al., 2013)	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Aspergillus oryzae	1.2x10 <sup>4</sup> esporas/mL	4-5	10	continuamente	50-150		Casi 100	(Zhou et al., 2013)	
<i>Scenedesmus consortia</i>	Candida sp	670 mg L-1	Entre 7 y 8	25	30	110	10	80.31	En este estudio	

# CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 ESTRATEGIA METODOLÓGICA

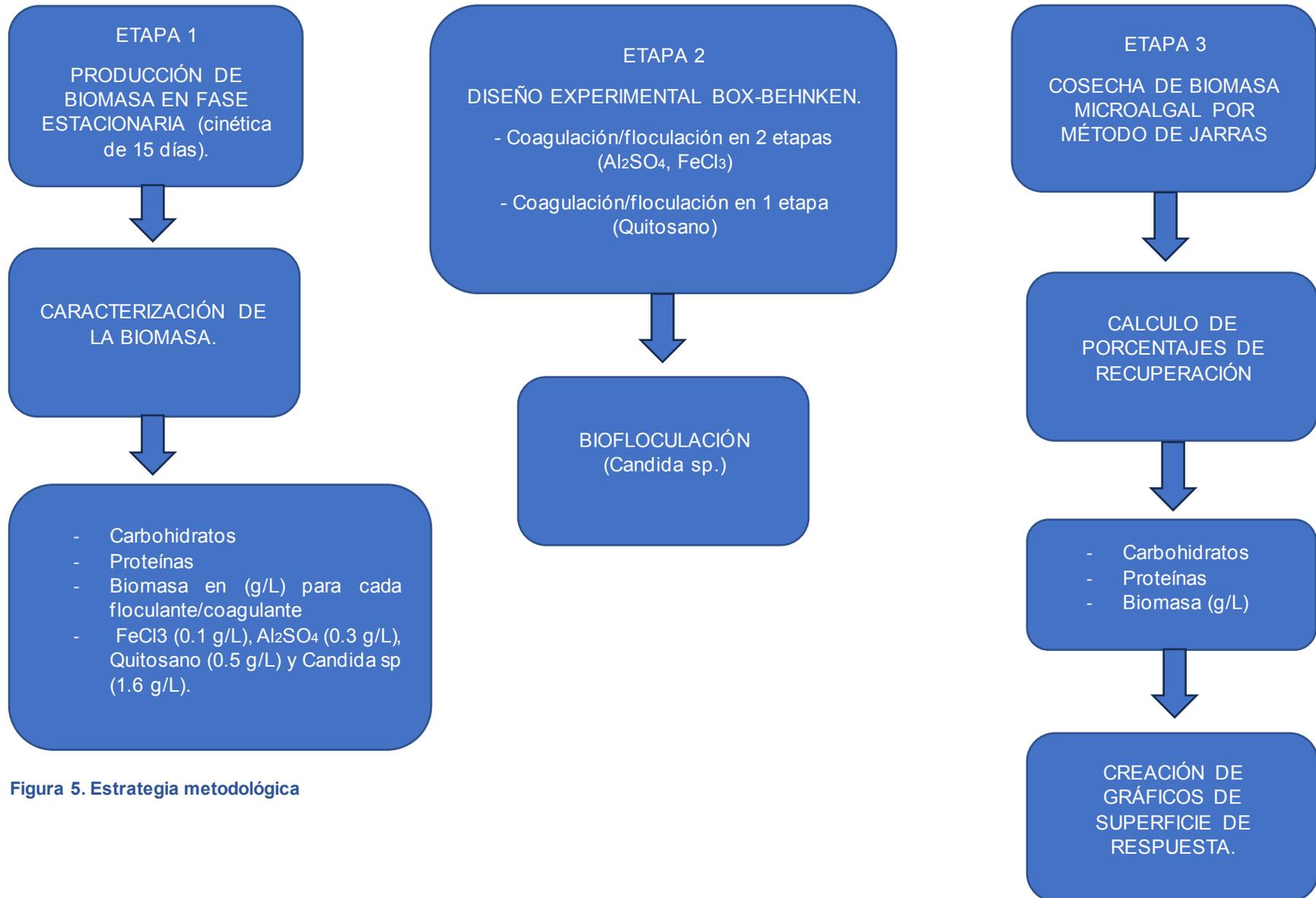


Figura 5. Estrategia metodológica

## 2.2 ETAPA 1

Corresponde a la producción de biomasa microalgal de un consorcio *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus sp*, que fue encontrado en una planta de escala piloto de aguas residuales “Atzintli”, construida por el Instituto de Ingeniería de la UNAM, México y la Universidad de Newcastle, Reino Unido ubicada en ciudad universitaria (19.320746, -99.176713). Se siguió una cinética de 15 días para llegar a la fase estacionaria. Con la finalidad de evitar interferencias con los coagulantes-floculantes a implementarse, la biomasa fue cultivada con medio sintético conocido como Blue-Green 11 medium (BG-11).

Se realizaron 4 cinéticas de crecimiento, una para cada coagulante-floculante sin embargo sólo se monitoreó una durante 20 días; esta cinética correspondió a la de reactivación de la biomasa microalgal donde cada tercer día se realizaron lecturas de densidad espectrofotométrica a una longitud de onda de 600nm así como determinaciones de peso seco y metabolitos. Se monitoreó el número de células con ayuda de un microscopio y una cámara Neubauer.

Para las siguientes cinéticas solo se midieron los parámetros finales al término de los 20 días de crecimiento; tales como metabolitos y peso seco para contemplar como datos iniciales para el proceso de jarras.

Para el cultivo de biomasa microalgal, esta se reactivó en fotobiorreactores de 10 y 1L donde se colocó 20% del volumen total de cultivo concentrado. Se utilizó medio de cultivo BG-11 y una solución metales traza como nutrientes. Estos reactores se dejaron 12 h en ciclos de luz/oscuridad en exposición a luces led.

Para la caracterización de biomasa microalgal final se determinaron 3 parámetros.

### i. DETERMINACIÓN DE BIOMASA (Método de sólidos suspendidos totales)

Se utilizó el método 2540 D Standard methods siguiendo la norma NMX-AA-034-SCFI-2015. El cuál consiste en la colocación de filtros GF/A en charolas de aluminio, se calientan en una estufa a  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, seguido de 30 min en un desecador. Se retiran del desecador y se pesan. Se monta el equipo de filtración al vacío, se coloca el filtro previamente secado y se vierte un volumen conocido de muestra utilizando una pipeta o probeta.

La cantidad de muestra se elige con base en las características de la muestra. Se retira el filtro utilizado y se coloca en su respectiva charola, la cual se introduce en la estufa nuevamente y se deja secar durante dos horas. Finalmente se retira la charola de la estufa, se deja enfriar por cinco minutos y finalmente se pesa (Mexicana, 2015).

ii. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS (*Método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico*)

Se prepara un blanco en un tubo roscado con 1mL de agua destilada, se le añade 1mL de fenol al 5% p/v y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agita y se deja reposar durante 10 minutos.

Para determinar el contenido de carbohidratos en la muestra, se agita y se toma 1mL de la misma. Se coloca en un tubo roscado más 1mL de fenol al 5% p/v y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agita y se deja reposar durante 10 minutos. Se coloca el tubo en un baño de agua a temperatura ambiente para disminuir la temperatura y se toma lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Hach a 490nm. Luego se calcula el contenido de carbohidratos a partir de una ecuación que el laboratorio de ingeniería ya había generado en estudios anteriores a través de una curva patrón siguiendo el método de (Dubois et al., 1956).

iii. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS (*Método alcalino y Biuret*)

Se toma una muestra de 5mL y se pasa a un tubo falcon, se añaden 2 gotas de NaOH 2N se tapa y agita. Se introducen los tubos en un baño de agua con agitación constante y se dejan calentar durante 1 hora a una temperatura de 40°C. Después de ese tiempo se retiran los tubos y se dejan reposar durante 30 minutos. Se utiliza una pipeta para tomar 1mL de sobrenadante y vaciarlo en un tubo al que posteriormente se le añaden 4mL de reactivo de Biuret, se tapa y se agita. Se toma lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Hach a 540nm, el blanco debe ser agua destilada. Luego se calcula el contenido de proteínas a partir de una ecuación que el

laboratorio de ingeniería ya había generado en estudios anteriores a través de una curva patrón siguiendo el método de (Uzun et al., 2012).

### 2.3 ETAPA 2

Se generó un diseño experimental Box-Benhken de 15 experimentaciones por medio del software Design-Expert. Las cuales se aplicaron a cada coagulante-floculante ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , quitosano y *Candida sp.*), todos los experimentos se realizaron por duplicado y las determinaciones a la biomasa se realizaron por triplicado. Con base en la literatura se consideraron las condiciones de velocidad de floculación, velocidad de coagulación, tiempo de sedimentación, tiempo de floculación y concentración de coagulante-floculante para generar las matrices experimentales que se muestran en la Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5.

#### i. DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-BEHNKEN

Se utilizó el diseño de Box-Behnken para obtener la mejor combinación de parámetros a emplear en el método de jarras; se consideraron factores tales como pH, velocidad de floculación y tiempo de floculación a diferentes niveles para  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y quitosano, mientras que para *Candida sp.*, en este último se varió el volumen de la levadura, velocidad de coagulación-floculación y concentración de glucosa. El diseño experimental consistió en un diseño Box-Behnken (DEBB) multilevel (3x3). Para cada coagulante-floculante y la levadura se planteó un diseño experimental diferente. Cada factor fue dividido en tres niveles (distribuidas equitativamente), para preparar llevar a cabo la experimentación de prueba de jarras. El rango de cada nivel se seleccionó a través de pruebas preliminares cuyas condiciones se tomaron de lo reportado en la literatura; con el objetivo de delimitar la cantidad de experimentaciones.

La matriz de cada coagulante-floculante y la levadura se muestran a continuación:

- $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Tabla 3. Matriz para  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Coagulantes-Floculantes	Niveles	F1 pH	F2 Tiempo de floculación (TF)-min	F3 Velocidad de floculación (VF)-rpm
FeCl <sub>3</sub>	L1	4	10	20
	L2	8	15	35
	L3	12	20	50
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	L1	4	10	10
	L2	8	20	20
	L3	12	30	30

Como podemos observar en la Tabla 2. Tanto los tiempos como las velocidades de floculación son datos variables en nuestro diseño experimental, esto debido a que en la literatura se reportan diferentes condiciones óptimas para cada coagulante-floculante, por lo que no se parte de compartir las mismas condiciones en los coagulantes-floculantes si no de encontrar las mejores eficiencias para cada sustancia individualmente y después comparar los resultados entre los demás coagulantes-floculantes.

- Quitosano

Tabla 4. Matriz para quitosano.

Coagulantes-Floculantes	Niveles	F1 pH	F2 Tiempo de floculación (TF)-min	F3 Velocidad de floculación (VF)-rpm
Quitosano	L1	4	10	10
	L2	8	23	130
	L3	12	35	250

Donde F1(pH), F2(TF) y F3(VF) representan el rango de variable es utilizadas en la experimentación de jarras para FeCl<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> y Quitosano.

- Levadura

Para el proceso de biofloculación las variables correspondientes a la levadura *Candida sp.* fueron F1(Vol), F2(C) y F3(VF).

Tabla 5. Matriz para *Candida sp.*

Candida sp	Niveles	F1 Volumen de levadura (Vol)- mL	F2 Concentración de glucosa (C)- g/L	F3 Velocidad de floculación (VF)-rpm
	L1	10	10	20
	L2	35	25	110
	L3	60	40	200

### 2.3.1 BIOFLOCULACIÓN

Se tuvo que realizar un paso previo que fue el tratamiento de la levadura *Candida sp*, este parte de la propagación de la levadura, seguido de su recolección. De tal forma que lo recolectado sirva como nuestra sustancia coagulante-floculante en la etapa de método de jarras. A continuación, se explica el procedimiento.

#### *i. PROPAGACIÓN DE LEVADURA CANDIDA SP*

En un estudio previo la levadura *Candida sp*, proveniente de agua residual, fue aislada y caracterizada (Romero Enrique, 2019).

Después de pasar por un proceso de reactivación, la levadura se proliferó tomando una asada de levadura y vertiéndola en 100mL de medio rico de levadura Peptona Dextrosa (por sus siglas en inglés YPD), se dejó toda la noche a 29°C y 180rpm en la incubadora. A la mañana siguiente se recuperó la levadura por centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos; lo que podemos observar como la pastilla blanca/pellet en la Figura 6b y permaneció en ayuno por un periodo de 3-4 hrs. Finalmente se midió el volumen recuperado en una probeta de vidrio Figura 6c.

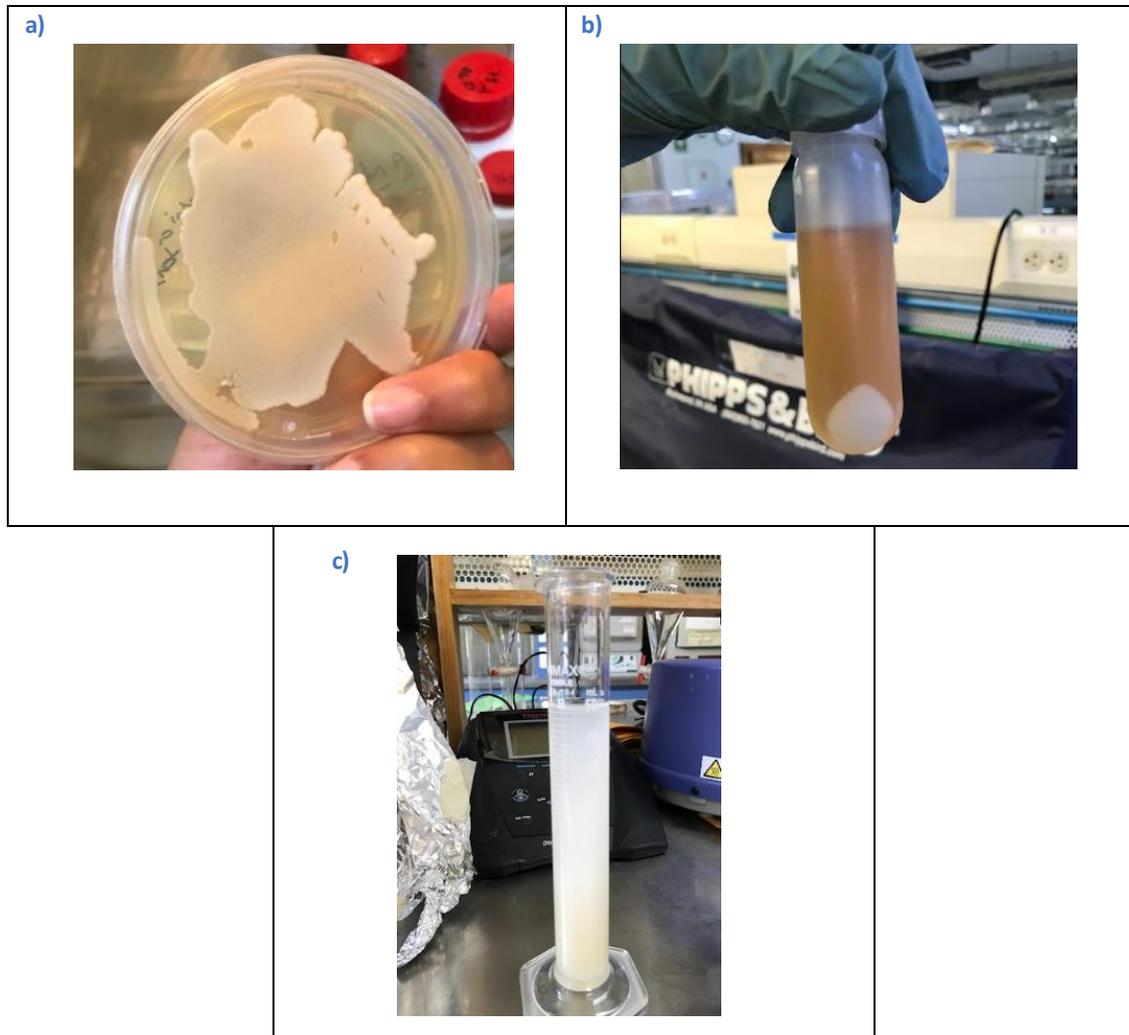


Figura 6. Tratamiento de la levadura *Candida sp*

### 2.4 ETAPA 3

Se utilizó un equipo de 6 jarras Phipps & Bird con capacidad de 2L. Se realizaron las corridas generadas en el diseño experimental a las diferentes condiciones para cada coagulante-floculante en un volumen de 1L. El volumen de coagulante-floculante, fue constante para todas las experimentaciones con  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y quitosano; mientras que, para las pruebas con levadura, este parámetro fue una variable. Antes de comenzar la experimentación de jarras se prepararon las soluciones de cada coagulante-floculante con la concentración seleccionada.

- Para el método de jarras con  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Se prepararon los contenedores del equipo Phipps & Bird con 1L de biomasa microalgal y un ajuste de pH a 4, 8 y 12 utilizando HCl 1 M y NaOH 6 N. La primera fase fue a 120 rpm durante 1 minuto, después se llevó a cabo la fase 2 señalada como la de floculación a diferentes combinaciones de tiempo.

- Para el método de jarras con quitosano.

Al igual que las jarras con  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , se prepararon los contenedores del equipo Phipps & Bird con 1L de biomasa microalgal y un ajuste de pH a 4, 8 y 12 utilizando HCl 1 M y NaOH 6 N. El procedimiento de jarras se llevó a cabo en una sola fase a diferentes combinaciones de tiempo y velocidad.

- Para el método de jarras con levadura.

Se prepararon las jarras con 100mL de biomasa microalgal, 500mL de agua residual filtrada y 400mL de agua destilada. La experimentación se llevó a cabo en una sola fase con diferentes combinaciones de volumen de levadura, concentración de glucosa y velocidad de coagulación-floculación a un tiempo constante de 30min. Se utilizó la levadura *Candida sp* en condiciones de ayuno y en su fase exponencial. Después de la experimentación en jarras, la biomasa fue recolectada y vertida en fotobiorreactores de 1L respectivamente. Se dejó el co-cultivo (microalga-levadura-glucosa-agua residual) durante al menos 36hrs con una aireación constante y exposición a luz led.

Al finalizar cada experimentación, se tomó un tiempo de 10 y 30 minutos para la sedimentación. Se decantó el líquido de la parte superior de la jarra y se recolectó la biomasa concentrada en probeta de vidrio. Finalmente, se midió un volumen aproximado de biomasa recuperada.

Se hicieron determinaciones a la biomasa microalgal recuperada de cada jarra tales como sólidos suspendidos totales para saber la concentración y contenido de metabolitos como carbohidratos y proteínas.

Se utilizaron los gráficos de superficie de respuesta para observar el efecto de los parámetros de operación del método de jarras con respecto a los datos calculados de porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos. De igual forma, esta herramienta ayudó a obtener la mejor proyección de parámetros para el método de jarras. Se realizaron quince experimentos por coagulante-floculante ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , quitosano y *Candida sp.*). Y los experimentos se realizaron por duplicado, para llevar a cabo el análisis estadístico.

A continuación, se presenta la Tabla 6 con 15 diferentes experimentaciones generadas por el software Desig-Expert para cada coagulante-floculante. La cuál será utilizada más adelante para reportar los porcentajes de recuperación de biomasa y metabolitos a diferentes parámetros.

**Tabla 6. Cuadro de 15 experimentaciones a diferentes combinaciones de parámetros para  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , quitosano y *Candida sp.***

		FeCl <sub>3</sub>			Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			Quitosano			<i>Candida sp.</i>		
Exp	TS (min)	pH	TF (min)	VF (rpm)	pH	TF (min)	VF (rpm)	pH	TF (min)	VF (rpm)	Vol. Levadura (mL)	Conc. Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	VF (rpm)
1	10	8	20	20	12	20	10	4	23	10	35	10	20
	30												
2	10	8	10	20	8	30	10	8	10	10	35	40	20
	30												
3	10	12	15	20	4	20	10	8	35	10	60	25	20
	30												
4	10	4	15	20	8	10	10	12	23	10	10	25	20
	30												
5	10	12	10	35	8	20	20	4	10	130	35	25	110
	30												
6	10	8	15	35	12	30	20	8	23	130	60	40	110
	30												
7	10	8	15	35	4	30	20	4	35	130	10	10	110
	30												
8	10	8	15	35	8	20	20	8	23	130	60	10	110
	30												
9	10	4	20	35	4	10	20	12	35	130	35	25	110
	30												
10	10	4	10	35	12	10	20	8	23	130	35	25	110
	30												
11	10	12	20	35	8	20	20	12	10	130	10	40	110
	30												
12	10	4	15	50	12	30	30	4	23	250	35	10	200
	30												
13	10	8	20	50	8	30	30	12	35	250	60	25	200
	30												
14	10	12	15	50	4	20	30	8	35	250	35	40	200
	30												
15	10	8	10	50	8	10	30	8	10	250	10	25	200
	30												

Para desarrollar el diseño experimental con el software Design Expert versión 12 (State-Ease Inc. Minneapolis, USA). Se ajustó una función de regresión general de

un modelo polinómico de segundo orden a los datos para predecir el valor óptimo de tres factores.

La ecuación del modelo es:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{j=2}^k C_{ij} X_i X_j$$

Donde:

Y: Variable de respuesta

k: : Número de variables de diseño

i, j: Variables dependientes.

$\beta_0, A_i, B_{ij}, C_{ij}$ : : Parámetros de coeficientes de regresión del modelo.

$X_i$  y  $X_j$  : Variables estudiadas, son los valores codificados de las variables controladas o independientes.

La validación del modelo se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA), considerando un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo al 5 %, mientras que  $0.005 < p < 0.1$  se consideró significativo al 10 %.

#### i. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE BIOMASA

Finalmente, en la fase de sedimentación pasados 10 y 30 minutos se tomaron muestras en la zona superior de cada jarra donde se ubicaba el sobrenadante. Se midió absorbancia cada una por medio de la densidad óptica (OD) a 600 nm.

El porcentaje o eficiencia de recuperación ( $\eta$ ) se calculó utilizando la fórmula:

$$\eta = \frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \times 100$$

Donde:

$\eta$ : Porcentaje de recuperación (%).

$OD_i$ : Absorbancia antes de comenzar la experimentación de jarras.

$OD_f$ : Absorbancia después de la fase de sedimentación.

ii. CREACIÓN DE GRÁFICOS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA

Con ayuda del Software Design-Expert, que se basa en el método de superficies de respuesta; se hicieron variaciones de los parámetros mínimos y máximos reportados en la literatura de  $FeCl_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$  y quitosano para encontrar la combinación óptima de estos coagulantes-floculantes que permitiera un mejor cosechado de la biomasa.

Mientras que, para *Candida sp.*, se utilizó esta herramienta para hacer un escaneo de diferentes parámetros como volumen de levadura, concentración de glucosa y velocidades de floculación que nos ayudaran a proponer condiciones base y ser un parteaguas para este proceso.

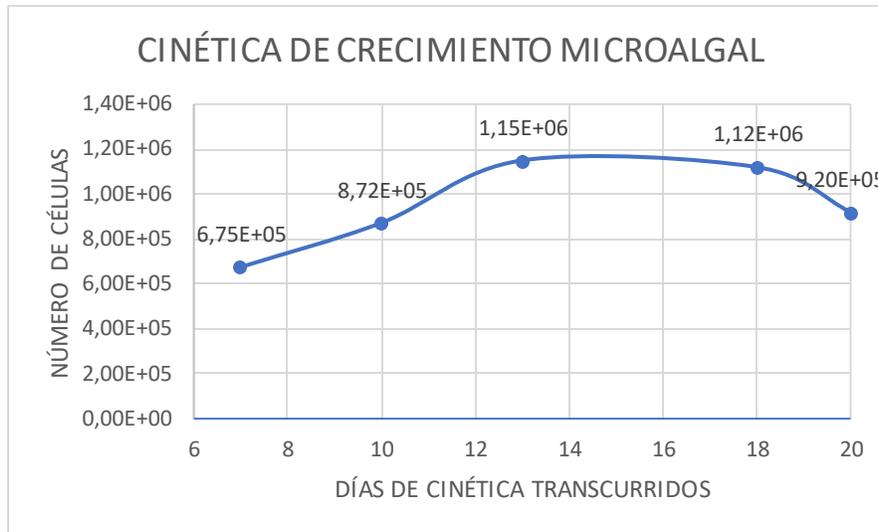
Finalmente, en el procesamiento de datos y para la creación de los gráficos de superficie de respuesta se analizaron los efectos individuales e interactivos entre los diferentes niveles (L1, L2 y L3) de  $FeCl_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$ , quitosano y levadura. Este programa recopila la información de los porcentajes de recuperación de biomasa, recuperación de proteínas y carbohidratos, y finalmente nos arroja un gráfico que nos ayuda a mapear cómo los cambios en las variables afectan la respuesta de interés. De igual forma al modificar estos parámetros por medio de los colores es que se hallan los niveles de las variables que optimizan una respuesta. Es decir, obtenemos la combinación óptima de nuestros parámetros variables que nos daría porcentajes más altos.

Aunado a lo anterior, el programa nos arroja el análisis de varianza (ANOVA) de modelo cuadrático para cada coagulante-floculante empleado.

# CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

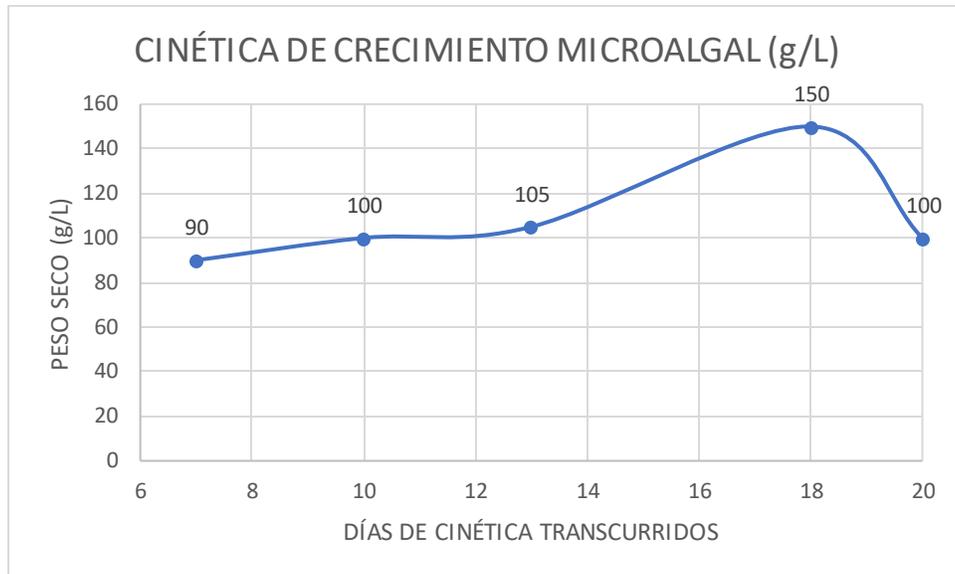
## 3.1 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS INICIALES

Al término de la reactivación de la biomasa microalgal; se obtuvo una gráfica donde podemos observar el crecimiento de las microalgas en términos de número de células y gramos de biomasa por litro de mezcla (cultivo, agua y medio BG-11).



**Figura 7** Cinética de crecimiento microalgal en términos de número de células

En la Figura 8 observamos que en el día 10 comienza un crecimiento importante, el cual podríamos interpretar como la fase exponencial del consorcio microalgal; entre los días 13 y 16 podríamos decir que comienza la fase estacionaria que es donde no hay crecimiento pero tampoco disminución de las células ya que aproximadamente entre el día 16 y 18 observamos un declive en el gráfico lo que se podría interpretar como la fase en la que las microalgas comienzan a morir. En la literatura se reporta la mayoría de las experimentaciones utilizando la biomasa microalgal en fase estacionaria; es por ello por lo que con respecto a nuestra gráfica decidimos tomar nuestra biomasa a partir del día 15 para continuar con el proceso de jarras.



**Figura 8** Cinética de crecimiento microalgal en términos de gramos de biomasa por litro de mezcla.

Como comparativo; en la Figura 8 se muestra una gráfica igualmente de crecimiento microalgal pero esta con respecto al peso seco donde observamos un pico de mayor producción de biomasa microalgal entre el día 13 y 18; después de ese periodo se observa igual un declive importante.

Después de la reactivación de la biomasa microalgal, se realizaron 4 cinéticas de crecimiento; una para cada coagulante-floculante. De las diferentes cinéticas de crecimiento reportas; se obtuvieron concentraciones finales de (0.1 g/L) para la biomasa con  $\text{FeCl}_3$ , (0.3 g/L) para la biomasa con  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , (0.5 g/L) para la biomasa con Quitosano y (1.6 g/L) para la biomasa con *Candida sp.* Como ya se mencionó anteriormente; de estas 4 cinéticas no hubo otro monitoreo; simplemente al término del periodo de 15 días de crecimiento (fase estacionaria) se tomaron muestras para realizar la caracterización de la biomasa correspondiente.



Figura 9. Fotobiorreactores de 10L con aireación y luz led.

La biomasa se caracterizó utilizando las técnicas antes descritas. A continuación, en la Tabla 7, se muestran los parámetros iniciales de la biomasa empleada para cada coagulante-floculante.

Tabla 7 Parámetros iniciales de la biomasa después de 15 días de cinética de crecimiento.

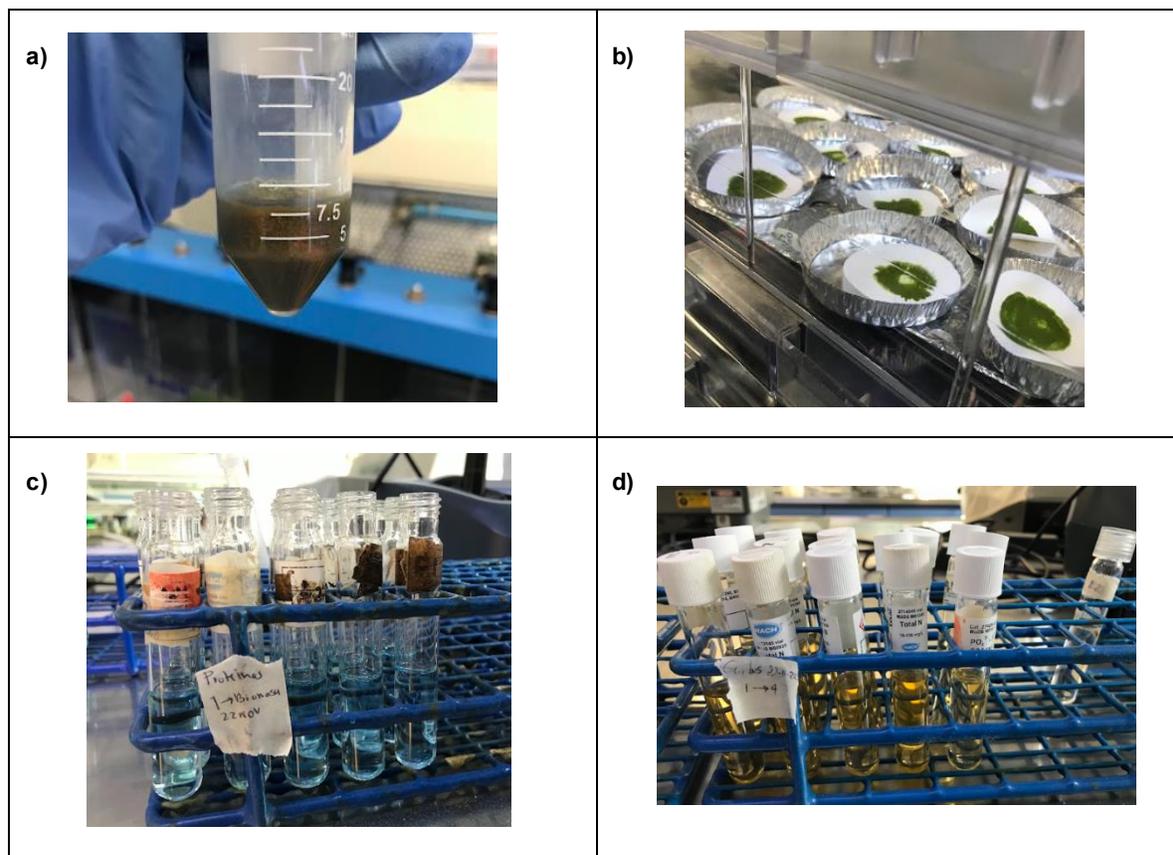
Coagulante-floculante	Sólidos suspendidos totales (mg L <sup>-1</sup> )	% Carbohidratos	%Proteínas
FeCl <sub>3</sub>	100	82.44	60
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	350	21.79	80
Quitosano	520	7.85	88
<i>Candida</i> sp	1640	11.23	30

Estos son los datos de la biomasa inicial que más adelante fueron utilizados para obtener los porcentajes de recuperación de metabolitos. Dado que las cinéticas de crecimiento fueron realizadas a diferentes tiempos para realizar la experimentación con cada coagulante-floculante es por ello que en la tabla se presentan diferentes concentraciones iniciales, así como contenido de metabolitos.

### 3.2 COSECHA DE BIOMASA POR MÉTODO DE JARRAS, PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE BIOMASA Y DE METABOLITOS, CREACIÓN DE GRÁFICOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Este estudio comparó el efecto de coagulantes-floculantes, inorgánicos, orgánicos y biológicos ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , quitosano y *Candida sp*); añadidos a la biomasa microalgal cultivada.

Se presenta la Figura 10 con imágenes de la metodología que se siguió para cada coagulantes floculante. Desde la recuperación de biomasa concentrada, sólidos suspendidos totales, determinación de proteínas y carbohidratos.



**Figura 10. a) Volumen recuperado de biomasa sedimentada de las jarras con  $\text{FeCl}_3$ . b) Determinación de sólidos suspendidos totales. c) Determinación de proteínas. d) Determinación de carbohidratos.**

A continuación, se muestran las tablas, gráficos y discusión para cada coagulante-floculante junto con su análisis.

### 3.2.1 $\text{FeCl}_3$ y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

En el proceso de jarras con  $\text{FeCl}_3$ , se observaron coloraciones amarillentas en la mezcla, de igual forma en la recuperación de biomasa se encontraron remanentes de  $\text{Fe}^{3+}$  como podemos observar en la Figura 11.



Figura 11. Equipo de jarras con biomasa microalgal y  $\text{FeCl}_3$

Mientras que en las jarras con  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  se logra ver de forma más clara la separación entre biomasa y sobrenadante Figura 12.

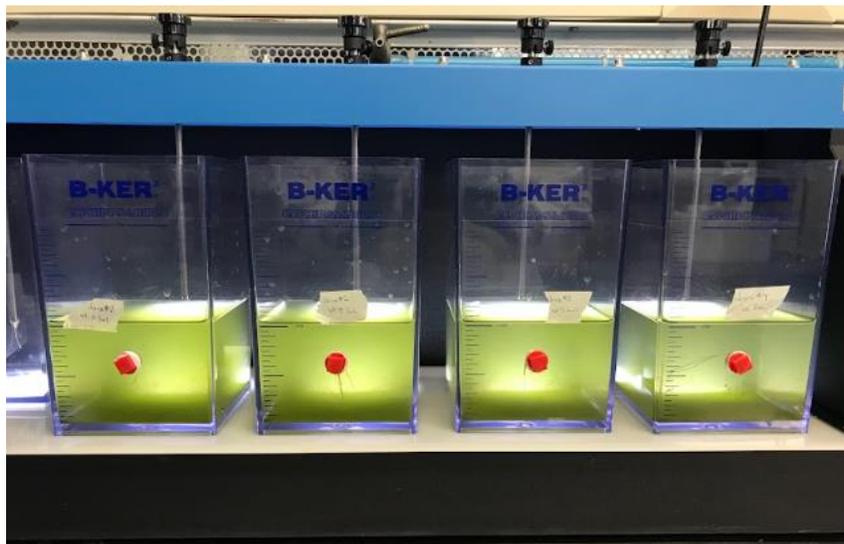


Figura 12. Equipo de jarras con biomasa microalgal más  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Para la determinación de sólidos suspendidos totales, proteínas y carbohidratos a la biomasa tratada con  $\text{FeCl}_3$  se le tuvieron que realizar lavados para tratar de quitar

los remanentes del coagulante-floculante como se puede ver en la Figura 10a); y así tratar de aminorar la interferencia de ellos en las siguientes determinaciones.

A continuación, se muestra la Tabla 8 donde se reportan los porcentajes de recuperación de biomasa y metabolitos calculados tanto para  $\text{FeCl}_3$  como  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  a diferentes parámetros de pH, tiempo y velocidad.

Vemos que las condiciones de pH 4, tiempo de floculación 20min, a 35rpm y tiempo de sedimentación de 30min arrojan un porcentaje de recuperación de biomasa alto de  $99.60\% \pm 0.000$  para  $\text{FeCl}_3$ . Mientras que para el  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  el porcentaje de recuperación de biomasa de  $93.33\% \pm 0.001$  corresponde a las condiciones de pH 8, tiempo de floculación 20min, velocidad de floculación 20rpm y tiempo de sedimentación de 30min.

Tabla 8. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con FeCl<sub>3</sub> y Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.

		<i>FeCl<sub>3</sub></i>						<i>Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub></i>						
					% DE RECUPERACIÓN						% DE RECUPERACIÓN			
Experimento	Tiempo de sedimentación (min)	pH	Tiempo de floculación (min)	Velocidad de floculación (rpm)	BIOMASA	CARBOHIDRATOS	PROTEÍNAS	pH	Tiempo de floculación (min)	Velocidad de floculación (rpm)	BIOMASA	CARBOHIDRATOS	PROTEÍNAS	
1	10	8	20	20	98.59 ± 0.009	32.14 ± 0.00	> 90 ± 0.05	12	20	10	89.94 ± 0.015	23.77 ± 0.00	36.33 ± 0.01	
	30				98.59 ± 0.011						89.94 ± 0.026			
2	10		10		99.19 ± 0.006	34.06 ± 0.02	> 90 ± 2.73	8	30		89.74 ± 0.017	45.94 ± 0.00	45.53 ± 0.02	
	30				99.50 ± 0.001						91.48 ± 0.004			
3	10	12	15		86.67 ± 0.037	36.55 ± 0.06	> 90 ± 1.77	4	20		78.03 ± 0.073	12.62 ± 0.00	60.39 ± 0.11	
	30				86.26 ± 0.060						82.14 ± 0.035			
4	10		4		35	99.60 ± 0.003	33.20 ± 0.02	> 90 ± 1.52	8		10	90.66 ± 0.033	7.39 ± 0.00	35.09 ± 0.07
	30					99.39 ± 0.006						89.74 ± 0.014		
5	10	12	10			92.12 ± 0.043	43.08 ± 0.03	> 90 ± 0.22	8		20	91.69 ± 0.007	30.24 ± 0.00	47.15 ± 0.04
	30		91.92 ± 0.043			92.30 ± 0.004								
6	10	8	15			98.69 ± 0.001	28.95 ± 0.11	> 90 ± 1.01	12		30	92.61 ± 0.017	26.85 ± 0.00	87.76 ± 0.03
	30					99.09 ± 0.001						93.12 ± 0.028		
7	10		19.95 ± 0.27	15		99.09 ± 0.001	19.95 ± 0.27	> 90 ± 3.63	4	30	85.11 ± 0.097	40.98 ± 0.00	15.34 ± 0.06	
	30					98.89 ± 0.010					90.35 ± 0.035			
8	10	24.00 ± 0.20	15	98.89 ± 0.001		24.00 ± 0.20	> 90 ± 2.32	8	20	91.12 ± 0.007	50.87 ± 0.00	55.00 ± 0.03		
	30			98.99 ± 0.006						92.81 ± 0.001				
9	10	4	20	98.99 ± 0.006		50.70 ± 0.21	> 90 ± 0.20	4	10	85.84 ± 0.096	45.07 ± 0.00	1.99 ± 0.10		
	30		99.60 ± 0.000	92.40 ± 0.006										
10	10		52.62 ± 0.00	10	98.99 ± 0.003	52.62 ± 0.00	> 90 ± 0.02	12	10	88.71 ± 0.026	24.46 ± 0.00	70.10 ± 0.01		
	30				98.89 ± 0.004					91.17 ± 0.055				
11	10	12	20	90.40 ± 0.064	60.61 ± 0.00	> 90 ± 0.08	8	20	90.56 ± 0.006	71.50 ± 0.00	62.85 ± 0.02			

	30				90.30 ± 0.057						93.33 ± 0.001		
12	10	4	15	50	99.29 ± 0.001	35.37 ± 0.07	> 90 ± 0.08	12	30	92.61 ± 0.012	84.81 ± 0.00	93.43 ± 0.33	
	30				97.98 ± 0.011								93.02 ± 0.009
13	10	8	20		98.28 ± 0.001	46.95 ± 0.08	> 90 ± 0.43	8		30	92.00 ± 0.014	14.87 ± 0.00	7.51 ± 0.06
	30				98.79 ± 0.003						92.92 ± 0.007		
14	10	12	15		85.66 ± 0.009	44.22 ± 0.06	> 90 ± 0.19	4		20	78.85 ± 0.009	29.33 ± 0.00	4.35 ± 0.14
	30				88.68 ± 0.003						88.71 ± 0.014		
15	10	8	10		98.79 ± 0.003	44.78 ± 0.04	> 90 ± 0.09	8		10	91.38 ± 0.012	9.22 ± 0.00	18.75 ± 0.11
	30				97.78 ± 0.0017						92.20 ± 0.006		

El porcentaje de recuperación promedio de biomasa con  $\text{FeCl}_3$  es del  $96.26 \pm 4.65\%$ , Estos valores son consistentes con lo reportado en la literatura para la cosecha de *Scenedesmus sp* cuya eficiencia ha llegado a ser del  $97.20\%$  para  $\text{FeCl}_3$  (Oliveira et al., 2018), mientras que para la cosecha de *Chlorella vulgaris* se han encontrado eficiencias del  $92.4\%$  y  $77\%$  con  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  (Reyes & Labra, 2016; Zhu et al., 2018).

En cuanto al contenido de proteínas, si observamos la Tabla 8, vemos que en el caso del  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , la recuperación de este metabolito en la biomasa varió entre el  $1.99\% \pm 0.10$  al  $93.43\% \pm 0.33$ , mientras que con  $\text{FeCl}_3$ , el contenido recuperado de este metabolito disminuyó.

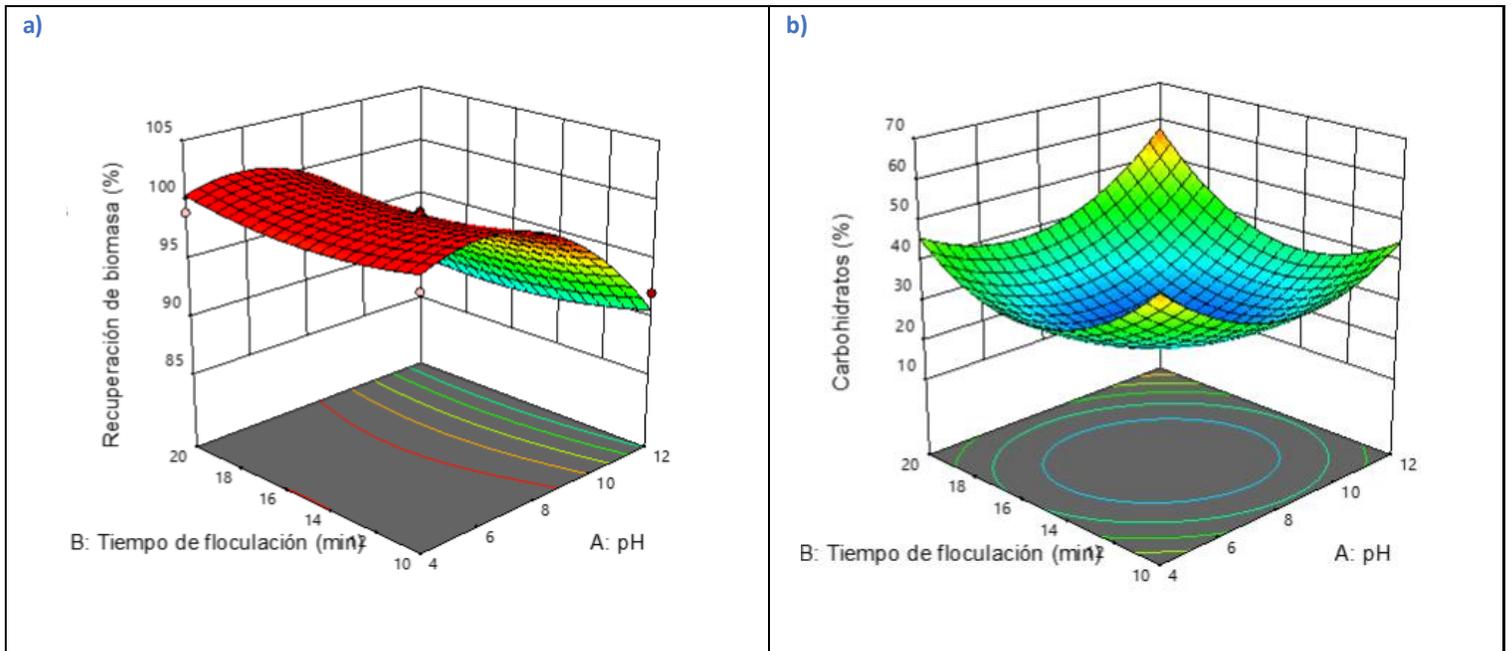
Esto se explica debido a que las muestras de biomasa recuperada fueron lavadas al menos 2 veces para determinar los niveles de carbohidratos y proteínas dados cambios en el pH atribuibles a la presencia de los agentes coagulantes-floculantes. También se observó una variación y disminución de proteínas y carbohidratos con respecto al valor que contenía la biomasa inicial, lo cual se relaciona con el daño celular observado en la primera capa de biomasa. Es importante resaltar que incluso después de los lavados de biomasa en el caso del coagulante  $\text{FeCl}_3$ , se formaron precipitados en forma de hidróxidos ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) (Mubarak et al., 2020).

Podemos comparar la disminución de proteínas y carbohidratos observada en esta experimentación, con un estudio realizado por Ma et al. (2023) en el que se reporta el uso de  $\text{FeCl}_3$  a 100 mg/L y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  a 60 mg/L para el proceso de floculación con *Chlorella vulgaris* donde se logró recuperar el  $98.77\% \pm 0.64$  y el  $93.50\% \pm 0.96$  de la biomasa respectivamente. En ese estudio no se observaron deformaciones celulares debido a las concentraciones utilizadas de los coagulantes-floculantes, pero se notó una ligera disminución de carbohidratos. Sin embargo, en otros estudios se ha observado la ruptura completa de las células a pH altos (Ma et al., 2023).

Kuzhiumparambil et al. (2022) mencionan el impacto de la floculación en los metabolitos o la composición celular de la biomasa. En dicho estudio, se observaron cambios en metabolitos como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y ácidos grasos debido al proceso de floculación al cosechar con poliacrilamida.

Las microalgas tienen formas diferentes, y no en todas las cepas se observa una ruptura celular. Los efectos en la determinación de metabolitos no llegan a ser completamente claros, dadas las diversas condiciones de cosecha y dosis informadas que varían para cada coagulante-floculante según la especie y tamaño celular de la microalga. Ahora se presentan los gráficos de superficies de respuesta para  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ .

Figura 13. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando  $\text{FeCl}_3$  para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando  $\text{FeCl}_3$  para el porcentaje de recuperación de carbohidratos.



Para  $\text{FeCl}_3$  y todos los demás coagulantes-floculantes, se registraron los porcentajes de recuperación de biomasa y carbohidratos. En el caso de las proteínas el coagulante-floculante generó precipitados que interfirieron en su determinación. En la literatura se ha informado que, ajustando el pH a niveles bajos, los precipitados a base de hierro liberan iones de hierro que son solubilizados. Esto podría sugerir un método para eliminar los precipitados de hierro de la biomasa de microalgas y brinda la oportunidad de reutilizar el sobrenadante con iones de hierro más de una vez (Li et al., 2020).

Finalmente, en la Figura 13 observamos las superficies de respuesta arrojados por el programa, donde a pH 4, tiempo de floculación de 10min y la velocidad de floculación a 30rpm se alcanzaría el máximo porcentaje de recuperación de biomasa. En cuanto al tiempo de sedimentación no se observaron diferencias importantes entre los 10 y 30min por lo que se tomaron los 10min como un tiempo óptimo.

Se observó que el pH llega a tener un efecto importante en el proceso de cosecha. Por ejemplo, en un estudio realizado por (Reyes & Labra, 2016) el porcentaje de

recuperación obtenido con  $\text{FeCl}_3$  fue de 98.7% con *Scenedesmus sp*, sin embargo, en el mismo, se incrementó este porcentaje gracias a la variación del pH.

Inclusive se ha reportado que bajo un pH alcalino se induce la floculación, aunque también esto podría tener un efecto en la calidad de la biomasa como se mencionó antes (Kuzhiumparambil et al., 2022).

En el análisis de varianza ANOVA los valores de p con  $\text{FeCl}_3$  fueron de 0.0076 y 0.0188 respectivamente. En los gráficos de superficie de respuesta relacionados con la recuperación de biomasa y carbohidratos para  $\text{FeCl}_3$  se observó que los niveles de pH, tiempo de floculación y la velocidad de floculación tienen un efecto significativo en los valores de las eficiencias de recuperación.

Después de la experimentación de jarras con  $\text{FeCl}_3$ , se indica la necesidad de incluir pasos adicionales para poder tratar y caracterizar la biomasa, como lo fueron los lavados de la biomasa cosechada; pasos que claramente representan un costo extra en el proceso. En la Figura 13b) se muestra el gráfico de superficies de respuesta para la eficiencia en la recuperación de carbohidratos; donde todos los niveles (F1, F2 y F3) incrementaron este porcentaje en un  $39.14 \% \pm 0.08$ .

Seguimos con el análisis de los gráficos de superficie de respuesta para  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  Figura 14, donde el análisis de varianza para el modelo cuadrático ANOVA nos arrojó los valores de p de 0.0465 para recuperación de biomasa, 0.8521 para carbohidratos y 0.0584 para proteínas, indicando la presencia de efectos significativos en la eficiencia de recuperación en función de los factores: velocidad de floculación, tiempo de floculación y pH.

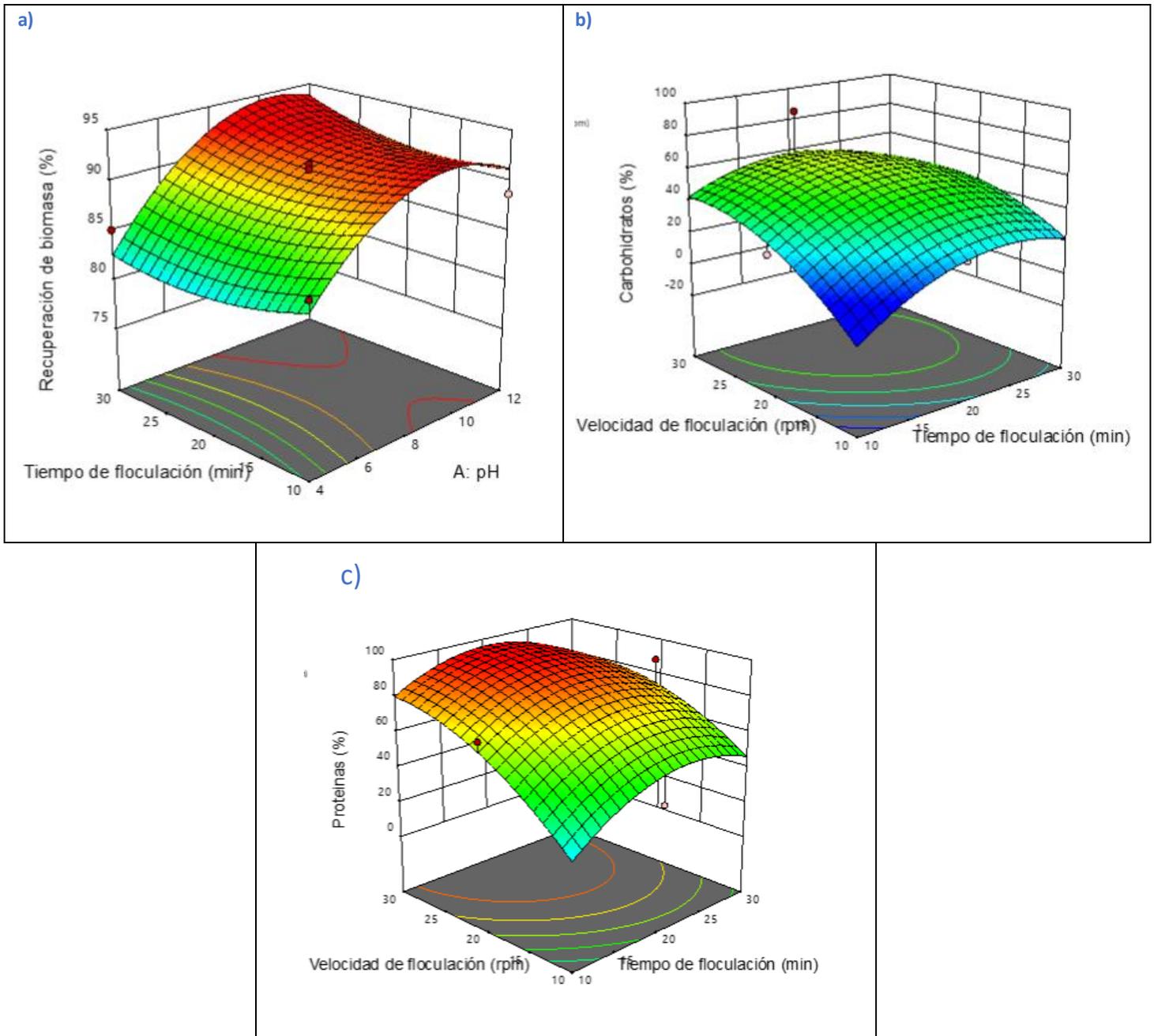


Figura 14. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando  $Al_2(SO_4)_3$  para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando  $Al_2(SO_4)_3$  para el porcentaje de recuperación de carbohidratos. c) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando  $Al_2(SO_4)_3$  para el porcentaje de recuperación de proteínas.

En la Figura 14 para el porcentaje de recuperación de biomasa se muestra el efecto de las condiciones de cosecha donde el programa indica que con un pH 12, tiempo de floculación de 30min y velocidad de floculación de 20rpm se alcanzaría el mayor porcentaje de recuperación de biomasa. Mientras que el máximo porcentaje de

carbohidratos y proteínas recuperado fue de  $84.81 \pm 0.04 \%$  y  $93.43 \pm 33.00 \%$  respectivamente.

Se observa que el pH es un factor importante en cuanto a la inducción de la sedimentación, inclusive (Chatsungnoen & Chisti, 2016) reportan en su estudio que además del efecto en la reducción o desactivación por completo de la carga negativa en la superficie, la adición de floculantes de iones metálicos multivalentes también induce un mecanismo de puenteo para agrupar células de algas neutralizadas. Es así como metales como  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  pueden actuar como puentes entre las células, facilitando la formación de agregados que pueden sedimentarse fácilmente.

### 3.2.2 QUITOSANO

Para la metodología de jarras con quitosano se observó una fácil remoción del sobrenadante y por lo tanto fácil cosechado de la biomasa ya que en el fondo de la jarra se formaron flocs de gran tamaño como podemos observar en la Figura 15 inclusive observamos que el agua dentro de la jarra se ve muchos más cristalina que en comparación con las jarras de  $FeCl_3$  y  $Al_2(SO_4)_3$ .



Figura 15. Equipo de jarras con biomasa microalgal más quitosano.

A continuación, se muestra la Tabla 9 con las combinaciones de pH, tiempo de coagulación-floculación, velocidad de coagulación-floculación, así como los porcentajes de recuperación de biomasa y metabolitos calculados con quitosano.

**Tabla 9. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con quitosano.**

Quitosano							
Experimento	pH	Tiempo de sedimentación (min)	Tiempo de coagulación-floculación (min)	Velocidad de coagulación-floculación (rpm)	% DE RECUPERACIÓN		
					BIOMASA	CARBOHIDRATOS	PROTEÍNAS
1	4	10	23	10	89.91 ± 0.041	> 90 ± 1.47	83.76 ± 0
		30			90.67 ± 0.045		
2	8	10	10		95.11 ± 0.009	> 90 ± 0.10	92.02 ± 0.98
		30	95.41 ± 0.009				
3		10	35		96.79 ± 0.026	> 90 ± 0.49	98.60 ± 1.02
		30			98.01 ± 0.015		
4	12	10	23		86.16 ± 0.051	> 90 ± 0.30	51.98 ± 0.63
		30			87.23 ± 0.040		
5	4	10	10		89.76 ± 0.065	> 90 ± 0.53	56.93 ± 0.41
		30	90.21 ± 0.067				
6	8	10	23		96.56 ± 0.003	> 90 ± 1.42	76.99 ± 0.96
		30			96.56 ± 0.005		
7	4	10	35		90.29 ± 0.083	> 90 ± 0.54	39.07 ± 0.16
		30			90.21 ± 0.061		
8	8	10	23		96.18 ± 0.001	> 90 ± 1.33	68.70 ± 0.88
		30		96.48 ± 0.004			
9	12	10	35	87.16 ± 0.048	92.29 ± 0.94	80.65 ± 0.59	
		30		87.46 ± 0.048			
10	8	10	23	95.80 ± 0.001	> 90 ± 1.25	60.41 ± 0.81	
		30		96.41 ± 0.003			
11	12	10	10	86.24 ± 0.052	59.94 ± 0.23	77.55 ± 0.39	
		30		86.77 ± 0.053			
12	4	10	23	90.29 ± 0.034	> 90 ± 0.06	> 90 ± 0.50	
		30		91.28 ± 0.032			
13	12	10	23	85.55 ± 0.010	69.55 ± 0.23	35.78 ± 0.28	
		30		86.01 ± 0.005			
14	8	10	35	95.34 ± 0.005	90.19 ± 0.08	68.53 ± 0.23	
		30		95.80 ± 0.005			
15		10	10	94.34 ± 0.002	43.69 ± 0.15	67.66 ± 0.10	
		30		94.80 ± 0.002			
				250			

De la Tabla 9 se concluye que a un tiempo de coagulación-floculación de 35min, pH 8, tiempo de sedimentación 30min y velocidad de 35rpm se obtiene el porcentaje más alto de 98.01% ± 0.015 para la recuperación de biomasa.

En promedio se alcanzó un porcentaje de  $91.96\% \pm 4.13$  de recuperación de biomasa lo que en comparación con la literatura es coherente por porcentajes reportados de hasta  $92.3\%$  (Reyes & Labra, 2016; Zhu et al., 2018).

Con relación a los parámetros, como el pH, el tiempo de floculación y el tiempo de velocidad, la Tabla 9 muestra que, en una sola etapa de agitación, a  $F1= 8$ ,  $F2$  mayor a 23min y  $F3= 10$ rpm es suficiente para lograr la adsorción del coagulante-floculante, lo que atrapa y recupera la biomasa por encima del 90%.

(Nayak et al., 2019) menciona que una de las ventajas del quitosano es la producción de flóculos más grandes que conduce a tiempos de sedimentación bajos. También sabemos que se reconoce el efecto del pH como un factor importante ya que el quitosano al ser un polisacárido catiónico con grupos amino cargados positivamente estos pueden adsorberse a la superficie de partículas coloidales en condiciones ácidas.

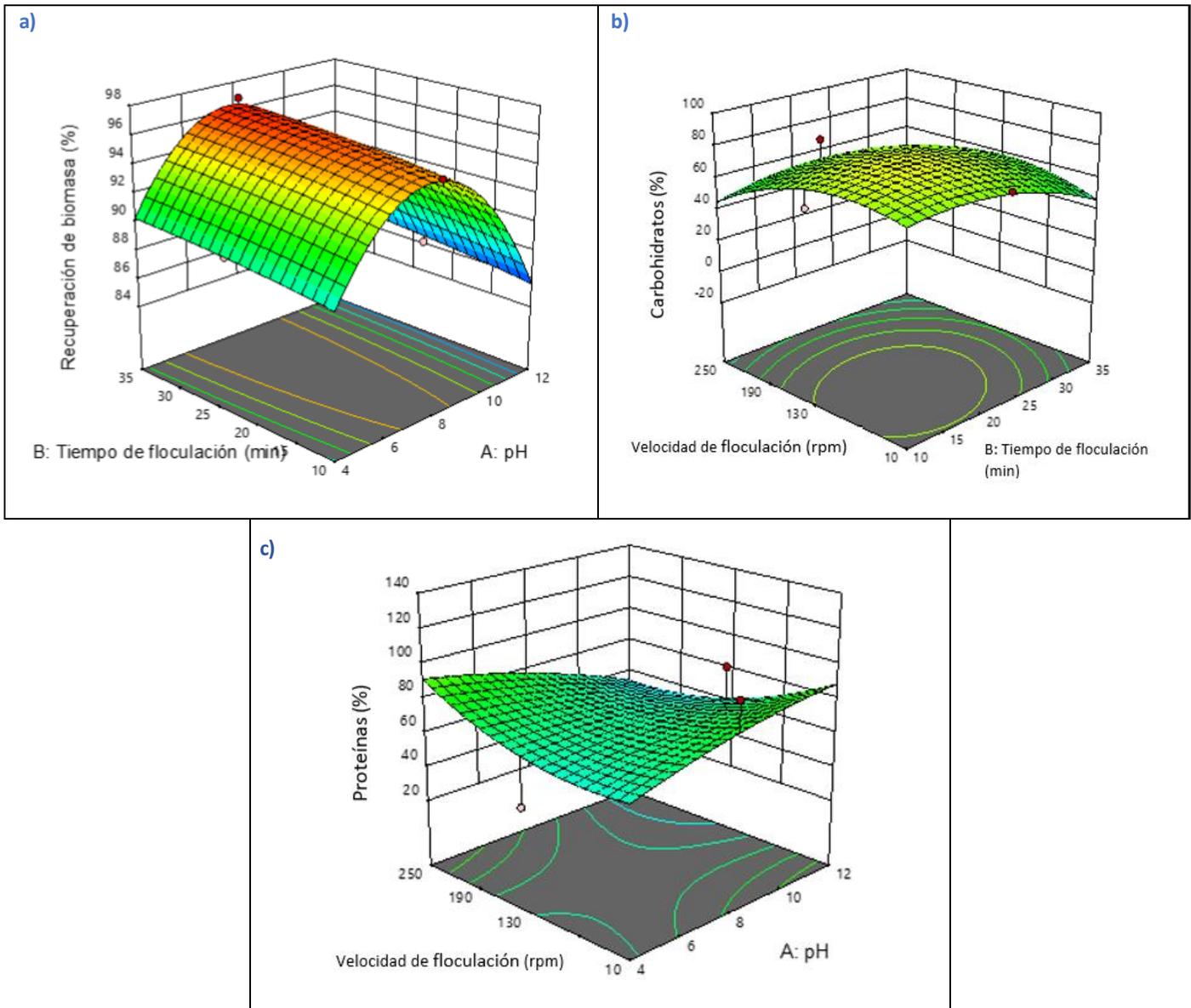
En este estudio también se observó que a bajas concentraciones de quitosano se obtuvieron mejores eficiencias. Esto dado que, el quitosano primero neutraliza la carga negativa de las células de microalgas y luego genera una carga positiva neta en los núcleos, que también actúan como agente quelante, a diferencia del mecanismo de neutralización de carga que tienen por ejemplo el  $FeCl_3$  y  $Al_2(SO_4)_3$ .

Por tal razón este coagulante-floculante orgánico requiere una menor dosis ya que de lo contrario se produciría una saturación de cargas positivas en la superficie de las células de algas, lo que provocaría una repulsión de estas (Nayak et al., 2019).

En cuanto a los porcentajes de recuperación de metabolitos, se observa en la Tabla 9 un aumento en la recuperación de proteínas en un rango del 35% al 90%, y en los carbohidratos el porcentaje de recuperación se encontró arriba del 92%. Esto podría deberse a la naturaleza del quitosano, el cual se deriva de crustáceos y conchas, que bajo condiciones ácidas libera una gran cantidad de grupos amino. Estos iones pueden neutralizar la electronegatividad de las células microalgales, aumentando así la sedimentación (Hadiyanto et al., 2022).

A continuación, se presentan los gráficos de superficie de respuestas generados para quitosano.

Figura 16. a) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de biomasa. b) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de carbohidratos. c) Efecto del pH, velocidad y tiempo de floculación utilizando quitosano para el porcentaje de recuperación de proteínas.



El análisis de varianza para el modelo cuadrático ANOVA del coagulante-floculante quitosano indicó un valor de  $p < 0.0001$  para biomasa, 0.0214 para carbohidratos y 0.9755 para proteínas, siendo este último, el más alto por lo que representa un valor significativo en la diferencia de tres factores: velocidad de floculación, tiempo de floculación y pH.

En la Figura 16 el software Design-Expert mostró que  $F1= 4$ ,  $F2= 10\text{min}$  y  $F3= 10\text{rpm}$  son la mejor combinación para un óptimo porcentaje en la recuperación de carbohidratos. Y finalmente en el caso de las proteínas, al igual que con los carbohidratos, se observó que, al disminuir la velocidad de floculación, el valor se incrementó en más del 90%.

### 3.2.3 BIOFLOCULACIÓN CON LEVADURA *Candida sp*

Para la biofloculación con levadura, en la primera etapa que fue la experimentación de jarras; mientras se encontraba la agitación constante, se observó una capa fina de biomasa microalgal al fondo de la jarra. Si bien no se observaron flocs de gran tamaño o una clara separación de la microalga y el sobrenadante, el tiempo en que la microalga comenzó a sedimentarse fue menor.



Figura 17. Equipo de jarras con biomasa microalgal más *Candida sp*.

Después del procedimiento de jarras; así como se realizó con todos los demás coagulantes-floculantes, se tomaron muestras del sobrenadante para la medición de la densidad óptica y así obtener el porcentaje de recuperación de biomasa. Seguido de esto; se montaron los fotobiorreactores con el co-cultivo de cada jarra como se observa a continuación de la Figura 18.



**Figura 18. Fotobiorreactores con co-cultivo (microalga-levadura-glucosa-agua residual) después de 24hrs.**

Pasadas al menos 24hrs desde que el co-cultivo microalga-levadura fue transferido a los fotobiorreactores de 1L, se observó el sobrecrecimiento de la levadura en el sistema Figura 18 y de igual forma se detectó una producción importante de bioetanol como subproducto. El cual se midió por medio de actividad enzimática obteniendo el valor más alto de  $10.205 \pm 1.488$  g/L de bioetanol. Esta medición y resultado fueron analizados para otro proyecto cuyo objetivo es realizar la continuación de esta investigación.

Esto se puede atribuir a todo un conjunto de condiciones. Romero et al. (2019) nos dice, en su tesis de maestría, que la asimilación de glucosa es principalmente influenciada por la cantidad que haya en el medio de esta, así como la fase de crecimiento en la que se encuentra la levadura. Dada la naturaleza silvestre de *Candida sp* y puesto que fue aislada de aguas residuales; así como el ayuno y tomándose en cuenta la fase exponencial en la que se encontraba al ser añadida, y aunado a esto, la temperatura del lugar donde se encontraban los fotobiorreactores, *Candida sp* pudo haber consumido rápidamente la fuente de carbono del medio, lo que se ve reflejado en la recuperación de metabolitos tales como proteínas y carbohidratos.

En esta segunda etapa se observó de igual forma la sedimentación de la biomasa; sin embargo, por el sobrecrecimiento de la levadura no se obtuvieron datos de densidad óptica que fueran comparables como los obtenidos de jarras.

A continuación, se presenta la Tabla 10 con los porcentajes de recuperación tanto de biomasa como metabolitos obtenidos después de la metodología de jarras.

Tabla 10. Condiciones experimentales y porcentajes de recuperación de biomasa microalgal y metabolitos con *Candida sp.*

<i>Candida sp.</i>							
					% DE RECUPERACIÓN		
Experimento	Vol. Levadura (mL)	Conc. Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	Velocidad de coagulación-floculación (rpm)	Tiempo de sedimentación (min)	BIOMASA	CARBOHIDRATOS	PROTEÍNAS
1	35	10	20	10	73.77 ± 0.136	> 90 ± 0.01	> 90 ± 0.05
				30	77.77 ± 0.084		
2	35	40		10	72.47 ± 0.117	> 90 ± 0.00	> 90 ± 0.09
				30	74.49 ± 0.095		
3	60	25		10	71.98 ± 0.116	> 90 ± 0.03	> 90 ± 0.29
				30	75.01 ± 0.078		
4	10	25		10	72.44 ± 0.129	> 90 ± 0.20	> 90 ± 0.09

				30	75.61 ± 0.089		
5	35	25	110	10	63.12 ± 0.196	> 90 ± 0.04	81 ± 0.12
				30	72.43 ± 0.077		
6	60	40		10	66.66 ± 0.107	> 90 ± 0.05	> 90 ± 0.28
				30	74.32 ± 0.026		
7	10	10		10	71.44 ± 0.072	> 90 ± 0.03	> 90 ± 0.37
				30	77.15 ± 0.024		
8	60	10		10	71.28 ± 0.055	> 90 ± 0.02	> 90 ± 0.46
				30	81.44 ± 0.036		
9	35	25		10	76.35 ± 0.036	> 90 ± 0.00	> 90 ± 0.06
				30	80.31 ± 0.008		
10	35	25	10	75.98 ± 0.008	> 90 ± 0.04	> 90 ± 0.22	
			30	79.51 ± 0.018			
11	10	40	10	68.18 ± 0.099	> 90 ± 0.02	> 90 ± 0.23	
			30	70.02 ± 0.0104			
12	35	10	200	10	47 ± 0.369	> 90 ± 0.04	> 90 ± 0.56
				30	72.89 ± 0.006		
13	60	25		10	50.29 ± 0.177	> 90 ± 0.05	> 90 ± 1.05
				30	66.63 ± 0.029		
14	35	40		10	67.36 ± 0.099	> 90 ± 0.01	96 ± 0.11
				30	73.84 ± 0.064		
15	10	25		10	69.82 ± 0.034	> 90 ± 0.07	> 90 ± 0.37
				30	71.46 ± 0.028		

De acuerdo con lo reportado en la Tabla 10, el volumen de levadura de 60mL, concentración de glucosa 10g/L, velocidad de 110rpm y tiempo de sedimentación de 30min, son los parámetros que permiten alcanzar un porcentaje de recuperación de biomasa significativo (81.44% ± 0.036). Sin embargo, también observamos un porcentaje de 80.31% ± 0.008 que es prometedor ya que se realizó por triplicado y que podría darnos un indicio de que, al no haber desviaciones significativas, los parámetros correspondientes de F1= 35mL, F2= 25g y F3= 110rpm serían ideales para su réplica.

Se obtuvo el porcentaje de recuperación de biomasa promedio de 71.37 ± 8.39% con levadura. Si bien los porcentajes de recuperación de biomasa con *Candida sp* se encuentran más despegados a los reportados con otras cepas como W01

*Solibacillus silvestris* y *Aspergillus oryzae* de 90 y casi 100% (Wan et al., 2013; Zhou et al., 2013); hemos de mencionar que aún no hay parámetros directamente comparables con la levadura empleada en este estudio, ni con este tipo de consorcio microalgal.

Por lo que es importante recordar que cada dato reportado en la literatura varía según la dosis del coagulante-floculante, así como de la especie de microalga utilizada en el proceso.

Aún no se comprenden completamente los mecanismos exactos de las interacciones entre algas y hongos. Sin embargo, se sugiere que, debido a la presencia de grupos funcionales carboxílicos, fosfóricos, fosfodiéstericos, hidroxilo y amina la carga superficial de las algas es negativa; así mismo, se indica que las micelias fúngicas, ricas en polisacáridos, poseen una carga positiva, lo que podría neutralizar las cargas negativas en la superficie de las algas y facilitar la unión a la pared celular del hongo. (Ummalyma et al., 2017). De igual forma, en otros estudios se ha reportado la existencia de un simporte celular en la levadura a diferentes concentraciones de glucosa, esto se traduce a que la levadura se protona y por consiguiente neutralice la carga negativa de la microalga lo que provoca la sedimentación (Romero Enrique, 2019).

En un estudio realizado por Zhou et al., 2013 se reporta el descubrimiento de algunas especies de algas que pueden establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos como hongos filamentosos. En esta simbiosis, las algas son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> mediante la fotosíntesis, produciendo compuestos orgánicos que promueven el crecimiento de los hongos filamentosos. A su vez, estos hongos pueden atrapar a las algas mediante la producción de hifas fúngicas, como en el caso típico del líquen. Por lo tanto, se sugiere que estas cepas fúngicas podrían atrapar células microalgales y formar pellets de hongos-algas, facilitando la cosecha eficiente de la biomasa microalgal. Sin embargo, Zhou reitera la falta de información sobre investigaciones en esta área, especialmente en lo que respecta a la cosecha de microalgas utilizando hongos filamentosos.

Diferentes estudios como los de Chatsungnoen & Chisti, 2016 reportan el proceso de cosechado por medio de la biofloculación en al menos 2 pasos. El primer paso

se da con la adición de los hongos-levaduras, así como una fuente de carbono al sistema de microalga y dejar este co-cultivo por un tiempo con una determinada velocidad de agitación, finalmente en el segundo paso se observa la formación de pellets microalga-hongo y finalmente se procede al cosechado. La biofloculación a diferencia de los coagulantes-floculantes de sales metálicas, utiliza floculantes poliméricos producidos por varios microorganismos para flocular una suspensión de algas. Este proceso puede llevarse a cabo in situ mediante la cocultura de microorganismos productores de floculantes con algas, siempre que la especie contaminante sea aceptable (Chatsungnoen & Chisti, 2016).

Sin embargo, en este estudio se observó que, al utilizar el método de jarras, todo el proceso puede llevarse a cabo en una sola etapa. Es decir, se tiene el cosechado de la microalga-levadura pasado solo un tiempo de sedimentación después de aplicar un tiempo y velocidad de floculación en el equipo y finalmente si se quisiera continuar con la producción de bioetanol; sólo se dejaría un periodo de al menos 24hrs de cultivación para sobrecrecer la levadura y obtener este bioproducto.

En cuanto a *Candida sp*, se observó una recuperación de carbohidratos de más del 90% y en proteínas arriba del 81%; estos porcentajes se presentan en la Tabla 10.

En breve se presentan los gráficos de superficie de respuesta representados en la Figura 19.

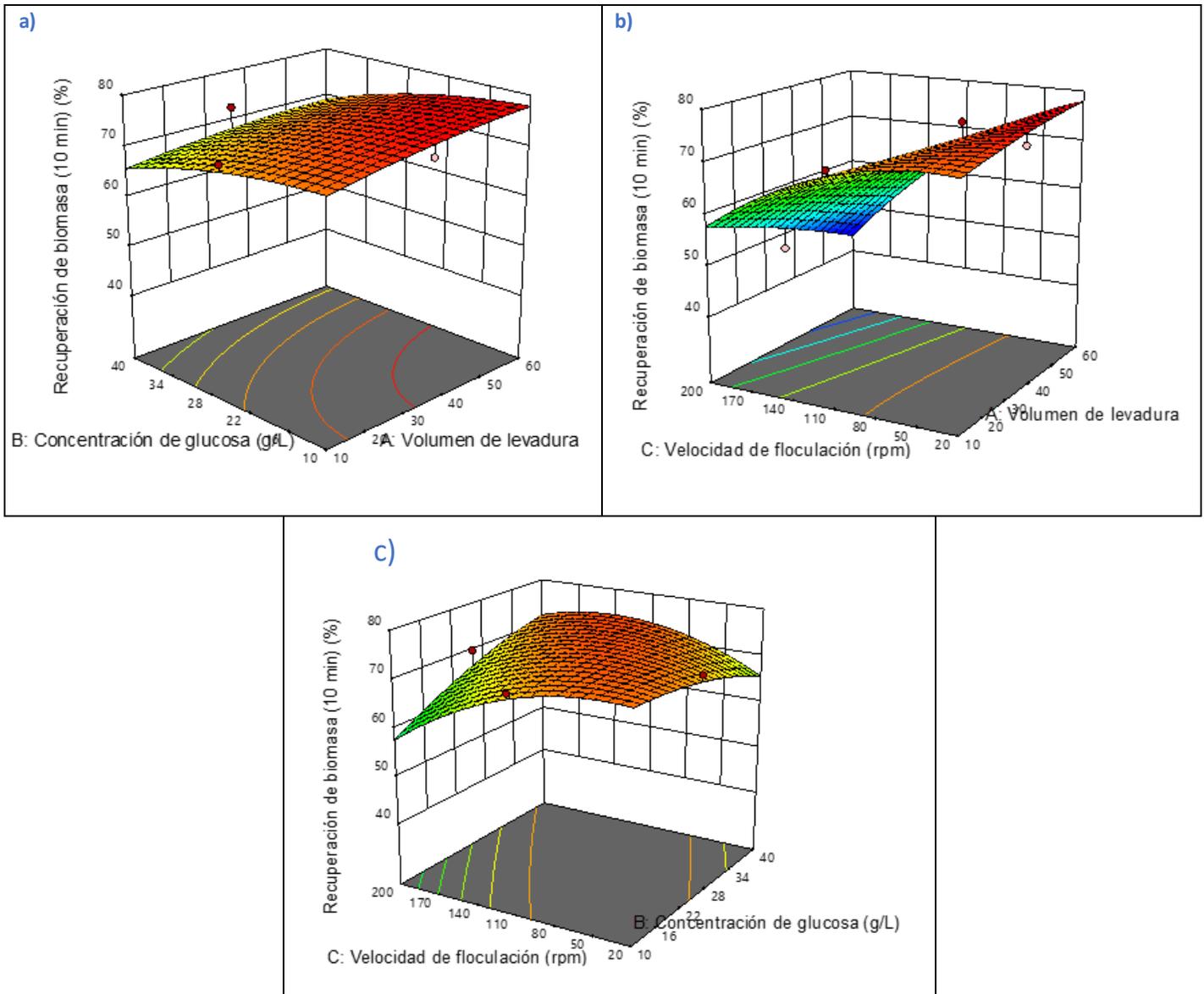


Figura 19. a) Efecto de la velocidad de floculación a 20rpm, concentración de glucosa y volumen de levadura para el porcentaje de recuperación de biomasa con *Candida sp.* b) Efecto de la concentración de glucosa a 10g L<sup>-1</sup>, velocidad de floculación y volumen de levadura para el porcentaje de recuperación de biomasa con *Candida sp.* c) Efecto del volumen de levadura a 10mL, velocidad de floculación y concentración de glucosa para el porcentaje de recuperación de biomasa con *Candida sp.*

A continuación, se analizaron las superficies de respuesta con levadura, las cuales arrojan que la fusión un volumen de 35mL de levadura, 10g de glucosa y 20rpm son la proyección óptima para el proceso de jarras con *Candida sp.*

Como podemos observar en la Figura 19; todas las variables F1, F2 y F3 se compararon contra el porcentaje de recuperación de biomasa, ya que como se comentó antes, de esta metodología no hay datos reportados por lo que esto solo fue en escaneo para buscar establecer parámetros que rijan el proceso de biofloculación con *Candida sp.*

El análisis de varianza para el modelo cuadrático ANOVA nos arrojó un valor de p de 0.8096 para la recuperación de biomasa.

En la Tabla 10 se observa que bajo los parámetros de 35mL de levadura *Candida sp.*, 25g/L de glucosa y una velocidad de 110rpm se alcanza un porcentaje de recuperación de hasta un 80% lo que indicaría una cantidad no tan grande de glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, vemos que la mejor combinación que sugieren los gráficos de superficies de respuesta es para volumen de levadura F1= 35mL, concentración de glucosa F2= 10g/L y velocidad de floculación F3= 20rpm

Hemos de mencionar que otra característica importante de la biofloculación es la velocidad de agitación, así como la concentración de glucosa en la mezcla para la adhesión de células, Leng et al., 2021 reporta que estos parámetros son cruciales para la formación de aglomerados. De tal forma que en su estudio menciona que a medida que aumenta la velocidad de agitación, la morfología de los pellets se volvía más compacta, más pequeña y suave. Por lo que las células microalgales capturadas son adsorbidas principalmente en la superficie de las hifas. Por otro lado, también menciona algunas otras investigaciones que reportan mejorar porcentajes de recuperación a velocidades bajas de agitación; de tal forma que este parámetro depende mucho de las condiciones y especies con las que se trabaje.

A su vez autores como Leng et al., 2021 y Zhou et al., 2013 mencionan que una buena concentración de glucosa como fuente de carbono son 10g/L, lo que corrobora el dato obtenido por el método de superficie de respuesta.

A continuación, en la Tabla 11 se muestran los resultados resumidos obtenidos tanto de la parte experimental como los obtenidos por el software Desgin-Expert.

Tabla 11 Cuadro comparativo de los resultados obtenidos experimentalmente como los obtenidos con el software Design-Expert

		FASE 1				FASE 2			FASE DE SEDIMENTACIÓN
Coagulante-floculante	pH	t Coagulación (min)	V. Coagulación (rpm)	Dosis coagulante-floculante (mg/L)	t Floculación (min)	V. Floculación (rpm)	t sedimentación (min)	% de Recuperación	
FeCl <sub>3</sub>	4	1	120	72	20	35	30	99.60 ± 0.000	
FeCl <sub>3</sub> valores óptimos obtenidos de Design-Expert	4				10	30			
Al <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8	1	200	180	20	20	30	93.33 ± 0.001	
Al <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> valores óptimos obtenidos de Design-Expert	12				30	20			
Quitosano	8			10	20	150	20	96.79 ± 0.026	
Quitosano valores óptimos obtenidos de Design-Expert	4				10	10			
LEVADURA	pH	Concentración de levadura (g L-1)	Concentración de glucosa (g L-1)	t coagulación-floculación (min)	V coagulación-floculación (rpm)	t sedimentación (min)	% de Recuperación		
Candida sp	7	60	10	30	110	30	81.44 ± 0.036		
Candida sp valores óptimos obtenidos de Design-Expert		35	10		20				

## CONCLUSIONES

De manera general, podemos concluir con este estudio que; existen coagulantes-floculantes de diferente naturaleza que en condiciones establecidas pueden ser comparadas bajo una misma metodología.

Los coagulantes-floculantes inorgánicos o al menos que contienen sales metálicas tienden a dejar remanentes en la biomasa lo que interfiere en la caracterización de dicha biomasa.

El uso de la metodología por superficie de respuesta es una herramienta estadística e innovadora que nos ayuda a realizar predicciones y generar diseños experimentales sustentados con condiciones probadas y reportadas en la literatura. Lo que nos ayudó a simplificar y encontrar parámetros óptimos para diferentes coagulantes-floculantes.

Los porcentajes de recuperación de biomasa más altos se reportaron para los coagulantes inorgánicos como  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . Sin embargo, estos coagulantes-floculantes implican un costo extra para la remoción de sus precipitados.

Se realizó un scanner para el proceso de biofloculación donde se encontraron las condiciones óptimas de *Candida sp*, para reportar por primera vez en la literatura.

La biofloculación se puede llevar a cabo en 1 etapa y además se puede hacer simultáneamente la cosecha de biomasa junto con la producción de bioetanol incluso sin haber ruptura celular.

Gracias a los porcentajes de recuperación obtenidos en el proceso de biofloculación, podemos concluir que el volumen de levadura empleado es independiente al porcentaje de biomasa recuperada. Es decir, no por mayor volumen, se recuperará un mayor porcentaje.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A. L., Mat Yasin, N. H., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879–882. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.070>
- Castillejos Salazar, A. E. H. M. M. V. A. P. M. K. S. R. A. M. (2010). *Enciclopedia de conocimientos fundamentales*.
- Chatsungnoen, T., & Chisti, Y. (2016). Harvesting microalgae by flocculation-sedimentation. *Algal Research*, 13, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.009>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Gao, S., Yang, J., Tian, J., Ma, F., Tu, G., & Du, M. (2010). Electro-coagulation-flotation process for algae removal. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.037>
- Gao, Z., Jiang, C., Lyu, R., Yang, Z., & Zhang, T. (2020). *Optimization of the preparation of fungal-algal pellets for use in the remediation of arsenic-contaminated water*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09757-2/Published>
- Ghazvini, M., Kavosi, M., Sharma, R., & Kim, M. (2022). A review on mechanical-based microalgae harvesting methods for biofuel production. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 158). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106348>
- Hadiyanto, H., Widayat, W., Christwardana, M., & Pratiwi, M. E. (2022). The flocculation process of *Chlorella* sp. using chitosan as a bio-flocculant: Optimization of operating conditions by response surface methodology. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100291>
- Kuzhiumparambil, U., Labeeuw, L., Commault, A., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Ralph, P. J., & Nghiem, L. D. (2022). Effects of harvesting on morphological and biochemical characteristics of microalgal biomass harvested by polyacrylamide addition, pH-induced flocculation, and centrifugation. *Bioresource Technology*, 359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127433>
- Leng, L., Li, W., Chen, J., Leng, S., Chen, J., Wei, L., Peng, H., Li, J., Zhou, W., & Huang, H. (2021). Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 330). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125008>
- Li, S., Hu, T., Xu, Y., Wang, J., Chu, R., Yin, Z., Mo, F., & Zhu, L. (2020a). A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 131). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110005>
- Li, S., Hu, T., Xu, Y., Wang, J., Chu, R., Yin, Z., Mo, F., & Zhu, L. (2020b). A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 131). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110005>

- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. (2007). A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3415–3423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.028>
- Ma, W., Feng, C., Guan, F., Ma, D., & Cai, J. (2023). Effective *Chlorella vulgaris* Biomass Harvesting through Sulfate and Chloride Flocculants. *Journal of Marine Science and Engineering*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/jmse11010047>
- Mexicana, N. (2015). *SECRETARÍA DE ECONOMÍA WATER ANALYSIS-MEASUREMENT OF SALTS AND SOLIDS DISSOLVED IN NATURAL WATER, WASTEWATERS AND TREATED WASTEWATERS-TEST METHOD*.
- Mohd Yunus, F. H., Nasir, N. M., Wan Jusoh, H. H., Khatoon, H., Lam, S. S., & Jusoh, A. (2017). Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *124*, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.07.016>
- Mubarak, M., Shaija, A., & Suchithra, T. V. (2020). Evaluation of ferric chloride and electroflocculation of *Chlorella pyrenoidosa* and reuse of the culture medium for subsequent cultures. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103612>
- Narayanan, M. (2024). Biorefinery products from algal biomass by advanced biotechnological and hydrothermal liquefaction approaches. In *Discover Applied Sciences* (Vol. 6, Issue 4). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s42452-024-05777-6>
- Nayak, M., Rashid, N., Suh, W. I., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Performance evaluation of different cationic flocculants through pH modulation for efficient harvesting of *Chlorella* sp. HS2 and their impact on water reusability. *Renewable Energy*, *136*, 819–827. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.050>
- Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>
- Oliveira, G. A., Carissimi, E., Monje-Ramírez, I., Velasquez-Orta, S. B., Rodrigues, R. T., & Ledesma, M. T. O. (2018). Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond. *Bioresource Technology*, *259*, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.072>
- Pereira, A. S. A. de P., Silva, T. A. da, Magalhães, I. B., Ferreira, J., Braga, M. Q., Lorentz, J. F., Assemany, P. P., Couto, E. de A. do, & Calijuri, M. L. (2024). Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies. In *Science of the Total Environment* (Vol. 920). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170918>
- Rashid, N., Park, W. K., & Selvaratnam, T. (2018). Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and

- bioflocculation. In *Chemosphere* (Vol. 194, pp. 67–75). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.108>
- Reyes, J. F., & Labra, C. (2016). Biomass harvesting and concentration of microalgae *scenedesmus* sp. cultivated in a pilot photobioreactor. *Biomass and Bioenergy*, *87*, 78–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.02.014>
- Romero Enrique. (2019). *TESIS DE MAESTRÍA-ENRIQUEROMERO(BIO-FLOCULACIÓN)*.
- Sanyano, N., Chetpattananondh, P., & Chongkhong, S. (2013). Coagulation-flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *147*, 471–476.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.080>
- Tripathi, G., Dubey, P., Shamim, A., Farooqui, A., & Mishra, V. (2024). Bio-flocculation: A cost effective and energy efficient harvesting technique for algal biofuel production and wastewater treatment. In *Bioresource Technology Reports* (Vol. 28). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101969>
- Ummalyma, S. B., Gnansounou, E., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Pandey, A., & Sahoo, D. (2017). Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. *Bioresource Technology*, *242*, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.097>
- Uzun, H., Ibanoglu, E., Catal, H., & Ibanoglu, S. (2012). Effects of ozone on functional properties of proteins. *Food Chemistry*, *134*(2), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.146>
- Vu, H. P., Nguyen, L. N., Lesage, G., & Nghiem, L. D. (2020). Synergistic effect of dual flocculation between inorganic salts and chitosan on harvesting microalgae *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology and Innovation*, *17*. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100622>
- Wan, C., Alam, M. A., Zhao, X. Q., Zhang, X. Y., Guo, S. L., Ho, S. H., Chang, J. S., & Bai, F. W. (2015). Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. In *Bioresource Technology* (Vol. 184, pp. 251–257). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.081>
- Wan, C., Zhao, X. Q., Guo, S. L., Asrafal Alam, M., & Bai, F. W. (2013). Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. *Bioresource Technology*, *135*, 207–212.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.004>
- Yin, Z., Chu, R., Zhu, L., Li, S., Mo, F., Hu, D., & Liu, C. (2021). Application of chitosan-based flocculants to harvest microalgal biomass for biofuel production: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 145). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111159>
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Hu, D., Liu, C., & Li, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. In *Bioresource Technology* (Vol. 301). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>

- Zhang, J., & Hu, B. (2012). A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. *Bioresource Technology*, *114*, 529–535.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.054>
- Zhou, W., Min, M., Hu, B., Ma, X., Liu, Y., Wang, Q., Shi, J., Chen, P., & Ruan, R. (2013). Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Separation and Purification Technology*, *107*, 158–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.030>
- Zhou, W., Min, M., Li, Y., Hu, B., Ma, X., Cheng, Y., Liu, Y., Chen, P., & Ruan, R. (2012). A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*, *110*, 448–455.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.063>
- Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. (2018). Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>