



**Evaluación de métodos y secuencia de recolección y rompimiento celular en un cultivo microalgal de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.**

**Edgar David Africano Camargo**

11992118829

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Maestría en Ingeniería de Bioprocesos

Facultad de Ingeniería Ambiental y Civil

Bogotá, Colombia

2022



**Evaluación de métodos y secuencia de recolección y rompimiento celular en un cultivo microalgal de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.**

**Edgar David Africano Camargo**

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ingeniería de Bioprocesos**

Director:

Juan Daniel Valderrama Rincón PhD.

Línea de Investigación:

Ingeniería de bioprocesos

Grupo de Investigación:

GRESIA

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Maestría Ingeniería de Bioprocesos

Facultad de Ingeniería Ambiental y Civil

Bogotá, Colombia

2022



## NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado

\_\_\_\_\_.

Cumple con los requisitos para optar

Al título de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Firma del Tutor

\_\_\_\_\_

Firma Jurado

\_\_\_\_\_

Firma Jurado

Ciudad, Día Mes Año.

# Contenido

Pág.

Preliminares.....	XIV
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Objetivos .....	5
Objetivo General .....	5
Objetivos específicos .....	5
Marco Conceptual.....	6
2.1    Uso de microalgas como fuente de biomasa y biocombustibles .....	6
2.2    Pared celular y generación de lípidos en microalgas .....	7
2.2.1    Pared celular en microalgas.....	7
2.2.2    Generación de lípidos en microalgas .....	9
2.3    Recolección celular .....	10
2.3.1    Sedimentación gravitacional.....	11
2.3.2    Modificación pH .....	12
2.3.3    Adición sales.....	12
2.3.4    Coagulación.....	12
2.3.5    Electrocoagulación.....	13
2.4    Ruptura celular .....	14
2.4.1    Microondas.....	16
2.4.2    Baño de agua .....	17
2.4.3    Rompimiento por agitación .....	17
2.4.4    Ultrasonicación .....	17
2.4.5    Aplicación de corriente eléctrica .....	17
2.4.6    Fenton .....	18
2.4.7    Electro-Fenton .....	20
2.4.8    Digestión Enzimática .....	20
2.4.9    Choque osmótico.....	21
2.5    Recuperación de lípidos .....	21
2.6    Valorizaciones corrientes alternas .....	26
2.6.1    Digestión anaerobia .....	27

2.6.2	Reutilización medio de cultivo .....	29
2.7	Estado del arte .....	30
2.7.1	Concentración celular .....	30
2.7.2	Rompimiento celular .....	34
2.7.3	Valorización .....	39
2.8	Análisis alternativas recolección y rompimiento celular y valorización corrientes alternas .....	43
<b>Metodología .....</b>		<b>46</b>
3.1	Biorreactor .....	46
3.1.1	Cepa usada y medio de cultivo .....	46
3.1.2	Biorreactor .....	46
3.2	Concentración celular .....	47
3.2.1	Sedimentación gravitacional.....	47
3.2.2	Modificación de pH .....	47
3.2.3	Adición de sales inorgánicas .....	47
3.2.4	Coagulación.....	47
3.2.5	Electrocoagulación.....	48
3.3	Rompimiento celular .....	49
3.3.1	Microalgas concentradas .....	49
3.3.2	Ultrasonicación .....	49
3.3.3	Aplicación corriente eléctrica .....	49
3.3.4	Fenton .....	50
3.3.5	Electro-Fenton .....	50
3.3.6	Choque osmótico.....	51
3.4	Extracción de lípidos.....	52
3.5	Valorización corrientes alternas .....	52
3.5.1	Reutilización medio de cultivo.....	52
3.5.2	Producción de metano .....	53
<b>Resultados y Discusión .....</b>		<b>54</b>
4.1	Biorreactor .....	54
4.2	Concentración celular .....	56
4.2.1	Sedimentación gravitacional.....	56
4.2.2	Modificación de pH .....	56
4.2.3	Adición de sales inorgánicas .....	58
4.2.4	Coagulación.....	58
4.2.5	Electrocoagulación.....	59
4.2.6	Comparación de métodos análisis técnico .....	61
4.2.7	Comparación de métodos análisis económico .....	66
4.2.8	Comparación de métodos análisis de seguridad sustancias químicas .....	68
4.2.9	Selección método de recolección celular .....	69
4.3	Rompimiento celular .....	72
4.3.1	Microalgas concentradas .....	72
4.3.2	Ultrasonicación .....	72

4.3.3	Aplicación corriente eléctrica de alto voltaje .....	73
4.3.4	Fenton .....	74
4.3.5	Electro-Fenton .....	74
4.3.6	Choque osmótico.....	76
4.4	Extracción de lípidos.....	76
4.5	Selección método de rompimiento celular .....	81
4.5.1	Análisis técnico.....	81
4.5.2	Análisis de seguridad por sustancias químicas .....	82
4.5.3	Análisis económico.....	84
4.5.4	Selección método.....	86
4.6	Valorización corrientes alternas .....	88
4.6.1	Reutilización medio de cultivo.....	88
4.6.2	Producción de metano .....	93
4.7	Secuencia de operaciones.....	95
<b>Conclusiones y Recomendaciones.....</b>		<b>98</b>
5.1	Conclusiones .....	98
5.2	Recomendaciones .....	98
<b>Anexos .....</b>		<b>103</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>		<b>105</b>
<b>Artículo relacionado .....</b>		<b>125</b>



## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura y composición de la pared celular microalgal.....	8
<b>Figura 2.</b> Proceso fotosintético simplificado con tres posibles rutas metabólicas para la formación de triacilglicerol. ....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema electrocoagulación flotación .....	14
<b>Figura 4.</b> Peroxidación de lípidos .....	19
<b>Figura 5.</b> Montaje proceso Electro-Fenton. ....	20
<b>Figura 6.</b> Hidrólisis ácida y alcalina combinada con transesterificación para obtención de biodiesel .....	22
<b>Figura 7.</b> Proceso de obtención de carotenoides y lípidos a partir de microalgas por extracción supercrítica. ....	23
<b>Figura 8.</b> Extracción líquido -líquido de lípidos. ....	23
<b>Figura 9.</b> Mezcla por ultrasonido con recuperación posterior de solventes. ....	24
<b>Figura 10.</b> Extracción por Soxhlet. ....	24
<b>Figura 11.</b> Método Folch.....	24
<b>Figura 12.</b> Método Bligh y Dyer.....	25
<b>Figura 13.</b> Diferentes productos obtenidos a partir de microalgas posterior a la extracción de lípidos.....	27
<b>Figura 14.</b> Ruta de reacción digestión anaeróbica de sustancias orgánicas poliméricas.....	28
<b>Figura 15.</b> Fotobiorreactores usados para el cultivo de microalgas. Izq. Reactor tipo carrera. ....	29
<b>Figura 16.</b> Proceso de electrocoagulación llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. ....	31
<b>Figura 17.</b> Proceso de rompimiento celular llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. ....	36
<b>Figura 18.</b> Proceso de obtención de bioestimulantes llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. ....	42
<b>Figura 19.</b> Diagrama general de la obtención de componentes de interés a partir de microalgas y valorización de residuos.....	43
<b>Figura 20.</b> Esquema de montaje proceso electrocoagulación a nivel experimental.....	48
<b>Figura 21.</b> Esquema cámara de pulsos eléctricos.....	50
<b>Figura 22.</b> Esquema montaje Electrofonton. ....	51
<b>Figura 23.</b> Dispositivo medición de biogás por desplazamiento de líquido.. ....	53
<b>Figura 24.</b> Curva de crecimiento biomasa (OD 675nm) vs tiempo (días) en fotobiorreactores .....	54
<b>Figura 25.</b> Fotobiorreactores microalgas en fase estacionaria de crecimiento.....	54
<b>Figura 26.</b> Cultivo microalgal visto por microscopio .....	55
<b>Figura 27.</b> Curva de calibración SSV (mg/L) vs absorbancia.....	55
<b>Figura 28.</b> Curva Absorbancia sobrenadante vs tiempo de los diferentes métodos de concentración celular .....	60
<b>Figura 29.</b> Perfil de porcentaje de remoción para los métodos de concentración celular .....	61
<b>Figura 30.</b> Perfil porcentaje de remoción de los diferentes métodos de recolección celular con corte a 400 minutos. ....	62
<b>Figura 31.</b> Tiempo para alcanzar un porcentaje de remoción del 30% y 70% de cada método.....	62
<b>Figura 32.</b> Etapa inicial de los ensayos de cada método de recolección celular exceptuando los de electrocoagulación .....	63
<b>Figura 33.</b> Resultado final típico ensayo de recolección celular, exceptuando electrocoagulación	63

<b>Figura 34.</b> Ensayo electrocoagulación etapa inicial y final del ensayo.....	64
<b>Figura 35.</b> Observaciones al microscopio de las microalgas posterior a los diferentes métodos de concentración celular. ....	64
<b>Figura 36.</b> Ensayo de sólidos volátiles para las muestras de los diferentes ensayos de concentración celular.. ....	65
<b>Figura 37.</b> Utilidad, ingresos y costos operacionales de cada método de recolección celular.....	67
<b>Figura 38.</b> Determinación del voltaje generado por el módulo de alto voltaje. ....	73
<b>Figura 39.</b> Montaje ensayo de pulsos eléctricos. ....	73
<b>Figura 40.</b> Corroboración de la formación de peróxido de hidrógeno en el montaje de electro-Fenton usando electrodos de no sacrificio (grafito).....	75
<b>Figura 41.</b> Ensayo típico de cuantificación de lípidos. ....	77
<b>Figura 42.</b> Porcentaje de extracción de lípidos de cada uno de los métodos de rompimiento celular evaluado. ....	77
<b>Figura 43.</b> Utilidad, ingresos y costos operacionales cada método de rompimiento celular .....	85
<b>Figura 44.</b> Precipitación de óxidos de hierro por cambio de pH del sobrenadante.....	88
<b>Figura 45.</b> Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Izq. Usando el sobrenadante del proceso de electrocoagulación. ....	88
<b>Figura 46.</b> Crecimiento de microalgas en los 3 reactores usando medio de cultivo reciclado y reactor control con medio fresco.....	89
<b>Figura 47.</b> Alícuotas de los cultivos de microalgas con medio sobrenadante y con medio fresco.. ....	90
<b>Figura 48.</b> Placas cultivo de microalgas en diferentes cultivos. ....	91
<b>Figura 49.</b> Placas prueba coliformes totales.....	92
<b>Figura 50.</b> Generación de metano en cada ensayo de la corriente alterna proceso de electrocoagulación a pH 8,2 y pH 7,38. ....	93
<b>Figura 51.</b> Diagrama concentración y rompimiento celular planteado. ....	96
<b>Figura 52.</b> Comparación secuencia propuesta y microalgas sin tratar .....	96

## Lista de tablas

**Pág.**

<b>Tabla 1:</b> Composición de pared celular de diferentes cepas de los géneros <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> .....	8
<b>Tabla 2:</b> Diferentes métodos de recolección celular. Basado en las referencias bibliográficas mencionadas.....	10
<b>Tabla 3:</b> Reacción en agua pura proceso de electrolisis .....	13
<b>Tabla 4:</b> Reacción de formación hidroxocomplejos.....	14
<b>Tabla 5:</b> Diferentes métodos para llevar a cabo el rompimiento celular. Información tomada y adaptada de las referencias bibliográficas mencionadas en la tabla.....	15
<b>Tabla 6:</b> Pasos reacción Fenton.....	18
<b>Tabla 7:</b> Pasos peroxidación de lípidos.....	19
<b>Tabla 8:</b> Diferentes procesos para la obtención de lípidos.....	22
<b>Tabla 9:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	30
<b>Tabla 10:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	31
<b>Tabla 11:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	32
<b>Tabla 12:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	34
<b>Tabla 13:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	35
<b>Tabla 14:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	36
<b>Tabla 15:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	37
<b>Tabla 16:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	38
<b>Tabla 17:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	39
<b>Tabla 18:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	40
<b>Tabla 19:</b> Parámetros usados en la investigación citada.....	41
<b>Tabla 20:</b> Resultados obtenidos en la investigación citada.....	42
<b>Tabla 21:</b> Resultado de ensayos de concentración celular .....	65
<b>Tabla 22:</b> Riesgo asociado a las sustancias químicas de cada método de recolección celular.....	69
<b>Tabla 23:</b> Normalización valores porcentaje de remoción.....	70
<b>Tabla 24:</b> Normalización valores utilidad operacional .....	70
<b>Tabla 25:</b> Puntaje de cada método de recolección celular .....	71
<b>Tabla 26:</b> Porcentaje de lípidos extraídos obtenidos por cada método de rompimiento celular .....	78
<b>Tabla 27:</b> Normalización métodos de rompimiento celular a través de su porcentaje de extracción de lípidos.....	82
<b>Tabla 28:</b> Riesgo asociado a las sustancias químicas de cada método de ruptura celular.....	83
<b>Tabla 29:</b> Normalización valores utilidad operacional .....	86
<b>Tabla 30:</b> Puntaje métodos de rompimiento celular.....	87
<b>Tabla 31:</b> Coliformes totales medio recirculado y medio fresco .....	92
<b>Tabla 32:</b> Parámetros agua sobrenadante proceso de electrocoagulación antes y después digestión anaeróbica a diferentes valores de pH.....	93
<b>Tabla 33:</b> Síntesis proceso de recolección y rompimiento celular planteado.....	95
<b>Tabla 34:</b> Comparación de variables microalgas sin tratar y con secuencia de operaciones .....	97

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
<b>atm</b>	Atmosfera	atm	Ec.1
<b>C</b>	Concentración final biomasa en el volumen recuperado	mg/L	Sección 4.2.6
<b>F</b>	Valor de venta microalgas	USD/mg	Sección 4.2.6
<b>G</b>	Fuerza G	rcf	Sección 3.2
<b>i</b>	Factor adimensional de Van't Hoff,	-	Sección 2.4
<b>I</b>	Corriente eléctrica	A	Sección 4.2.6
<b>J</b>	Costo sustancia usada	USD/mg	Sección 4.2.6
<b>M</b>	Concentración molar	mol/L	Sección 2.4
<b>N</b>	Cantidad sustancia usada en la operación	mg	Sección 4.2.6
<b>P</b>	Extracción de lípidos por peso microalga	mg/mg	Sección 4.5.3
<b>Pa</b>	Pascal	kg/ms <sup>2</sup>	Ec. 1
<b>R</b>	Constante universal de gases	molL/atmK	Sección 2.4
<b>S</b>	Costo kWh	USD/kWh	Sección 4.2.6
<b>t</b>	Tiempo duración operación de concentración	h	Sección 4.2.6
<b>T</b>	Temperatura	K	Sección 2.4
<b>t1</b>	Tiempo duración electrolisis	h	Sección 4.2.6
<b>V</b>	Voltaje	V	Sección 4.2.6
<b>V</b>	Volumen recuperado de células concentradas	L	Sección 4.2.6
<b>W</b>	watts	W	Sección 4.5.3

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
$\pi$	Presión osmótica	atm	Ec. 1

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACP	Proteína transportadora de acetil
BG	Azul verde ( <i>Blue Green</i> )
BWLL	Agua residual bioquímica de lixiviado de vertedero
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQO	Demanda Química de Oxígeno

**Abreviatura    Término**

---

FAME	Esteres metílicos de ácidos grasos
FBR	Fotobiorreactor
FS	puntaje área seguridad
FT	puntaje área técnica
FU	puntaje área utilidad operacional
KTM-A	Medio <i>Kolkwitz A</i>
LAB	Bacterias de ácido láctico
LB	Luria -Bertani
NRS	Especies sin radicales
OD	Densidad óptica
PEF	Campo eléctrico por pulsos
pH	Potencial de hidrogeno
PLA	Ácido poliláctico
RPM	Revoluciones por minuto
TAG	Triacilglicerol
SSV	Solidos volátiles
UFC	Unidad formadora de colonias

## **Preliminares**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecerle a mi familia por su constante apoyo y soporte durante la realización de la maestría, a la Universidad Antonio Nariño, al grupo de investigación GRESIA, a sus profesores, pasantes y en especial al supervisor de este proyecto, el profesor Juan Daniel Valderrama Rincón por su permanente orientación y retroalimentación en el desarrollo de este.





## Resumen

Se evaluó una secuencia de operaciones para la concentración y el rompimiento celular de un cultivo de microalgas compuesto de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. Para esto se hizo el crecimiento de biomasa en fotobiorreactores de 20 L. En estado estacionario se tomó esta biomasa y se evaluaron ocho operaciones para la concentración de esta biomasa (Sedimentación gravitacional, modulación pH, adición de sal, floculación con sal de hierro y de aluminio, electrocoagulación con electrodos de hierro y de aluminio). Efectuadas estas operaciones, se analizó desde el aspecto técnico, económico y de riesgo ocupacional el mejor proceso de concentración celular.

Para el rompimiento celular se evaluaron seis métodos (Ultrasonificación alto voltaje, Fenton, electro Fenton usando Fe como ánodo de sacrificio, adicionando  $\text{FeSO}_4$  y electrodos grafito y choque osmótico). De estos métodos la ultrasonificación fue usada como método de control positivo. Aplicados estos métodos de ruptura a las microalgas concentradas, de manera análoga a la etapa de concentración celular, se seleccionó el mejor proceso de rompimiento celular.

Del proceso de concentración y rompimiento celular sale una corriente de interés y una corriente de residuos, la segunda se valorizó por dos procesos: su reutilización para el crecimiento de microalgas en un biorreactor y la producción de metano por digestión anaerobia de este.

Con la evaluación de las operaciones de concentración, rompimiento celular y valorización de la corriente de residuos se determinó la secuencia óptima de las operaciones usadas no solo a nivel técnico, sino también a nivel económico y de riesgo asociado por sustancias químicas para la obtención de productos intracelulares de microalgas. Para la concentración celular el método seleccionado fue electrocoagulación con electrodos de hierro, para rompimiento se selecciona el choque osmótico sin tiempo de incubación y como método de valorización de corrientes alternas se selecciona la producción de metano por digestión anaerobia.

Palabras clave: Microalgas, Recolección, Rompimiento, Valorización Residuos, Electrocoagulación, Choque Osmótico, Digestión Anaerobia.

## Abstract

A sequence of operations for concentration and cell disruption of a culture of microalgae composed of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* was evaluated. For this, biomass growth was carried out in 20 L photobioreactors. This biomass was taken at a stationary growth phase and eight operations were evaluated for the concentration of this biomass (gravitational sedimentation, pH modulation, salt addition, flocculation with iron salt and aluminum, electrocoagulation with iron and aluminum electrodes). Once these operations were carried out, the best cell concentration process was analyzed from the technical, economic and occupational risk aspects.

For cell disruption, six methods were evaluated (High voltage, Fenton, Electro Fenton using Fe as sacrificial anode, Electro Fenton adding FeSO<sub>4</sub> and graphite electrodes; osmotic shock and ultrasonication). Of these methods ultrasonication was used as a positive control method. Applied these rupture methods to the concentrated microalgae, analogous to the cell concentration step, the best cell disruption process was selected.

A stream of interest and a stream of waste come out of the process of concentration and cell breakdown, the second was valued by two processes: its reuse for the growth of microalgae in a bioreactor and the production of methane by anaerobic digestion.

With the evaluation of the operations of concentration, cell disruption and valorization of the waste stream, the optimal sequence of the operations used was determined not only at a technical level, but also at an economic level and a hazard risk level associated with chemical substances used in order to obtain intracellular products from microalgae. For cell concentration, the selected method was electrocoagulation with iron electrodes, osmotic shock without incubation time is selected for cell rupture, and methane production by anaerobic digestion is selected as the valorization method for the waste stream.

Keywords: Microalgae, Harvesting, Rupture, Waste Valorization, Electrocoagulation, Osmotic Shock, Anaerobic Digestion.

## Introducción

Debido al agotamiento de recursos fósiles no renovables (Huang & Kim, 2013), Las crecientes preocupaciones de los impactos generados por su uso (Ghazvini et al., 2022), y el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, siendo este uno de los principales componentes de gases de efecto invernadero y un predominante contaminante ambiental (Enamala et al., 2018). Se hace necesario encontrar alternativas sostenibles a los combustibles fósiles, de las cuales las microalgas presentan un gran potencial, debido a la generación de lípidos de estas, los cuales pueden ser usados como base para la producción de biocombustibles (Figueroa-Torres et al., 2020). Si bien uno de los principales impulsores para la investigación en microalgas ha sido su potencial como fuente de combustibles no fósiles (hattab, 2015), estas también son una fuente de varias moléculas intracelulares de interés como la astaxantina, betacaroteno, clorofila, carbohidratos, proteínas o lípidos (Barkia et al., 2019; Udayan et al., 2022). Con base en la extracción de componentes intracelulares, algunas de las ventajas de las microalgas como fuente de estos son alta eficiencia fotosintética, periodo rápido de crecimiento y falta de competencia con tierras cultivables para alimentación (Figueroa-Torres et al., 2020; Krishna Koyande et al., 2020; Lee & Han, 2021; Yang et al., 2022). La extracción de lípidos a partir de las microalgas ha sido probada técnicamente posible por varios estudios (dos Santos et al., 2015; Mansour et al., 2019; X. Xu et al., 2021; Zou et al., 2021), pero aún no es económicamente viable (Schade & Meier, 2021; Xia et al., 2016). Algunas de las razones de esta inviabilidad radican en la baja concentración de biomasa obtenida del biorreactor, la cual puede variar de 0,5 a 5 g/L dependiendo del tipo de biorreactor usado (Vandamme et al., 2014), el tamaño de las microalgas está entre 5 - 50 µm, una densidad muy cercana a la densidad del agua (1020 kg/m<sup>3</sup>) (Krishnamoorthy et al., 2021) y la alta estabilidad coloidal en suspensión de la microalga (Vandamme et al., 2014). Haciendo que el proceso de producción de biomasa representa entre el 20 - 30% del costo total de producción de biodiesel (Krishnamoorthy et al., 2021; Ortiz et al., 2021). Una forma de superar estas causas que generan la inviabilidad económica de las microalgas como fuente de lípidos, es a través de la implementación de procesos de concentración y rompimiento celular (Barkia et al., 2019). Dentro de los métodos de concentración celular se encuentra la

sedimentación gravitacional, modulación de pH, adición de sales inorgánicas, coagulación, electrocoagulación, centrifugación y filtración (Aljuboori et al., 2016; Baierle et al., 2015; Barros et al., 2015; Lucakova et al., 2021; Mathimani & Mallick, 2018; Singh & Patidar, 2018). Para el rompimiento celular, algunas de las técnicas usadas son microondas, baño de agua, rompimiento por agitación, ultrasonicación, aplicación de corriente eléctrica, Fenton, electro-Fenton, digestión enzimática y choque osmótico (Byreddy et al., 2015; Carullo et al., 2018; Enamala et al., 2018; Kim et al., 2016; McMillan et al., 2013; Nagappan et al., 2019; Steriti et al., 2014; Zhang et al., 2020).

Del proceso de concentración y rompimiento celular se generan corrientes alternas, las cuales, con el fin de facilitar una sustentabilidad económica del proceso, se deben aprovechar (Ansari et al., 2015). Algunas de la posibilidad de valorización de estos residuos son la producción de fertilizantes, digestión anaerobia, bioplásticos, biocarbón, biosorbentes, reutilización medio de cultivo y celdas microbianas de combustible (Quinn et al., 2014; Tsarpali et al., 2021; Wu et al., 2015).

Una alternativa adicional de reducir los costos de producción es el uso de agua residual como fuente de nutrientes para el cultivo (De Francisci, DPodevin et al., 2017). Dentro de los tipos de agua residual, se encuentra la orina humana, la cual ha sido utilizada previamente para el cultivo de microalgas con buenos resultados (Behera et al., 2020; Jaatinen et al., 2016; Patil et al., 2021).

Teniendo en cuenta el contexto anteriormente mencionado y el contexto de trabajo del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Antonio Nariño. En este trabajo se desarrolló la evaluación y secuencia de operaciones adecuada de recolección y rompimiento celular de un cultivo mixto de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* usando orina humana diluida como fuente de nutrientes. En donde adicionalmente se evaluó la valorización de la corriente alterna de la etapa de recolección celular. Dentro de cada etapa, la selección del método asociado fue a partir de un análisis por decisión multicriterio, análisis que permite ponderar diferentes factores que influyen en el desempeño de una variable y facilita la toma de decisión a partir de varios criterios. Los criterios tenidos en cuenta fueron el desempeño técnico, la utilidad operacional y las sustancias químicas usadas en el proceso de cada uno de los métodos planteados.

## Objetivos

### Objetivo General

- Determinar los métodos y secuencia adecuada de recolección y rompimiento celular de un cultivo microalgal de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* para la obtención de productos intracelulares.

### Objetivos específicos

- Seleccionar un método adecuado para la concentración de biomasa proveniente del fotobiorreactor con el fin de mejorar la etapa posterior de rompimiento celular.
- Seleccionar un método adecuado para el rompimiento celular proveniente de la etapa de concentración de biomasa.
- Elegir la alternativa de valorización de los residuos del proceso de concentración y rompimiento celular con el fin de integrar estos al proceso productivo.

## Marco Conceptual

### 2.1 Uso de microalgas como fuente de biomasa y biocombustibles

Existen varias fuentes de energía alternativas potenciales, dentro de las cuales se encuentra la hidroeléctrica, la geotérmica, la eólica y la biomasa (Golzary et al., 2015).

En lo que respecta a la biomasa, uno de sus principales usos en términos energéticos es por medio de la obtención de sustancias químicas de alto valor energético, como lo son el biodiesel, el bioetanol, el glicerol o los residuos combustibles para ser usados en quema como el bagazo (Datta et al., 2019).

La biomasa usada para la obtención de energía puede clasificarse en tres generaciones (Enamala et al., 2018):

- Primera generación: biomasa proveniente de cultivos como caña de azúcar, maíz, remolacha y soya. Su principal ventaja consiste en su alta productividad, facilidad para la obtención de la biomasa y una tecnología ya desarrollada (Figueroa-Torres et al., 2020). Sus desventajas radican en la gran extensión de área requerida para cultivos y su competencia con la producción de alimentos (Gonzalez-Contreras et al., 2021).
- Segunda generación: biomasa proveniente de fuentes que no compiten en la producción de alimentos, como lo es el material lignocelulósico resultante de actividades agropecuarias como el bagazo de caña y la cascarilla de arroz, entre otros (Datta et al., 2019). Sus ventajas adicionales a la de no competir con usos alimentarios, están en ser más eficientes que los de primera generación y que su uso representa un uso eficiente de un material catalogado como residuo (hattab, 2015). Sus desventajas radican en que su transporte, cultivo y almacenamiento aún no son adecuados para el procesamiento y distribución en gran escala (Figueroa-Torres et al., 2020).
- Tercera generación: biomasa proveniente del tratamiento de diferentes residuos agrícolas, aguas residuales y otros desechos de origen orgánico, por medio del uso de microorganismos tales como bacterias o microalgas (Mansour et al., 2019). Algunas de las especies de microalgas usadas son *Anabaena cilindria*, *Chlorella*,

*Nannochloropsis*, *Spirulina* y *Scenedesmus*. Respecto a las bacterias utilizadas se mencionan las bacterias de ácido láctico (LAB), *Streptomyces*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* y *Pediococcus* (Mazzoli et al., 2014). Dentro de las ventajas de éstas tenemos que se encuentran en diferentes ambientes con diversos pH, temperaturas y diferentes tipos de nutrientes. La principal desventaja de este tipo radica en que la tecnología asociada aún se encuentra en una etapa inicial (Vasistha et al., 2021).

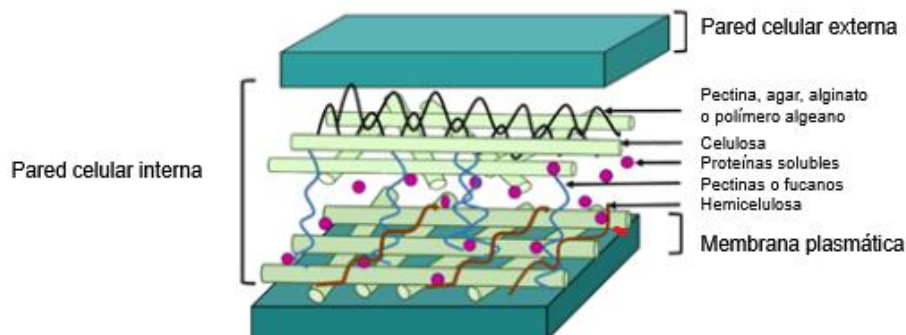
Dentro de la biomasa de tercera generación, se encuentran las microalgas, las cuales resultan de interés como fuente de energía por la alta concentración de material lipídico intracelular que tienen, en promedio la concentración de lípidos de estas, se encuentra en el rango de 20% - 50% (Velazquez-Lucio et al., 2018). Adicionalmente, las microalgas en su proceso fotosintético, al utilizar dióxido de carbono y luz solar como sustrato y fuente de energía respectivamente, aparte de ser una fuente renovable de compuestos químicos y energía, también pueden contribuir con la neutralidad de carbono, convirtiéndose en una opción interesante en la transición energética actual (Dahiya et al., 2020). La principal desventaja de las microalgas en su uso como fuente de energía radica en que los lípidos, al ser un producto intracelular, requieren de varias etapas de purificación (Ali & Watson, 2015), lo cual puede afectar el rendimiento y utilidad del proceso (Figueroa-Torres et al., 2020). Dentro de las etapas de purificación requeridas para la obtención de lípidos se tiene la concentración celular para remover gran parte del medio proveniente del biorreactor (Barros et al., 2015) y el rompimiento celular para facilitar el acceso a estos lípidos (McMillan et al., 2013).

## **2.2 Pared celular y generación de lípidos en microalgas**

### **2.2.1 Pared celular en microalgas**

La pared celular de las microalgas provee una robusta protección contra el ambiente, esta se compone de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, alginato, pectina y/o algaenanos) y proteínas (glicoproteínas) (Pôjo et al., 2021). La composición y la estructura de la pared celular le proporciona a la microalga rigidez y recalcitrancia lo cual impide una

bio-degradación efectiva de estos microorganismos (Zabed et al., 2019). La pared celular depende de la especie respecto a estructura química y proporción (Pôjo et al., 2021). Un diagrama con la composición y estructura típica de las microalgas verdes es el siguiente:



**Figura 1.** Estructura y composición de la pared celular microalgal. Tomado y adaptado de (Pôjo et al., 2021).

En la siguiente tabla se desglosa la composición de la pared celular de diferentes cepas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*.

**Tabla 1:** Composición de pared celular de diferentes cepas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Tomado y adaptado de (Spain et al., 2021).

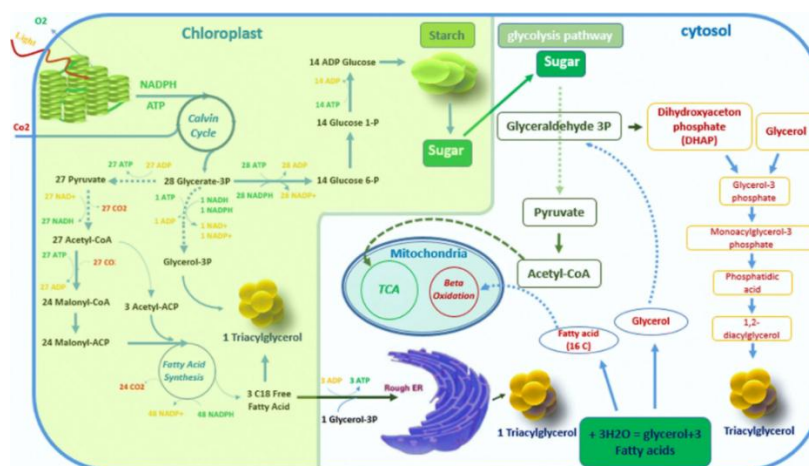
Género	Cepa	Estructura pared celular	Composición pared celular
<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Capa interna fosfolípídica	Pared rígida de glucosamina (compuesta de galactosa y ramnosa) 30% polisacáridos, 2.46% proteínas, 15% lípidos, 52.54% sustancias desconocidas
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Capa interna y capa externa trilaminar	70% glucosa y 30% manosa en su “pared celular rígida” y 65% manosa, 30% glucosa, cantidades menores de ramnosa y galactosa en la matriz de pared celular
	<i>Chlorella homosphaera</i>	No especificada	85% glucosa, 15% manosa en su “pared celular rígida” y 70% manosa, 20% glucosa, y 10% galactosa en su matriz de pared celular.
	<i>Chlorella fusca</i>	Capa interna y capa externa trilaminar	Cetocarotenoides y esporopolenina
<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Capa interna y capa externa trilaminar	24–74% de azúcares neutros, 1–24% ácidos urónicos, 2–16% proteínas, y 0–15% glucosamina



	<i>Scenedesmus acutus</i>	No reportado	Fracción fibrilar: 13% manosa y 87% glucosa Fracción no fibrilar: 23% ramnosa, 6% arabinosa, 21% xilosa y 50% galactosa
--	---------------------------	--------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 2.2.2 Generación de lípidos en microalgas

La generación de lípidos en microalgas se da por tres posibles rutas metabólicas de acuerdo con los mencionado por (Alishah Aratboni et al., 2019), una en el cloroplasto, otra por medio del retículo endoplasmático rugoso y en el citosol. En el cloroplasto se da el proceso inicial en el cual a través del CO<sub>2</sub> y luz solar comienza el proceso fotosintético, por medio del ciclo de Calvin se da la formación de glicerato 3-fosfato. Esta molécula puede tomar 3 rutas diferentes. Por una ruta se forma glicerol 3-fosfato y posteriormente triacilglicerol (TAG). Por otra ruta se forma el piruvato, el cual permite la formación de malonil-ACP y acetyl-ACP (ACP: proteína transportadora de acetyl) que conllevan a la generación de ácidos grasos libres formando TAG y glicerol que ya en el retículo endoplasmático rugoso forma TAG. Por la otra ruta, se forma glucosa 6-fosfato hasta llegar a almidón y azúcares, los cuales ya en el citosol toman la ruta de glicolisis para formar gliceraldehido 3-fosfato y llegar a TAG. La molécula TAG es usado ampliamente por las microalgas como molécula de almacenamiento de energía (Yu et al., 2011). Estas rutas se visualizan en la figura 2.



**Figura 2.** Proceso fotosintético simplificado con tres posibles rutas metabólicas para la formación de triacilglicerol. Diagrama tomado de (Alishah Aratboni et al., 2019).

### 2.3 Recolección celular

En el proceso de recolección de células se busca obtener la biomasa obtenida en el reactor concentrándola para ser usada en procesos posteriores (Singh & Patidar, 2018). La recolección de estas células se puede llevar a cabo de las siguientes maneras y se explica a mayor detalle en la tabla 2 (Barros et al., 2015):

- Centrifugación
- Sedimentación gravitacional
- Filtración
- Flotación
- Coagulación
- Electrocoagulación
- Modificación pH

**Tabla 2:** Diferentes métodos de recolección celular. Basado en las referencias bibliográficas mencionadas.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> <li>• Alta eficiencia</li> <li>• Independiente del cultivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intensivo energéticamente</li> <li>• Alto costo operacional</li> <li>• Alto costo de inversión</li> </ul>	( <u>Barros et al., 2015</u> )
Sedimentación gravitacional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso costo efectivo</li> <li>• Bajo costo operacional</li> <li>• Proceso simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso lento</li> <li>• Dependiente del cultivo</li> <li>• Depende de condiciones del cultivo</li> </ul>	( <u>Barros et al., 2015; Singh &amp; Patidar, 2018</u> )
Filtración	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No requiere compuestos químicos</li> <li>• Bajo consumo energético</li> <li>• Alta recuperación de biomasa</li> <li>• Fácil escalamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere bombeo y cambio recurrente de membranas</li> <li>• Membrana selectiva</li> <li>• Dependiendo del tamaño celular, se requieren mallas de alto costo</li> </ul>	( <u>Barros et al., 2015; Singh &amp; Patidar, 2018</u> )
Flotación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo de operación corto</li> <li>• Fácil operación</li> <li>• Escalamiento simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto consumo energético</li> <li>• Alta inversión</li> </ul>	( <u>Barros et al., 2015; Singh &amp; Patidar,</u>

			2018)
Coagulación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costo efectivo</li> <li>• Escalamiento simple</li> <li>• Alta recuperación de biomasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta inversión</li> <li>• Adición de componentes químicos externos</li> <li>• Se requiere separar el compuesto químico adicional en una etapa posterior</li> </ul>	(Aljuboori et al., 2016; Singh & Patidar, 2018)
Electrocoagulación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta eficiencia</li> <li>• Se lleva a cabo una primera oxidación de las células</li> <li>• Alta recuperación de microalgas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta inversión</li> <li>• Requiere condiciones de seguridad adicionales</li> </ul>	(Barros et al., 2015; Singh & Patidar, 2018)
Modificación pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso simple</li> <li>• Escalamiento simple</li> <li>• Bajo consumo energético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dependiente del cultivo</li> <li>• Requiere adición de compuestos químicos</li> <li>• Proceso lento</li> </ul>	(Castrillo et al., 2013)

Si bien esta etapa no es completamente necesario para llevar a cabo el rompimiento celular, pensando en una escala a nivel piloto o industrial, tener una corriente con una mayor concentración de biomasa permite tener equipos con un menor volumen y a su vez permite eliminar de la corriente de tratamiento, desde el comienzo, elementos no deseados para este proceso (hattab, 2015).

### 2.3.1 Sedimentación gravitacional

La sedimentación gravitacional es una operación de separación sólido - líquido, en donde la fase sólida, en este caso microalgas, sedimenta debido a la diferencia de densidades entre esta y la fase líquida (Bhatia et al., 2021). Especies algales de baja densidad no sedimentan eficientemente, mientras que las algas de alta densidad sedimentan rápidamente (Barros et al., 2015). Si bien esta operación es energéticamente favorable, no es útil para todas las especies de microalgas (Mathimani & Mallick, 2018).

### 2.3.2 Modificación pH

La modificación de pH se realiza, sea por medio de la acidificación del cultivo o alcalinizándolo. Cuando se acidifica el medio de cultivo, los iones carboxilatos presentes en la superficie de las microalgas aceptan los protones, neutralizando las cargas negativas de estas, lo cual lleva a la aglomeración de las algas y a una posterior sedimentación (Mathimani & Mallick, 2018).

En el caso del uso de una sustancia básica, el mecanismo de separación dependerá de la sustancia a usar, si se usa hidróxido de calcio, a pH alto este precipita como carbonato de calcio y actúa como un mecanismo de barrido facilitando la sedimentación de otros componentes del medio, en el caso de usar otras sustancias básicas, se debe procurar que el medio tenga calcio o magnesio (Castrillo et al., 2013), esto con el fin de que el pH alto permita la precipitación de estas especies y llevar a cabo ese mismo efecto barrido.

### 2.3.3 Adición sales

Un sistema coloide, como es el caso de una suspensión de microalgas provenientes de un fotobiorreactor, se compone de partículas altamente dispersas distribuidas a través del medio de dispersión (Yang et al., 2022). El potencial zeta es un indicador para evaluar la estabilidad de un sistema coloide (Krishnan et al., 2022). Aumentar la salinidad del medio a través de la adición de sales inorgánicas, genera que el valor absoluto del potencial zeta en el medio tiende a disminuir, lo cual puede llevar a la precipitación de sustancias coloides en el medio (Yang et al., 2022).

### 2.3.4 Coagulación

La superficie de las microalgas tiene una densidad de carga negativa, lo cual les permite una estabilidad coloidal en suspensión, siendo la pared de este compuesta en su mayoría de polisacáridos, lípidos y proteínas, cuyos grupos funcionales proveen la carga de la superficie (Visigalli et al., 2021). La carga de la superficie aparte de depender de los grupos funcionales presentes en la pared celular depende del tipo de especies, pH del medio, fuerza iónica del medio y otras condiciones ambientales (Chatsungnoen & Chisti,

2016). La floculación busca la coalescencia de las microalgas suspendidas en solución y formar aglomerados de células que por su aumento de densidad respecto al medio sedimentaran (J. Wu et al., 2015) . Los floculantes usados actúan de diferentes maneras; unos al neutralizar la carga superficial de las células (floculantes catiónicos), conexión de células individuales (algunos bio-floculantes) o por la formación de precipitados que atrapan a las células (mecanismo de barrido) (Lama et al., 2016).

### 2.3.5 Electrocoagulación

La electrocoagulación ocurre cuando fluye una corriente directa a través de una solución electrolítica por medio de dos electrodos con carga eléctrica opuesta desde el polo positivo (ánodo) hasta el polo negativo (cátodo), estableciendo un campo eléctrico (Alam & Shang, 2016).

En agua pura las reacciones que ocurren por el proceso de electrólisis son:

**Tabla 3:** Reacción en agua pura proceso de electrólisis

Ánodo	$2H_2O + 4e^- \rightarrow O_2 + 4H^+$
Cátodo	$4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$
General	$2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$

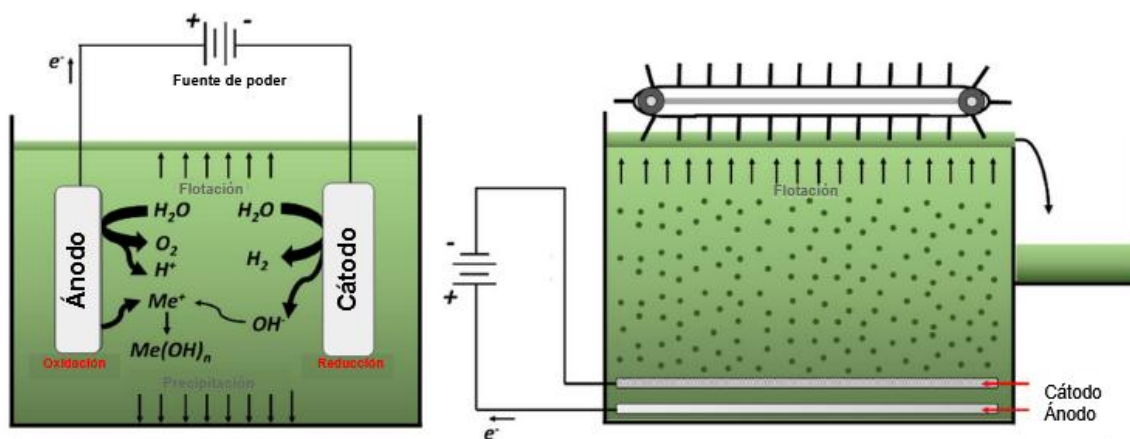
Los electrodos usados en este proceso pueden ser no reactivos (de no sacrificio), en el cual las células negativamente se mueven hacia el ánodo, donde pierden la carga, formando agregados celulares que pueden sedimentarse o flotar con base en su densidad (Mathimani & Mallick, 2018). Al usar electrodos reactivos (de sacrificio) ocurren dos fenómenos: i. la electrólisis del agua que genera burbujas favoreciendo la flotación del floc. ii. la oxidación del ánodo a los cationes metálicos que son lanzados al medio desestabilizando la carga de las células generando la floculación de estas (Visigalli et al., 2021).

En el caso de usar hierro como electrodo, el hierro liberado en solución puede reaccionar espontáneamente en solución, llevando a la formación de hidroxocomplejos férricos detallado por (Lucakova et al., 2021) y como se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4:** Reacción de formación hidroxocomplejos

Ánodo	$4Fe_s \rightarrow 4Fe_{aq}^{2+} + 8e^-$ $4Fe_{aq}^{2+} + (2x + 4)H_2O_{(l)} + O_{2(g)} \rightarrow 2(Fe_2O_3 \cdot xH_2O)_{(s)} + 8H_{(aq)}^+$
Cátodo	$8H_{(aq)}^+ + 8e^- \rightarrow 4H_{2(g)}$

Donde x es un coeficiente estequiométrico mayor a 3. Las especies de complejos formados dependen de las condiciones del sistema, en especial el pH (Lucakova et al., 2021). Si bien la electrocoagulación ocurre en rangos ácidos y básicos, en varios estudios se evidencia que esta se favorece a pH ácidos (Lucakova et al., 2021) (Alam & Shang, 2016) (Visigalli et al., 2021). El proceso de electrocoagulación flotación se ejemplifica en el siguiente esquema:



**Figura 3.** Esquema electrocoagulación flotación con electrodos en posición lateral (izquierda) y en posición inferior (derecha). Tomado y adaptado de (Visigalli et al., 2021).

## 2.4 Ruptura celular

El rompimiento de la pared celular busca facilitar la extracción de componentes de interés tales como lípidos, proteínas y carbohidratos (Hemalatha et al., 2019).

Algunos de los métodos usados para la obtención de lípidos a partir de microalgas son los siguientes que se detallan en la tabla 5:

- Microondas
- Baño de agua
- Rompimiento por agitación
- Ultrasonicación

- Aplicación de corriente eléctrica
- Fenton
- Electro-Fenton
- Digestión enzimática
- Choque osmótico

**Tabla 5:** Diferentes métodos para llevar a cabo el rompimiento celular. Información tomada y adaptada de las referencias bibliográficas mencionadas en la tabla.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Microondas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rompimiento efectivo de células</li> <li>• Alta frecuencia genera un rompimiento rápido de células</li> <li>• Solo interactúa con el agua y moléculas polares sin afectar los lípidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escalamiento complejo</li> <li>• Alto consumo energético</li> <li>• Puede afectar los componentes polares de la célula afectando la valorización de estos</li> </ul>	( <a href="#">McMillan et al., 2013</a> ; <a href="#">Nagappan et al., 2019</a> )
Baño de agua	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil escalamiento</li> <li>• Alta disrupción celular</li> <li>• Altamente eficiente</li> <li>• La temperatura de trabajo no afecta los lípidos y permite su separación al estar líquidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto consumo energético</li> <li>• Procesos posteriores requieren un alto consumo energético</li> </ul>	( <a href="#">McMillan et al., 2013</a> ; <a href="#">Nagappan et al., 2019</a> )
Rompimiento por agitación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altamente eficiente</li> <li>• Baja consumo energético</li> <li>• Escalamiento simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia disminuye a mayor volumen y tiempo de trabajo</li> </ul>	( <a href="#">Carullo et al., 2018</a> ; <a href="#">McMillan et al., 2013</a> )
Ultrasonificación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta eficiencia</li> <li>• No afecta los productos intracelulares</li> <li>• Aumento de temperatura ocasionado por el proceso es beneficioso para el rompimiento de la célula</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto costo operativo</li> <li>• Requiere bastante tiempo de operación</li> <li>• Escalamiento complejo</li> </ul>	( <a href="#">McMillan et al., 2013</a> ; <a href="#">Nagappan et al., 2019</a> )
Corriente eléctrica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escalamiento viable</li> <li>• Fácil operación</li> <li>• Permite flocular y romper células a la vez</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere condiciones de seguridad adicionales</li> <li>• Ocurren procesos</li> </ul>	( <a href="#">Carullo et al., 2018</a> )

		adicionales de oxidación difíciles de controlar	
Fenton	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso eficiente</li> <li>• Alta extracción de lípidos</li> <li>• Fácil escalamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere sustancias químicas adicionales</li> <li>• Condiciones de seguridad adicionales</li> <li>• Dificultad en parar reacción</li> </ul>	( <u>Steriti et al., 2014</u> )
Electro-Fenton	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminar el uso de peróxido de hidrógeno</li> <li>• Fácil escalamiento</li> <li>• Alta eficiencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere sustancias químicas adicionales</li> <li>• Manejo de electricidad</li> </ul>	( <u>S. Zhang et al., 2020</u> )
Digestión enzimática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta eficiencia en el rompimiento de la pared celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta especificidad</li> <li>• Alto costo de materia prima</li> </ul>	( <u>Enamala et al., 2018; D.-Y. Kim et al., 2016</u> )
Choque osmótico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil escalamiento</li> <li>• Bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere sustancias químicas adicionales</li> <li>• Requiere llevar a cabo un tratamiento adicional de la corriente de salida</li> <li>• La adición de agua con salmuera disminuye la concentración de los componentes de interés</li> </ul>	( <u>Byreddy et al., 2015</u> )

### 2.4.1 Microondas

El uso de calentamiento asistido por microondas para la ruptura celular tiene como principio la absorción de energía por moléculas polares (Nagappan et al., 2019). En el caso del uso de este proceso como pretratamiento celular, las moléculas de agua dentro del sistema absorben la energía y se calientan rápidamente generando un incremento en la presión interna celular. Esta presión interna al exceder la presión máxima celular causa el rompimiento celular y la liberación de los componentes internos hacia el solvente de extracción (Zhou et al., 2019).



### **2.4.2 Baño de agua**

El baño de agua caliente al ser usado como método de rompimiento celular tiene como objetivo inducir por medios térmicos un aumento en la presión celular, llevando a un eventual rompimiento celular debido a que la célula falla al contener su elevada presión interna (McMillan et al., 2013). Este proceso es similar al uso de calentamiento asistido por microondas, con la diferencia de que en el baño de agua el caliente es desde el medio hacia la célula, mientras que en el uso de microondas el calentamiento se da internamente por la absorción de energía por parte de las moléculas polares internas de la célula (Zhou et al., 2019).

### **2.4.3 Rompimiento por agitación**

El rompimiento por agitación consiste en que a través de la agitación se genere la colisión entre células, colisión de las células con la pared del recipiente y a través del golpe entre la cuchilla afilada del agitador y las células (McMillan et al., 2013). Esta técnica ha mostrado ser eficiente en el rompimiento de la pared celular de microalgas, pero su consumo energético impide su fácil escalamiento (Nagappan et al., 2019).

### **2.4.4 Ultrasonicación**

El principio de usar ultrasonicación para el rompimiento celular consiste en la transmisión de ondas sónicas a la célula. Estas ondas producen microburbujas transfiriendo energía cinética a la pared celular del tejido que genera el rompimiento celular (Halim et al., 2012). Durante el proceso de cavitación, también se presenta un aumento de temperatura en un punto específico del medio, que resulta en el aumento general de la temperatura de todo el medio (McMillan et al., 2013).

### **2.4.5 Aplicación de corriente eléctrica**

El proceso de aplicación de corriente eléctrica para el rompimiento de células consiste en la formación de un campo eléctrico por pulsos, (PEF) *pulsed electric field*, en

el cual el material de interés se posiciona entre dos electrodos y se expone a un campo eléctrico de alta intensidad por periodos de corta duración (pulsos), llevando a la permeabilización de la membrana celular por electroporación facilitando la obtención del material intracelular (Raso et al., 2016).

#### 2.4.6 Fenton

El rompimiento celular por medio de los reactivos Fenton, consistentes de sulfato de hierro y peróxido de hidrógeno, se basa en el contacto de una biomasa húmeda con la solución disruptora que contiene estos reactivos (Steriti et al., 2014). El peróxido de hidrógeno al reaccionar con el  $Fe^{2+}$  inicia la cadena de reacción de radicales Fenton obteniendo la producción de especies reactivas de oxígeno  $OH\cdot$  (Y. Wu et al., 2010). Esta especie reactiva tiene la capacidad de atacar y degradar los componentes de la pared celular como lo son polisacáridos, celulosa, glicoproteínas o fosfolípidos (Concas et al., 2015).

Los pasos de la reacción Fenton son los siguientes:

**Tabla 6:** Pasos reacción Fenton. Tomado y adaptado de (Concas et al., 2015; Y. Wu et al., 2010)

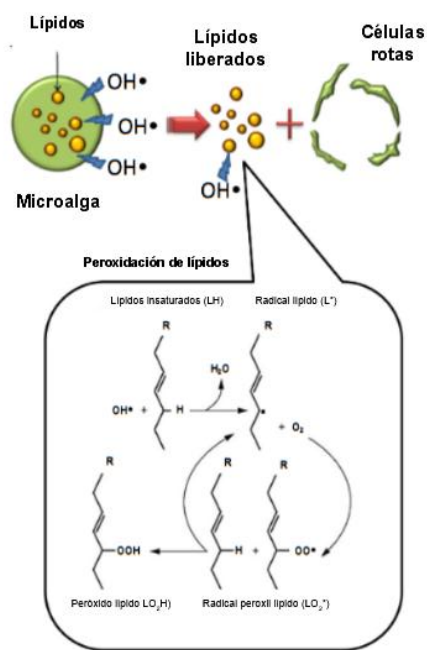
Reacción iniciación	
R1	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$
Reacción propagación	
R2	$OH\cdot + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2\cdot$
R3	$H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + HO_2\cdot + H^+$
R4	$Fe^{3+} + HO_2\cdot \rightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^+$
Reacción terminación	
R5	$Fe^{2+} + HO_2\cdot \rightarrow Fe^{3+} + HO_2^-$
R6	$OH\cdot + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^-$

Efectuada la reacción Fenton y la ruptura de la pared celular, los lípidos al entrar en contacto con los radicales  $\text{OH}\cdot$  pueden iniciar una cadena de reacciones para la producción de peróxidos lipídicos y su finalización en especies sin radicales (NRS) (Xue et al., 2012). En la siguiente tabla se detallan las reacciones llevadas a cabo.

**Tabla 7:** Pasos peroxidación de lípidos. Tomado y adaptado de (Concas et al., 2015; Xue et al., 2012).

Reacción propagación	
R7	$L + O_2 \rightarrow LO_2$
R8	$LO_2 + LH \rightarrow LO_2H + L$
Reacción terminación	
R9	$L + L \rightarrow NRS_1$
R10	$L + LO_2 \rightarrow NRS_2$
R11	$LO_2 + LO_2 \rightarrow NRS_3$

(Concas et al., 2015) esquematiza este proceso de la siguiente manera:

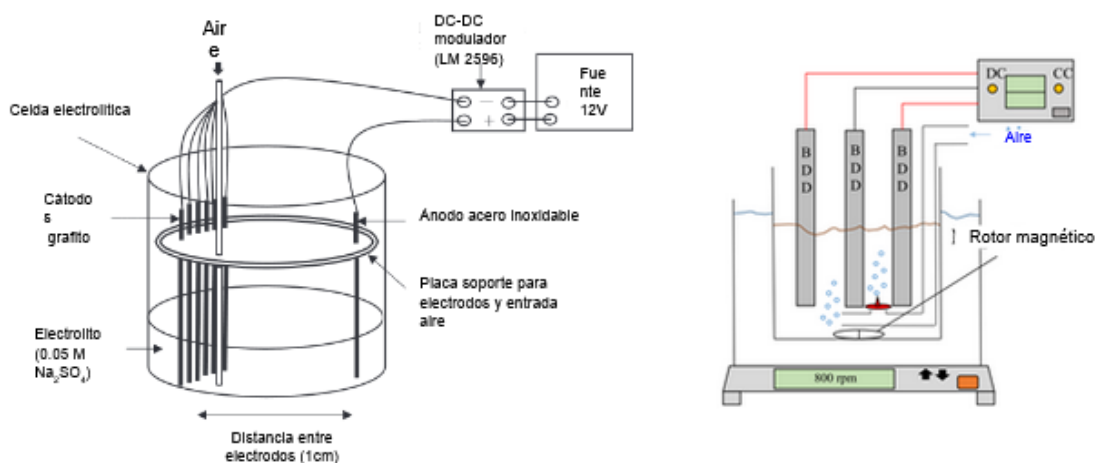


**Figura 4.** Peroxidación de lípidos, Tomado de (Concas et al., 2015).

### 2.4.7 Electro-Fenton

El proceso Electro-Fenton tiene el mismo principio que el proceso Fenton, pero su principal diferencia radica en el método de generación de los reactivos Fenton, que para este proceso es por medio de procesos electroquímicos (Gamarra-Güere et al., 2022).

En un proceso Fenton tradicional los reactivos se proveen externamente, en un proceso Electro-Fenton se busca la generación del peróxido de hidrógeno *in situ* eliminando condiciones de riesgo asociado al almacenamiento de esta sustancia (Chen et al., 2022). La formación del peróxido de hidrógeno se da saturando de oxígeno el área cercana al cátodo a través de la reducción catódica del oxígeno (S. Zhang et al., 2020). También es posible la generación *in situ* del  $\text{Fe}^{2+}$  dependiendo de los electrodos empleados. Al usar electrodos de no sacrificio, se requiere la adición externa de una fuente de estos cationes. Si se usa un electrodo de sacrificio de hierro o acero, esta es la fuente de estos iones (Sandani et al., 2022). A continuación, se muestran dos esquemas de montaje del proceso electro-Fenton, uno con electrodos de sacrificio y otro con electrodos no reactivos que ejemplifican el proceso electro-Fenton y el mecanismo explicado previamente.



**Figura 5.** Montaje proceso Electro-Fenton. Izq. con electrodos de sacrificio. Tomado de (Sandani et al., 2022). Der. con electrodos no reactivos. Tomado de (Chen et al., 2022).

### 2.4.8 Digestión Enzimática

El uso de enzimas para llevar a cabo la ruptura celular consiste en llevar a cabo el proceso de enzimolisis, cuya función es romper la pared celular de la microalga y extraer

los componentes celulares de esta (Enamala et al., 2018). Algunas de las enzimas usadas para el rompimiento de la pared celular han sido amilasa, celulasa y una mezcla de varias. La principal desventaja de este proceso son el prolongado tiempo de reacción requerido y el alto costo de las enzimas a emplear (D.-Y. Kim et al., 2016).

#### 2.4.9 Choque osmótico

El choque osmótico para ruptura celular es un proceso que consiste en suspender células en una solución salina, la cual puede ser hipotónica (la concentración salina en solución es menor que la concentración de sal en el citoplasma) o hipertónica (la concentración salina en solución es mayor que la concentración de sal en el citoplasma) para así inducir un gradiente osmótico a través de la membrana celular (Harrison et al., 2015). En el proceso hipotónico se logra una difusión neta de agua al interior de las células, generando un aumento de la presión celular interna y a su eventual rompimiento. En el caso hipertónico la difusión neta de agua se da hacia el exterior de las células, llevando a un colapso de las estructuras celulares internas (Harrison et al., 2015). (Byreddy et al., 2015) hace uso de la ecuación de Morse para el cálculo de la presión de ruptura.

$$\pi = iMRT \quad (1)$$

Donde  $\pi$  es la presión celular generada por el choque osmótico,  $i$  es el factor adimensional de Van't Hoff,  $R$  es la constante universal de gases,  $M$  es la concentración molar de la sal usada para llevar a cabo la ruptura celular y  $T$  es la temperatura absoluta.

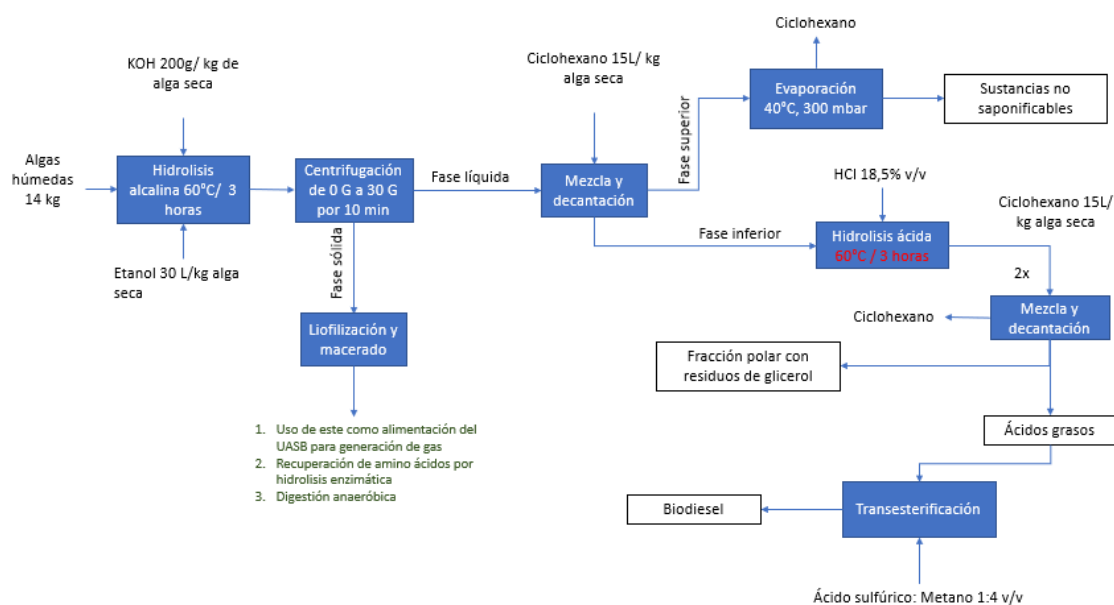
### 2.5 Recuperación de lípidos

Con las microalgas fracturadas, su material intracelular aumenta su disponibilidad, facilitando la obtención del material. No solo los lípidos son material de valor a obtener de partes de las microalgas, aunque si es la molécula que ha suscitado gran interés por su valor y aplicaciones energéticas (Alishah Aratboni et al., 2019; Ebhodaghe et al., 2022; Yen et al., 2013). A diferencia de las etapas anteriores la obtención de lípidos en algunos procesos no solo se compone de un método sino de una combinación de varios pasos. Debido a esto, en vez de realizar un cuadro comparativo entre los diferentes métodos, se

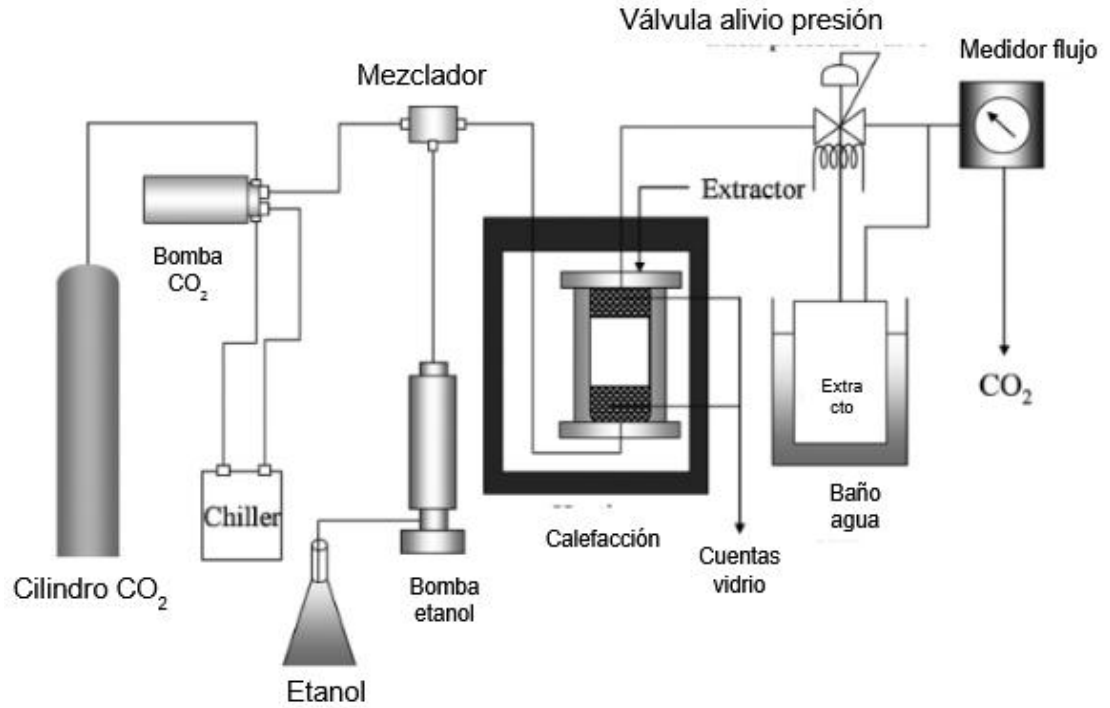
ilustran algunos procesos completos para la obtención de lípidos, de los cuales algunos van hasta biodiesel y otro solo hasta los lípidos. Los procesos ilustrados para la obtención de lípidos se numeran en la siguiente tabla.

**Tabla 8:** Diferentes procesos para la obtención de lípidos

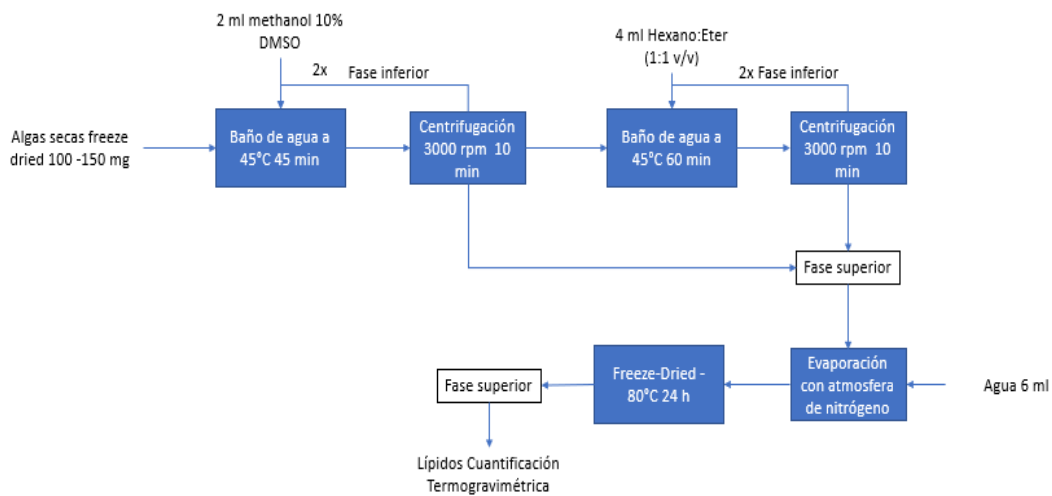
Alga	Proceso	Producto	Figura	Referencia
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrólisis ácida y alcalina combinada con transesterificación	Biodiesel	6	(Monlau et al., 2021)
Muestra comercial	Extracción supercrítica con CO <sub>2</sub>	Carotenoides y lípidos	7	(Goto et al., 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción líquido - líquido	Lípidos	8	(Zhu et al., 2020)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Ultrasonido y extracción por solventes	Lípidos y biodiesel	9	(Shi et al., 2018)
<i>Spirogyra</i>	Extracción líquido – líquido por Soxhlet	Lípidos	10	(Aravind et al., 2021)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción líquido – líquido por método Folch	Lípidos	11	(Enamala et al., 2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracción líquido – líquido por método Folch	Lípidos	12	(Enamala et al., 2018)



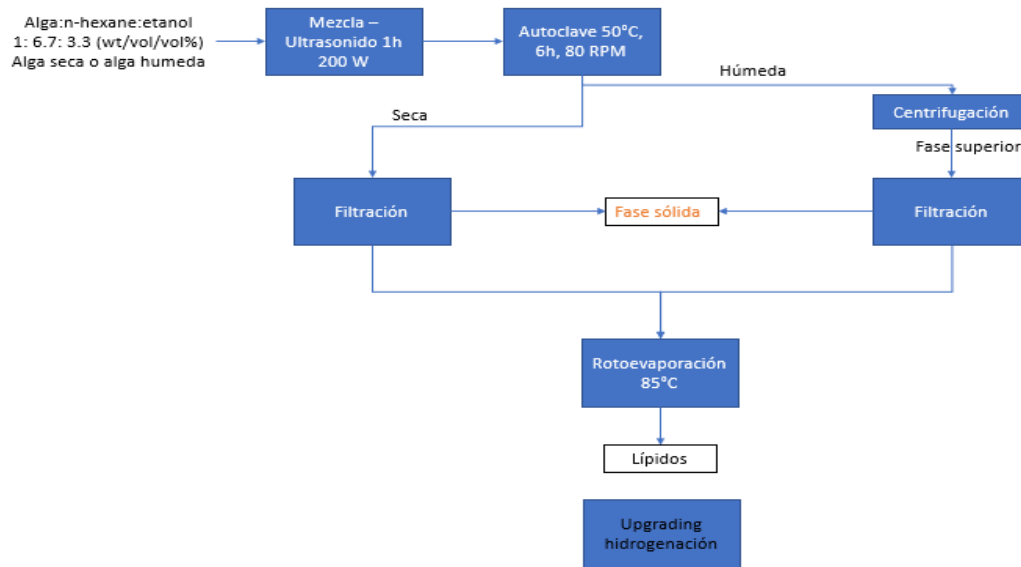
**Figura 6.** Hidrólisis ácida y alcalina combinada con transesterificación para obtención de biodiesel. Información tomada de (Monlau et al., 2021).



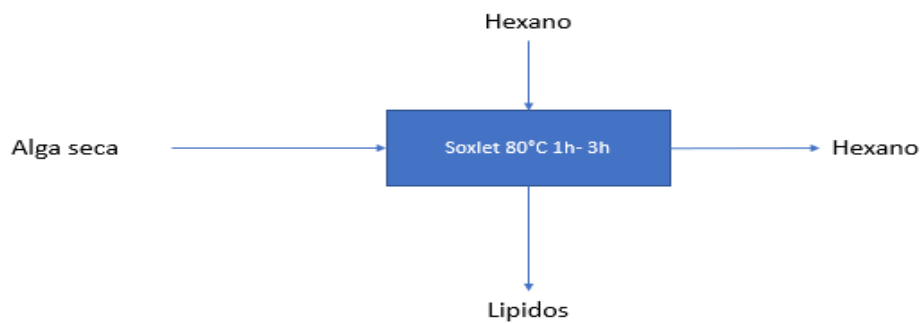
**Figura 7.** Proceso de obtención de carotenoides y lípidos a partir de microalgas por extracción supercrítica. Tomado de (Goto et al., 2015)



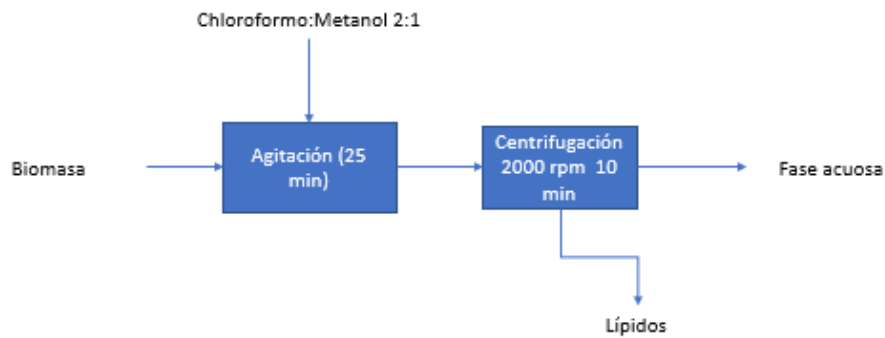
**Figura 8.** Extracción líquido-líquido de lípidos. Información tomada de (Zhu et al., 2020).



**Figura 9.** Mezcla por ultrasonido con recuperación posterior de solventes. Información tomada de (Shi et al., 2018).

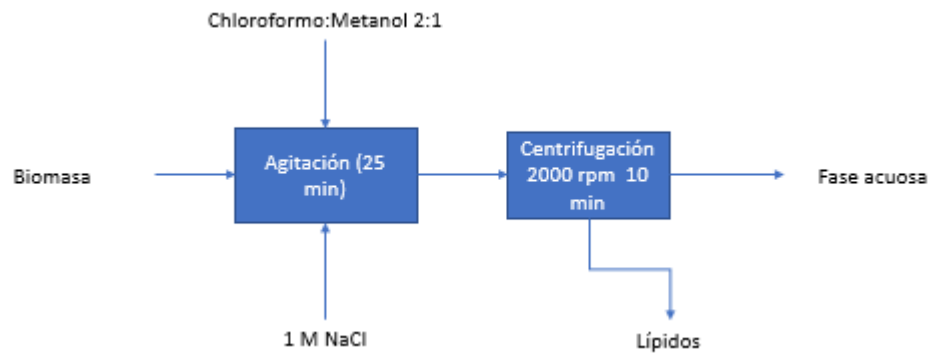


**Figura 10.** Extracción por Soxhlet. Información tomada de (Aravind et al., 2021).



**Figura 11.** Método Folch. Información tomada de (Enamala et al., 2018).





**Figura 12.** Método Bligh y Dyer. Información tomada de [\(Enamala et al., 2018\)](#).

Evaluando los diferentes procesos usados para la obtención de lípidos, se realizan las siguientes observaciones:

- Muchos procesos usan como entrada microalgas secas [\(Goto et al., 2015; Zhu et al., 2020\)](#) , sin llevarles a cabo ningún pretratamiento que genere la ruptura de la pared celular, por lo cual, llevar a cabo una operación previa podría generar un mayor rendimiento en el proceso o hacerlo más eficiente [\(Enamala et al., 2018\)](#).
- Algunos procesos usan algas húmedas para iniciar la extracción de lípidos, lo cual, si se logra un rompimiento celular eficiente, resulta de mayor beneficio que usar biomasa seca [\(Shi et al., 2018\)](#). De manera similar a lo que sucede con la biomasa seca, no se lleva a cabo ningún pretratamiento para romper la pared celular, sino que se parte de que el uso de solventes permite la extracción del contenido intracelular de las microalgas [\(de Jesus et al., 2019\)](#).
- No se evidencia un uso de métodos mecánicos para extracción de lípidos, los cuales son comunes con otro tipo de materia prima de lípidos como lo son girasol, maní, palma de aceite, entre otros [\(Enamala et al., 2018\)](#).
- Algunos procesos van desde la extracción de lípidos hasta la obtención de biodiesel [\(Shi et al., 2018\)](#). Otros solo buscan obtener los lípidos [\(Aravind et al., 2021\)](#) mientras otros procesos buscan separar lípidos saponificables y los no

saponificables (Monlau et al., 2021). Estos diferentes enfoques resultan valiosos ya que también evalúan la idoneidad de los lípidos para su uso en biodiesel.

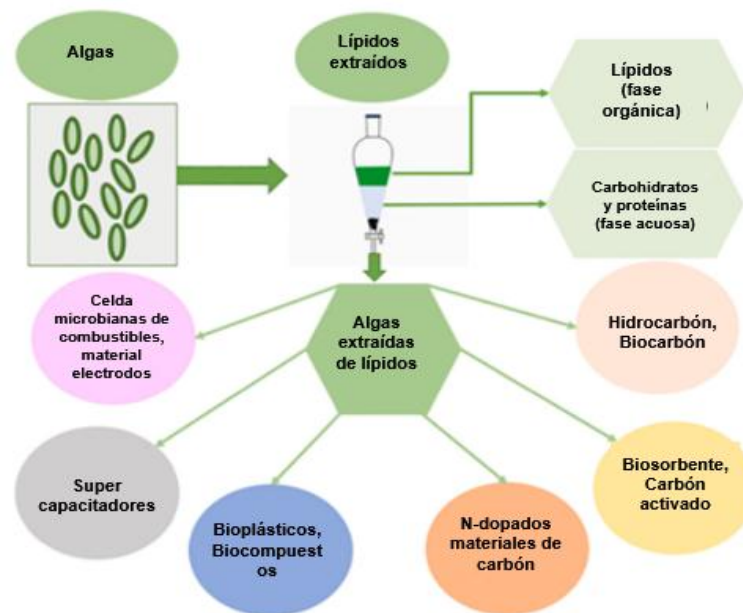
## **2.6 Valorizaciones corrientes alternas**

Con el fin de obtener un proceso sostenible en términos ambientales y económicos, no solo es suficiente obtener los lípidos o directamente biodiesel, sino que se deben buscar métodos de valorización de los residuos obtenidos en cada una de las corrientes que se generan en el proceso (Ansari et al., 2015).

A continuación, se muestran algunas de las posibilidades de valorización de estos residuos. Tomado de (Quinn et al., 2014; Tsarpali et al., 2021; J. Wu et al., 2015).

- Carbohidratos y proteínas
- Fertilizantes
- Digestión anaerobia
- Bioplásticos
- Biocarbón
- Biosorbentes
- Celdas microbianas de combustible
- Reutilización del medio de cultivo

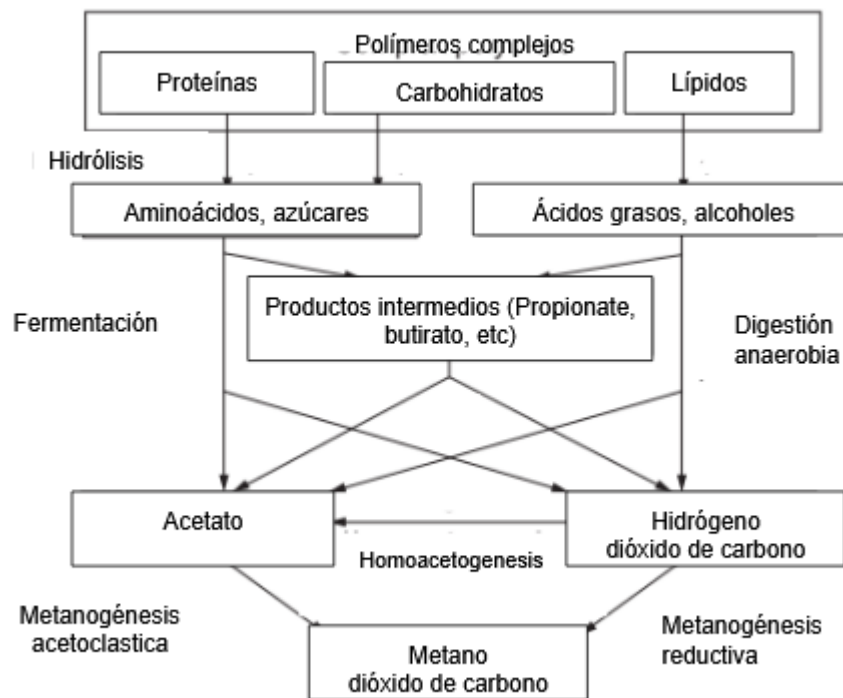
(Tsarpali et al., 2021) por medio del siguiente diagrama resume los diversos usos de algas, posterior a la extracción de lípidos.



**Figura 13.** Diferentes productos obtenidos a partir de microalgas posterior a la extracción de lípidos. Tomado y adaptado de (Tsarpali et al., 2021).

### 2.6.1 Digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia es uno por el cual la materia orgánica se degrada en ausencia de oxígeno generando mayoritariamente metano y dióxido de carbono, denominado biogás (Arhoun, s. f.). La obtención de biogás por medio de un proceso de digestión anaerobia se muestra a continuación:



**Figura 14.** Ruta de reacción digestión anaeróbica de sustancias orgánicas poliméricas. Tomado y adaptado de (Teng et al., 2014)

Las microalgas aparte a ser una fuente de lípidos, también es fuente de carbohidratos, pigmentos y proteínas; con potencial de desarrollo en varios productos de interés (Yen et al., 2013). Uno de los potenciales de uso de estos componentes, es la obtención de biogás a través de un proceso de digestión anaerobia. Como antecedente, se tiene que las microalgas sin ningún pretratamiento ya han sido usadas directamente como sustrato en un proceso de digestión anaeróbica, mostrando la factibilidad de estas para la obtención de biogás (Ward et al., 2014). El mismo proceso se ha llevado a cabo con microalgas que han pasado previamente por un rompimiento celular y una extracción de lípidos, que tiene como principal característica la destrucción previa de la pared celular, facilitando la degradación de las componentes celulares, obteniendo mayores cantidades de metano (B. Zhang & Ogden, 2017).

## 2.6.2 Reutilización medio de cultivo

Los biorreactores en los cuales se lleva el cultivo de microalgas pueden clasificarse como fotobiorreactor tipo tubulares o un reactor de tipo carrera (raceway pond) (Paladino & Neviani, 2021). En la figura 15 se evidencian este tipo de reactores.



**Figura 15.** Fotobiorreactores usados para el cultivo de microalgas. Izq. Reactor tipo carrera. Tomado de (Inostroza et al., 2021). Der. Fotobiorreactor tubular. Tomado de (de Andrade et al., 2016).

De los reactores mencionados en la figura 15, están los reactores tipo carrera (*Raceway pond*). Estos consisten en un circuito de canales paralelos abiertos al entorno, en donde la circulación de microalgas se lleva a cabo por rueda de paletas (Costa et al., 2019). Los otros reactores nombrados son los tubulares, compuestos de tubería transparente con entrada de dióxido de carbono, en donde el cultivo de microalgas circula por esta tubería (Acién et al., 2017). La concentración de biomasa obtenida en estos reactores mencionados está entre 0,5 g/L y 5 g/L (Gorin et al., 2015). En una etapa de recolección celular, al separar las microalgas del medio de cultivo, se generan dos fases, una fase con alta concentración celular y otra fase sobrenadante compuesto mayoritariamente del medio de cultivo y productos de secreción de las microalgas (Castrillo et al., 2013). La reutilización del sobrenadante para el cultivo de microalgas en el biorreactor disminuye la huella hídrica del cultivo de microalgas, reducción de costos y mejora del uso de los nutrientes adicionados al medio (Castrillo et al., 2013; de Moraes et al., 2021). La única modificación del medio reutilizado evidenciada es el ajuste de pH a neutralidad y la reposición de nitrógeno y fósforo al medio (J. Wu et al., 2015).

## 2.7 Estado del arte

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica en las áreas de concentración, rompimiento celular y valorización de cadenas alternativas en la producción de microalgas y se lleva a cabo un análisis de dos artículos por área, esto con el fin de evaluar posibles tendencias en esta área y determinar si a partir de estos trabajos se puede obtener.

Como criterio para la selección de estos artículos se tuvo en cuenta que la temática desarrollada fuera enfocada en cada etapa del trabajo realizado (concentración, rompimiento y valorización de corrientes alternas) de manera específica y que fueran bastante detallados en la metodología empleada, con la finalidad de poder tomar herramientas de estas investigaciones para ser usadas en este proyecto.

### 2.7.1 Concentración celular

Artículo: **Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae** (Lucakova et al., 2021)

DOI: [10.1016/j.biortech.2020.124606](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124606)

El objetivo de la investigación llevada a cabo en este artículo fue determinar si la electrocoagulación es un método económicamente viable para la recolección de microalgas. Para esto evaluaron un rango amplio de diferentes condiciones que influyen en el proceso de electrocoagulación como pH, concentración de carga, concentración inicial de biomasa, pH, temperatura, agitación, efecto de sales residuales y tiempo de cultivación. Ya con las condiciones óptimas determinadas procedieron a evaluar y comparar este proceso con uno convencional de recolección de microalgas como lo es la centrifugación, determinando que la electrocoagulación es una alternativa viable para recolección celular.

Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación

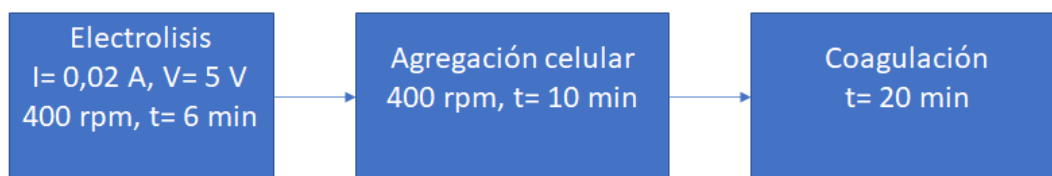
**Tabla 9:** Parámetros usados en la investigación citada (Lucakova et al., 2021).

Parámetros	Características
Cepa usada	<i>Chlorella vulgaris</i>

Crecimiento celular	FBR a 30°C, aire filtrado con CO <sub>2</sub> al 2% v/v, flujo de 250 mL/min, iluminación continua de 300 μmol/m <sup>2</sup> /s
Medio de cultivo	Medio mínimo de sales, pH 6,5 - 7,0

A continuación, se muestra cómo se llevó a cabo el proceso de electrocoagulación:

### Electrocoagulación



**Figura 16.** Proceso de electrocoagulación llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. Información tomada de (Lucakova et al., 2021) para el desarrollo del diagrama.

Del proceso de electrocoagulación se modificaron diferentes parámetros: Carga eléctrica, Concentración inicial de biomasa, pH, Temperatura, Agitación. Medio de cultivo. Las variables objetivo para la determinación del valor óptimo de estos parámetros fueron eficiencia de la recolección, hierro residual en biomasa y costo energético

A partir de estas condiciones experimentales, variables objetivo y la modificación de los parámetros mencionados arriba se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 10:** Resultados obtenidos en la investigación citada (Lucakova et al., 2021).

Parámetro	Valores óptimos
<b>Carga eléctrica</b>	A partir de un valor de 14,4 C/L la remoción fue constante
<b>Concentración inicial de biomasa</b>	En altas concentraciones el factor limitante es el hierro liberado, en bajas concentraciones la agregación celular es muy lenta, el rango óptimo está entre 0,7 g/L - 2,0 g/L
<b>pH</b>	4 - 8
<b>Temperatura</b>	Los autores sugieren que no es un factor importante en la recolección celular
<b>Agitación</b>	Baja velocidad disminuye probabilidad de coaliciones y muy alta genera

	rompimiento del aglomerado. Rango Reynolds de 4000 - 6000
<b>Sales residuales</b>	La concentración alta de fosfatos inhibe la recolección celular, debido a que reacciona con el hierro limitando su disponibilidad. Valor óptimo de concentración de fosfatos menor a 0,15 mg/L.
<b>Tiempo de cultivación</b>	El tiempo de cultivación óptimo debe ser mayor a dos días de cultivo.

A partir de estos resultados los autores concluyen que la electrocoagulación presenta un método valioso para la concentración y recolección celular de microalgas que permiten ahorro de tiempo, energía y permite usar las algas en una gran cantidad de campos diversos. Estos resultados son valiosos ya que muestran una metodología de cómo realizar el proceso de electrocoagulación e involucra los diferentes parámetros asociados en el proceso de recolección celular y cuáles son los valores base para la implementación de estos.

Artículo: **Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae** (J. Wu et al., 2015)

DOI: [10.1016/j.biortech.2015.08.094](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.094)

El objetivo de esta investigación se divide en dos: la evaluación de la eficiencia del proceso de floculación de microalgas a través del empleo de diferentes sustancias (quitosano, poliacrilamida, sulfato de plata, hidróxido de sodio y ácido nítrico); y el impacto de cada una de estas sustancias en el contenido final de carbohidratos, lípidos y proteínas de las microalgas y la posibilidad de uso del sobrenadante para ser usado nuevamente en el cultivo de microalgas. Finalmente, ya dos de estos objetivos evaluados, los autores proceden a hacer una evaluación económica y determinación de las condiciones de uso adecuado de cada uno de estos coagulantes.

Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación.

**Tabla 11:** Parámetros usados en la investigación citada (J. Wu et al., 2015).

Parámetros	Características
------------	-----------------



Cepa usada	<i>Scenedesmus sp.</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i>
Crecimiento celular	FBR a 25°C, aire con CO <sub>2</sub> al 1% v/v, iluminación continua de 200 μmol/m <sup>2</sup> /s
Medio de cultivo	Medio BG-11
Concentración celular de algas usadas en floculación	<i>Scenedesmus sp.</i> (2,20 g/L) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (2,22 g/L)
Floculantes y concentración	
Quitosano	0,25 g/L
Poliacrilamida	1,01 g/L
Sulfato de Aluminio	0,05 mol/L
Ácido nítrico	1 mol/L
Hidróxido de Sodio	1 mol/L
Medición eficacia	se adiciona la solución, se hace vortex por 30 s, se reposa por 10 min y se toma una alícuota del sobrenadante a OD 750 nm
Determinación lípidos	Centrifugación y extracción con DMSO-Metanol y residuo extraído con dietil éter hexano
Determinación de carbohidratos totales	Método modificado fenol-vitriol
Determinación de proteínas	Ensayo de <i>Lowry</i>
Ensayo células viables	Azul de <i>Evans</i>
Reciclaje del medio	Al sobrenadante se ajusta a neutralidad y se adicionan los nutrientes restantes y se usa para cultivo celular

A partir de estos ensayos se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 12:** Resultados obtenidos en la investigación citada (J. Wu et al., 2015).

<b>Resultado</b>	
<b>Desempeño flocculantes</b>	Los cinco flocculantes presentan un desempeño similar con su dosis adecuada. Sin embargo, el sulfato de aluminio representa un problema ambiental, por lo cual no se recomienda su uso
<b>Viabilidad celular</b>	Las células no presentan lisis, indicando que los flocculantes no afectan la viabilidad de las células
<b>Flocculante en la extracción</b>	Para obtención de lípidos se pueden usar los 5 flocculantes, para carbohidratos todos se pueden usar menos NaOH, para proteínas el NaOH es el adecuado
<b>Reciclaje cultivación</b>	No se evidencia mayores diferencias en el crecimiento celular con cualquiera de estos flocculantes
<b>Comparación económica</b>	El flocculante de menor costo es el ácido nítrico

A partir de estos resultados los autores concluyen que todos los flocculantes presentan un comportamiento similar en la recolección celular. Si el producto de interés a obtener son carbohidratos o proteínas, se sugiere usar flocculantes específicos, de lo contrario la decisión del flocculante se debe determinar por factores más allá de lo técnico. Este artículo presenta información bastante útil respecto a las consecuencias del uso de los flocculantes, ya que la concentración de carbohidratos, lípidos y proteínas no dependen fuertemente de las sustancias usadas, adicionalmente presenta métodos simples pero válidos para la cuantificación de los productos intracelulares de las microalgas.

### 2.7.2 Rompimiento celular

Artículo: **A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from microalgae** (Steriti et al., 2014)

DOI: [10.1016/j.biortech.2014.04.056](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.056)

El objetivo de la investigación llevada a cabo en este artículo busca a través del uso de sulfato de hierro y una mezcla de sulfato de hierro y peróxido de hidrógeno, el

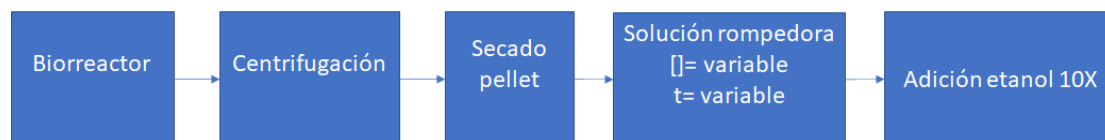
rompimiento celular de microalgas, siendo este el gran cuello de botella para el aprovechamiento de los componentes intracelulares de valor agregado que las microalgas tienen. Ya posterior a este proceso se cuantifican los lípidos obtenidos y después estos se transesterifican para determinar si el proceso permite tener lípidos óptimos para su uso como biocombustibles. En la investigación, los autores cuantifican la concentración de sustancias y tiempo óptimo de reacción de rompimiento celular. Adicionalmente cuantifican la cantidad de lípidos extraídos por este método y el tipo de lípidos transesterificados.

Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación.

**Tabla 13:** Parámetros usados en la investigación citada (Steriti et al., 2014).

Parámetros	Características
Cepa usada	<i>Chlorella vulgaris</i>
Crecimiento celular	Erlenmeyer a 25°C, aire, iluminación 12 horas de 98 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , agitación a 100 rpm
Escalado	Reactor de 6 L, CO <sub>2</sub> puro burbujeado a 30 mL/min, iluminación 12 horas 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
Medio de cultivo	Medio <i>Kolkwitz</i> (KTM-A)
Solución rompedora	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>2. Solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - FeSO<sub>4</sub></li> </ol>
Rompimiento celular	Diagrama posterior
Extracción lípidos	Extracción con agua desionizada, n-hexano
Análisis FAME	Transesterificación con metanol acetil cloro a 100°C, enfriamiento y posterior adición de agua y hexano. Análisis FAME por cromatografía gaseosa

Las etapas del rompimiento celular llevadas a cabo en este trabajo se muestran a continuación:



**Figura 17.** Proceso de rompimiento celular llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. Información tomada de (Steriti et al., 2014) para el desarrollo del diagrama.

A partir de estos ensayos se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 14:** Resultados obtenidos en la investigación citada (Steriti et al., 2014).

Resultado	
Tiempo de contacto óptimo solución rompedora	1. 4 min 2. 3 min
Concentración solución rompedora	1. $[H_2O_2] = 0,29$ M 2. $[H_2O_2] = 0,5$ M, $[Fe_2SO_4] = 0,024$ M
Porcentaje de lípidos extraídos	Sin solución rompedora: 7% 1. 9,5% 2. 17,5%
FAME Saturados y Monoinsaturados obtenidos	Sin solución rompedora: 35% 1. 85% 2. 80%

Con base en estos resultados, el estudio concluye que el uso de estos reactivos es vital para el rompimiento celular y la posterior obtención celular ya que se aumenta la disponibilidad de estos y la concentración final de lípidos obtenidos. Los ensayos posteriores de transesterificación indican que llevar a cabo este rompimiento permite obtener mayores cantidades de lípidos adecuados para su posterior transformación como biodiésel. Esta investigación permite evaluar la alternativa de este uso de reactivos como una opción interesante para el rompimiento celular, las concentraciones y el tiempo óptimo de estos. Como aspecto negativo de esta investigación, se encuentra la forma en cómo se detuvo la reacción de rompimiento celular, la cual fue la adición de 10 veces la cantidad de etanol a la mezcla. Esta adición dificulta la escalabilidad del proceso por el aumento de

costos, menores rendimientos y aumento de tamaño de equipos. Se hace necesario buscar alternativas para parar esta reacción.

Artículo: **Novel electrochemical method for the recovery of lipids from microalgae for biodiesel production** (Daghrir et al., 2014)

DOI: [10.1016/j.jtice.2013.04.013](https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.04.013)

El objetivo de la investigación llevada a cabo en este artículo es la evaluación de un método electroquímico para el rompimiento celular de microalgas y la recuperación de lípidos. En este método, se evaluaron por medios estadísticos las condiciones óptimas de operación que den como resultado la mayor extracción de lípidos. Las variables modificadas fueron intensidad de corriente, tiempo de tratamiento y tasa de flujo de reciclo con variables objetivo siendo la concentración de proteínas y lípidos extraídas de las microalgas. Finalmente, el método electroquímico propuesto con las variables objetivo se compara con métodos convencionales.

Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación:

**Tabla 15:** Parámetros usados en la investigación citada (Daghrir et al., 2014).

Parámetros	Características
Cepa usada	<i>Chlorella vulgaris</i>
Medio de cultivo	Medio <i>Bristol</i>
Unidad experimental	Reactor con dos electrodos, ánodo de Ti/IrO <sub>2</sub> , Ti, Ti/SnO <sub>2</sub> y Ti/PbO <sub>2</sub> y un cátodo de acero inoxidable conectados a una fuente directa y agitación por bomba de recirculación
Variables medidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH</li> <li>• Sólidos totales</li> <li>• Turbidez</li> <li>• Tamaño de partículas</li> <li>• Concentración proteínas</li> <li>• Concentración lípidos</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morfología microalgas</li> </ul>
--	---------------------------------------------------------------------------

A partir de estos ensayos se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 16:** Resultados obtenidos en la investigación citada (Daghrir et al., 2014).

Resultados	
Intensidad de corriente	0,6 A
Tiempo de tratamiento	100 min
Tasa de flujo de reciclo	394,5L
Eficiencia de extracción de lípidos	88,7%
Eficiencia de extracción de proteínas	86,9 %

Finalmente, los autores comparan el proceso electroquímico con los valores óptimos obtenidos con métodos convencionales (sonicación, microondas, hidrotérmico) obteniendo como resultado que el proceso electroquímico da mejores resultados y tiene la ventaja de que este proceso no requiere la remoción de agua para su eficiencia dando ventajas económicas y de proceso.

Dentro de las conclusiones del estudio se evidencia que el proceso electroquímico presenta bastantes ventajas para la extracción de lípidos y proteínas. Las variables progresivas son tiempo de procesos y tasa de reciclo y las regresivas son la intensidad de corriente. Comparado con otros procesos este resulta una alternativa interesante para su implementación y escalamiento. Este estudio resulta de interés ya que determina y cuantifica variables de proceso para la obtención óptima de lípidos y proteínas, pero falla en el análisis del tipo de electrodos usados; y en el análisis y comparación del método electroquímico con procesos convencionales ya que, si bien este proceso es más eficiente, no necesariamente sea el mejor para ser implementado ya que existen otras variables (ambientales, económicas, operacionales) que pueden determinar cuál método es el más viable.

### 2.7.3 Valorización

Artículo: **Biochemical wastewater from landfill leachate pretreated by microalgae achieving algae's self-reliant cultivation in full wastewater-recycling chain with desirable lipid productivity** (L. Zhang et al., 2021)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125640>

El objetivo de este estudio era evaluar el uso de agua residual bioquímica proveniente del vertedero BWLL (biochemical wastewater from landfill leachate) en una batería de fotobiorreactores en serie de microalgas. En el primer reactor se adiciona el agua residual directamente, pasado un tiempo de cultivo, se realiza una sedimentación de las algas y el sobrenadante se usa para cultivos posteriores de microalgas hasta cuatro veces. De estos cultivos se evalúan diferentes factores como el crecimiento celular, contenido de lípidos, influencia de sustancias extracelulares en el cultivo, entre otros factores. Como control los autores llevaron a cabo estos mismos experimentos con medio de cultivo BG11, y un medio BWLL con adición de fósforo. Este estudio se realizó con el fin de determinar si agua residual podía ser usada como fuente de nutrientes para el crecimiento de microalgas y si un tren de FBR eran adecuados para la remoción y limpieza de esta agua, un crecimiento adecuado de las microalgas y un mayor beneficio en la obtención de productos de valor agregado a partir de estas microalgas.

Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación:

**Tabla 17:** Parámetros usados en la investigación citada (L. Zhang et al., 2021).

Parámetros	Características
Cepa usada	<i>Chlorella vulgaris</i>
Medio de cultivo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. BG11</li> <li>2. BWLL</li> <li>3. BWLL + P</li> </ol>
Condiciones de cultivo	FBR 3 l, aireación a 600 mL/min, 25°C, iluminación continua de 81 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , relación N: P 35:1 para medio 1 y 3. En cada cultivo para medios 1 y 3 se adicionan fósforo, no en el medio 2

Tren de reactores	4 FBR en serie por medio de cultivo
-------------------	-------------------------------------

Ya con este montaje el estudio buscó determinar el desempeño de este proceso a través del seguimiento del crecimiento celular, morfología, pigmentos, contenido de lípidos, almidón, proteínas, sustancias extracelulares, iones metálicos, nitrógeno, fósforo, carbono orgánico total y turbidez.

A partir de estos ensayos se obtienen los siguientes resultados:

**Tabla 18:** Resultados obtenidos en la investigación citada ([L. Zhang et al., 2021](#)).

Resultados	
Acumulación de biomasa	En el primer cultivo el crecimiento de biomasa fue mayor en el medio BG11, pero en cultivos consecuentes el crecimiento en BG11 y BWLL + P fue similar. En el medio BWLL, el crecimiento fue el menor
Pigmentos	En la fase inicial el contenido de pigmentos fue bajo en los medios BWLL y BWLL + P, pero a medida que la turbidez del medio descendía, el contenido fue similar en los medio BG11 y BWLL + P
Lípidos, almidones y proteínas	El contenido de almidón y proteínas en los tres medios fue similar y presentaron la tendencia en declive en cada cultivo. El contenido de lípidos fue superior en los medios BWLL y BWLL + P
Sustancias extracelulares	Las sustancias extracelulares pueden inhibir el crecimiento y ser fuente de carbono para la proliferación de bacterias. La concentración extracelular fue mayor en los medios reciclados que en el medio BG11.
Iones metálicos	En el primer cultivo, el contenido de metales era muy alto en los medio BWLL y BWLL + P inhibió el crecimiento de biomasa, pero en los cultivos posteriores cuando ya la concentración de metales en el medio era menor, el crecimiento fue mayor y el consumo de metales fue casi total
Turbidez	Inicialmente la turbidez BWLL y BWLL + P era muy alta, pero en cada cultivo posterior, la turbidez disminuyó por la absorción de sólidos suspendidos hasta que finalmente la turbidez del medio era en su mayoría debido al crecimiento celular, similar al medio BG11



Nitrógeno y fósforo	El contenido de nitrógeno y fósforo son factores muy importantes para el crecimiento celular del medio, en especial en el mantenimiento de la relación N:P de 35:1, lo cual se observa en los medios BG11 y BWLL +P donde al mantener esa relación estos nutrientes disminuyeron en gran medida, a diferencia del medio BWLL en donde en el momento que el contenido de fósforo fue bajo, el de nitrógeno disminuyó poco
---------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Con base en estos resultados, los autores concluyen que el uso de agua residual presenta una alternativa bastante útil en términos económicos y técnicos, adicionalmente al hecho de que con el uso de agua residual se logra un beneficio ambiental importante. Dentro de los factores más importantes para el uso de aguas residuales para el crecimiento de microalgas es mantener la relación N:P en valores óptimos. Este artículo presenta un antecedente bastante útil en mostrar que es posible reutilizar el agua sobrenadante del cultivo de algas varias veces, siempre y cuando se repongan los nutrientes esenciales. En el caso del trabajo que se está realizando en la maestría, esto indicaría adicionar orina cada vez que se lleve a cabo un nuevo cultivo.

Artículo: **Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution** (Rachidi et al., 2020)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00426>

El objetivo del presente estudio fue evaluar si los polisacáridos extracelulares provenientes de las microalgas pueden ser usados como bioestimulantes en el crecimiento de plantas de tomate. Esto a través de la medición de las características de las plantas, aumento en la concentración de carotenoides, clorofila y proteína; indicando que estos polisacáridos son bastante útiles como estimulante en este tipo de plantas.

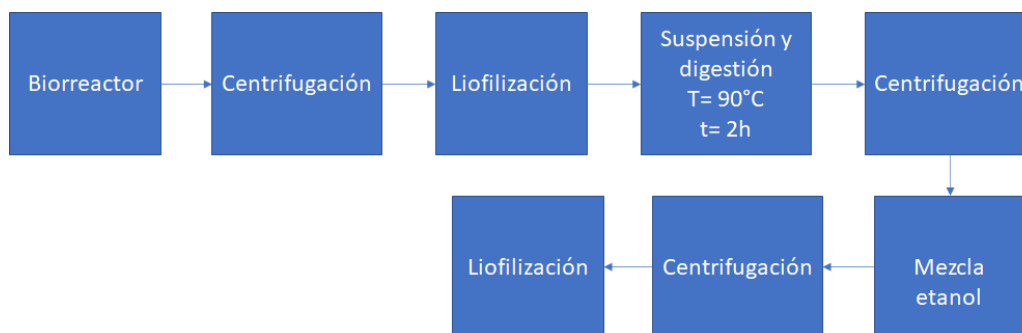
Las características del proceso experimental usado por esta investigación se resumen a continuación:

**Tabla 19:** Parámetros usados en la investigación citada (Rachidi et al., 2020).

Parámetros	Características
Cepa usada	1. <i>Arthrospira platensis</i> MS001

	<ol style="list-style-type: none"> <li>2. <i>Dunaleilla salina</i> MS002</li> <li>3. <i>Porphyridium sp.</i> MS099</li> </ol>
Condiciones de crecimiento	<i>Dunaleilla salina</i> y <i>Porphyridium sp</i> en medio <i>Walne</i> , pH 8,2 a 25 °C <i>Arthrospira platensis</i> medio <i>Zarrouk</i> , pH 9 a 30°C ambos a 150 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$
Planta usada para evaluación	<i>Solanum lycopersicum</i> L. var. <i>Jana F1 (tomate) bayer nunhems netherlands bv. Seeds.</i>
Producción de polisacáridos	Diagrama inferior

Las etapas llevadas a cabo para la obtención de los bioestimulantes se detallan en la siguiente figura.



**Figura 18.** Proceso de obtención de bioestimulantes llevado a cabo en la investigación desarrollada en este artículo. Información tomada de (Rachidi et al., 2020) para el desarrollo del diagrama.

Ya con los polisacáridos extraídos se procedió a cultivar las plantas de tomate complementando sus sustratos con estas sustancias extracelulares y se evaluó el crecimiento de la planta de tomate y las condiciones asociadas al crecimiento. Obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 20:** Resultados obtenidos en la investigación citada (Rachidi et al., 2020).

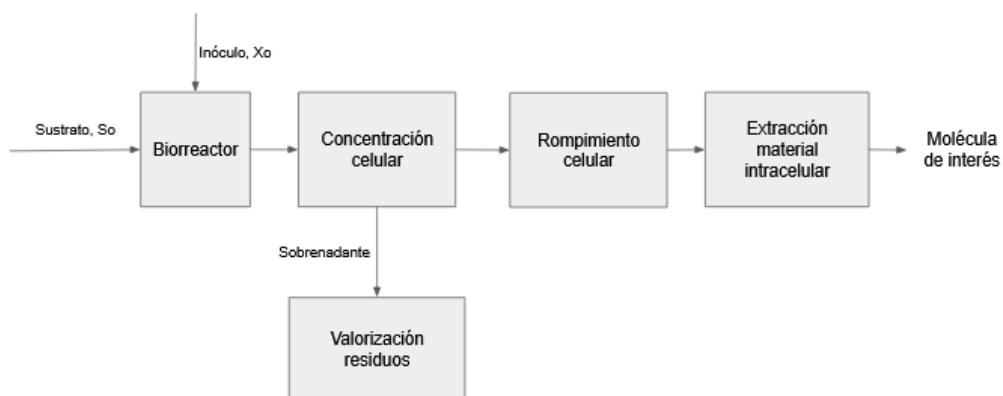
Resultados	
Producción biomasa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1.28 g/L</li> <li>2. 0.95 g/L</li> <li>3. 0.67 g/L</li> </ol>
Contenido de polisacáridos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2.59 %</li> </ol>

extracelulares	2. 4.1 % 3. 5.53 %
Crecimiento planta de tomate con los polisacáridos	Tamaño follaje mejora 25,26% Peso seco raíz mejora 46,61% Peso seco raíz mejora 12,12%
Perfil lípido planta de tomates	Con el uso de los polisacáridos se genera un aumento en la concentración de lípidos cercana al 45%, mejorando el desarrollo de las plantas

A partir de estos resultados, los autores concluyen que los polisacáridos obtenidos a partir de las microalgas presentan resultados positivos como bioestimulantes para el crecimiento de plantas como es el caso de tomate, los cuales va en concordancia con resultados similares obtenidos en otros estudios como el crecimiento de plantas de tabaco, pimienta o amapola. Esta investigación resulta de interés ya que muestra una aplicación del material extracelular obtenido por polisacáridos para su uso como bioestimulantes.

## 2.8 Análisis alternativas recolección y rompimiento celular y valorización corrientes alternas

La extracción de moléculas de interés a partir de microalgas con base en las revisiones de ([Barros et al., 2015](#); [hattab, 2015](#); [Visigalli et al., 2021](#)) se puede sintetizar en el siguiente diagrama:



**Figura 19.** Diagrama general de la obtención de componentes de interés a partir de microalgas y valorización de residuos. Con base en los trabajos de ([Barros et al., 2015](#); [hattab, 2015](#); [Visigalli et al., 2021](#))

Evaluando cada una de las etapas del diagrama de flujo y los diferentes procesos y operaciones que ocurren en cada etapa, es posible determinar que una propuesta de valor para la obtención de lípidos debe tener los siguientes aspectos en cuenta:

- La etapa de recolección de células debe buscar concentrar la biomasa proveniente del biorreactor y remover la mayor cantidad de agua posible, teniendo en cuenta que la concentración de salida del biorreactor es baja (Vandamme et al., 2014); y la disminución de volumen es importante en etapas posteriores como el rompimiento celular (Visigalli et al., 2021).
- Con el fin de evitar la oxidación o modificación de los lípidos (Sandani et al., 2022), se debe preferir el uso de métodos eléctricos o mecánicos, en vez de métodos químicos.
- Se evidencia un enfoque a nivel laboratorio y no tanto a nivel piloto o industrial (Singh & Patidar, 2018; McMillan et al., 2013; D.-Y. Kim et al., 2016), por lo cual es importante enfocar el trabajo a esta escala.
- En la revisión bibliográfica, muchos de los métodos propuestos no tienen en cuenta la relación costo beneficio de cada operación (hattab, 2015), por lo cual resulta importante realizar el análisis respectivo.
- La refinación y purificación de lípidos no es un proceso en el cual la mayoría de los artículos evaluados se detengan, sino que por lo general usan métodos ya establecidos (dos Santos et al., 2015; Lai et al., 2014). El enfoque principal de los artículos es llevar a cabo el rompimiento de la pared celular de las microalgas, considerado el cuello de botella.
- Con el fin de lograr un proceso sostenible económicamente se deben aprovechar las corrientes residuales de las diferentes etapas (Tsarpali et al., 2021).
- Si se busca implementar alguno de estos métodos a nivel piloto o industrial, la mejor alternativa es evaluar los métodos cuyo escalamiento es relativamente simple (Carullo et al., 2018; Barros et al., 2015).
- La valorización de las corrientes alternas del proceso, solo se van a enfocar en dos procesos estandarizados. Debido a que buscar optimizar la valorización de estas corrientes sale del alcance de este proyecto.

- En la revisión bibliográfica llevada a cabo y con base en las alternativas presentes en el laboratorio, se considera que las siguientes opciones tienen una mayor factibilidad de ser implementadas:
- Recolección celular: Sedimentación, Adición de sales inorgánicas, Modificación de pH (ácido y alcalino), coagulación y electrofloculación.
- Rompimiento celular: Corriente eléctrica, Fenton (sol.  $H_2O_2$  y reactivos Fenton), Electro-Fenton, Choque osmótico y como métodos de control Ultrasonicación (control positivo) y algas concentradas sin método de rompimiento celular (control negativo).
- Recuperación de lípidos: Extracción por cloroformo - metanol. Con este método solo se piensa cuantificar la extracción de lípidos por rompimiento celular.
- Valorización residuos: Producción de metano y reutilización medio de cultivo.

## Metodología

### 3.1 Biorreactor

#### 3.1.1 Cepa usada y medio de cultivo

El cultivo microalgal usado es una mezcla de las cepas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. Las cuales fueron obtenidas de un humedal ubicado en la sede Usme de la Universidad Antonio Nariño y aisladas en trabajos previos en el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Antonio Nariño. Como medio de cultivo se usó orina humana disuelta en agua de la llave en una relación de 4 mL de orina por litro de agua. Cada semana se alimentaba el cultivo con 4 mL de orina por litro de cultivo para mantener las mismas condiciones de nutrientes en el medio.

#### 3.1.2 Biorreactor

El cultivo de microalgas se llevó a cabo en dos reactores de 20 L, como inóculo de este se tomó el contenido de un biorreactor de 2 L con este cultivo microalgal en estado estacionario a pH neutro. Como fuente luminosa, una lámpara de led de 30 cm sumergible de 5 W (Deewoo, China), ubicada dentro del reactor. Como fuente de aire se usó una bomba de acuario de 2 L/min (Jeneca, AP 1688, China) con dispersores de aire y como agitación se usó una bomba sumergible de 400 L/h (AT - 707, China). El crecimiento de la biomasa se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo a 675 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20, EE. UU.). La relación entre la concentración de biomasa y la absorbancia a OD 675 nm se da por un análisis de sólidos volátiles (SSV), el cual consiste en medir la absorbancia del cultivo a una concentración de 100%, 75%, 50% y 25%. Se tomaron 10 mL de cada una de estas concentraciones en un crisol y fueron secados en un horno a 105°C a 24 horas y por gravimetría se determinó la cantidad de biomasa por volumen vs absorbancia. Ensayos realizados por triplicado.

## **3.2 Concentración celular**

### **3.2.1 Sedimentación gravitacional**

De los biorreactores se tomó una muestra de 1,5 L de biomasa en fase estacionaria en un recipiente de 2 L y se dejó reposar. De manera periódica se tomó una alícuota a 5 cm debajo de la superficie de la muestra y se determinó el cambio de la concentración de biomasa a esta altura de la muestra debido a la sedimentación. Ensayo realizado por triplicado.

### **3.2.2 Modificación de pH**

Se llevaron a cabo dos ensayos por triplicado. Uno a pH básico por medio del uso de una solución NaOH 1 N y otro a pH ácido adicionando ácido acético glacial; adicionandolos a una muestra de 1,5 L del cultivo microalgal en fase estacionaria en un recipiente de 2 L. Adicionadas las sustancias, se agito la muestra por 2 minutos. Pasado esto, se dejaron reposar y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el proceso de sedimentación.

### **3.2.3 Adición de sales inorgánicas**

Se adicionaron 1,5 g de  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$  a una muestra de 1,5 L del cultivo microalgal en fase estacionaria en un recipiente de 2 L. Se agitó el medio por 2 minutos a 120 rpm, se dejó reposar y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el proceso de sedimentación. Ensayo realizado por triplicado.

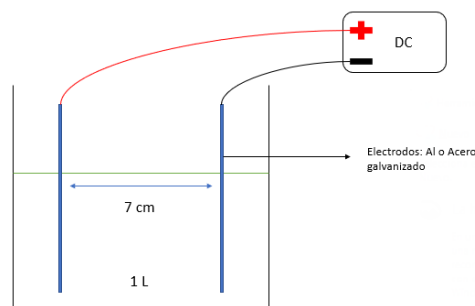
### **3.2.4 Coagulación**

Se llevaron a cabo dos ensayos por triplicado. Uno usando  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  a una concentración molar de 0,0018 (1,8 mM) y otro usando  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 14H_2O$  a concentración molar de 0,0017 (1,7 mM). Adicionados a una muestra de 1 L del cultivo microalgal en

fase estacionaria en un recipiente de 2 L. Se agitó el medio por 2 minutos a 120 rpm, se deja reposar y se lleva a cabo el mismo procedimiento que en el proceso de sedimentación

### 3.2.5 Electrocoagulación

Se llevaron a cabo dos ensayos por triplicado. Uno usando como electrodos dos placas de aluminio con área superficial de  $99 \text{ cm}^2$  por placa, separados a 7 cm. El otro ensayo se realizó con dos placas de acero galvanizado con área superficial de  $80 \text{ cm}^2$  por placa, separados a 7 cm. Los electrodos se conectaron a una fuente de corriente directa (Extech Industries, EE. UU.) con un voltaje de 30 V. En el ensayo usando electrodos de aluminio la electrólisis se llevó a cabo por 7 minutos y para los de acero por 20 minutos, posteriormente se detuvo la electrólisis y se dejó en agitación la solución por 10 minutos a 200 rpm con el fin de facilitar el proceso de aglomeración celular, pasado este tiempo se detuvo la agitación y se permitió la sedimentación o flotación en reposo de las células agregadas por 10 minutos. esto con base en diferentes estudios de electrocoagulación (Baierle et al., 2015; Landels et al., 2019; Lucakova et al., 2021; Visigalli et al., 2021). En la figura 20 se diagrama el montaje experimental de los ensayos de electrocoagulación.



**Figura 20.** Esquema de montaje proceso electrocoagulación a nivel experimental.



### **3.3 Rompimiento celular**

#### **3.3.1 Microalgas concentradas**

Como control negativo se hizo la extracción de lípidos de las microalgas concentradas sin llevar a cabo ninguna etapa de rompimiento celular. Se tomaron 200 mL de algas concentradas y se realizó el procedimiento con estas descrito en el numeral 3.4. Estas microalgas concentradas provenientes del proceso de electrocoagulación con electrodos de hierro se caracterizaron por sólidos volátiles (SSV) dando una concentración de 3190 mg/L, estas microalgas se usaron para el rompimiento celular por los diferentes métodos del numeral 3.3.

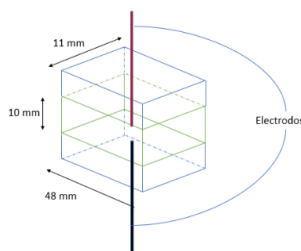
#### **3.3.2 Ultrasonicación**

El rompimiento de algas por ultrasonicación se usó como método de control positivo. 25 mL de microalgas concentradas en un tubo de fondo cónico de 50 mL se colocaron en el equipo de ultrasonicación (Q125, Qsonica, EE. UU.) a una potencia del 90% de amplitud (112,5 W), por un periodo de 10 min a una frecuencia de 20 kHz a ciclos de 4 segundos encendido, 1 segundo apagado, esto con base en los estudios de ([Daghrir et al., 2014](#); [Misra et al., 2015](#); [Zou et al., 2021](#)). Posterior a este proceso, se tomó la muestra para la extracción de lípidos. Ensayo realizado por triplicado.

#### **3.3.3 Aplicación corriente eléctrica**

La aplicación de corriente eléctrica se realizó por medio de un módulo generador de alto voltaje con voltaje de entrada de 3v- 6v, corriente de entrada de 2 A - 5 A y un voltaje de salida nominal de 400 kV (EQV, China). El pulso eléctrico fue aplicado en una cámara de largo 48 mm, ancho 11 mm y alto 10 mm en cuyo interior se pusieron las microalgas concentradas, en un volumen aproximado de 5,28 mL. El tiempo de proceso fueron 30 seg. Las dimensiones de largo y ancho de la cámara y el tiempo de proceso se basaron en el estudio de ([Silve et al., 2018](#)). La cámara fue fabricada por impresión 3D

usando PLA como filamento. Ensayo realizado hasta completar 200 mL. En la figura 21 se esquematiza el montaje experimental para este método.



**Figura 21.** Esquema cámara de pulsos eléctricos. Basado en (Silve et al., 2018)

### 3.3.4 Fenton

Se realizaron dos ensayos tres veces. En el primer ensayo se disminuyó el pH debajo a 4 usando ácido acético glacial, después se adicionaron 2 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 M a 500 mL de microalgas concentradas en un beaker agitando por 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 2 mL de bisulfito de sodio 0,1 M para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno y detener la reacción. En el segundo ensayo se disminuyó el pH debajo de 4, se adicionaron 14 mL de una solución de  $\text{FeSO}_4$  0,024 M y 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 M a 500 mL de microalgas concentradas en un beaker agitando por 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 2 ml de bisulfito de sodio 0,1 M para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno y detener la reacción Fenton. Esto con base en el estudio desarrollado por (Steriti et al., 2014).

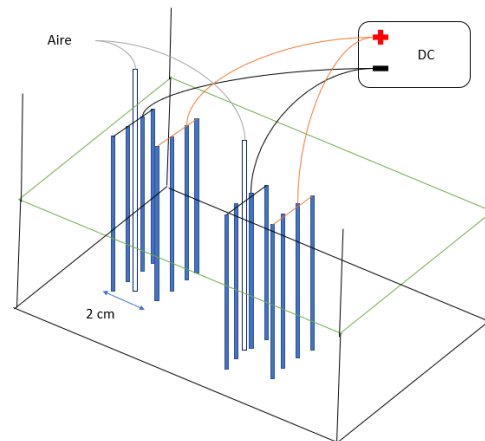
### 3.3.5 Electro-Fenton

Se realizaron dos ensayos tres veces. En el primer ensayo los dos electrodos fueron de no sacrificio, usando barras de grafito, en cercanías del cátodo, se colocó una fuente de oxígeno conectada a una bomba de aire (Jeneca, AP 1688, China) de 2 L/min con el fin de generar la formación de peróxido de hidrógeno. La distancia entre los cátodos y ánodos fue de 2 cm. Por los electrodos, conectados a una fuente de corriente directa (Extech Industries, EE. UU.), se hizo pasar una corriente de 5 V por 40 minutos. Apenas se inició la electrolisis, se adicionaron 14 mL de una solución de  $\text{FeSO}_4$  0,024 M. Este proceso se

realizó en un recipiente con 500 mL de microalgas concentradas con un conjunto de electrodos por duplicado.

El segundo ensayo se usaron electrodos de sacrificio, El montaje es similar al del primer ensayo con la diferencia de que el ánodo es una lámina de acero galvanizado y que en este caso no se usó una fuente de hierro adicional ya que el ánodo es el que proveyó estos iones al sistema.

La generación de peróxido de hidrógeno se determinó por medio de cintas indicadores de peróxido del rango de 0 a 100 mg/L de  $H_2O_2$  (MQuant, EE. UU.). En la figura 22, está el montaje experimental llevado a cabo para este proceso de rompimiento celular.



**Figura 22.**Esquema montaje Electrofenton. Basado en [\(Sandani et al., 2022\)](#)

### 3.3.6 Choque osmótico

Para este proceso se hicieron tres ensayos por triplicado. 100 mL de microalgas concentradas se mezclaron con 300 mL de una solución de NaCl al 10%, se agitaron por 5 minutos (primer ensayo) y se dejaron reposar por 24 horas (segundo ensayo) y 48 horas (tercer ensayo). Esto con base en los estudios de [\(Ansari et al., 2015; Byreddy et al., 2015\)](#). Posterior al ensayo de 24 horas se recuperó la solución salina y se repitió el ensayo de 24 horas.

### **3.4 Extracción de lípidos**

La extracción de lípidos fue utilizada como método de evaluación y comparación entre procesos. Se usó como base el método de Bligh & Dyer ([Enamala et al., 2018](#)). 50 mL de microalgas, que pasaron por el proceso de rompimiento celular, se llevaron a una centrífuga (SL 8R Thermoscientific, EEUU) a 4500 rpm (3260 G) por 10 minutos. Se recolectó el pellet de microalgas que pasó por la etapa de rompimiento celular. Se pesó el pellet de algas y se adiciono una solución de cloroformo metanol en relación 2:1 en una cantidad de 20 veces el volumen de algas concentradas (es decir para 1 mL de microalgas, 20 mL de solución). Se realizó una agitación por 30 minutos, después la muestra se llevó nuevamente a centrifugación a 4500 rpm (3260 G) por 10 minutos. La fase oleosa se recolectó en un envase de fondo cónico pre pesado y se dejó secar a 60°C hasta peso constante. Se cuantificó la cantidad de lípidos obtenida respecto a la cantidad inicial de algas usadas. Ensayo realizado por cuatro veces para cada método descrito en el numeral 3.3.

### **3.5 Valorización corrientes alternas**

#### **3.5.1 Reutilización medio de cultivo**

Del proceso de recolección celular se tomó el sobrenadante, se ajustó el pH a neutralidad ya sea con ácido acético glacial o solución de NaOH 1N. En un fotobiorreactor se tomaron 800 mL de este sobrenadante ya neutralizado, 200 mL de inóculo de microalgas y 4 mL de orina. Como fuente lumínica se usó una lámpara led 5 W (Deewoo, China) y como fuente de aire, una bomba de aire de 2 L/min (Jeneca, AP 1688, China) con un dispersor de aire. El crecimiento de la biomasa se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo a 675 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20, EE. UU.). Como control del desempeño de este sobrenadante para el cultivo de microalgas, se cultivaron bajo las mismas condiciones el mismo tipo de microalgas en medio fresco compuesto de orina humana diluida en agua de la llave, en la misma relación mencionada en el numeral 3.1.2. Ensayo realizado por triplicado.

### 3.5.2 Producción de metano

La producción de metano del sobrenadante se llevó a cabo, adicionando 200 mL del líquido sobrenadante a 11 mL de lodo granular en un recipiente cerrado con válvula de salida de gas cerrada. Este recipiente se incubó a 35 °C y cada dos días se midió el biogás generado, por desplazamiento de líquido, ubicado en otro dispositivo que tenía en solución hidróxido de sodio 1 N. Antes y al finalizar la producción de metano, se caracterizó el agua sobrenadante midiendo demanda química de oxígeno, fósforo reactivo, potasio y nitrógeno haciendo uso de los kits de Hanna asociados al fotómetro multiparamétrico HI83399 (Hanna Instruments, EEUU) para cuantificar la degradación lograda y para verificar la degradación biológica llevada a cabo. Ensayo realizado por triplicado. En la figura 23, se visualiza el equipo usado para cuantificar la producción de metano.

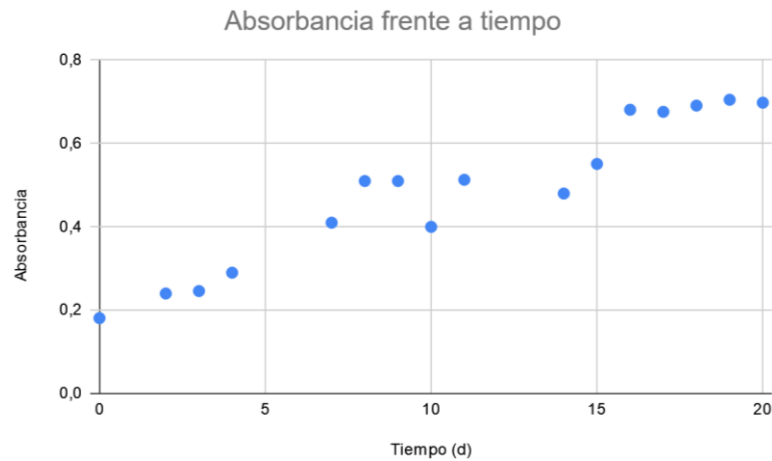


**Figura 23.** Dispositivo medición de biogás por desplazamiento de líquido. Dispositivo fabricado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental en trabajos previos.

## Resultados y Discusión

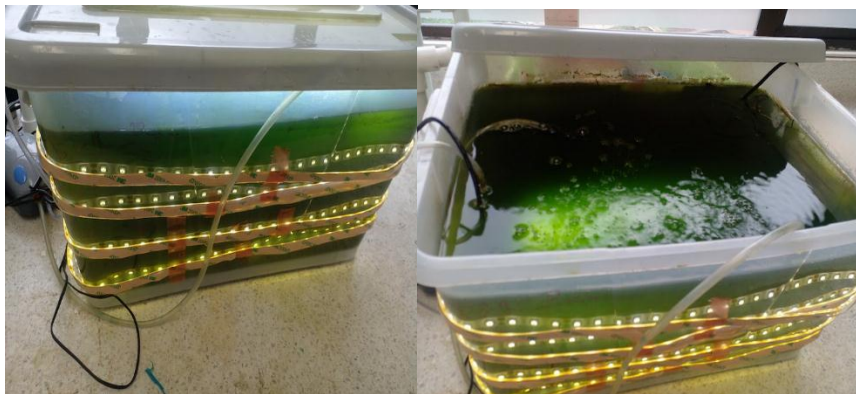
### 4.1 Biorreactor

La curva de crecimiento de biomasa en el fotobiorreactor (FBR) medida en absorbancia a OD 675 nm vs días fue la siguiente:

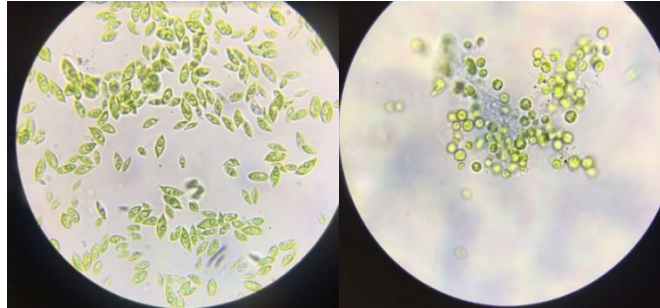


**Figura 24.** Curva de crecimiento biomasa (OD 675nm) vs tiempo (días) en fotobiorreactores

El estado estacionario de crecimiento de biomasa se logró a partir de los 16 días del inicio del cultivo. Los fotobiorreactores ya cuando se encontraban en estado estacionario tenían la siguiente apariencia.



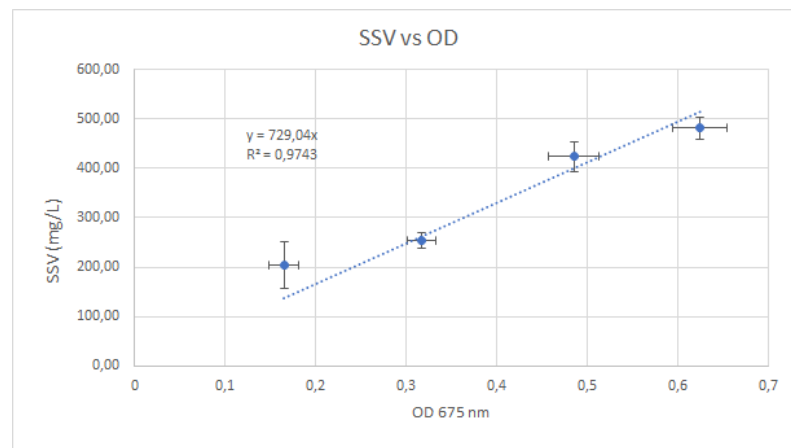
**Figura 25.** Fotobiorreactores microalgas en fase estacionaria de crecimiento.



**Figura 26.** Cultivo microalgal visto por microscopio. Izq. Cultivo mixto de ambos géneros de microalga. Der. Microfotograma de un área donde solo se observa el género *Chlorella*.

Se tomó una muestra de la biomasa generada en el FBR y se observó por el microscopio (OMAX, EE. UU.) Evidenciado el cultivo de microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. En los cuales en la figura 26 en la izquierda se evidencia el cultivo mixto de ambos géneros de microalgas, *Scenedesmus* con una morfología elíptica con ligeros apéndices espinosos (Borowitzka et al., 2016) y *Chlorella* con una forma esférica definida y agrupadas (Safi et al., 2014). Microalgas *Chlorella* que en la figura de la derecha se detalla de mejor manera ya que esta imagen es de una zona en donde en su mayoría estaban microalgas de este género.

Por medio de gravimetría se determinó la cantidad de sólidos volátiles (SSV) y se obtuvo la relación entre concentración de biomasa y densidad óptica descrito en la figura 27 y ecuación (2).



**Figura 27.** Curva de calibración SSV (mg/L) vs absorbancia

La ecuación obtenida que asocia la concentración de biomasa con la densidad óptica es la siguiente:

$$SSV_{\left(\frac{mg}{L}\right)} = 729,04 * OD_{675nm} \quad (2)$$

Con las microalgas en fase estacionaria de crecimiento se procede a llevar a cabo la etapa de concentración celular.

## 4.2 Concentración celular

### 4.2.1 Sedimentación gravitacional

Durante las primeras seis horas de los ensayos se midió la absorbancia del medio cada 30 minutos y posteriormente cada día. Esto dio como resultado que en la primera seis horas del ensayo, la absorbancia promedio pasó de 0,752 a 0,520, a las 24 horas 0,304 y a las 49 horas a un valor de 0,202, momento en el que se paró el ensayo. Este resultado se usó como línea base para comparar el desempeño de los otros métodos, teniendo en cuenta que fue el único método en donde la concentración celular no estuvo mediada por la acción de un método químico o electroquímico.

### 4.2.2 Modificación de pH

En los ensayos de modificación de pH se llevaron a cabo dos pruebas. Uno a pH básico usando NaOH 1 N y otro a pH ácido usando ácido acético glacial.

Para el ensayo a pH básico, la muestra de 1500 mL de microalgas tenía un pH inicial de 7,37. Se utilizaron en promedio 12,66 mL de NaOH 1 N para llegar a un pH de 12, dando una concentración de 334 mg/L de NaOH en la muestra. La medida de absorbancia se hizo en rangos similares al del ensayo de sedimentación. En las seis primeras horas se pasó de una absorbancia de 1,110 a 0,765, a las 24 horas a 0,296 y a los 2 días a 0,15. Esto dio un porcentaje de remoción al finalizar el ensayo del 86%. Al comparar estos resultados con lo reportado por [\(J. Wu et al., 2015\)](#) se obtienen resultados comparables ya que la eficiencia de remoción en el estudio usando NaOH es cerca del 90%.

Otro estudio con una metodología comparable al trabajo realizado es el de [\(Castrillo et al., 2013\)](#) en donde evaluaron la influencia del pH en la floculación - sedimentación de microalgas, los cuales a un pH de 12 usando NaOH en un cultivo



*Chlorella vulgaris* obtuvieron una remoción del 80%. La principal diferencia entre este estudio y el trabajo realizado radica en el tiempo que se logró esta remoción ya que en el estudio esto se logró a 60 min, mientras que, en este trabajo, esto se logró en un tiempo cercano a 48 h. Esta diferencia en los tiempos se puede explicar parcialmente al medio de cultivo usado, el cual en el estudio comparado tiene sales de magnesio, calcio y de otros iones lo cual facilita la formación de precipitados a pH altos y llevar a cabo el efecto barrido (Mathimani & Mallick, 2018); y de esa manera la precipitación de las microalgas. Mientras que en este trabajo realizado el medio de cultivo fue agua de la llave y orina humana, la cual, si bien es una fuente de nutrientes para el crecimiento, no es la más difundida y común como sí lo son los medios formulados y cuya concentración de iones calcio y/o magnesio es menor (Behera et al., 2020).

Respecto al proceso de acidificación del medio, las muestras de 1500 ml tenían un pH en promedio de 3,75 posterior a la adición de 1 mL de ácido acético glacial a cada una (concentración de ácido en la muestra: 699 mg/L). La medición se realizó en un rango menor de tiempo ya que en 28 horas la absorbancia del medio era en promedio 0,058, valor de densidad óptica menor a la prueba de sedimentación o en la que se usó NaOH, por lo cual se decidió detener la prueba en ese momento. Al comparar estos resultados con el ensayo a pH alcalino, se evidencia que el método ácido es más veloz. Lo cual se puede explicar por la influencia del medio en el mecanismo de separación predominante en cada ensayo. En el ensayo alcalino, la separación es influenciada por la presencia de iones calcio y magnesio en el medio (Behera et al., 2020), mientras que en el ensayo a pH ácido, la separación se debe a la neutralización de cargas en la superficie de las microalgas por la adición de protones, en donde el medio de cultivo y la fuente de micronutrientes usada influyen en menor medida y lo de mayor relevancia es el pH y la concentración de biomasa (Mathimani & Mallick, 2018). Se comparan los resultados con los obtenidos en (J. Wu et al., 2015) en donde se usó ácido nítrico en vez de acético, obteniendo una remoción entre el 85% y el 95% dependiendo de la cepa de microalga usada dando un resultado similar al obtenido en el ensayo a pH ácido. Obtener un resultado de remoción similar con un ácido débil orgánico como lo es el ácido acético al reportado con ácido nítrico es relevante ya que este ácido orgánico se puede obtener en un proceso de digestión

anaerobia de residuos biológicos (Bai et al., 2021), integrando la concentración de microalgas a un proceso de valorización de residuos.

### 4.2.3 Adición de sales inorgánicas

Durante las primeras seis horas del ensayo, la absorbancia se midió cada 6 horas y la última medición se llevó a cabo a las 24 horas del ensayo, momento en el que se detuvo el ensayo, esto debido a que la absorbancia fue similar a la del ensayo de sedimentación a las 48 h. La absorbancia del medio en las 6 primeras horas del ensayo pasó de 0,872 a 0,489 y en las 24 horas a 0,212. En el estudio realizado por (Yang et al., 2022) muestra que el aumento de la salinidad del medio mejora la floculación de microalgas de agua dulce, tipo de algas como las del trabajo realizado. En el ensayo realizado la adición de una sal inorgánica mejoró el proceso de floculación ya que, al compararlo con los resultados del método de sedimentación, se logró una absorbancia similar 24 horas antes que en el proceso de sedimentación, resultado acorde al estudio con el que se está comparando este ensayo.

### 4.2.4 Coagulación

Se hicieron dos ensayos de coagulación. Un ensayo usando  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para obtener una concentración de 500 mg/L de coagulante en el medio. El ensayo se llevó a cabo por 210 minutos, en donde cada media hora se midió la absorbancia del medio, pasando de 0,793 a 0,104 obteniendo una remoción promedio del 86,85%. En comparación con los otros métodos se evidenció una disminución considerable de tiempo. Se comparan los resultados obtenidos con los estudios de (D. Y. Kim et al., 2015) y (Ummalyima et al., 2016) en donde en el primer estudio usaron  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  y en el segundo usaron solo  $\text{FeCl}_3$  como sales de hierro para la floculación. En el primer estudio a una dosificación similar se obtiene una remoción cercana al 85% y del 40% usando  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  respectivamente. En el segundo estudio a comparar, a un tiempo fijo de 10 minutos de sedimentación para lograr una remoción similar se requirió una concentración 10 mM de  $\text{FeCl}_3$ . En este aspecto en el presente trabajo realizado si bien el tiempo requerido de floculación fue mayor, los porcentajes de remoción fueron bastante similares a los

obtenidos en los estudios comparados, la diferencia en los tiempos es posible explicarla por la baja concentración de coagulantes usados, lo cual genera un gradiente bajo de concentración, el cual por ley de acción de masas influye en la cinética del proceso haciéndolo más lento.

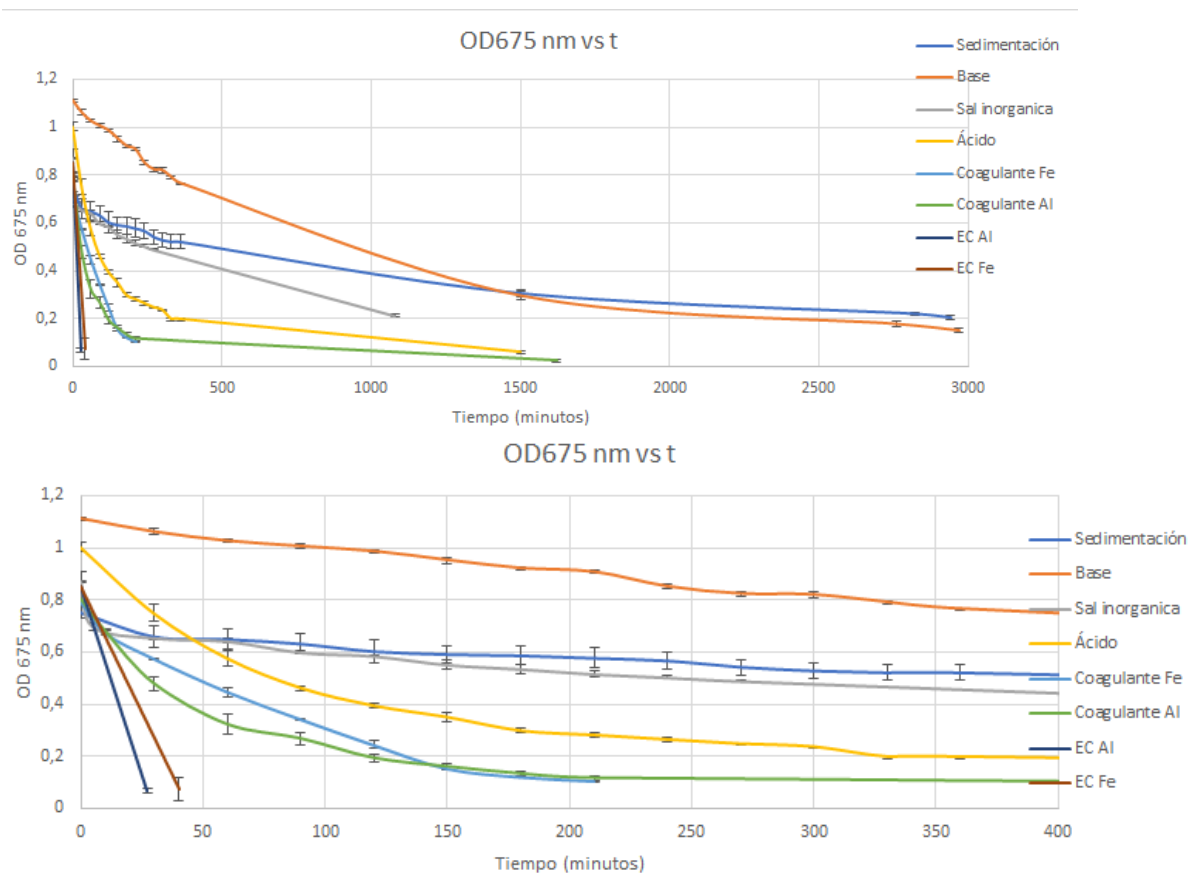
Para el segundo ensayo de coagulación se usó concentración de 1000 mg/L de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  en la muestra de biomasa. El ensayo se llevó a cabo por 24 horas, en donde en los primeros 180 minutos se hizo una medición similar a la hecha con el coagulante de hierro. Se decidió no parar el ensayo viendo que el uso de coagulantes estaba arrojando remociones mayores en un corto tiempo en comparación a los otros métodos y se quiso observar la remoción obtenida pasada las 24 horas. En los primeros 180 minutos se pasó de una absorbancia de 0,802 a una de 0,132, llegando a una remoción del 83,513%, similar a la obtenida con  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; y a las 24 horas la absorbancia es de 0,023. Comparando los resultados obtenidos con los estudios de [\(Ummalyima et al., 2016; J. Wu et al., 2015\)](#) que usan  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  obteniendo una remoción cercana al 87% con 200 mM, y entre el 85% y 100 % empleando 250 mg/L de sal inorgánica; y el de [\(Rwehumbiza et al., 2012\)](#) usando nitrato de aluminio para obtener una remoción 99% empleando 60 mg/L de coagulante. El trabajo realizado muestra una remoción cercana a la dada por los estudios comparados, con la principal diferencia de que en el primer estudio la concentración es mayor y en los dos últimos la concentración es menor. Respecto al tiempo, los estudios usaron un tiempo fijo y una agitación inicial de muy alta potencia, lo cual permite una aglomeración de partículas más eficiente, que la obtenida por una agitación de baja potencia como la realizada en el trabajo.

#### **4.2.5 Electrocoagulación**

En el ensayo usando placas de aluminio como electrodos, el tiempo de electrólisis fueron 7 minutos. En el caso del ensayo donde los electrodos fueron de acero galvanizado, el tiempo de la electrólisis es de 20 minutos. En el ensayo usando aluminio se partió de una absorbancia de 0,849 y se obtuvo una absorbancia final promedio de 0,067 (remoción 92,1%). En el ensayo usando acero galvanizado la absorbancia inicial fue de 0,849 y la final fue 0,073 (remoción promedio 91,3%). Confrontado con los otros métodos se

evidenció que este tuvo una remoción mayor y el tiempo en que se logró fue menor que en los demás. Comparado los resultados obtenidos con los estudios de (Baierle et al., 2015; Lucakova et al., 2021; Uduman et al., 2011) y la revisión de (Visigalli et al., 2021), los resultados de eficiencia de floculación por electrolisis estuvieron en el rango del 85% al 100% dependiendo de la especie de microalga usada, adicionalmente evidencian que la remoción cuando se usó aluminio como electrodo es mayor y requirió un menor tiempo de electrólisis que cuando se usó hierro. Aspecto igualmente evidenciado en los ensayos realizados.

En síntesis, a continuación, se muestran los resultados de la absorbancia vs tiempo de cada método de concentración celular evaluado, en la duración total de cada uno y a corte de 400 minutos



**Figura 28.** Curva Absorbancia sobrenadante vs tiempo de los diferentes métodos de concentración celular. Arriba. Curva por la duración de todos los ensayos. Abajo. Curva a corte de 400 minutos.

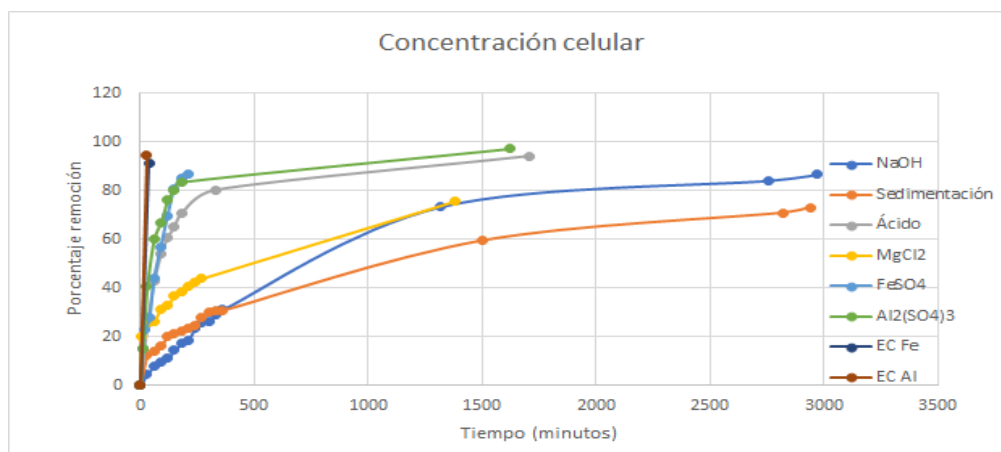
#### 4.2.6 Comparación de métodos análisis técnico

El porcentaje de remoción mide el cambio de la absorbancia del medio debido al proceso de recolección celular respecto a la absorbancia inicial. A menor absorbancia en el medio, mayor el porcentaje de remoción y menor la concentración de biomasa en el sobrenadante (J. Wu et al., 2015), evidenciado en la ecuación (3)

$$\% \text{ de remoción} = \left( 1 - \frac{OD_{675nm}}{OD_{i675nm}} \right) * 100 \quad (3)$$

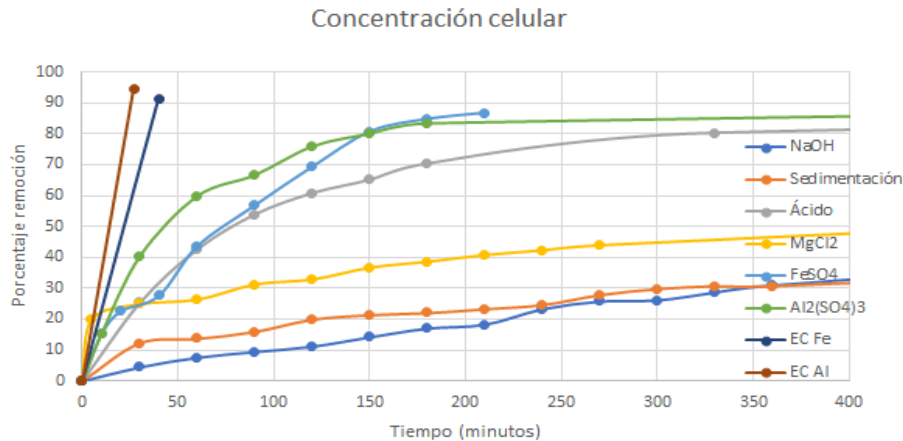
En donde  $OD_{675nm}$  es la absorbancia del sobrenadante cada vez que se lleva a cabo la medición y  $OD_{i675nm}$  es la absorbancia inicial.

El porcentaje de remoción se calculó para todos los métodos, evidenciado en la figura 29.



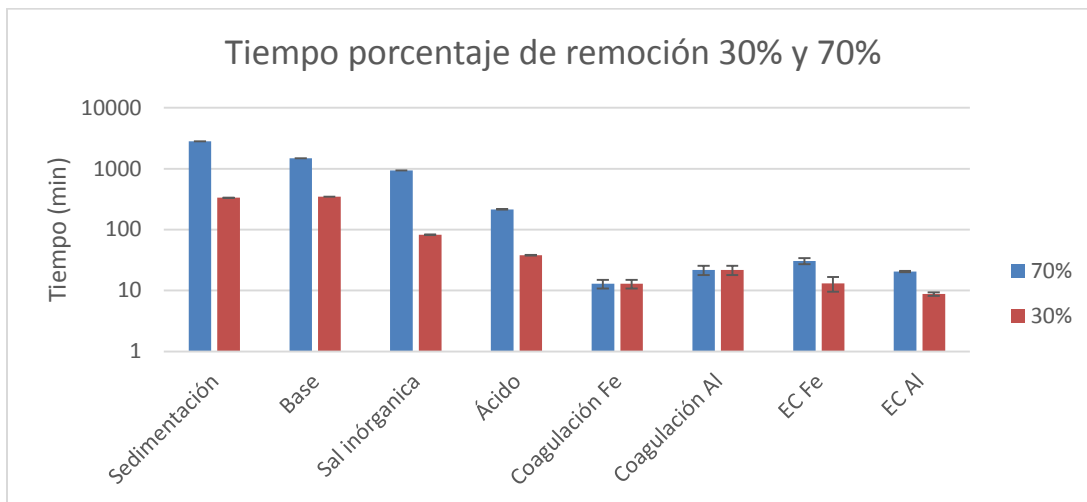
**Figura 29.** Perfil de porcentaje de remoción para los métodos de concentración celular

Teniendo en cuenta que el tiempo de los ensayos no fue el mismo para todos, se decidió hacer un corte a los 400 minutos para realizar la comparación de la remoción entre los métodos evidenciado a continuación en la figura 30.



**Figura 30.** Perfil porcentaje de remoción de los diferentes métodos de recolección celular con corte a 400 minutos.

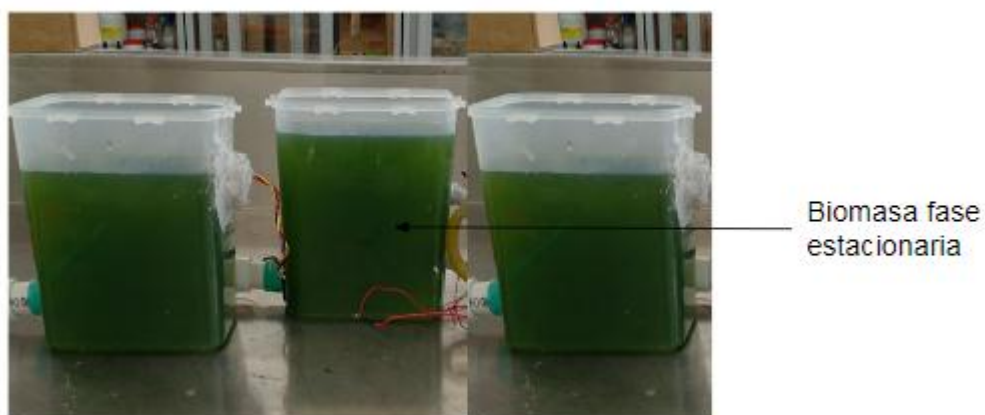
Como forma adicional de comparación entre métodos se contrasta el tiempo al que cada método le tomó llegar a un porcentaje de remoción del 30% y al 70%. Se usaron como criterio de comparación estos dos porcentajes de remoción ya que el 30% es el porcentaje que logró la sedimentación gravitacional (el cual fue el método de base) a 400 minutos, siendo este el tiempo de corte usado en la figura 30 y 70% ya que fue el rango de remoción alcanzado por la sedimentación en todo el transcurso de su ensayo, comparación visualizada en la figura 31.



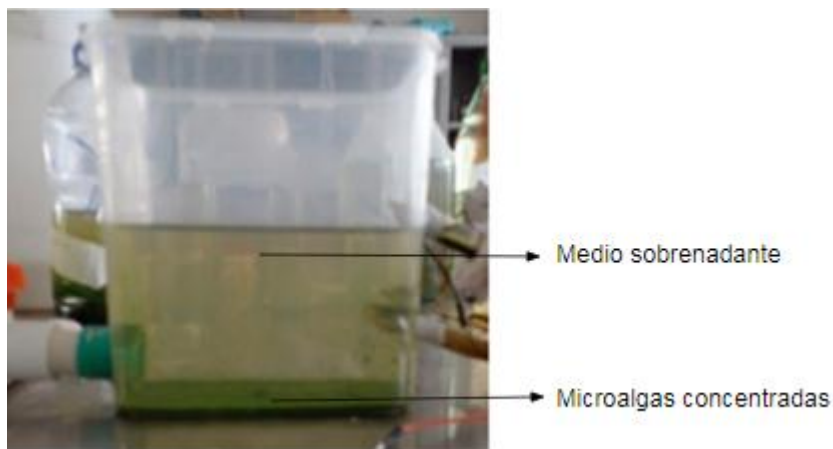
**Figura 31.** Tiempo para alcanzar un porcentaje de remoción del 30% y 70% de cada método.

A partir de los ensayos de concentración celular por los diferentes métodos se observa que a los 400 minutos solo cuatro métodos habían logrado un porcentaje de remoción mayor al 80% (Floculación Fe, Al y Electrocoagulación Fe y Al). De estos cuatro métodos, solo los de electrocoagulación antes de los 50 minutos habían removido más del 90% de biomasa.

A continuación en las figuras 32 y 33, se muestra el montaje del ensayo por triplicado de los métodos de recolección celular, exceptuando los de electrocoagulación y el resultado final de los ensayos para cada método.



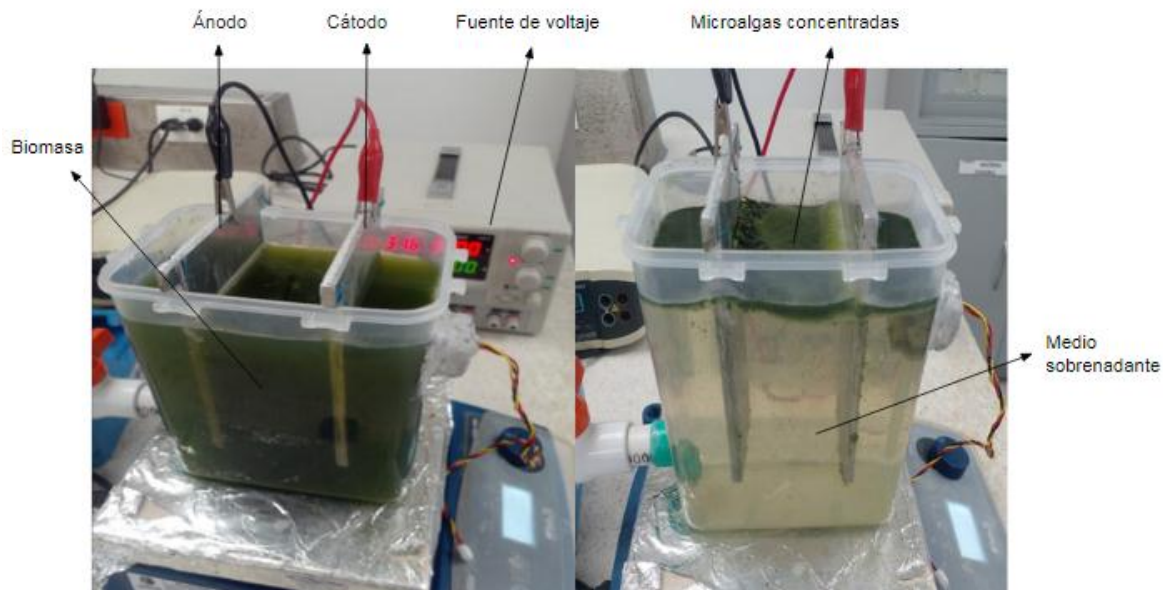
**Figura 32.** Etapa inicial de los ensayos de cada método de recolección celular exceptuando los de electrocoagulación



**Figura 33.** Resultado final típico ensayo de recolección celular, exceptuando electrocoagulación

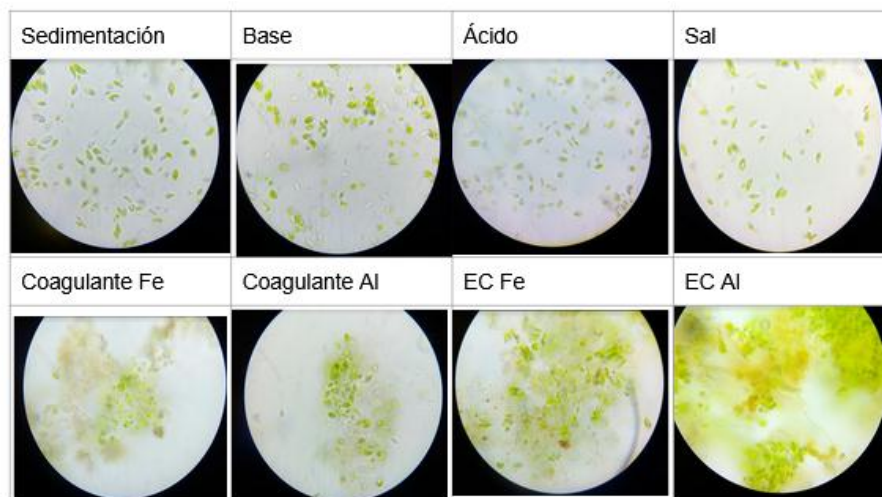
En el ensayo de electrocoagulación el montaje inicial y el resultado final típico fue el siguiente:





**Figura 34.** Ensayo electrocoagulación etapa inicial y final del ensayo

Finalizados los ensayos de concentración, se observaron a través del microscopio las características de las microalgas y el cambio de estas por la acción de cada método, evidenciado en la siguiente figura.



**Figura 35.** Observaciones al microscopio de las microalgas posterior a los diferentes métodos de concentración celular.

De las visualizaciones al microscopio se observó en los cuatro primeros ensayos una baja aglomeración de las células, lo cual solo se esperaba en el ensayo de sedimentación gravitacional ya que en este no se busca una modificación de la carga del medio para la aglomeración de partículas. En los ensayos donde se usó  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$



y los de electrocoagulación si se evidencia una aglomeración celular (hattab, 2015), siendo este el resultado esperado en estos métodos.

Continuando la comparación entre métodos, se determinó el volumen de biomasa concentrada recuperada, la concentración de biomasa determinada por sólidos volátiles, la cantidad de biomasa concentrada y el volumen removido de la muestra proveniente del biorreactor, resultados sintetizados en la siguiente tabla.

**Tabla 21:** Resultado de ensayos de concentración celular

	Sedimentación gravitacional	NaOH	Ácido	Coagulante Aluminio	Coagulante Hierro	Cloruro de Magnesio	Electrodo Aluminio	Electrodo Hierro
v (L)	0,108	0,062	0,039	0,058	0,057	0,138	0,187	0,217
C (mg peso seco/L)	4160	9310	3310	9190	6560	2570	4500	3190
Cantidad recuperada (mg peso seco)	448,356	579,289	128,722	536,083	371,733	354,089	840	691,167
Volumen removido (%)	89,22	93,78	96,11	94,17	94,33	86,22	81,33	78,33

Los crisoles con la biomasa concentrada por cada método posterior al ensayo de sólidos volátiles tiene la siguiente apariencia.



**Figura 36.** Ensayo de sólidos volátiles para las muestras de los diferentes ensayos de concentración celular. Arriba de izquierda a derecha coagulante hierro, coagulante aluminio, electrocoagulación electrodos de hierro y electrocoagulación electrodos aluminio. Debajo de izquierda a derecha sedimentación, pH base, pH ácido, sal inorgánica.

A partir de estos resultados se evidencia lo siguiente:

- En un tiempo prolongado ( $t > 2500$  min) todos los métodos lograron un porcentaje de remoción mayor al 70%.
- Al manejar un intervalo de tiempo hasta 400 min, 4 métodos (Electrocoagulación Fe, Al; floculación Fe, Al) se logró una remoción mayor al 80 %. De los otros 4 métodos solo uno logró una remoción cercana al 50%.
- En el intervalo de 400 minutos solo los métodos electroquímicos lograron una remoción mayor al 90%.

De estos procesos de recolección celular, el de mejor desempeño en el proceso de remoción fue el de electrocoagulación con electrodos de Al, seguido muy de cerca por la electrocoagulación con electrodos de Fe.

#### 4.2.7 Comparación de métodos análisis económico

El desempeño en la remoción de biomasa no fue el único factor a tener en cuenta para la selección del método óptimo. También se llevó un análisis económico con el fin de facilitar una posible aplicación industrial de los resultados de la etapa de concentración celular (Harrison et al., 2015).

Para el análisis económico, se usó como criterio la utilidad operacional, calculada de la siguiente manera.

$$Utilidad\ operacional = ingreso\ operacional - costo\ operaconal \quad (4)$$

$$Ingreso\ operacional = \frac{v * C * F}{t} \quad (5)$$

$$costo\ operaconal = \frac{V * I * t_1 * S}{1000t} + \frac{N * J}{t} \quad (6)$$

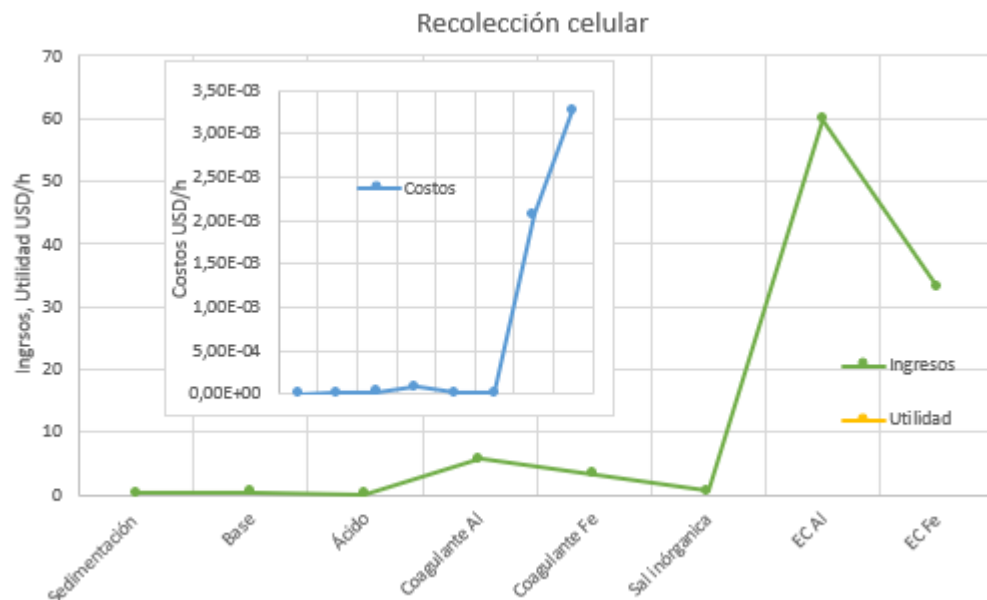
$$Utilidad\ operacional = \frac{v * C * F}{t} - \frac{V * I * t_1 * S}{1000t} - \frac{N * J}{t} \quad (7)$$

En donde

- v: volumen recuperado de células concentradas (L)

- C: Concentración final biomasa en el volumen recuperado (mg/L)
- F: Valor de venta microalgas (USD/mg)
- t: Tiempo duración operación de concentración (h)
- t1: Tiempo duración electrolisis (h)
- V: Voltaje (V)
- I: Corriente eléctrica (A)
- S: Costo kWh (USD/kWh)
- N: Cantidad sustancia usada en la operación (mg)
- J: Costo sustancia usada (USD/mg)
- 1000= factor de conversión de W a kW

El valor de venta de las microalgas se tomó a partir de estas fuentes ([Biorizon Biotech, 2018](#); [Schade & Meier, 2021](#)), el costo de kWh se tomó de [Tarifas de energía | Enel Colombia 2022](#) y el costo de las materias primas se obtuvo a partir de una página de compra de sustancias químicas como lo es <https://www.alibaba.com> (año 2022). Los valores de utilidad operacional para cada método se detallan a continuación.



**Figura 37.** Utilidad, ingresos y costos operacionales de cada método de recolección celular.

Comparando la utilidad operacional de los diferentes métodos se evidenciaron dos aspectos relevantes. El primero fue que los costos operacionales de todos los métodos

tuvieron un costo muy bajo incluso los que usan energía eléctrica, esto en gran medida se debió al poco tiempo de duración de la electrólisis. El segundo aspecto evidenciado fue que el tiempo del proceso fue muy importante para el ingreso operacional ya que en procesos como el de coagulación o electrocoagulación los ingresos fueron mayores en gran medida por el poco tiempo de proceso en comparación a los otros métodos y no tanto por el porcentaje de remoción de biomasa.

Respecto a la utilidad operacional se observó el proceso de electrocoagulación usando electrodos de Al genera una mayor utilidad seguido de la electrocoagulación con electrodos de Fe.

#### **4.2.8 Comparación de métodos análisis de seguridad sustancias químicas**

El aspecto técnico y económico no resulta suficiente para la selección del método adecuado de concentración, es necesario realizar un análisis de seguridad industrial sobre las sustancias químicas usadas.

Se procedió a realizar una revisión de las sustancias usadas en el proceso de concentración celular con el fin de determinar posibles factores que afecten el uso posterior de las microalgas recolectadas.

- Base – Hidróxido de sodio: Riesgo bajo, fácilmente neutralizable (Castrillo et al., 2013).
- Ácido- Ácido acético glacial: Riesgo bajo, fácilmente neutralizable (Ummalyma et al., 2016).
- Cloruro de Magnesio: Riesgo bajo, Tomar medidas para evitar altas concentraciones de este en vertiente (Carson & Mumford, 2002).
- Sulfato de hierro y sustancias con hierro: Riesgo medio, se debe eliminar de las aguas vertientes del proceso. Precauciones en su almacenamiento. Más su uso es menos nocivo para la salud que el uso de aluminio de acuerdo con lo mencionado por (Baierle et al., 2015).
- Sulfato de aluminio y sustancias a base de aluminio: Riesgo alto. El aluminio está relacionado con enfermedades cerebrales (Baierle et al., 2015).

Con el fin de comparar las sustancias usadas en los ensayos de manera cuantitativa se le dio una calificación de 0 a 5 a las sustancias basadas en su riesgo. 0 a las sustancias de riesgo muy alto, 1 a las sustancias de riesgo alto y 3 a las sustancias de riesgo medio, 4 a la sustancia de riesgo bajo y 5 al método en donde no se usan sustancias químicas.

**Tabla 22:** Riesgo asociado a las sustancias químicas de cada método de recolección celular

Método	Riesgo	Puntaje
Sedimentación gravitacional	Bajo	5
NaOH	Bajo	4
Ácido	Bajo	4
Cloruro de Magnesio	Bajo	4
Coagulante Hierro	Medio	3
Coagulante Aluminio	Alto	1
Electrodo Hierro	Medio	3
Electrodo Aluminio	Alto	1

Con base en lo anterior los métodos que presentaron mayor riesgo por las sustancias químicas involucradas fueron los que usaron aluminio. Esto puede limitar el uso de algunos métodos de recolección celular dependiendo del uso final que se le busque dar a las microalgas ([hattab, 2015](#)).

#### 4.2.9 Selección método de recolección celular

Ya a partir del análisis de estos tres aspectos, se seleccionó el método óptimo de recolección celular de los evaluados, esto a través de la normalización y ponderación de cada aspecto, haciendo uso de una matriz de análisis de decisión multicriterio, cuya utilidad radica en la toma de decisiones teniendo en cuenta diferentes variables y el impacto de estas en el resultado ([Berumen & Redondo, 2007](#)). Se usó este análisis para la selección del método de concentración celular, por su enfoque holístico al permitir usar criterios diversos que tienen una influencia en la salida de un proceso, ponderar la influencia de cada criterio en la salida de esta y a su vez seleccionar un proceso óptimo

con diversos factores (Firouzi et al., 2021). Esta metodología ha sido usada previamente en áreas similares como son la selección de la cepa adecuada de microalgas para la obtención de biodiesel (Nwokoagbara et al., 2015), determinación del tipo de tratamiento a aplicarle a residuos agrícolas para la producción de polímeros (Bolaji et al., 2021), para relacionar las características de las corrientes de entrada con las características del producto obtenido (Obeid et al., 2021) o para determinar el lugar adecuado para el montaje de una planta de bioenergía (Emeksiz & Yüksel, 2022).

Respecto al análisis técnico, se hizo uso del porcentaje de remoción de cada método para la normalización de este criterio, este se realizó asignando un puntaje de 5 al método con el porcentaje de remoción por tiempo más alto y 0 al de menor remoción, dando el siguiente resultado.

**Tabla 23:** Normalización valores porcentaje de remoción

Método	Porcentaje de remoción	Puntaje
Sedimentación gravitacional	73,06	0,00
pH base	86,49	2,79
pH ácido	94,19	4,39
Sal inorgánica	75,61	0,53
Coagulación Fe	86,85	2,86
Coagulación Al	97,13	5,00
Electrocoagulación Fe	91,37	3,80
Electrocoagulación Al	92,07	3,95

Se llevó a cabo un proceso similar de normalización respecto a la utilidad operacional, asignando un puntaje de cero al proceso que generó una menor utilidad y 5 al de mayor utilidad.

**Tabla 24:** Normalización valores utilidad operacional

Método	Utilidad operacional	Puntaje
Sedimentación gravitacional	0,3057	0,0135

pH base	0,4036	0,0217
pH ácido	0,1447	0,0000
Sal inorgánica	0,6305	0,0407
Coagulación Fe	3,4040	0,2731
Coagulación Al	5,7271	0,4677
Electrocoagulación Fe	33,2246	2,7714
Electrocoagulación Al	59,8246	5,0000

Con los puntajes obtenidos para cada área de evaluación se procedió a realizar una suma de estos puntajes de manera ponderada para la obtención del método óptimo de la siguiente manera:

$$\text{Puntaje Método } i = t * FT_i + u * FU_i + s * FS_i \quad (8)$$

En donde:

- t= factor técnico de ponderación
- FT= puntaje área técnica
- u= factor utilidad operacional de ponderación
- FU= puntaje área utilidad operacional
- s= factor seguridad de ponderación
- FS= puntaje área seguridad

Al factor técnico se le asignó un valor de 0,3 igual que al factor de utilidad y 0,4 al factor de seguridad obteniendo los siguientes valores para cada método.

**Tabla 25:** Puntaje de cada método de recolección celular

Método	Puntaje Método
Sedimentación gravitacional	2,004
pH base	2,444
pH ácido	2,917
Sal inorgánica	1,771
Coagulación Fe	2,140

Coagulación Al	2,040
<b>Electrocoagulación Fe</b>	<b>3,171</b>
Electrocoagulación Al	3,085

A partir de este análisis se determinó que el método con mayor puntaje de los evaluados para recolección celular es la electrocoagulación con Fe, método con el cual se procedió a concentrar las células para los métodos posteriores de valorización de corrientes alternas y rompimiento celular.

### **4.3 Rompimiento celular**

#### **4.3.1 Microalgas concentradas**

200 mL de algas concentradas se centrifugaron en cuatro tubos de fondo cónico de 50 mL. Al pellet de microalgas se le llevó a cabo el proceso de extracción de lípidos, obteniendo una cantidad promedio de lípidos extraídos del 1,2 % respecto al peso seco de microalgas. Este valor se usó como línea base (control negativo), en donde el resultado esperado fue que este valor fuera el menor y que los diferentes métodos de rompimiento celular permitieran obtener una mayor cantidad de lípidos extraídos.

#### **4.3.2 Ultrasonicación**

Los ensayos de ultrasonicación se llevaron a cabo por 10 minutos a una potencia de 112,5 W, descrito en el numeral 3.3.2. Posteriormente se realizó la centrifugación y extracción de lípidos de las células, obteniendo un porcentaje en promedio del 11,03 % del peso seco de microalgas. La ultrasonicación es un método usado frecuentemente para la extracción de lípidos, tal como se evidencia en los trabajos dados por ([Enamala et al., 2018](#)), ([Sandani et al., 2022](#)) o ([J. Xu et al., 2021](#)) pero aún presenta inconvenientes en temas de costo energético ([J. Xu et al., 2021](#)). Debido a la amplia difusión del empleo de esta técnica como método de rompimiento celular, evidenciado en las investigaciones mencionadas antes, se usó este valor de porcentaje de extracción de lípidos como control positivo para la ruptura de las microalgas



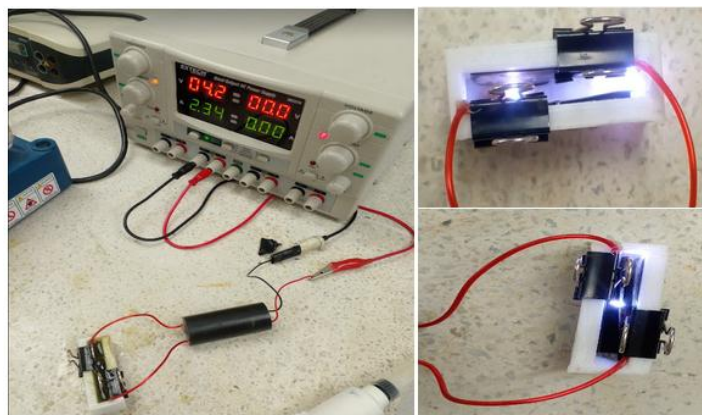
### 4.3.3 Aplicación corriente eléctrica de alto voltaje

Previo al desarrollo de los ensayos de aplicación de corriente eléctrica a las microalgas, fue necesario cuantificar el voltaje efectivo generado por el módulo de alto voltaje, lo cual se llevó a cabo mediante la determinación de la máxima distancia de formación de chispa. Calculada esta distancia, se determinó el voltaje generado por el equipo usado (*Jochen's High Voltage Page: Measuring high voltages by spark length, s.f.*). La distancia calculada fue de 1,2 cm, que corresponde un voltaje de 13,8 kV. Desarrollo evidenciado en la figura 38.



**Figura 38.** Determinación del voltaje generado por el módulo de alto voltaje.

Determinado este voltaje, se procedió a realizar el montaje con base en el esquema de la figura 21, resultando en el montaje experimental evidenciado en la figura 39.



**Figura 39.** Montaje ensayo de pulsos eléctricos. Izq. Montaje con microalgas concentradas. Der. Montaje previo a la adición de microalgas.

El voltaje proveniente de la fuente usado en los ensayos fue en promedio de 4,2 V y una corriente de 2,34 A. Por ensayo de 30 segundos de duración, el volumen de microalgas tratadas fue de 5,1 mL. Para completar los 200 mL requeridos, el ensayo se llevó a cabo 40 veces. Teniendo en cuenta que la distancia entre electrodos era de 1 cm, la fuerza del campo eléctrico fue de 13,8 kV/cm. Posterior a esto se realizó la centrifugación y extracción de lípidos, obteniendo un porcentaje promedio de lípidos extraídos de 4,13% peso seco microalgas.

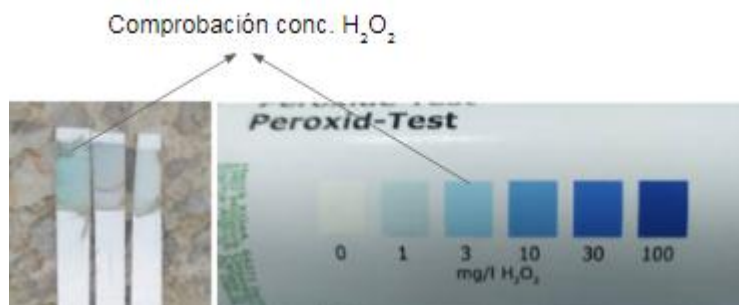
#### 4.3.4 Fenton

Se adicionó un 1 mL de ácido acético glacial para obtener un pH de 3,62 para ambos experimentos. Para el experimento usando solo peróxido de hidrógeno el porcentaje de lípidos extraídos fue en promedio del 2,6% de peso seco de microalgas. En el segundo experimento, usando ambos reactivos Fenton, los lípidos extraídos fueron en promedio del 4,4% de peso seco de microalgas. Comparando los dos experimentos se evidenció una extracción mayor en el método que usó los reactivos Fenton, que en el experimento que solo usó peróxido de hidrógeno como solución disruptora. Estos resultados van acordes a lo reportado en [\(Steriti et al., 2014\)](#) en donde el uso de los reactivos Fenton generó una extracción casi del doble versus solo usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este trabajo los reactivos Fenton generaron 1,7 veces más lípidos extraídos que solo usando una solución de peróxido de hidrógeno. Esto se puede explicar por el hecho de que el peróxido en solución ácida actúa como oxidante, pero con la presencia de sulfato de hierro se da la formación de radicales, obteniendo así la producción de especies reactivas de oxígeno OH<sup>·</sup> que tienen un poder oxidante mayor [\(Concas et al., 2015\)](#).

#### 4.3.5 Electro-Fenton

Previo a la realización de los ensayos de rompimiento celular por este método, primero se determinó si en este sistema se daba la formación de peróxido de hidrógeno a través de la saturación con oxígeno del hidrógeno generado por la electrólisis. El montaje usando electrodos de grafito y como medio agua de la llave se inició y a los 15 minutos de

operación se insertaron las cintas de prueba de peróxido en esta por 15 segundos, obteniendo una tenue coloración azul, indicando de esta forma una concentración cercana a 3 mg/L de  $H_2O_2$ . A partir de la corroboración de la formación de peróxido en el sistema, se llevó a cabo el método de disrupción celular a las microalgas concentradas. Esta corroboración de la formación de peróxido de hidrogeno se puede evidenciar en la figura 40.



**Figura 40.** Corroboración de la formación de peróxido de hidrógeno en el montaje de electro-Fenton usando electrodos de no sacrificio (grafito)

Para el primer ensayo sin electrodos de sacrificio, al finalizar las tres pruebas se tomaron 200 mL en total y se llevó a cabo el proceso de extracción de lípidos. En promedio la concentración de lípidos extraídos fue del 3,3% de peso seco de microalgas. La concentración de peróxido de hidrógeno en el método Fenton usado en los ensayos previos fue de 37,84 mg/L (1,99 mM) mientras que en el proceso de Electro-Fenton llevado a cabo, la concentración de  $H_2O_2$  fue más de 10 veces menor, lo cual en parte explica la menor extracción de lípidos al comparar estos dos métodos. Haciendo la comparación cuando solo se emplea la solución de peróxido de hidrógeno, el método Electro-Fenton permite una extracción mayor de lípidos, lo cual se debe a que en uno solo se da la reacción Fenton y en el otro el único agente oxidante es el peróxido de hidrogeno.

No fue posible llevar a cabo el método electro-Fenton con electrodos de sacrificio debido a la rápida oxidación del acero galvanizado y la formación de precipitados de hierro, impidiendo recolectar las microalgas procesadas. Este resultado no era esperado ya que a pH ácidos se espera la solubilización de los óxidos de hierro y que en solución estas especies estén presentes en forma de iones (Salama et al., 2016).

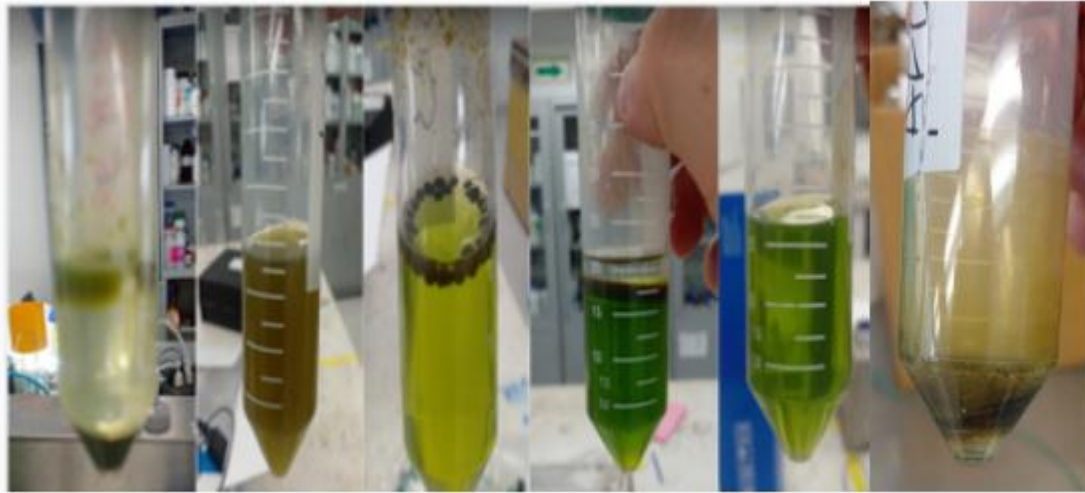
### 4.3.6 Choque osmótico

Para el primer ensayo el porcentaje de lípidos extraídos en promedio fue del 6,18% peso seco de microalgas. En el ensayo de 24 horas el porcentaje de lípidos extraídos fue en promedio de 9,48%. Para el ensayo de 48 en promedio la extracción en promedio fue de 8,19% peso seco. En el caso de la reutilización de la solución salina la extracción pasadas 24 horas fue del 9,66% peso seco. A partir de la ecuación de Morse (1), se calculó la presión osmótica generada por la solución salina, la cual fue de 30,87 atm. En el estudio realizado por [\(Byreddy et al., 2015\)](#) se realizó la incubación con la solución salina por 48 horas y por lo cual se decidió en este trabajo usar este mismo rango. Adicionalmente se realizaron ensayos a 24 horas previendo la posibilidad de que en menor tiempo se lograría una extracción similar. En otros estudios como los realizados por [\(González-González et al., 2019; Krishna Koyande et al., 2020\)](#) el tiempo de contacto con la solución salina fue de 5 minutos, por lo cual también se decidió realizar un ensayo sin incubar. Para los experimentos con tiempo de incubación a 24 y 48 horas el porcentaje de extracción fue similar, pero al comparar estos porcentajes con el experimento sin tiempo de incubación, se observó una diferencia de casi 3%, indicando la posibilidad de que exista un tiempo mínimo de incubación en el cual, a partir de este, el rompimiento celular sea el mismo. En trabajos posteriores se sugiere evaluar a mayor detalle la extracción de lípidos por este medio a diferentes tiempos de incubación.

Reutilizar la solución salina es una alternativa interesante para la disminución de costos y de corrientes efluentes teniendo en cuenta que el porcentaje de lípidos extraídos está en el mismo rango que el obtenido con la solución salina fresca. En este trabajo solo se usó la misma solución salina dos veces, se sugiere en estudios siguientes usar la solución salina un mayor número de ocasiones.

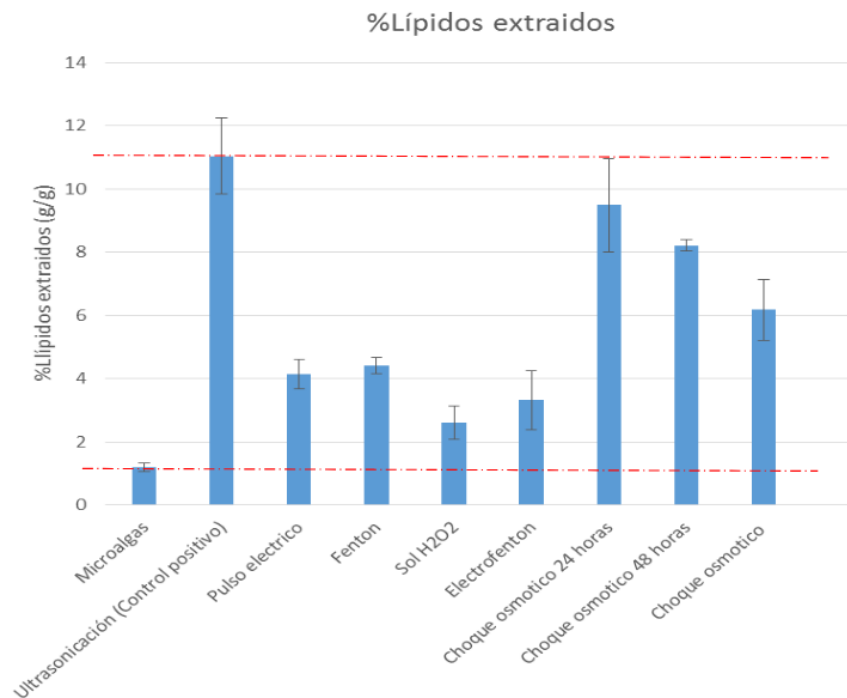
## 4.4 Extracción de lípidos

El ensayo típico de cuantificación de lípidos por solventes era el siguiente:



**Figura 41.** Ensayo típico de cuantificación de lípidos a. adición inicial de solventes sin agitar. b. microalgas disueltas en solventes. c. y d. Muestra post-centrifugación. e. Muestra al separar la fase acuosa y el material sólido. f. Muestra seca a peso constante.

En síntesis, el porcentaje de extracción de lípidos por cada método se visualiza a continuación:



**Figura 42.** Porcentaje de extracción de lípidos de cada uno de los métodos de rompimiento celular evaluado.

**Tabla 26:** Porcentaje de lípidos extraídos obtenidos por cada método de rompimiento celular

<b>Método</b>	<b>% Lípidos extraídos</b>	<b>% Error estándar</b>
<b>Microalgas</b>	1,20	0,13
<b>Ultrasonificación (control positivo)</b>	11,03	1,20
<b>Pulso eléctrico</b>	4,13	0,46
<b>Fenton</b>	4,40	0,26
<b>Sol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	2,60	0,52
<b>Electro-Fenton</b>	3,31	0,93
<b>Choque osmótico</b>	6,18	1,46
<b>Choque osmótico 24 hr</b>	9,48	0,18
<b>Choque osmótico 48 hr</b>	8,19	0,96

La extracción de lípidos de los diferentes métodos evaluados facilita ver que la ultrasonificación, la cual fue usada como método de control positivo permitió extraer una mayor cantidad de lípidos y con las microalgas sin ningún tratamiento adicional, se obtuvo la menor cantidad de lípidos extraídos.

El bajo porcentaje de extracción de lípidos a las microalgas sin ningún tratamiento se debe a la resistencia y recalcitrancia de la pared celular de estas (Zabed et al., 2019), siendo este el valor esperado. El método con la menor extracción de lípidos fue el uso de la solución de peróxido de hidrógeno, lo cual se puede explicar al hecho de que, si bien el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un agente oxidante, su poder oxidante no necesariamente es suficiente para generar un rompimiento alto de la pared celular de las microalgas en el periodo de contacto, tal como se explica en el numeral 4.3.4.

El siguiente método con menor extracción fue el método electro-Fenton, inicialmente se esperaba que este método permitiese la extracción de una cantidad superior o por lo menos similar a la del proceso Fenton, esto con base a los estudios llevados a cabo por (Gamarra-Güere et al., 2022; Sruthi et al., 2018), en los cuales el proceso electro-Fenton presentó una mayor eficacia en comparación al Fenton. Esta menor extracción se puede explicar a la menor concentración de peróxido de hidrógeno generado por la electrolisis en comparación a la concentración de esta sustancia adicionada en el proceso

Fenton convencional.

El siguiente proceso en extracción fue la aplicación de corriente eléctrica por alto voltaje, cuya extracción estuvo en el mismo rango que el proceso Fenton. Inicialmente se esperaba una extracción de lípidos cercana al control positivo, ya que en estudios como el de [\(Papachristou et al., 2020\)](#) se logra una extracción casi total de lípidos usando pulsos eléctricos con la microalga *Auxenochlorella protothecoides*. Esta diferencia en la extracción obtenida y la esperada se puede explicar por la fuerza del campo eléctrico aplicado y el tiempo durante el cual se llevó a cabo, por ejemplo, en la revisión llevada a cabo por [\(Joannes et al., 2015\)](#) se menciona que a mayor voltaje y tiempo en el cual se lleva a cabo el pulso eléctrico mayor es la extracción de lípidos debido a la permeabilización irreversible de la membrana que ocurre en estas condiciones. En esta revisión la fuerza del campo eléctrico promedio con el cual se asegura la permeabilización irreversible de la membrana y/o la lisis completa de la célula se da por encima de 30 kV/cm. Otro factor que puede explicar esta diferencia en el porcentaje de extracción es la fase de crecimiento en la que se encuentren las microalgas. En la fase de crecimiento inicial la pared celular de *Chlorella vulgaris* tiene un espesor de 2 nm y en madurez el espesor está en el rango de 17 - 21 nm [\(Safi et al., 2014\)](#). En el trabajo realizado, las microalgas sometidas a la concentración y rompimiento celular se encontraban en fase estacionaria de crecimiento donde el espesor de la pared celular se esperaba fuera el mayor. Debido a estos motivos se explica la baja extracción de lípidos por este método, en comparación con el control positivo.

El método consecuente fue el Fenton, el cual obtuvo un porcentaje mayor en comparación al solo uso de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se mencionó previamente se esperaba una mayor extracción con el método electro-Fenton que con este. El proceso Fenton es un proceso de oxidación avanzada usada ampliamente cuyo objetivo en el contexto de tratamiento de contaminantes es la mineralización del material orgánico [\(Cai et al., 2021\)](#). En el contexto de rompimiento de la pared celular para la extracción de componentes intracelulares de microalgas, se usa el proceso Fenton para la degradación de la pared celular, pero no para la degradación del material intracelular, motivo por el cual se hace necesario frenar la reacción [\(Concas et al., 2015\)](#). En el estudio realizado por [\(Steriti et al., 2014\)](#) se detenía la reacción por medio de la adición de un volumen 10 veces del



inicial de etanol, con el fin de disminuir la concentración de los reactivos Fenton y por ende, la cinética de la reacción por ley de acción de masas. En este trabajo realizado se usó bisulfito de sodio para detener la reacción y evitar la futura oxidación del material intracelular. Este método resulta de interés por la facilidad de escalamiento y de implementación, pero tiene como aspecto negativo la poca selectividad del método ya que, si no se detiene la reacción, esta puede oxidar los componentes intracelulares y disminuir el valor de estos, haciendo inconveniente el proceso de rompimiento celular.

Siguiente a este, está el método de choque osmótico a sus diferentes periodos, el cual aparte del método de control positivo, fueron los métodos en los cual se obtuvieron una mayor extracción. Esta eficiencia se explica por la concentración de NaCl usada y la presión osmótica que esta genera, tal como se describe en la ecuación de Morse (1). En el estudio desarrollado por ([Kar & Singhal, 2015](#)) la presión osmótica necesaria para generar la ruptura celular de *Actinopolyspora halophila* fue de 1,9 kPa (0,0188 atm), lo cual si bien no es el mismo tipo de microorganismos a los usados en el estudio, si permite establecer una línea de referencia para comparación y explicar el rompimiento celular de las microalgas por este método. Como aspecto negativo de este proceso está la dilución de la biomasa y por ende de los componentes intracelulares, lo cual en el esquema de operación del proceso podría implicar una etapa adicional de separación de la solución salina. En futuros trabajos vale la pena explorar la eficacia de este método con una mayor concentración y un menor volumen, esto con el fin de diluir la biomasa en un menor factor.

Existen varios estudios en donde se realiza la comparación de diferentes métodos de rompimiento celular con diferentes especies de microalgas. Por ejemplo, en el estudio realizado por ([Byreddy et al., 2015](#)) se evaluaron los métodos de maceración, vortex con perlas, choque osmótico, baño de agua, sonicación y molino de bolas con las microalgas *Schizochytrium sp.* y *Thraustochytrium sp.* O el estudio llevado a cabo por ([McMillan et al., 2013](#)) usando los métodos de microondas, baño de agua, licuado, ultrasonicación y láser con *Nannochloropsis Oculata*. Otros estudios posteriores al rompimiento celular variaron en los solventes, o los métodos de extracción usados fueron modificados ([dos Santos et al., 2015](#); [Lai et al., 2014](#); [Shahi et al., 2020](#)) o donde el enfoque estuvo en los solventes ([de Jesus et al., 2019](#)). Otras investigaciones adicionalmente se enfocaron en los



tipos de nutrientes, la forma y el momento de dosificación de estos; y la influencia de estos en la cantidad de lípidos obtenidos de las microalgas (Bhatia et al., 2021; Byreddy et al., 2015; Halim et al., 2021; Morais et al., 2022). Estos aspectos combinados hacen que evaluar los resultados obtenidos en este trabajo frente a otros estudios de manera específica sea de gran complejidad ya que no se cumplen las mismas condiciones. Algunas de estas condiciones son concentración celular; si hubo recolección celular no necesariamente es electrocoagulación con electrodos de hierro; diferentes los métodos de rompimiento celular o solo se evalúa un método y se compara con las algas sin tratar; el tipo y cantidad de nutrientes empleada en el crecimiento de las microalgas; y finalmente el tipo de microalgas usadas.

En términos generales, los resultados obtenidos en este trabajo están de acorde a la mayoría de estudios, en el cual la ultrasonicación presenta uno de los mayores rompimientos celulares, el Fenton y Electro-Fenton presentan una mejora de mínimo el doble en comparación a la célula sin tratamiento, el choque osmótico muestra también ser un método eficiente para el rompimiento celular y como resultado general que también fue el encontrado en este trabajo, es que todos los métodos de rompimiento celular permiten una mayor extracción de lípidos en comparación con el extraído de las microalgas sin ninguna etapa de rompimiento.

#### **4.5 Selección método de rompimiento celular**

De manera análoga a la concentración celular, se realizó la selección del método de rompimiento celular por medio de una matriz de decisión multicriterio, teniendo en cuenta el criterio técnico, económico y de seguridad asociado al uso de sustancias químicas

##### **4.5.1 Análisis técnico**

Como criterio técnico para la selección del método de rompimiento celular se usó el porcentaje de lípidos extraídos asignado el valor de 5 al método de mayor extracción y normalizando a partir de este valor, normalización llevada a cabo en la tabla 27.

**Tabla 27:** Normalización métodos de rompimiento celular a través de su porcentaje de extracción de lípidos

Método	% de extracción de lípidos	Valor normalizado
Microalgas	1,20	0,544
Ultrasonicación (control positivo)	11,03	5
Pulso eléctrico	4,13	1,87
Fenton	4,40	1,99
Sol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,60	1,17
Electro-Fenton	3,31	1,50
Choque osmótico	6,18	2,80
Choque osmótico 24 hr	9,48	4,29
Choque osmótico 48 hr	8,19	3,71

A partir de esta normalización se determinó que el método con el mejor desempeño técnico, después del control positivo, fue el choque osmótico a 24 horas de incubación.

#### 4.5.2 Análisis de seguridad por sustancias químicas

Las sustancias químicas adicionadas en cada método de disrupción celular fueron las siguientes:

- Microalgas: Ninguno
- Ultrasonicación: Ninguno
- Pulso eléctrico: Ninguno
- Fenton: Peróxido de hidrógeno, sulfato de hierro y bisulfito de sodio
- Solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno, bisulfito de sodio
- Electro-Fenton: Sulfato de hierro
- Choque osmótico: Cloruro de sodio

Llevando a cabo una revisión de las sustancias usadas en el proceso de rompimiento celular con el fin de determinar posibles factores de riesgo asociados al manejo de estas sustancias químicas, se determina lo siguiente:

- Cloruro de sodio: Riesgo bajo, Tomar medidas para evitar altas concentraciones de este en vertientes (Carson & Mumford, 2002).
- Sulfato de hierro y sustancias con hierro: Riesgo medio, se debe eliminar de las aguas vertientes del proceso. Precauciones en su almacenamiento (Baierle et al., 2015).
- Bisulfito de sodio: Riesgo alto. Puede ser perjudicial en solución y causar efectos clínicos adversos al entrar en contacto (Vally & Misso, 2012).
- Peróxido de hidrógeno: Riesgo muy alto. Sustancia altamente oxidante y corrosiva, manejar con precaución (insideout, 2015).

Con el fin de comparar las sustancias usadas en los ensayos de manera cuantitativa y poder involucrarlas en el análisis por decisión multicriterio, se le dio una calificación de 0 a 5 a las sustancias basadas en su riesgo. 0 a las sustancias de riesgo muy alto, 1 a las sustancias de riesgo alto y 3 a las sustancias de riesgo medio, 4 a la sustancia de riesgo bajo y 5 al método en donde no se usaron sustancias químicas y no haya agotamiento de recursos. En algunos métodos se utilizaron varias sustancias químicas, en este caso la calificación al método se dio con base en la sustancia de mayor riesgo empleada, selección dada en la tabla 28.

**Tabla 28:** Riesgo asociado a las sustancias químicas de cada método de ruptura celular

Método	Riesgo	Calificación
Microalgas	Bajo	5
Ultrasonificación	Bajo	4
Pulso eléctrico	Bajo	4
Fenton	Muy Alto	0
Sol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Muy Alto	0
Electro-Fenton	Medio	3

<b>Choque osmótico</b>	Bajo	4
<b>Choque osmótico 24 hr</b>	Bajo	4
<b>Choque osmótico 48 hr</b>	Bajo	4

A partir de este análisis, los métodos de mayor riesgo fueron los Fenton y solución de peróxido de hidrógeno. El método electro-Fenton tiene un riesgo medio por agotamiento de recursos y por el uso del sulfato de hierro. El choque osmótico tiene un riesgo bajo por usar únicamente una solución salina y finalmente las microalgas sin tratar que no usaron ninguna sustancia química.

### 4.5.3 Análisis económico

Al igual que en la parte de concentración celular, se hizo el análisis a partir de la utilidad operacional del proceso de rompimiento celular. El ingreso operativo tuvo en cuenta la cantidad de lípidos extraídos, el coste de estos lípidos y el tiempo de cada uno de los métodos usados, descritos a continuación.

$$\text{ingreso operacional} = \frac{C * P * v * F_t}{t} \quad (9)$$

En donde:

C= concentración biomasa mg/L

P= Extracción de lípidos por peso de microalga (mg/mg)

v= volumen tratado de microalga (L)

F= valor lípidos (USD/kg) como valor de referencia se toma 160 USD/kg tomado de [\(Barkia et al., 2019\)](#)

t= tiempo del proceso (h)

El costo operacional usó como base la misma forma de cálculo usada en el proceso de concentración celular con la diferencia de la adición de la potencia empleada en el proceso de ultrasonificación.

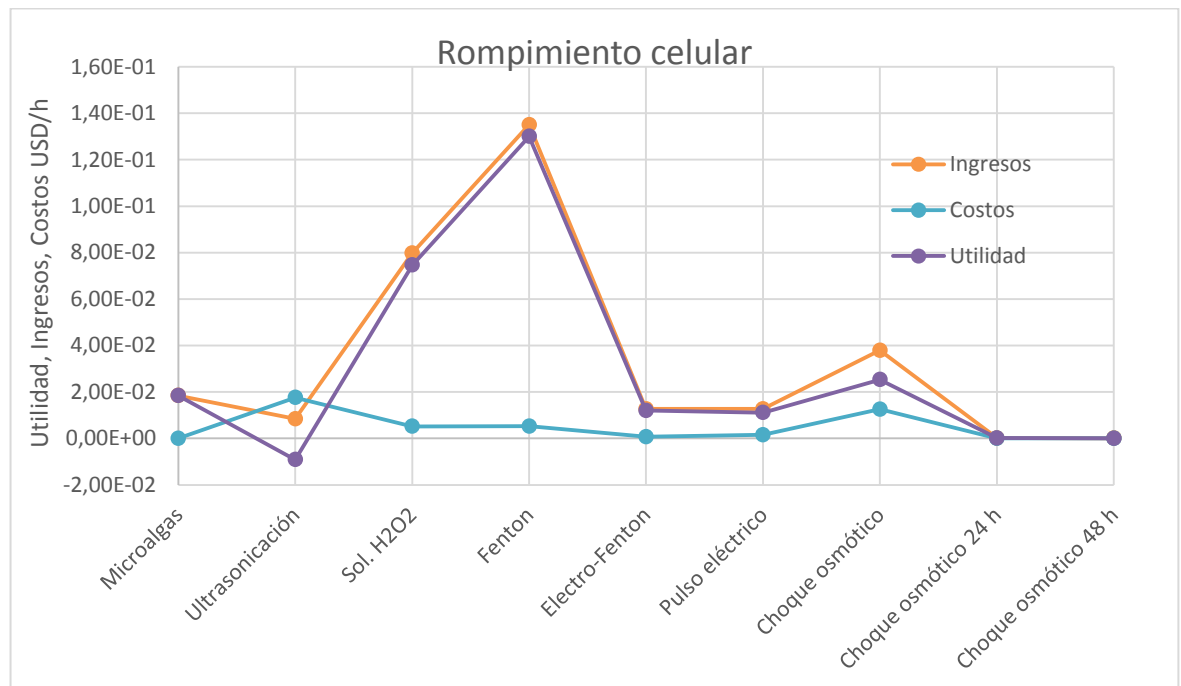
$$\text{costo operacional} = \frac{W * t_1 * S}{1000t} + \frac{V * I * t_1 * S}{1000t} + \frac{N * J}{t} \quad (10)$$

Donde el término adicional es W potencia en Watts.

A diferencia de la concentración celular, los procesos de electrólisis no involucran procesos de agitación o sedimentación por lo cual el valor  $t_1$  fue el mismo de  $t$  en la ecuación (11). La utilidad operacional será la diferencia entre el ingreso y el costo.

$$Utilidad\ operacional = \frac{C * P * v * F_t}{t} - \frac{W * t_1 * S}{1000t} - \frac{V * I * t_1 * S}{1000t} - \frac{N * J}{t} \quad (11)$$

De manera análoga, los valores del costo de energía y costo de sustancias químicas se tomaron de las mismas referencias que en la etapa de concentración. Se llevó a cabo el cálculo respectivo de utilidad operacional como se observa en la siguiente figura.



**Figura 43.** Utilidad, ingresos y costos operacionales cada método de rompimiento celular

A partir del cálculo de la utilidad operacional se observaron varios aspectos relevantes, al igual que en la etapa anterior de concentración, el tiempo del método fue un factor determinante en la utilidad, esto mejor se evidenció al comparar el choque osmótico a sus diferentes periodos, en el cual el mismo proceso a la misma cantidad de solución salina, pero a diferentes periodos, generó una diferencia de utilidad en el rango de 100 y 300 veces más en comparación al periodo de 24 y 48 horas respectivamente. Otro aspecto de interés fue la utilidad operacional negativa de la ultrasonificación, la cual se explica por

la alta potencia usada para el rompimiento celular, lo cual derivó en un alto costo operacional que sobrepasó el ingreso a pesar de obtener el mayor valor de extracción.

El proceso que genera una mayor utilidad operacional fue el Fenton, seguido de la solución de peróxido de hidrógeno, después el choque osmótico sin tiempo de incubación, después las microalgas sin tratamiento, seguido de Electro-Fenton y pulso eléctrico que se encontraron en el mismo rango, seguido estos estaban los procesos de choque osmótico de 24 y 48 horas; y finalmente el proceso de ultrasonicación con utilidad negativa.

La normalización de este criterio se realizó asignando un valor de 5 a la mayor utilidad operacional y a partir de este normalizar sobre este valor, resultado de esto se muestra en la tabla 29.

**Tabla 29:** Normalización valores utilidad operacional

Método	Utilidad operacional	Puntaje
Microalgas	1,84E-02	0,709
Ultrasonicación	-9,12E-03	-0,352
Pulso eléctrico	1,11E-02	0,430
Fenton	1,30E-01	5
Sol. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,46E-02	2,880
Electro-Fenton	1,20E-02	0,463
Choque osmótico	2,95E-02	1,137
Choque osmótico 24 hr	1,72E-04	0,007
Choque osmótico 48 hr	7,26E-05	0,003

#### 4.5.4 Selección método

Con los puntajes obtenidos para cada área de evaluación se procedió a realizar una suma de estos puntajes de manera ponderada para la obtención del método de manera análoga a la etapa de concentración celular, haciendo uso de la ecuación (8).

Al factor técnico se le asignó un valor de 0,2, teniendo en cuenta que hay una diferencia grande entre los porcentajes de extracción y todos los métodos mostraron una

extracción mayor a las microalgas sin tratar (control negativo), siendo este resultado acorde a que la extracción de sustancias intracelulares de las microalgas es técnicamente factible pero aún inviable financieramente (Figuroa-Torres et al., 2020). A los factores de utilidad y de seguridad se le asignaron un valor de 0,4. Al aspecto de seguridad se le asignó este valor por el alto riesgo de las sustancias usadas en algunos procesos. En el caso económico, tal como se mencionó anteriormente y en varios estudios referenciados previamente, la no implementación de las microalgas como fuente de combustibles renovable y fuente de otras sustancias de valor agregado se da porque aun económicamente presenta obstáculos para su generalización. La suma de puntajes fue la siguiente.

**Tabla 30:** Puntaje métodos de rompimiento celular

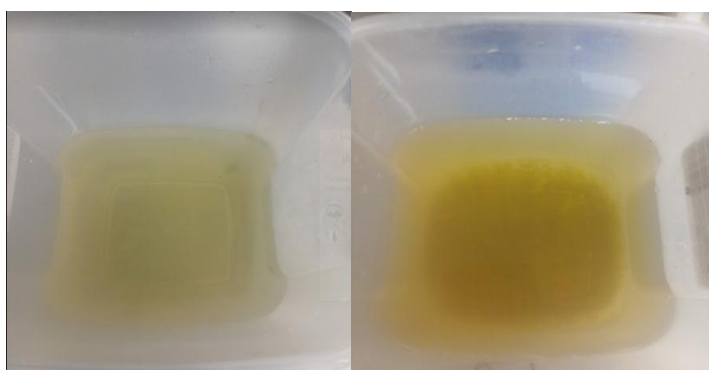
Método	Técnico	Riesgo químico	Económico	Total
<b>Microalgas</b>	0,544	5,000	0,709	2,392
<b>Ultrasonicación</b>	5,000	4,000	-0,352	2,459
<b>Pulso eléctrico</b>	1,870	4,000	0,430	2,146
<b>Fenton</b>	1,990	0,000	5,000	2,398
<b>Sol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	1,170	0,000	2,880	1,386
<b>Electro-Fenton</b>	1,500	1,000	0,463	0,885
<b>Choque osmótico</b>	2,800	4,000	0,975	<b>2,550</b>
<b>Choque osmótico 24 hr</b>	4,290	4,000	0,006	2,460
<b>Choque osmótico 48 hr</b>	3,710	4,000	0,003	2,343

A partir de este análisis el método de mayor puntaje fue el choque osmótico sin tiempo de incubación. Esto se explica por tener una de las mayores utilidades, bajo riesgo por las sustancias usadas y un alto porcentaje de extracción y adicionalmente la posibilidad de reutilizar la solución salina la hace una opción interesante para el rompimiento celular. Ya con la selección de este método de rompimiento se llega a la secuencia completa para la obtención de componentes intracelulares y finalmente se evaluó la valorización de corrientes alternas.

## 4.6 Valorización corrientes alternas

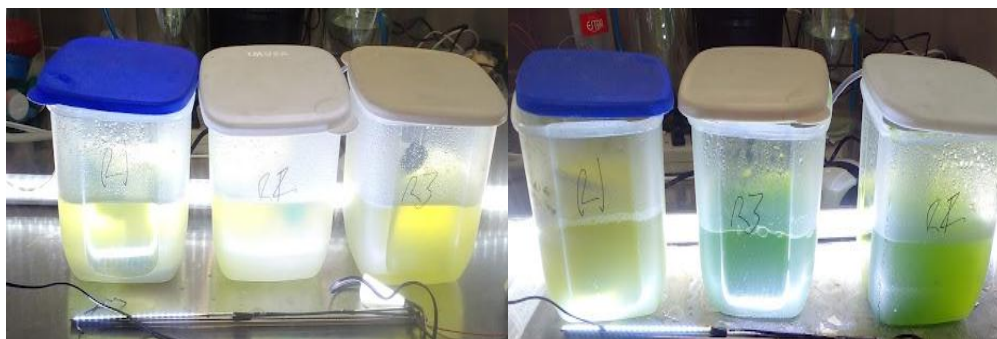
### 4.6.1 Reutilización medio de cultivo

La reutilización del medio de cultivo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 3.5.1. El pH del sobrenadante del proceso de electrocoagulación era 5,3, se usaron 8 ml de solución NaOH 1 N para lograr un pH promedio de 7,02. Cuando el sobrenadante estaba a pH neutro, ocurrió la precipitación de los óxidos de hierro del medio como se evidencia en la figura 44.



**Figura 44.** Precipitación de óxidos de hierro por cambio de pH del sobrenadante. Izq. sobrenadante a pH ácido. Der. Sobrenadante a pH neutro.

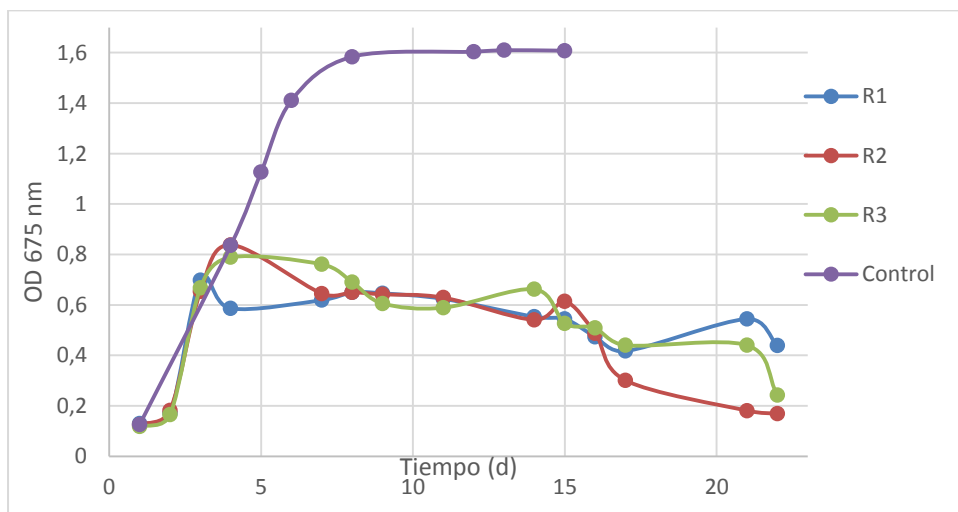
Debido a la interferencia que podrían generar estos precipitados de hierro, se decantó y se tomó la parte superior para usarla en el fotobiorreactor. Esta agua presentó una ligera coloración amarilla pero no turbidez, usándola para realizar el montaje de los fotobiorreactores y se evaluó el crecimiento correspondiente de biomasa ejemplificado en la figura 45.



**Figura 45.** Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Izq. Usando el sobrenadante del proceso de electrocoagulación. Der. Reactor R1 usando sobrenadante y R3 y R2 usando medio fresco para el cultivo de microalgas.



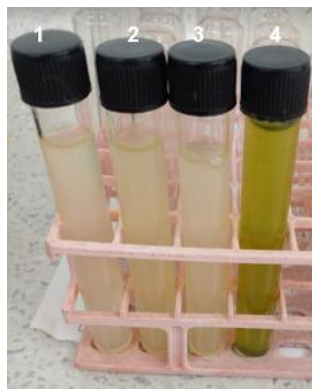
El crecimiento de algas usando como medio el sobrenadante del proceso de electrocoagulación no presentó una curva de crecimiento esperada o similar a la de la figura 24, sino que su crecimiento no fue similar en todos los reactores y no fue estable. Solo durante los primeros días fue posible observar una curva de crecimiento análoga a la fase de crecimiento exponencial de las microalgas en el reactor control.



**Figura 46.** Crecimiento de microalgas en los 3 reactores usando medio de cultivo reciclado y reactor control con medio fresco.

En la búsqueda bibliográfica de estudios asociados a concentración y/o rompimiento celular de microalgas no se encontraron trabajos previos en donde se usará el sobrenadante de electrocoagulación con hierro u otro electrodo como medio para el crecimiento de microalgas. El estudio realizado por (Ummalyima et al., 2016), en el cual recolectó algas con sales inorgánicas ( $\text{FeCl}_3$  y  $\text{AlSO}_4$ ) mencionan la posible contaminación del medio de cultivo con hierro y aluminio, sugiriendo que, si se quisiera reutilizar el sobrenadante, primero es necesario remover los iones metálicos. Conclusión similar es mencionada en la revisión hecha por (hattab, 2015) donde menciona que el uso de coagulantes de sales inorgánicas, como las de hierro, puede ser tóxico para las microalgas. Si bien en este proceso no se usaron sales de hierro, la electrólisis libera iones de hierro, similar a lo que ocurre con la disociación de sales férricas en solución. Esto en parte puede explicar el poco crecimiento de las microalgas por intoxicación de estas por la presencia de compuestos férricos en el medio. Más, sin embargo, otros estudios como los de (de Moraes et al., 2021; Ummalyima et al., 2016; J. Wu et al., 2015) usaron el agua sobrenadante de

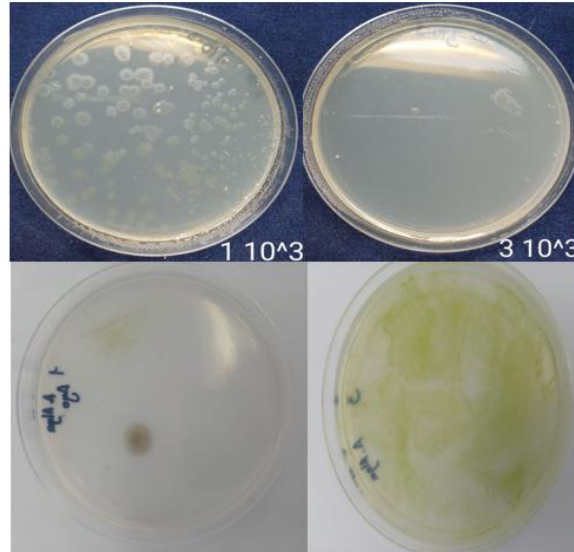
procesos de concentración como modulación de pH, bio-floculantes, floculantes inorgánicos ( $AlSO_4$ ,  $FeCl_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$ ) o sedimentación gravitacional para cultivar nuevamente microalgas, en los cuales la curva de crecimiento de biomasa fue similar a la que usó medio fresco. Comparando estos resultados con los obtenidos en este trabajo, se observa que las especies de microalgas usadas en estos estudios fueron diferentes y por tanto los mismos compuestos pudieron presentar diferentes grados de inhibición o intoxicación a diferentes especies de microalgas (Rwehumbiza et al., 2012), por lo cual existe la posibilidad de que los componentes del sobrenadante usado en el presente trabajo realizado haya generado inhibición de las microalgas. Otro posible motivo que puede explicar el poco crecimiento de las microalgas en el medio reciclado es la posibilidad de que haya ocurrido un rompimiento celular de una pequeña porción de las microalgas por el proceso de electrocoagulación, llevando a la liberación de componentes intracelulares en el medio facilitando el crecimiento de otros microorganismos presentes. Esta posible explicación se sustenta en que en el momento de toma de alícuotas de los reactores para medir la absorbancia, se observó una turbidez, similar a la evidenciada en cultivos de bacterias como *Escherichia coli*, esta similitud se visualizó en la figura 47, en donde los cultivos con agua sobrenadante tuvieron una apariencia bastante diferente al del cultivo que usó medio fresco.



**Figura 47.** Alícuotas de los cultivos de microalgas con medio sobrenadante y con medio fresco. 1,2 y 3. Medio sobrenadante proceso de electrocoagulación. 4. Medio fresco.

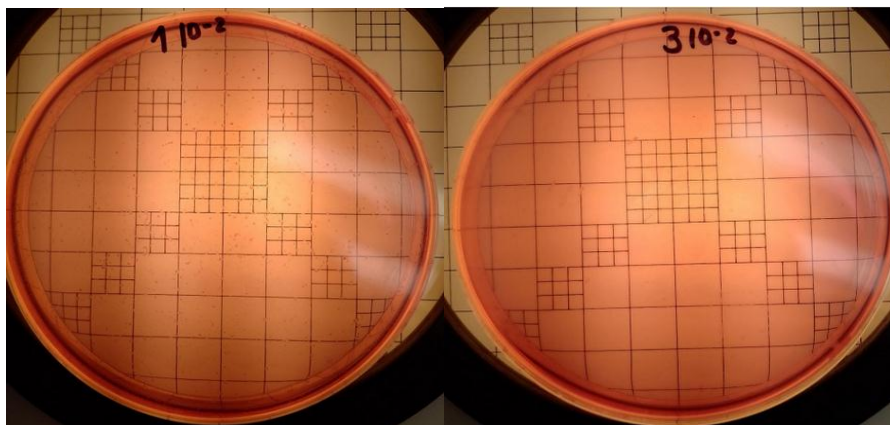
Para corroborar esta posible explicación se tomó una alícuota de un reactor con medio reciclado y otro con el medio de control y se cultivaron en agar Luria Bertani (LB) y otro en agar alga, esto con el fin de verificar la presencia de otros microorganismos

aparte de las microalgas. Inicialmente se esperaba que en las placas hubiera presencia de microorganismos aparte de las algas, por el hecho de que el medio de cultivo ya fuera el agua sobrenadante o el medio fresco no estaba bajo condiciones estériles.



**Figura 48.** Placas cultivo de microalgas en diferentes cultivos. Arriba. Izq. Cultivo medio recirculado y der. medio fresco en agar LB. Abajo. Izq. Cultivo medio recirculado y der. medio fresco en agar Alga

Como se evidencia en la figura 48 por medio de las placas de cultivo, en el medio recirculado hubo una mayor presencia de microorganismos aparte de microalgas y en el agar alga en el medio fresco hubo un mayor crecimiento de microalgas. Mientras que en el medio recirculado la presencia de microalgas fue baja y se evidenció la presencia de colonias de otro tipo de microorganismos. Con estos medios de cultivo esta comparación fue cualitativa, por lo cual se procedió a hacer una prueba de coliformes totales cultivadas en agar m-Endo para buscar hacer una comparación cuantitativa entre los dos reactores, las placas de los ensayos se muestran en la figura 49.



**Figura 49.** Placas prueba coliformes totales. Izq. Coliformes totales reactor medio recirculado. Der. Coliformes totales reactor medio fresco

**Tabla 31:** Coliformes totales medio recirculado y medio fresco

Coliformes totales		
Dilución	Medio recirculado	Medio fresco
10 <sup>3</sup>	66x 10 <sup>3</sup> / 0,1mL= 660.000 UFC/mL	3 x 10 <sup>3</sup> / 0,1mL= 30.000 UFC/ mL
10 <sup>3</sup>	64x 10 <sup>3</sup> / 0.1mL= 640.000 UFC/mL	2 x 10 <sup>3</sup> / 0.1mL= 20.000 UFC/ mL
Promedio	650.000 UFC/mL	25.000 UFC/ mL

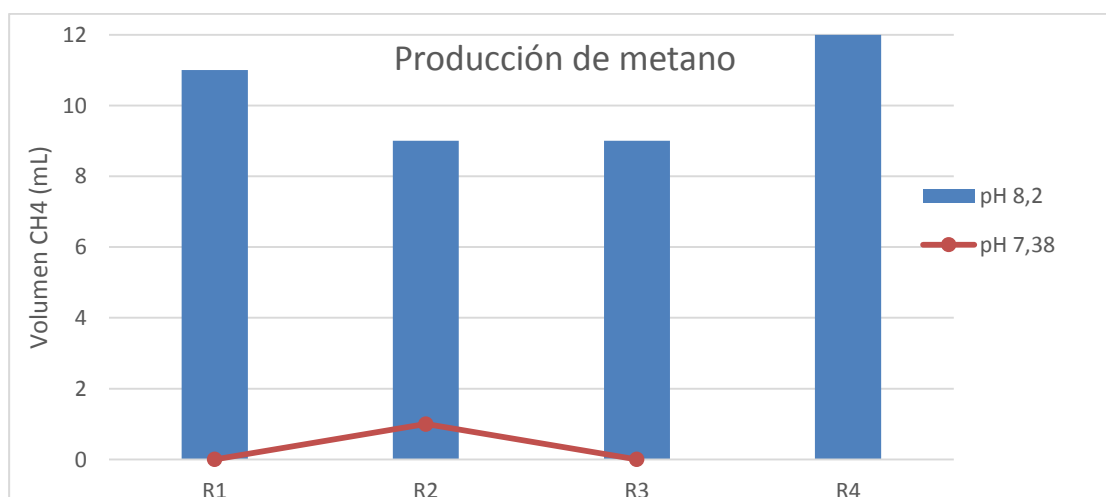
El medio m-Endo si bien es selectivo para coliformes como *E. Coli* y cultivos mixtos de *E. coli* y bacterias Gram-negativas(Hörman & Hänninen, 2006) lo cual puede inhibir el crecimiento de otras especies presentes, permite la cuantificación de al menos un grupo de especies y comparar las dos muestras. En el medio recirculado el número de coliformes totales fue en promedio de 650000 UFC/ml, mientras que en el medio fresco fue en promedio de 25000 UFC/ml, indicando que el medio de cultivo posterior al proceso de electrocoagulación y las condiciones de cultivo favoreció el crecimiento de microorganismos aparte de microalgas. Con base en los resultados previos, se determinó que la corriente alterna del proceso de electrocoagulación usada como medio de cultivo para microalgas en estas condiciones de proceso no fue adecuada y por lo tanto no es alternativa útil de valorización de esta corriente alterna.

#### 4.6.2 Producción de metano

Se caracterizó la corriente alterna del proceso de electrocoagulación y se llevó a cabo el montaje de esta prueba. El pH del sobrenadante ya con el lodo granular fue de 8,2, valor cercano al límite de 8,5 en el cual la digestión anaerobia es inhibida (Jingura & Kamusoko, 2017). Teniendo en cuenta que este pH estaba cerca del valor de inhibición, se decidió realizar un ensayo adicional disminuyendo el pH a un valor en promedio de 7,38, el cual estaba en el rango recomendado de digestión anaeróbica (Jingura & Kamusoko, 2017) y se procedió a llevar a cabo la misma evaluación. Los resultados de la degradación anaerobia en los ensayos a diferente pH se muestran en la tabla 32 y figura 50.

**Tabla 32:** Parámetros agua sobrenadante proceso de electrocoagulación antes y después digestión anaeróbica a diferentes valores de pH

Antes		Después pH 8,2	Después pH 7,38	
Sobrenadante	Valor		Valor	Unidad
COD	1320	365	682	mg/L
P	9,4	8,5	7	
K	16	15	16	
N	69	7,75	8,9	
CH <sub>4</sub> generado por DQO consumido	-	0,0026	0,0536	mL CH <sub>4</sub> / DQO mg/L



**Figura 50.** Generación de metano en cada ensayo de la corriente alterna proceso de electrocoagulación a pH 8,2 y pH 7,38.

La producción de metano en el ensayo a pH 8,2 fue en promedio de 10,25 mL por 200 mL de agua sobrenadante del proceso de electrocoagulación. Mientras que para el ensayo a pH 7,38 solo en un ensayo se generó la producción de 1 mL de metano. Respecto a los parámetros de agua, en especial el DQO, donde hubo una reducción del 72,3% y 48,3% respectivamente. El resultado esperado era que hubiera una mayor generación de metano a pH 7,38 teniendo en cuenta que este es el rango óptimo de digestión anaerobia, pero a estas condiciones hubo una generación mínima de metano, pero sí actividad biológica evidenciado en la reducción del DQO, una posible explicación radica en que hubo acidogénesis del sobrenadante previo a la metanogénesis que disminuyó el pH del medio pudiendo inhibirlo (Teng et al., 2014).

Llevando a cabo una revisión bibliográfica con el fin de comparar estos resultados, no se encontraron estudios en donde la corriente alterna de un proceso de concentración celular de microalgas fuera usada para la generación de metano. Algunos estudios evaluaron la generación de metano usando como sustrato microalgas (González-González et al., 2019), otros buscan valorizar la generación de metano a partir de microalgas a las cuales ya se les había realizado la extracción de lípidos (Quinn et al., 2014). Pero no se hace uso de este sobrenadante para producción de metano. Si bien la producción de metano en este trabajo fue baja, por lo menos existió una generación de metano que podría facilitar la viabilidad económica de la obtención de compuestos intracelulares de las microalgas. De este proceso salió a su vez una corriente adicional de interés que fue el digestato, el cual al presentar materia orgánica y macronutrientes puede ser usado en agricultura en remediación de suelos (Rincón et al., 2018).

Teniendo en cuenta los resultados de las dos alternativas de valorización no fue necesario hacer un análisis posterior para seleccionar la alternativa más idónea, ya que la reutilización de medio para el cultivo de microalgas no dio resultados positivos. Por lo cual la alternativa de valorización a emplear fue la producción de metano.

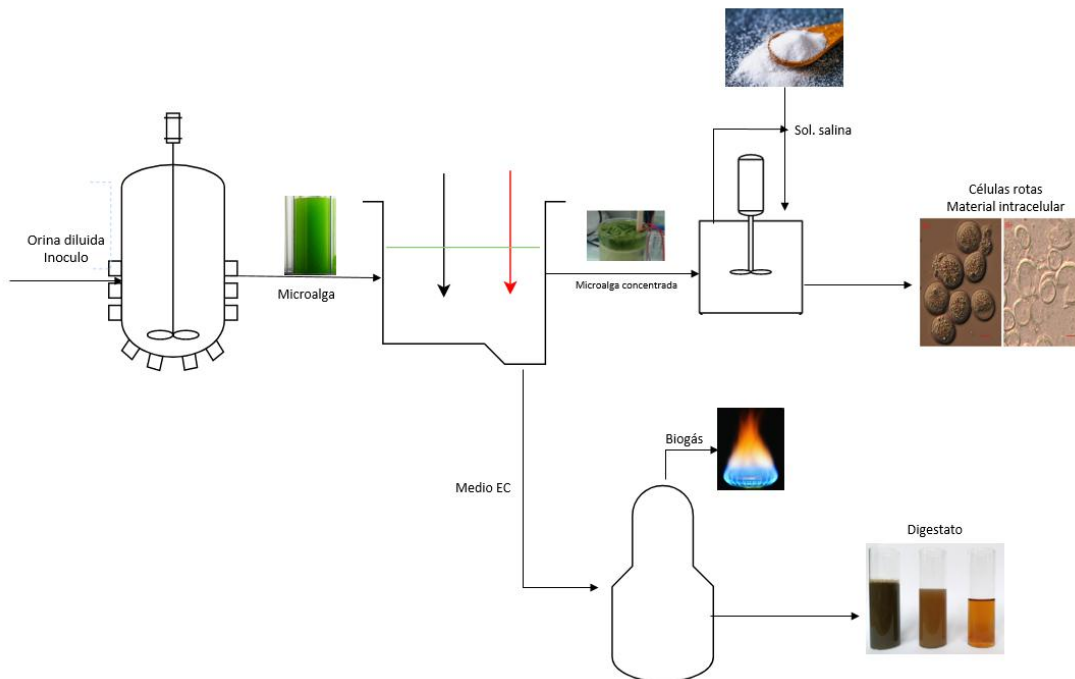
#### 4.7 Secuencia de operaciones

En los numerales previos se determinaron los métodos idóneos para la concentración y rompimiento celular y la valorización de corrientes alternas, resultados sintetizados en la siguiente tabla.

**Tabla 33:** Síntesis proceso de recolección y rompimiento celular planteado

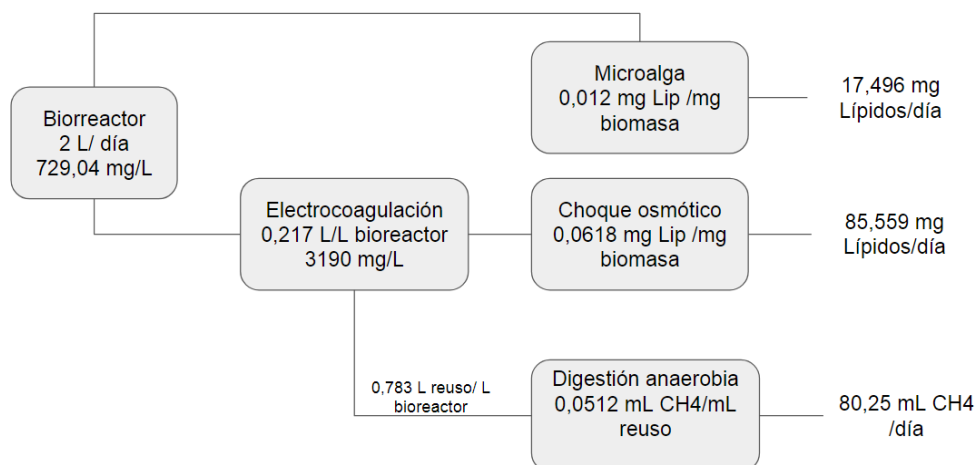
Etapa	Método	Sustancias usadas	Condiciones de proceso	Valores
Biorreactor	Fotobiorreactor	Medio de cultivo: orina diluida Inóculo: <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> .	Tipo reactor: FBR pH: 7 Flujo aire: 2 L/min Iluminación: Luz blanca LED 5 W Agitación: Bomba sumergible 400 L/h Volumen: 20 L	Concentración biomasa fase estacionaria: 729,04 mg/L
Concentración	Electrocoagulación	Electrodos: Acero galvanizado	Voltaje: 30 V Amperaje: 0,55 A Tiempo: 20 min	Porcentaje remoción: 91,3% Concentración biomasa: 3190 mg/L
Rompimiento	Choque osmótico	Solución salina NaCl 10% p/v	Relación Sol. Salina/Microalgas: 3:1 Tiempo: 5 min	Porcentaje lípidos extraídos: 6,18%
Valorización	Digestión anaerobia	Lodos granulares	Temperatura: 35 °C Vol. Inóculo: 200 mL pH: 8,2 Vol. Lodo granular: 11 mL Tiempo incubación: 27 días DQO: 1320 mg/L	Producción metano: 0,0512 mL/mL reutilización Remoción DQO: 72,3 %

Se realizó la misma síntesis en forma de diagrama.



**Figura 51.** Diagrama concentración y rompimiento celular planteado.

Con el fin de evaluar las ventajas de las operaciones implementadas en esta secuencia, se comparó la obtención de lípidos sin llevar a cabo ninguna etapa versus la secuencia propuesta de la siguiente manera.



**Figura 52.** Comparación secuencia propuesta y microalgas sin tratar



**Tabla 34:** Comparación de variables microalgas sin tratar y con secuencia de operaciones

Relación	Microalgas	Secuencia	Resultado
Lípidos	17,496 mg/día	85,559 mg/día	4,89
Volumen por tratar	2 L/día	0,434 L/día	21,7 %
Concentración biomasa	729,04 mg/L	3190 mg/L	4,37
NaCl usado	755.3 g NaCl/ L biomasa día	163,9 g NaCl/L biomasa día	0,217

Al llevar a cabo la comparación entre las microalgas sin tratar y la secuencia propuesta, realizada en la tabla 33, se observó un incremento de casi 5 veces en la cantidad de lípidos obtenidos y una disminución de casi el 80% del volumen de biomasa a tratar, el cual va de la mano del aumento en la concentración de biomasa. Adicionalmente en el caso de que se quisiera llevar a cabo el rompimiento celular de las microalgas sin tratar por medio del choque osmótico, se hubiera requerido casi 5 veces la cantidad de NaCl en comparación con la secuencia propuesta. Estos resultados indican el valor agregado asociado al implementar la secuencia de operaciones propuesta en donde se es posible evidenciar una mejora de lípidos obtenidos. También se observó una disminución del volumen de suspensión biomasa a tratar y a su vez un aumento en la concentración de esta, lo cual para procesos posteriores de rompimiento celular o almacenamiento de biomasa son bastante útiles por el menor volumen de equipos requeridos, menor uso de sustancias adicionales cuyo efecto depende en parte por la concentración de estos, como es el caso de la solución salina empleada para el rompimiento celular; y finalmente una mayor concentración de material intracelular obtenido, lo cual es de gran utilidad en posteriores etapas de aprovechamiento.

## Conclusiones y Recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- El cultivo microalgal mixto compuesto de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. usando orina humana diluida como fuente de nutrientes en su fase estacionario y bajo las condiciones de operaciones llega a una concentración de 729,04 mg/L
- El método de concentración seleccionada a través de una ponderación técnica, de riesgo de sustancias químicas y utilidad operacional fue la electrocoagulación por medio del uso de electrodos de hierro. Con un porcentaje de remoción de biomasa en el efluente del 91,3%.
- El método de rompimiento celular seleccionado de microalgas provenientes del proceso de concentración previo es el choque osmótico, en el cual su eficacia fue evaluada a través de la extracción de lípidos con solventes orgánicos. Obteniendo un porcentaje de extracción de lípidos del 6,18%.
- El método seleccionado para la valorización de corrientes alternas del proceso de concentración celular fue la producción de metano por digestión anaerobia, el cual da una tasa de producción de 0,0512 mL de CH<sub>4</sub>/ mL agua de reutilización.
- La secuencia de etapas para la obtención de productos intracelulares del cultivo mixto microalgal es: Cultivo en fotobiorreactor - Electrocoagulación con electrodos de hierro - Choque osmótico - Digestión anaerobia para la corriente alterna de la electrocoagulación. Obteniendo 4,37 veces más la concentración de biomasa, una reducción del volumen a tratar de 78,3 % y 4,89 veces más la cantidad de lípidos en comparación con el cultivo mixto microalgal sin estas etapas.

### 5.2 Recomendaciones

A partir del trabajo realizado respecto a la secuencia para la recolección y rompimiento celular; y aprovechamiento de corrientes alternas de las microalgas cultivadas planteada, se plantean las siguientes observaciones y recomendaciones que en futuros estudios sobre

este mismo tema se consideran valiosos para tener en cuenta, esto con el fin de seguir avanzando en este y obtener conclusiones cada vez más robustas.

- El trabajo con cultivos mixtos de microalgas es aún muy limitado, al igual que el uso de medios de cultivo no formulados como es el uso de aguas residuales y orina humana. Estos medios al no presentar características exactas como los formulados, sino variaciones en su composición pueden impactar en la proporción de material intracelular generado por las microalgas. Por lo cual resulta relevante continuar el trabajo en formas de estandarización de estos, ya sea a través del contenido de nitrógeno o carga orgánica inicial del medio.
- En futuros estudios se considera importante evaluar, con base en la aplicación final y/o producto a obtener, la importancia o no de trabajar en condiciones estériles. Esto ya que dependiendo del sector de trabajo (farmacéutico, alimenticio y/o energético) y del producto a obtener (astaxantina,  $\beta$ -caroteno, ácidos grasos de omega 3, biodiesel y/o polímeros) puede no ser necesario y a su vez ser una fuente de sobrecostos; los cuales para productos de gran valor agregado puede no ser importantes, pero en productos cuya utilidad está asociada a economías de gran escala y grandes volúmenes esto puede resultar de gran relevancia.
- Respecto a la etapa de concentración celular, todos los métodos se evaluaron bajo las mismas condiciones, es decir, mismo recipiente, volumen de muestra, concentración de biomasa, pH, temperatura. Esto con el fin de solo evaluar la influencia del método sobre la biomasa. En futuros trabajos se recomienda incorporar el uso de diferentes equipos e instrumentos cuyas geometrías y configuraciones pueden favorecer la recolección celular y de esta forma obtener resultados que faciliten una implementación comercial de esta operación unitaria.
- La electrocoagulación con hierro fue el método seleccionado para la recolección celular y el choque osmótico como método de rompimiento celular con base en los parámetros discutidos y elaborados anteriormente. Se recomienda en estudios posteriores optimizar las condiciones de ambos métodos, buscando obtener un mayor porcentaje de remoción de biomasa, minimizar el contenido de hierro

remanente en las microalgas, el tiempo de incubación en donde se obtenga una mayor cantidad de lípidos y una mayor utilidad operacional

- En este estudio la solución salina sólo fue reutilizada una vez más para el rompimiento celular, dando resultados similares de extracción en comparación con la solución salina fresca. Viendo esto se recomienda evaluar el número de veces en que esta solución salina se puede utilizar y el porcentaje de lípidos extraídos de cada uso esto con el fin de disminuir costos y evitar corrientes residuales en el proceso.
- Se recomienda en estudios posteriores de rompimiento celular usando el método de choque osmótico modificar la concentración de sal en el medio y a su vez buscar corrientes salinas residuales provenientes de otros procesos, como osmosis inversa, y emplearlas en este proceso, integrándolos y al tiempo hacer de estos más sostenibles ambiental y económicamente.
- En este estudio se usó como método de evaluación del rompimiento celular, la extracción de lípidos por solventes, la cual, si bien es una forma ampliamente difundida, tal como se evidencia los diferentes estudios referenciados, sigue siendo una medida indirecta solo centrada en los lípidos. En futuros trabajos se sugiere usar otros análisis adicionales para la evaluación del rompimiento, tal como citometría de flujo o medir el porcentaje de carbohidratos y proteínas también extraídos por cada proceso.
- En este estudio como criterio económico solo se usó la utilidad operacional. En trabajos posteriores vale la pena hacer un análisis económico y financiero más profundo que tenga en cuenta montaje de la planta, escalamiento, análisis de mercado, costos de inversión, retorno a la inversión, tasa de ganancias. Ya que estos análisis permiten la materialización de la secuencia planteada a un proceso industrial.
- Las etapas de la secuencia planteada tienen diferentes tiempos de proceso en las condiciones evaluadas. Por ejemplo, el biorreactor produce 2 litros de biomasa por día en condiciones estacionarias. La electrocoagulación con hierro toma 40 minutos para tratar un litro de biomasa y el choque osmótico toma 5 minutos para tratar un litro de biomasa concentrada. Estas diferencias generan tiempos muertos

entre etapas. Se recomienda hacer un análisis con enfoque en productividad industrial para reducir los tiempos muertos entre etapas, ya sea a través del montaje de varios reactores en paralelo, aumentar el volumen de este, poner en flujo continuo la concentración y/o rompimiento celular, entre otras alternativas.

- Respecto a la valorización de corrientes alternas, si bien la reutilización del medio de cultivo para el crecimiento de microalgas no fue satisfactoria, en este se evidencio el cultivo de bacterias, por lo cual vale la pena hacer un análisis más detallado de las características de estas y evaluar su posible utilidad.





% Extracción	1,200	11,037	2,607	4,403	3,319	4,136	6,181	9,480	8,199
Extracción (g/g)	0,01200	0,11037	0,02607	0,04403	0,03319	0,04136	0,06181	0,09480	0,08199
F USD/mg	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04	1,60E-04
t min	10	10	5	5	40	0,5	5	1440	2880
t (h)	0,166	0,166	0,083	0,083	0,667	0,0083	0,083	24	48
Total	1,84E-02	8,45E-03	7,98E-02	1,35E-01	1,27E-02	1,27E-02	3,79E-02	2,02E-04	8,72E-05
<b>Costos</b>									
W	0	112,5	0	0	0	0	0	0	0
V (V)	0	0	0	0	5	4,2	0	0	0
I (A)	0	0	0	0	0,1	2,34	0	0	0
S (USD/kWh)	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156
N (mg) ácido acético	0	0	1005	1005	1005	0	0	0	0
N (mg) Bisulfito de sodio	0	0	20,8122	20,8122	0	0	0	0	0
N (mg) FeSO4	0	0	0	51,041	51,041	0	0	0	0
N (mg) H2O2	0	0	19	19	0	0	0	0	0
N (mg) NaCl	0	0	0	0	0	0	15000	15000	15000
J (USD/mg) ácido acético	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07	4,10E-07
J (USD/mg) Bisulfito de sodio	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07	5,00E-07
J (USD/mg) FeSO4	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08	8,00E-08
J (USD/mg) H2O2	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07	6,50E-07
J (USD/mg) NaCl	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08	7,00E-08
t (h)	0,166	0,166	0,083	0,083	0,667	0,0083	0,083	24	48
t1 (h)	0	0,166	0	0	0,667	0,0083	0	0	0
Total	0,00E+00	1,76E-02	5,22E-03	5,27E-03	7,02E-04	1,53E-03	1,26E-02	4,38E-05	2,19E-05
Utilidad Operacional (USD/h)	1,84E-02	-9,12E-03	7,46E-02	1,30E-01	1,20E-02	1,11E-02	2,53E-02	1,58E-04	6,53E-05



## Referencias Bibliográficas

- Acién, F. G., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G. C., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2017). Photobioreactors for the production of microalgae. En *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (pp. 1-44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
- Alam, R., & Shang, J. Q. (2016). Electrochemical model of electro-flotation. *Journal of Water Process Engineering*, 12, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.06.009>
- Ali, M., & Watson, I. A. (2015). Microwave treatment of wetalgal paste for enhanced solvent extraction of lipids for biodiesel production. *Renewable Energy*, 76, 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.024>
- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., & Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>
- Aljuboori, A. H. R., Uemura, Y., & Thanh, N. T. (2016). Flocculation and mechanism of self-flocculating lipid producer microalga *Scenedesmus quadricauda* for biomass harvesting. *Biomass and Bioenergy*, 93, 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.013>
- Ansari, F. A., Shriwastav, A., Gupta, S. K., Rawat, I., Guldhe, A., & Bux, F. (2015). Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: A step closer to the biorefinery. *Bioresource Technology*, 179, 559-564. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.047>

- Aravind, S., Barik, D., Ragupathi, P., & Vignesh, G. (2021). Investigation on algae oil extraction from algae *Spirogyra* by Soxhlet extraction method. *Materials Today: Proceedings*, *43*, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.668>
- Arhoun, B. (s. f.). *Digestión y Codigestión Anaerobia de Residuos Agrícolas, Ganaderos y Lodos de Depuradora*. 211.
- Bai, S., Xi, B., Li, X., Wang, Y., Yang, J., Li, S., & Zhao, X. (2021). Anaerobic digestion of chicken manure: Sequences of chemical structures in dissolved organic matter and its effect on acetic acid production. *Journal of Environmental Management*, *296*, 113245. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113245>
- Baierle, F., John, D. K., Souza, M. P., Bjerk, T. R., Moraes, M. S. A., Hoeltz, M., Rohlfes, A. L. B., Camargo, M. E., Corbellini, V. A., & Schneider, R. C. S. (2015). Biomass from microalgae separation by electroflotation with iron and aluminum spiral electrodes. *Chemical Engineering Journal*, *267*, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.031>
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs*, *17*(5), 304. <https://doi.org/10.3390/md17050304>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 1489-1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Behera, B., Patra, S., & Balasubramanian, P. (2020). Biological nutrient recovery from human urine by enriching mixed microalgal consortium for biodiesel production. *Journal of Environmental Management*, *260*, 110111. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110111>

- Berumen, S. A., & Redondo, F. L. (2007). *La utilidad de los métodos de decisión multicriterio (como el ahp) en un entorno de competitividad creciente*. 24.
- Bhatia, S. K., Mehariya, S., Bhatia, R. K., Kumar, M., Pugazhendhi, A., Awasthi, M. K., Atabani, A. E., Kumar, G., Kim, W., Seo, S. O., & Yang, Y. H. (2021). Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges. *Science of The Total Environment*, 751, 141599. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141599>
- Biorizon Biotech. (2018). *D1.2. Cost and economic feasibility guide FOR LARGE SCALE MICROALGAL BIOREFINERIES*.
- Bolaji, I., Nejad, B., Billham, M., Mehta, N., Smyth, B., & Cunningham, E. (2021). Multi-criteria decision analysis of agri-food waste as a feedstock for biopolymer production. *Resources, Conservation and Recycling*, 172, 105671. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105671>
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. (2015). Marine drugs Comparison of Cell Disruption Methods for Improving Lipid Extraction from Thraustochytrid Strains. *Mar. Drugs*, 13, 5111-5127. <https://doi.org/10.3390/md13085111>
- Cai, Q. Q., Jothinathan, L., Deng, S. H., Ong, S. L., Ng, H. Y., & Hu, J. Y. (2021). Fenton- and ozone-based AOP processes for industrial effluent treatment. En *Advanced Oxidation Processes for Effluent Treatment Plants* (pp. 199-254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821011-6.00011-6>
- Carson, P. A., & Mumford, C. J. (2002). *Hazardous chemicals handbook* (2nd ed). Butterworth-Heinemann.
- Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., & Pataro, G. (2018). Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous

extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 31, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.017>

Castrillo, M., Lucas-Salas, L. M., Rodríguez-Gil, C., & Martínez, D. (2013). High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 128, 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.114>

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>

Chen, H., Yoshida, G., Andriamanohiarisoamanana, F. J., & Ihara, I. (2022). Electro-oxidation combined with electro-Fenton for decolorization of caramel colorant aqueous solution using BDD electrodes. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102672. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102672>

Concas, A., Pisu, M., & Cao, G. (2015). Disruption of microalgal cells for lipid extraction through Fenton reaction: Modeling of experiments and remarks on its effect on lipids composition. *Chemical Engineering Journal*, 263(November 2017), 392-401. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.012>

Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Santos, T. D., Mitchell, B. G., & Morais, M. G. (2019). Open pond systems for microalgal culture. En *Biofuels from Algae* (pp. 199-223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00009-3>

Daghrir, R., Igounet, L., Brar, S. K., & Drogui, P. (2014). Novel electrochemical method for the recovery of lipids from microalgae for biodiesel production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(1), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.04.013>

- Dahiya, S., Katakojwala, R., Ramakrishna, S., & Mohan, S. V. (2020). Biobased Products and Life Cycle Assessment in the Context of Circular Economy and Sustainability. *Materials Circular Economy*, 2(1). <https://doi.org/10.1007/s42824-020-00007-x>
- Datta, A., Hossain, A., & Roy, S. (2019). An overview on biofuels and their advantages and disadvantages. *Asian Journal of Chemistry*, 31(8), 1851-1858. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22098>
- de Andrade, G. A., Berenguel, M., Guzmán, J. L., Pagano, D. J., & Acién, F. G. (2016). Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, 37, 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2015.10.001>
- De Francisci, DPodevin, M., Fotidis, I. A. avide, Møller, P., & Angelidaki, I. (2017). Detailing the start-up and microalgal growth performance of a full-scale photobioreactor operated with bioindustrial wastewater. *Algal Research*, 25(April), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.030>
- de Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Moreira, L. S., Wolf Maciel, M. R., & Maciel Filho, R. (2019). Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents. *Renewable Energy*, 143, 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.168>
- de Moraes, A. P. J., Teixeira, C. M. L. L., Faria-Machado, A. F., & Lage, C. L. S. (2021). Effects of bioflocculants on lipid extraction, fatty acid composition and reuse of the culture media for biodiesel production using *Chlorella vulgaris*. *Separation Science and Technology*, 56(15), 2609-2618. <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1839097>
- dos Santos, R. R., Moreira, D. M., Kunigami, C. N., Aranda, D. A. G., & Teixeira, C. M. L. L. (2015). Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella*

vulgaris biomass. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 95-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.015>

Ebhodaghe, S. O., Imanah, O. E., & Ndibe, H. (2022). Biofuels from microalgae biomass: A review of conversion processes and procedures. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103591. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103591>

Emeksiz, C., & Yüksel, A. (2022). A suitable site selection for sustainable bioenergy production facility by using hybrid multi-criteria decision making approach, case study: Turkey. *Fuel*, 315, 123214. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123214>

Enamala, M. K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T. V., Velpuri, J., & Kuppam, C. (2018). Production of biofuels from microalgae—A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94(June), 49-68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>

Figuroa-Torres, G. M., Wan Mahmood, W. M. A., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2020). Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 153(October 2019), 107396. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107396>

Firouzi, S., Allahyari, M. S., Isazadeh, M., Nikkhah, A., & Van Haute, S. (2021). Hybrid multi-criteria decision-making approach to select appropriate biomass resources for biofuel production. *Science of The Total Environment*, 770, 144449. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144449>

Gamarra-Güere, C. D., Dionisio, D., Santos, G. O. S., Vasconcelos Lanza, M. R., & de Jesus Motheo, A. (2022). Application of Fenton, photo-Fenton and electro-Fenton processes for

- the methylparaben degradation: A comparative study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 106992. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106992>
- Ghazvini, M., Kavosi, M., Sharma, R., & Kim, M. (2022). A review on mechanical-based microalgae harvesting methods for biofuel production. *Biomass and Bioenergy*, 158(December 2021), 106348. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106348>
- Golzary, A., Imanian, S., Abdoli, M. A., Khodadadi, A., & Karbassi, A. (2015). A cost-effective strategy for marine microalgae separation by electro-coagulation-flotation process aimed at bio-crude oil production: Optimization and evaluation study. *Separation and Purification Technology*, 147, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.011>
- Gonzalez-Contreras, M., Lugo-Mendez, H., Sales-Cruz, M., & Lopez-Arenas, T. (2021). Synthesis, design and evaluation of intensified lignocellulosic biorefineries—Case study: Ethanol production. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 159(November 2020), 108220. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108220>
- González-González, L. M., Astals, S., Pratt, S., Jensen, P. D., & Schenk, P. M. (2019). Impact of osmotic shock pre-treatment on microalgae lipid extraction and subsequent methane production. *Bioresource Technology Reports*, 7(February), 100214. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100214>
- Gorin, K. V., Sergeeva, Y. E., Butylin, V. V., Komova, A. V., Pojidaev, V. M., Badranova, G. U., Shapovalova, A. A., Konova, I. A., & Gotovtsev, P. M. (2015). Methods coagulation/flocculation and flocculation with ballast agent for effective harvesting of microalgae. *Bioresource Technology*, 193, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.097>

- Goto, M., Kanda, H., Wahyudiono, & Machmudah, S. (2015). Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.003>
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*, 91(1), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.048>
- Halim, R., Papachristou, I., Kubisch, C., Nazarova, N., Wüstner, R., Steinbach, D., Chen, G. Q., Deng, H., Frey, W., Posten, C., & Silve, A. (2021). Hypotonic osmotic shock treatment to enhance lipid and protein recoveries from concentrated saltwater *Nannochloropsis* slurries. *Fuel*, 287, 119442. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119442>
- Harrison, R. G., Todd, P. W., Rudge, S. R., & Petrides, D. P. (2015). *Bioseparations Science and Engineering* (2.<sup>a</sup> ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780195391817.001.0001>
- hattab, M. A. (2015). Microalgae Harvesting Methods for Industrial Production of Biodiesel: Critical Review and Comparative Analysis. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 05(02). <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000154>
- Hemalatha, M., Sravan, J. S., Min, B., & Venkata Mohan, S. (2019). Microalgae-biorefinery with cascading resource recovery design associated to dairy wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 284(January), 424-429. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.106>
- Hörman, A., & Hänninen, M.-L. (2006). Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, Colilert 18, ReadyCult Coliforms 100, Water-Check-100, 3M Petrifilm EC and DryCult Coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Research*, 40(17), 3249-3256. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.024>



- Huang, W. C., & Kim, J. D. (2013). Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass. *Bioresource Technology*, *149*, 579-581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.095>
- Inostroza, C., Solimeno, A., García, J., Fernández-Sevilla, J. M., & Ación, F. G. (2021). Improvement of real-scale raceway bioreactors for microalgae production using Computational Fluid Dynamics (CFD). *Algal Research*, *54*, 102207. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102207>
- insideout. (2015, junio 17). *Hydrogen Peroxide Health & Safety Tips*. VelocityEHS. <https://www.ehs.com/2015/06/hydrogen-peroxide-health-safety-tips/>
- Jaatinen, S., Lakaniemi, A.-M., & Rintala, J. (2016). Use of diluted urine for cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*, *37*(9), 1159-1170. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1105300>
- Jingura, R. M., & Kamusoko, R. (2017). Methods for determination of biomethane potential of feedstocks: A review. *Biofuel Research Journal*, *4*(2), 573-586. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.2.3>
- Joannes, C., Sipaut, C. S., Dayou, J., Yasir, S. M., & Mansa, R. F. (2015). Review Paper on Cell Membrane Electroporation of Microalgae using Electric Field Treatment Method for Microalgae Lipid Extraction. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *78*, 012034. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/78/1/012034>
- Jochen's High Voltage Page: *Measuring high voltages by spark length*. (s. f.). Recuperado 10 de septiembre de 2022, de <http://www.kronjaeger.com/hv/hv/msr/spk/index.html#:~:text=The%20simplest%20way%20of%20measuring,until%20a%20spark%20jumps%20over>

- Kar, J. R., & Singhal, R. S. (2015). Investigations on ideal mode of cell disruption in extremely halophilic *Actinopolyspora halophila* (MTCC 263) for efficient release of glycine betaine and trehalose. *Biotechnology Reports*, 5, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.005>
- Kim, D. Y., Oh, Y. K., Park, J. Y., Kim, B., Choi, S. A., & Han, J. I. (2015). An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. *Bioresource Technology*, 191, 469-474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.020>
- Kim, D.-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.-I., Lee, K., Park, J.-Y., Chang, W.-S., Lee, J.-S., & Oh, Y.-K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199, 300-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Krishna Koyande, A., Tanzil, V., Murrally Dharan, H., Subramaniam, M., Robert, R. N., Lau, P.-L., Khoiroh, I., & Show, P.-L. (2020). Integration of osmotic shock assisted liquid biphasic system for protein extraction from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 157, 107532. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107532>
- Krishnamoorthy, N., Unpaprom, Y., Ramaraj, R., Maniam, G. P., Govindan, N., Arunachalam, T., & Paramasivan, B. (2021). Recent advances and future prospects of electrochemical processes for microalgae harvesting. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105875. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105875>
- Krishnan, A., Devasya, R., Hu, Y., & Bassi, A. (2022). Fundamental investigation of bio-surfactants-assisted harvesting strategy for microalgae. *Biomass and Bioenergy*, 158(January), 106364. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106364>

- Lai, Y. S., Parameswaran, P., Li, A., Baez, M., & Rittmann, B. E. (2014). Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, *173*, 457-461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.124>
- Lama, S., Muylaert, K., Karki, T. B., Foubert, I., Henderson, R. K., & Vandamme, D. (2016). Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, *220*, 464-470. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>
- Landels, A., Beacham, T. A., Evans, C. T., Carnovale, G., Raikova, S., Cole, I. S., Goddard, P., Chuck, C., & Allen, M. J. (2019). Improving electrocoagulation floatation for harvesting microalgae. *Algal Research*, *39*(January). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101446>
- Lee, I., & Han, J. I. (2021). Development of a pretreatment method based on Fenton-like reaction combined with hydrodynamic cavitation for lipid extraction from wet microalgae. *Renewable Energy*, *175*, 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.04.130>
- Lucakova, S., Branyikova, I., Kovacikova, S., Pivokonsky, M., Filipenska, M., Branyik, T., & Ruzicka, M. C. (2021). Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae. *Bioresource Technology*, *323*(December 2020), 124606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124606>
- Mansour, E. A., Abo El-Enin, S. A., Hamouda, A. S., & Mahmoud, H. M. (2019). Efficacy of extraction techniques and solvent polarity on lipid recovery from domestic wastewater microalgae. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, *12*(August), 100271. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2019.100271>

- Mathimani, T., & Mallick, N. (2018). A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel—Key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 91*(April 2018), 1103-1120. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances, 32*(7), 1216-1236. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2014.07.005>
- McMillan, J. R., Watson, I. A., Ali, M., & Jaafar, W. (2013). Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy, 103*, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.020>
- Misra, R., Guldhe, A., Singh, P., Rawat, I., Stenström, T. A., & Bux, F. (2015). Evaluation of operating conditions for sustainable harvesting of microalgal biomass applying electrochemical method using non sacrificial electrodes. *Bioresource Technology, 176*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.014>
- Monlau, F., Suarez-alvarez, S., Lallement, A., Vaca-medina, G., & Giacinti, G. (2021). *A cascade biorefinery for the valorization of microalgal biomass: Biodiesel , biogas , fertilizers and high valuable compounds. 59*(August). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102433>
- Morais, M. G., Santos, T. D., Moraes, L., Vaz, B. S., Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2022). Exopolysaccharides from microalgae: Production in a biorefinery framework and potential applications. *Bioresource Technology Reports, 18*, 101006. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101006>
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P. C., Dinakaran, S., Dahms, H. U., & Ponnusamy, V. K. (2019). Passive cell disruption lipid extraction methods of microalgae for biofuel

- production – A review. *Fuel*, 252(100), 699-709.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.092>
- Nwokoagbara, E., Olaleye, A. K., & Wang, M. (2015). Biodiesel from microalgae: The use of multi-criteria decision analysis for strain selection. *Fuel*, 159, 241-249.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.074>
- Obeid, F., Van, T. C., Guo, B., Surawski, N. C., Hornung, U., Brown, R. J., Ramirez, J. A., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Hankamer, B., & Rainey, T. (2021). The fate of nitrogen and sulphur during co-liquefaction of algae and bagasse: Experimental and multi-criterion decision analysis. *Biomass and Bioenergy*, 151, 106119.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106119>
- Ortiz, A., García-Galán, M. J., García, J., & Díez-Montero, R. (2021). Optimization and operation of a demonstrative full scale microalgae harvesting unit based on coagulation, flocculation and sedimentation. *Separation and Purification Technology*, 259(June 2020).  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118171>
- Paladino, O., & Neviani, M. (2021). Biomass and Bioenergy Airlift photo-bioreactors for *Chlorella vulgaris* cultivation in closed-loop zero waste biorefineries. *Biomass and Bioenergy*, 144(January 2020), 105926. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105926>
- Papachristou, I., Silve, A., Jianu, A., Wüstner, R., Nazarova, N., Müller, G., & Frey, W. (2020). Evaluation of pulsed electric fields effect on the microalgae cell mechanical stability through high pressure homogenization. *Algal Research*, 47, 101847.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101847>
- Patil, S. S., Behera, B., Sen, S., & Balasubramanian, P. (2021). Performance evaluation of bubble column photobioreactor along with CFD simulations for microalgal cultivation using

- human urine. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104615.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104615>
- Pôjo, V., Tavares, T., & Malcata, F. X. (2021). Processing Methodologies of Wet Microalga Biomass Toward Oil Separation: An Overview. *Molecules*, 26(3), 641.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26030641>
- Quinn, J. C., Hanif, A., Sharvelle, S., & Bradley, T. H. (2014). Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. *Bioresource Technology*, 171, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.037>
- Rachidi, F., Benhima, R., Sbabou, L., & El Arroussi, H. (2020). Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnology Reports*, 25, e00426. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00426>
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J., & Miklavčič, D. (2016). Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 312-321.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.003>
- Rincón, B., Fernández-Rodríguez, M. J., Lama-Calvente, D. de la, & Borja, R. (2018). The Influence of Microalgae Addition as Co-Substrate in Anaerobic Digestion Processes. En E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.75914>
- Rwehumbiza, V. M., Harrison, R., & Thomsen, L. (2012). Alum-induced flocculation of pre-concentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and

- its effects on microalgae growth upon media recycling. *Chemical Engineering Journal*, 200-202, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.008>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Salama, E. S., Jeon, B. H., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., Govindwar, S. P., Lee, S. H., Yang, I. S., & Lee, D. S. (2016). Harvesting of freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* using acid mine drainage as a cost effective flocculant for biofuel production. *Energy Conversion and Management*, 121, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.020>
- Sandani, W. P., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., & Premachandra, J. K. (2022). Novel strategy for microalgae cell disruption and wet lipid extraction by employing electro-Fenton process with sacrificial steel anode. *Bioresource Technology*, 343(October 2021), 126110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126110>
- Schade, S., & Meier, T. (2021). Techno-economic assessment of microalgae cultivation in a tubular photobioreactor for food in a humid continental climate. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23(5), 1475-1492. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02042-x>
- Shahi, T., Beheshti, B., Zenouzi, A., & Almasi, M. (2020). Bio-oil production from residual biomass of microalgae after lipid extraction: The case of *Dunaliella* Sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(August 2019), 101494. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101494>

- Shi, Z., Zhao, B., Tang, S., & Yang, X. (2018). Hydrotreating lipids for aviation biofuels derived from extraction of wet and dry algae. *Journal of Cleaner Production*, *204*, 906-915. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.351>
- Silve, A., Kian, C. B., Papachristou, I., Kubisch, C., Nazarova, N., Wüstner, R., Leber, K., Strässner, R., & Frey, W. (2018). Incubation time after pulsed electric field treatment of microalgae enhances the efficiency of extraction processes and enables the reduction of specific treatment energy. *Bioresource Technology*, *269*, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.060>
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, *217*, 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Spain, O., Plöhn, M., & Funk, C. (2021). The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*, *173*(2), 526-535. <https://doi.org/10.1111/ppl.13405>
- Sruthi, T., Gandhimathi, R., Ramesh, S. T., & Nidheesh, P. V. (2018). Stabilized landfill leachate treatment using heterogeneous Fenton and electro-Fenton processes. *Chemosphere*, *210*, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.172>
- Steriti, A., Rossi, R., Concas, A., & Cao, G. (2014). A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, *164*, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.056>
- Teng, Z., Hua, J., Wang, C., & Lu, X. (2014). Design and optimization principles of biogas reactors in large scale applications. In *Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology* (pp. 99-134). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59566-9.00004-1>



- Tsarpali, M., Arora, N., Kuhn, J. N., & Philippidis, G. P. (2021). Lipid-extracted algae as a source of biomaterials for algae biorefineries. *Algal Research*, *57*, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102354>
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B.-I., Sim, S. J., Kim, S. H., & Pandey, A. (2022). Production of microalgae with high lipid content and their potential as sources of nutraceuticals. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09784-y>
- Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M. K., & Hoadley, A. F. A. (2011). A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, *174*(1), 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.012>
- Ummalyma, S. B., Mathew, A. K., Pandey, A., & Sukumaran, R. K. (2016). Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. *Bioresource Technology*, *213*, 216-221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.114>
- Vally, H., & Misso, N. L. (2012). Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, *5*(1), 16-23.
- Vandamme, D., Muylaert, K., Fraeye, I., & Foubert, I. (2014). Floc characteristics of *Chlorella vulgaris*: Influence of flocculation mode and presence of organic matter. *Bioresource Technology*, *151*, 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.112>
- Vasistha, S., Khanra, A., Clifford, M., & Rai, M. P. (2021). Current advances in microalgae harvesting and lipid extraction processes for improved biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *137*(October 2020), 110498. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110498>

- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., Fernandes, B. D., & Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. *Biofuel Research Journal*, 5(1), 780-791. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>
- Visigalli, S., Barberis, M. G., Turolla, A., Canziani, R., Berden Zrimec, M., Reinhardt, R., & Ficara, E. (2021). Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting – A review. *Separation and Purification Technology*, 271, 118684. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118684>
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>
- Wu, J., Liu, J., Lin, L., Zhang, C., Li, A., Zhu, Y., & Zhang, Y. (2015). Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae. *Bioresource Technology*, 197, 495-501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.094>
- Wu, Y., Zhou, S., Qin, F., Zheng, K., & Ye, X. (2010). Modeling the oxidation kinetics of Fenton's process on the degradation of humic acid. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1), 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.036>
- Xia, L., Li, H., & Song, S. (2016). Cell surface characterization of some oleaginous green algae. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 391-407. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0768-1>
- Xu, J., Zhao, F., & Su, X. (2021). Direct extraction of lipids from wet microalgae slurries by super-high hydrostatic pressure. *Algal Research*, 58, 102412. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102412>

- Xu, X., Zhang, H., Gao, T., & Teng, J. (2021). Impacts of applied voltage on forward osmosis process harvesting microalgae: Filtration behaviors and lipid extraction efficiency. *Science of the Total Environment*, 773, 145678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145678>
- Xue, C., Chou, C.-S., Kao, C.-Y., Sen, C. K., & Friedman, A. (2012). Propagation of cutaneous thermal injury: A mathematical model: Propagation of cutaneous thermal injury. *Wound Repair and Regeneration*, 20(1), 114-122. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00759.x>
- Yang, Z. Y., Gao, F., Liu, J. Z., Yang, J. S., Liu, M., Ge, Y. M., Chen, D. Z., & Chen, J. M. (2022). Improving sedimentation and lipid production of microalgae in the photobioreactor using saline wastewater. *Bioresource Technology*, 347(November 2021), 126392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126392>
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135, 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>
- Yu, W.-L., Ansari, W., Schoepp, N. G., Hannon, M. J., Mayfield, S. P., & Burkart, M. D. (2011). Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 91. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-91>
- Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F. N., Qi, X., & Sahu, J. N. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 105-128. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>

- Zhang, B., & Ogden, K. (2017). Recycled wastewater from anaerobic digestion of lipid extracted algae as a source of nutrients. *Fuel*, *210*, 705-712. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.09.026>
- Zhang, L., Zhang, L., Wu, D., Wang, L., Yang, Z., Yan, W., Jin, Y., Chen, F., Song, Y., & Cheng, X. (2021). Biochemical wastewater from landfill leachate pretreated by microalgae achieving algae's self-reliant cultivation in full wastewater-recycling chain with desirable lipid productivity. *Bioresource Technology*, *340*, 125640. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125640>
- Zhang, S., Hou, Y., Liu, Z., Ji, X., Wu, D., Weijiewang, Zhang, D., Wang, W., Chen, S., & Chen, F. (2020). Electro-Fenton Based Technique to Enhance Cell Harvest and Lipid Extraction from Microalgae. *Energies*, *13*(15). <https://doi.org/10.3390/en13153813>
- Zhou, X., Jin, W., Tu, R., Guo, Q., Han, S. fang, Chen, C., Wang, Q., Liu, W., Jensen, P. D., & Wang, Q. (2019). Optimization of microwave assisted lipid extraction from microalga *Scenedesmus obliquus* grown on municipal wastewater. *Journal of Cleaner Production*, *221*, 502-508. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.260>
- Zhu, L., Hu, T., Li, S., Nugroho, Y. K., Li, B., Cao, J., Show, P.-L., & Hiltunen, E. (2020). Effects of operating parameters on algae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting and lipid extraction using metal sulfates as flocculants. *Biomass and Bioenergy*, *132*, 105433. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105433>
- Zou, X., Xu, K., Chang, W., Qu, Y., & Li, Y. (2021). Rapid extraction of lipid from wet microalgae biomass by a novel buoyant beads and ultrasound assisted solvent extraction method. *Algal Research*, *58*(March), 102431. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102431>

## Artículo relacionado

### **Evaluation of several harvesting methods of a mixed microalgae culture of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*, using diluted human urine as nutrient source**

Edgar David Africano Camargo

Environmental and Civil Engineering School, University Antonio Nariño, Bogotá, Colombia  
eafricano46@uan.edu.co

#### **Abstract**

This study evaluated the performance of several harvesting methods (gravity sedimentation, pH modulation at high pH and low pH, coagulation with iron and aluminum salts and electrocoagulation with iron and aluminum electrodes) on a mixed microalgae culture composed of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* that used as growth medium diluted human urine and atmospheric air as the carbon dioxide source. Flocculation efficiency (FE) was measured for each method to evaluate their performance. FE was assessed by measuring the optical density at 675 nm of the microalgae culture in stationary phase growth and after different time periods after the harvesting method is applied. The methods with the highest FE were the coagulation and the electrocoagulation ones, achieving a FE over 85% the first ones after 210 min and the second ones after 40 min. The low pH method achieved a FE of 73% and the others achieved a FE below 30% at 210 min. The electrocoagulation methods seem promising for harvesting microalgae but it is important to take into account the possible health and environmental risks they have due to the release of the electrode ions into the medium which may limit the application fields of the microalgae harvested by this method.

Keywords: Microalgae, Mixed culture, Harvesting, Human urine

#### **1. Introduction**

Due to the depletion of non-renewable fossil fuels [1], the increasing concerns due to the impacts generated by its use [2] and the rise of the concentration of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) in the atmosphere, being one of the main components of greenhouse gasses and a major environmental pollutant [3]. It is necessary to find a sustainable alternative for fossil fuels, in which microalgae biofuels have a great potential [4]. Microalgae, as a main source for sustainable biofuels, have several advantages such as high photosynthetic efficiency, no use of cultivated land, lipid accumulation, rapid growth period and lack of competition with food-based crops [4–7]. The extraction of lipids from microalgae has been proven technically feasible by several studies [8–11] but still it is not economically viable [12,13]. Some of the reasons behind this unviability lies in the low biomass concentration obtained from the bioreactor which can vary from 0,5 to 5 g/l depending on the type of bioreactor used [14], microalgae size with a diameter between 5 - 50 μm, a very close density to water (1020 kg/m<sup>3</sup>) [15] and the colloidal stability in suspension of the microalgae [14].

Making the harvesting process challenging, accounting a 20 - 30 % of the total biomass production cost [15,16].

A way to lower the cost in the production of microalgae is the use of wastewater as a source of nutrients for the culture [17]. Human urine has been previously used as a nutrient source for the growth of microalgae with promising results [18–20].

Several harvesting methods have been used which include gravity sedimentation, pH modification, inorganic salt addition, coagulation and electrocoagulation [21–26]. Gravity sedimentation is a solid-liquid separation method where the solid phase, in this case microalgae, settles due the density difference between the two phases [21]. The pH modulation mechanism differs whether it is by the use of an acid substance or a basic one. An acid assisted flocculation has as mechanism the proton acceptance by the carboxylate ions present on the cell surface of the microalgae by neutralizing its negative charges, leading to a cell agglomeration and sedimentation [21]. The basic assisted flocculation mechanism relays on the substance used for the pH increase. If  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  is used, this forms calcium carbonate which precipitates at high pH acting as the sweeping mechanism in which particles, in this case microalgal cells, are entrapped in a mineral precipitation [22,27]. When NaOH is used, it is necessary the presence of Calcium and/or Magnesium for the precipitation to occur [28]. The coagulation mechanism takes advantage that the microalgae surface has a negative charge which provides colloidal stability in suspension, being the cell wall composed mostly of polysaccharides, lipids and proteins which functional groups give the surface charge [29]. The coagulation seeks the coalescence of the microalgae suspended in solution and to form agglomerates of cells that, due to their increased density, settle in the medium [30]. Electrocoagulation occurs when a direct current flows through an electrolytic solution by two electrodes with opposite electrical charge from the positive pole (anode) to the negative pole (cathode), establishing an electric field [31]. The electrodes used in this process can be non-reactive (non-sacrificial), in which the cells negatively move towards the anode, where they lose their charge, forming cell aggregates that can settle or float based on their density [21]. When using reactive (sacrificial) electrodes two phenomena occur: i. the electrolysis of the water that generates bubbles favoring the flotation of the floc. ii. the oxidation of the anode to the metal cations that are released into the medium, destabilizing the charge of the cells, generating their flocculation [29]. Microalgae species have different chemical composition [32] and different morphological characteristics [33], which makes it very challenging to find universal conditions and harvesting methods for all types of microalgae [21,34]. Therefore the results obtained with a harvesting method for a specific type of microalgae growth in a determined medium can give an approximate result but not an exact result when applying this harvesting method to other types of microalgae and medium conditions [3,22,34]. Based on this, evaluating the performance of several harvesting methods for specific working conditions, which includes the medium characteristics and species used, is important and can provide more accurate results for the scale-up of the harvesting process.

In this work, mixed microalgae consortia composed of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* are cultured in a photobioreactor using diluted human urine as nutrient source. After reaching the stationary growth phase, the biomass is being harvested by the following methods: gravity sedimentation, pH modification basic and acid; coagulation by the use of an Al based salt and a Fe based salt; and electrocoagulation using aluminum and steel electrodes. The main objective of the present study is to evaluate the performance of several harvesting methods in a mixed microalgal culture with a nutrient source of diluted human urine. The main parameter used

to evaluate the performance of each method is the flocculation efficiency, which was assessed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgae and culture conditions

*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* were used in this study. These were grown in a 2 L tubular photobioreactor using sterilized human urine as medium in a ratio of 4 ml per 1 l of tap water. When the stationary growth phase was reached, the 2 L of microalgae was transferred to a 20 L photobioreactor keeping the same ratio of urine/water with an air feed of 2 L/min given by an air pump coupled with a bubble diffuser. As light source a submersible 5 W led lamp under continuous illumination at a light intensity of 46  $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ . The cultivation temperature was kept between 20 - 22 °C and a pH at 6.9 - 7.1. The biomass concentration reached its stationary phase after 20 days with a concentration of 729 mg/L dry cell weight measured gravimetrically at 105°C (n=3), the moment in which it is harvested by the different methods.

### 2.2 Harvesting methods

#### 2.2.1 Gravitational sedimentation

In this work, 1.5 L of biomass were put in a 1.84 L plastic recipient, the same recipient is used for all the methods, (14 cm x 9 cm x 14 cm) and let to settle at room temperature. Periodically (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, and 1500 min) an aliquot of supernatant was taken 5 cm below the liquid surface, the optical density of the aliquot was measured with a spectrophotometer (Thermo Scientific Genesys 20, USA) at 675 nm. The flocculation efficiency (FE) of each aliquot at different periods was calculated by the following equation:

$$\text{Flocculation efficiency \%} = (A_o - A_i) * 100/A_o$$

Where  $A_o$  and  $A_i$  are the optical density measured at 675 nm at initial time and after a period respectively. For all the methods, at the end of each assay the supernatant was recollected and quantified in a 2 L glass beaker and the harvested cell concentration at the plastic recipient was measured gravimetrically at 105°C. Assay done by triplicate.

#### 2.2.2 pH modification

The pH modification method was tested by two experiments, one at basic pH and other at acid pH. For the basic pH experiment, to 1.5 L of biomass put in a 1.84 L plastic recipient was added a solution of NaOH 1N until pH = 12 was reached and let to settle. For the acid pH experiment, to the same amount of biomass glacial acetic acid was added until pH= 3.7 was reached and let to settle. The FE of each method was done in the same way

as the gravitational sedimentation (GS) method in the same time periods. Each experiment is done by triplicate.

### 2.2.3 Coagulation

Two coagulation experiments were carried out both in 1 L of biomass put in a 1.84 L plastic recipient, one using  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at a molar concentration of 1.8 mM (500 mg/L) and the other using  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  at a molar concentration of 1.7mM (1000 mg/L). These compounds are added and mixed for 2 minutes. The FE of each method was done in the same way as the GS method but a different periods (0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 210 min) the periods for taking the aliquots for this method were determined in previous assays done at the research group. Each experiment is realized by triplicate.

### 2.2.4 Electrocoagulation

Two experiments were realized both by triplicate in 1 L of biomass put in a 1.84 L plastic recipient. One using aluminum plates as electrodes, each plate with a superficial area of  $99 \text{ cm}^2$  put apart at a distance of 7 cm. The other with galvanized steel plates, each with a superficial area of  $80 \text{ cm}^2$  having the same separation distance. The electrodes were connected to a DC power supply (Extech Industries, USA) providing a voltage of 30 V and a current of 0.55 A. The electrocoagulation (EC) methods were done in three stages based on the studies done by [25,35].

1. Electrolysis: voltage: 30 V, electric current: 0.55 A, agitation: 300 rpm, electrolysis duration: 7 min for the aluminum experiment and 20 min for the steel experiment.
2. Cell aggregation: no electric current, agitation: 300 rpm, duration: 10 min.
3. Floc sedimentation: no electric current, no agitation, duration: 10 min.

The FE of these experiments was measured after the floc sedimentation.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Gravitational sedimentation

In the first 6 hours of the assay the average optical density measured at 675 nm went from 0.752 to 0.520 and after 25 hours it was 0.304 resulting in a FE of 31% and 60% at the respective time. [36] reports the biomass recovery after 24 hours of several microalgae species, ranging from about 15% to almost 100%. For *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*, the biomass recovery was less than 43% and 79 - 86% respectively. Indicating the dependence of this method on the type of algae processed. Even though the FE cannot be said to be additive since it is dependent on factors such as pH, medium composition and biomass density [37]. The one obtained in this work is close to the average of the efficiencies reported in [36]. The use of urine as nutrient source does not seem to have an impact on the use of this method since the assays presented the expected characteristics of this process mentioned in [15,22,37].



### 3.2 pH modification

In the high pH experiment it was used on average 12.66 mL of the NaOH 1N solution to reach a pH of 12 in the biomass samples. The FE after 6 and 25 hours were 31% and 73% respectively. For the acid pH experiment on average to reach a pH of 3.7 it was used 1 ml of glacial acetic acid (669 mg/L) reaching flocculation efficiencies of 80% and 94% at 6 h and 25 h respectively.

The study done by [30] uses several concentrations of NaOH and evaluates the FE of each one, where at a similar concentration, the FE is about 5%, while in this study, using NaOH the FE at 30 min is 4.53% as shown in Fig 2. In this reference study the methodology is different since they were evaluating the FE at different concentrations of NaOH in a set time, whereas in ours the methodology was to evaluate the high pH effect in the cell harvesting. [27] evaluates FE at pH 12 using NaOH with *Chlorella Vulgaris* obtaining a value of 80% at 60 min at much lower time than the one required in the present study to achieve a similar FE (1500 min - 25 h). This main difference can be explained by the medium used in each study since in [27] BG11 medium which contains Ca and Mg salts ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75 mg/L and  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 36 mg/L) which at high pH can precipitate and flocculate the microalgal cells by the sweep mechanism. Unlike the use of urine which  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions molarity (mmol/1.5 L) in healthy human urine are 1.663 and 4.389 respectively [38], which at the diluted ratio used in this work gives a concentration of 0.399 mg/L of calcium and 0.640 mg/L of magnesium. Lower concentration than formulated mediums and therefore possibly not making the high pH induced flocculation an effective and consistent harvesting method for cultures using urine.

Regarding low pH induced flocculation this has a higher FE compared to the one high pH experiments. This is due mainly to the dependence of the high pH flocculation on the medium and the presence of certain ions as previously explained, while at low pH the mechanism is due to the proton acceptance and its dependence on the medium used seems to be lower. [30] using a strong acid like  $\text{HNO}_3$  at a similar concentration obtained a FE of 85% with *Scenedesmus sp.* and 95% with *Scenedesmus obliquus*. Obtaining a similar FE with a weak acid, which can be obtained via anaerobic digestion of residues, such as chicken manure [39] or wastewater [40], results of great interest, since it shows a possible integration of two processes (anaerobic digestion and microalgae growth) that can use biological residues as raw materials.

### 3.3 Coagulation

In the experiment using  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  the initial optical density at 675 nm was on average 0.793 and after 210 min it was 0.104 given a FE of 86.8%. Regarding the use of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  the FE was 85.6%. In both coagulant experiments, the pH of the samples after the dosage of the coagulants was in the same range as in the bioreactor.

Using  $\text{FeCl}_3$  and  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  [41] with similar dosage reports a FE of 85% and 40% respectively. [42] using  $\text{FeCl}_3$  at a concentration 10 mM obtained a FE of 87%. With aluminum salts for coagulation [42,43] obtained a similar FE with a concentration of 200 mM  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  and 60 mg/L of aluminum nitrate sulfate respectively

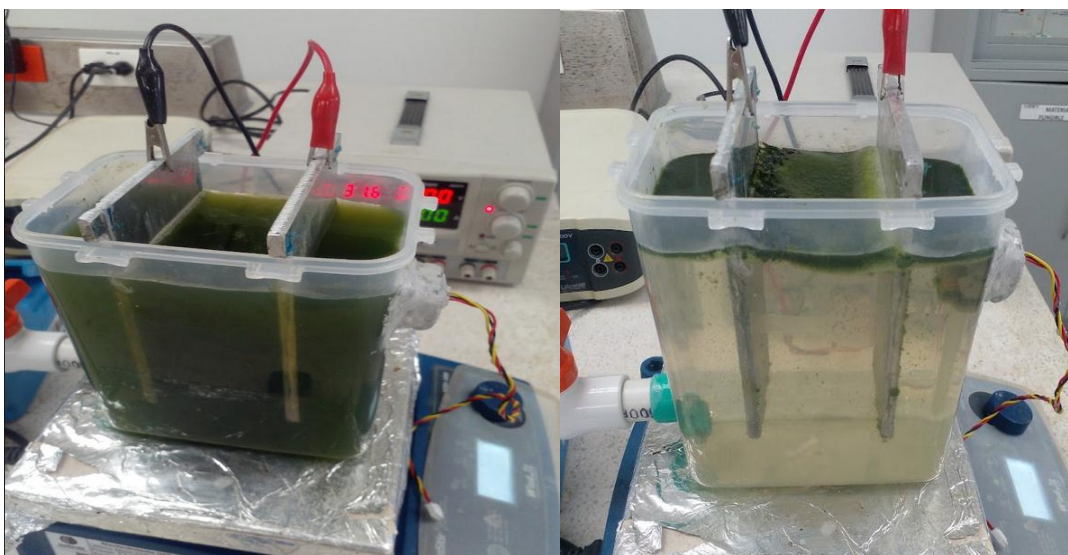
In the present study there does not seem to be a significant difference in the use of either coagulant at the same molar concentration since the FE at each measurement period was

very similar. Keeping neutral the pH of the samples was important to evaluate the sole effect given by the coagulants since the efficiency of the method changes with the pH [42]. A higher pH the ferric ions can precipitate [41] and hydroxoaluminum anions are predominant in the solution [22] decreasing the FE. The use of coagulants seems to be effective for harvesting microalgae cultured in diluted human urine.

### 3.4 Electrocoagulation

In the experiment using the galvanized steel electrodes the FE was 86% whereas for the aluminum electrodes the FE was 92%. A typical assay with aluminum electrodes is shown in Fig. 1.

Whether with iron or aluminum electrodes other studies employing EC have reported FE in the range of 85% to 100% depending on the type of microalgae [25,26,35] and also showed that it is more efficient when using aluminum electrodes instead of iron [26,44]. Since aluminum at the anode generates more ions than iron, therefore neutralizing more charges [45]. In our study the FEs are in the same range and using Al electrodes showed a higher efficiency since the electrolysis time was shorter and the FE higher than using galvanized steel. The impact of the zinc coating to steel and the possible loss of the coating during electrolysis was not evaluated in the study but it is important in further work to evaluate the possible impacts of using different iron electrodes (stainless, mild, galvanized steel, iron) in harvesting microalgae. This method seems adequate for its use in a medium with diluted urine.

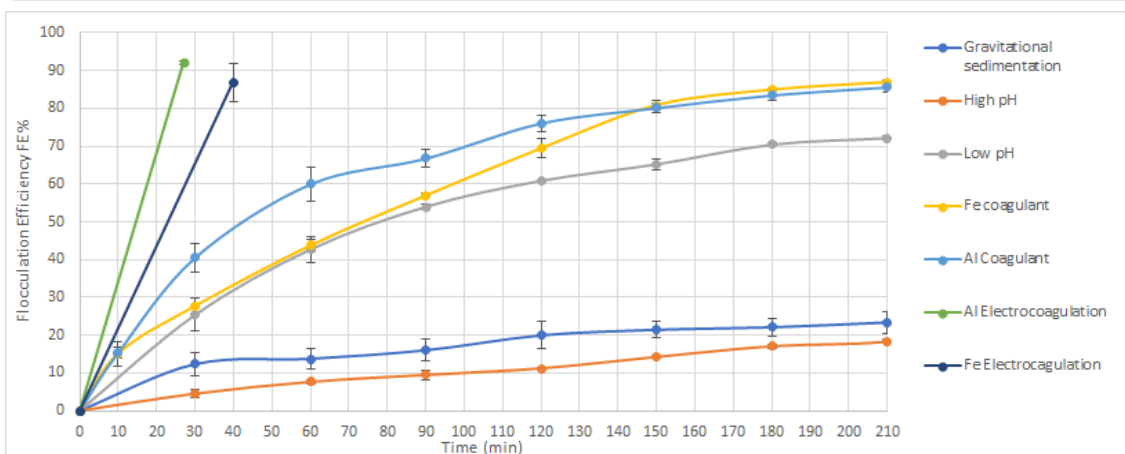
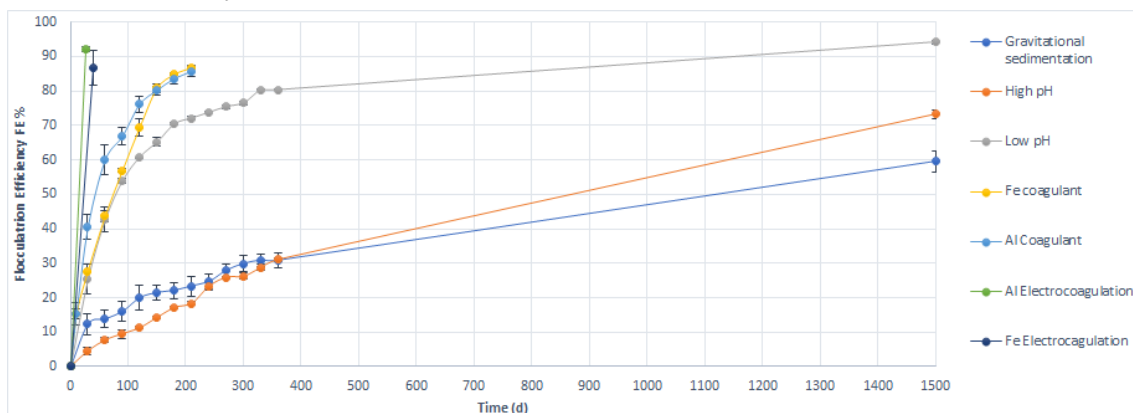


**Figure 1.** Electrocoagulation assay using Al electrodes (a) at  $t=0$  (b) after assay completion.

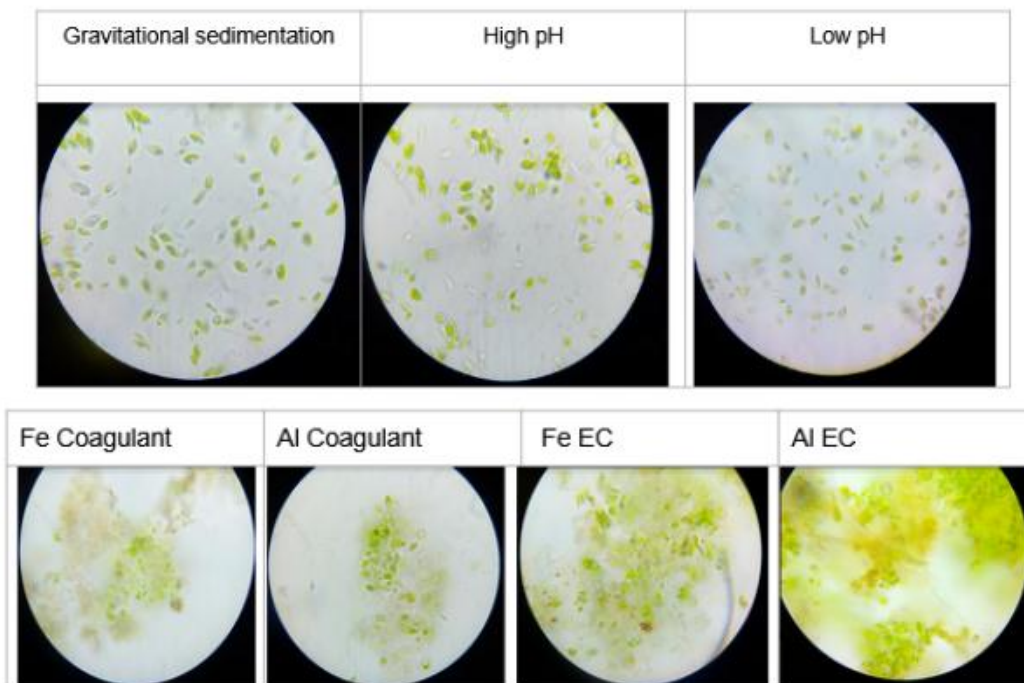
### 3.5. Method comparison

Regarding FE summarized in Fig.2 It can be seen that at a prolonged time ( $t > 1500$  min) all the methods achieved a FE higher than 60%. At 210 min, being the last time that the experiments have in common, only 4 methods (Al and Fe coagulation; Al and Fe EC)

reached a FE higher than 80% and only the EC with aluminum electrodes had a higher FE than 90%. Through an optical microscope (OMAX, USA) the harvested cells were observed. In Fig 3 it is shown that in 3 methods there was low cell aggregation, which was only expected in the GS methods, since in this the driving factor for separation is the density differences of the solid and liquid phases and not substances were added that induced a charge neutralizing and therefore cell agglomeration. In the high pH method, the low aggregation is explained by the medium used since its Ca and Mg concentrations in diluted urine are lower than standard mediums making the sweep mechanism not efficient. The other methods showed the expected result of aggregated cells. In table 1 is summarized the volume of the harvested microalgae and its concentration of each method, showing the added value of the harvesting process since at least 78% of the initial volume is removed and the biomass concentration goes from 729 mg/L to at least 3000 mg/L. Further work is recommended to be done on harvesting equipment to further increase the supernatant volume removal. The chemical substances used in each harvesting method can be toxic and limit the use of the microalgae and the supernatant [34]. In this aspect GS is non-toxic, pH modification has a relatively low toxicity since the added substances can be easily neutralized, adding iron whether by flocculant or electrolysis can be toxic to the cells and limit the reuse of the supernatant [42]. Therefore even though these methods are efficient for its use in microalgae cultured with urine, its use should depend on the application of the harvested cells and the available reuse of the supernatant or its treatment. The use of aluminum has as a major disadvantage its toxicity. Since a high aluminum concentration in body content has been correlated with Parkinson's disease and other nerve and brain disorders [26,29]. Despite its high FE, its use can be limited to specific applications and processes where the aluminum content in effluents is heavily controlled.



**Figure 2.** Flocculation efficiency (FE) of the evaluated harvesting methods (a) FE at the whole duration period (b) FE zoom at the 210 min period.



**Figure 3.** Optical microscope observations at 100x of the microalgae cells gone through the different harvesting methods.

Parameters	Harvesting Method						
	GS	High pH	Low pH	Al Coagulant	FE Coagulant	Al EC	Fe EC
v (L)	0,108	0,062	0,039	0,058	0,057	0,187	0,217
C(mg dry weight/L)	4160	9310	3310	9190	6560	4500	3190
HQ (mg dry weight)	448,356	579,289	128,722	536,083	371,733	840	691,167
SV (%)	89,22	93,78	96,11	94,17	94,33	81,33	78,33

**Table 1.** Harvested microalgae concentration for each method evaluated where v is the harvested microalgae volume, C is the harvested concentration, HQ is the harvested quantity and SV is the supernatant volume percentage compared to the initial sample volume.

#### 4. Conclusions

In this study several harvesting methods were evaluated for mixed consortia of microalgae grown using diluted human urine as nutrient source. Where the electrocoagulation methods using aluminum and galvanized steel electrodes achieved the highest flocculation efficiencies in less than an hour with iron electrodes being more efficient (FE 91.3% process time 20 min), coagulation methods reached similar efficiencies than electrocoagulation methods after 210 min. The pH modulation and gravitational sedimentation methods were not as efficient as the other to flocculate the microalgae and took prolonged times to reach efficiencies in the same range the coagulation or electrocoagulation. Nonetheless the possible hazard risks are low since in the gravitational method no additional components are added to the medium and in the pH modulation methods the additional chemical substances are easily neutralized. The electrocoagulation methods seem promising for harvesting microalgae but it is important to take into account the possible health and environmental risks they have due to the release of the electrode ions into the medium which may limit the application fields of the microalgae harvested by this method.

## 5. References

- [1] W.C. Huang, J.D. Kim, Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass, *Bioresour. Technol.* 149 (2013) 579–581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.095>.
- [2] M. Ghazvini, M. Kavosi, R. Sharma, M. Kim, A review on mechanical-based microalgae harvesting methods for biofuel production, *Biomass Bioenergy.* 158 (2022) 106348. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106348>.
- [3] M.K. Enamala, S. Enamala, M. Chavali, J. Donepudi, R. Yadavalli, B. Kolapalli, T.V. Aradhyula, J. Velpuri, C. Kuppam, Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94 (2018) 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>.
- [4] G.M. Figueroa-Torres, W.M.A. Wan Mahmood, J.K. Pittman, C. Theodoropoulos, Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production, *Biochem. Eng. J.* 153 (2020) 107396. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107396>.
- [5] Z.Y. Yang, F. Gao, J.Z. Liu, J.S. Yang, M. Liu, Y.M. Ge, D.Z. Chen, J.M. Chen, Improving sedimentation and lipid production of microalgae in the photobioreactor using saline wastewater, *Bioresour. Technol.* 347 (2022) 126392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126392>.
- [6] I. Lee, J.I. Han, Development of a pretreatment method based on Fenton-like reaction combined with hydrodynamic cavitation for lipid extraction from wet microalgae, *Renew. Energy.* 175 (2021) 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.04.130>.
- [7] A. Krishna Koyande, V. Tanzil, H. Murrally Dharan, M. Subramaniam, R.N. Robert, P.-L. Lau, I. Khoiroh, P.-L. Show, Integration of osmotic shock assisted liquid biphasic system for protein extraction from microalgae *Chlorella vulgaris*, *Biochem. Eng. J.* 157 (2020) 107532. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107532>.
- [8] X. Xu, H. Zhang, T. Gao, J. Teng, Impacts of applied voltage on forward osmosis process harvesting microalgae: Filtration behaviors and lipid extraction efficiency, *Sci. Total Environ.* 773 (2021) 145678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145678>.

- [9] X. Zou, K. Xu, W. Chang, Y. Qu, Y. Li, Rapid extraction of lipid from wet microalgae biomass by a novel buoyant beads and ultrasound assisted solvent extraction method, *Algal Res.* 58 (2021) 102431. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102431>.
- [10] E.A. Mansour, S.A. Abo El-Enin, A.S. Hamouda, H.M. Mahmoud, Efficacy of extraction techniques and solvent polarity on lipid recovery from domestic wastewater microalgae, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 12 (2019) 100271. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2019.100271>.
- [11] S.S. de Jesus, G.F. Ferreira, L.S. Moreira, M.R. Wolf Maciel, R. Maciel Filho, Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using green solvents, *Renew. Energy.* 143 (2019) 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.168>.
- [12] S. Schade, T. Meier, Techno-economic assessment of microalgae cultivation in a tubular photobioreactor for food in a humid continental climate, *Clean Technol. Environ. Policy.* 23 (2021) 1475–1492. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02042-x>.
- [13] L. Xia, H. Li, S. Song, Cell surface characterization of some oleaginous green algae, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 391–407. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0768-1>.
- [14] D. Vandamme, K. Muylaert, I. Fraeye, I. Foubert, Flocc characteristics of *Chlorella vulgaris*: Influence of flocculation mode and presence of organic matter, *Bioresour. Technol.* 151 (2014) 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.112>.
- [15] N. Krishnamoorthy, Y. Unpaprom, R. Ramaraj, G.P. Maniam, N. Govindan, T. Arunachalam, B. Paramasivan, Recent advances and future prospects of electrochemical processes for microalgae harvesting, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 105875. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105875>.
- [16] A. Ortiz, M.J. García-Galán, J. García, R. Díez-Montero, Optimization and operation of a demonstrative full scale microalgae harvesting unit based on coagulation, flocculation and sedimentation, *Sep. Purif. Technol.* 259 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118171>.
- [17] M. De Francisci, DPodevin, I.A. avide Fotidis, P. Møller, I. Angelidaki, Detailing the start-up and microalgal growth performance of a full-scale photobioreactor operated with bioindustrial wastewater, *Algal Res.* 25 (2017) 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.030>.
- [18] S. Jaatinen, A.-M. Lakaniemi, J. Rintala, Use of diluted urine for cultivation of *Chlorella vulgaris*, *Environ. Technol.* 37 (2016) 1159–1170. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1105300>.
- [19] S.S. Patil, B. Behera, S. Sen, P. Balasubramanian, Performance evaluation of bubble column photobioreactor along with CFD simulations for microalgal cultivation using human urine, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 104615. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104615>.
- [20] B. Behera, S. Patra, P. Balasubramanian, Biological nutrient recovery from human urine by enriching mixed microalgal consortium for biodiesel production, *J. Environ. Manage.* 260 (2020) 110111. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110111>.
- [21] T. Mathimani, N. Mallick, A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel - Key challenges and future directions, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 91 (2018) 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>.
- [22] A.I. Barros, A.L. Gonçalves, M. Simões, J.C.M. Pires, Harvesting techniques applied to microalgae: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41 (2015) 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>.

- [23] A.H.R. Aljuboori, Y. Uemura, N.T. Thanh, Flocculation and mechanism of self-flocculating lipid producer microalga *Scenedesmus quadricauda* for biomass harvesting, *Biomass Bioenergy*. 93 (2016) 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.013>.
- [24] G. Singh, S.K. Patidar, Microalgae harvesting techniques: A review, *J. Environ. Manage.* 217 (2018) 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
- [25] S. Lucakova, I. Branyikova, S. Kovacikova, M. Pivokonsky, M. Filipenska, T. Branyik, M.C. Ruzicka, Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae, *Bioresour. Technol.* 323 (2021) 124606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124606>.
- [26] F. Baierle, D.K. John, M.P. Souza, T.R. Bjerk, M.S.A. Moraes, M. Hoeltz, A.L.B. Rohlfes, M.E. Camargo, V.A. Corbellini, R.C.S. Schneider, Biomass from microalgae separation by electroflotation with iron and aluminum spiral electrodes, *Chem. Eng. J.* 267 (2015) 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.031>.
- [27] M. Castrillo, L.M. Lucas-Salas, C. Rodríguez-Gil, D. Martínez, High pH-induced flocculation-sedimentation and effect of supernatant reuse on growth rate and lipid productivity of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 128 (2013) 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.114>.
- [28] L. Semerjian, G.M. Ayoub, High-pH–magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment, *Adv. Environ. Res.* 7 (2003) 389–403. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00009-6).
- [29] S. Visigalli, M.G. Barberis, A. Turolla, R. Canziani, M. Berden Zimec, R. Reinhardt, E. Ficara, Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting – A review, *Sep. Purif. Technol.* 271 (2021) 118684. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118684>.
- [30] J. Wu, J. Liu, L. Lin, C. Zhang, A. Li, Y. Zhu, Y. Zhang, Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.094>.
- [31] R. Alam, J.Q. Shang, Electrochemical model of electro-flotation, *J. Water Process Eng.* 12 (2016) 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.06.009>.
- [32] V. Pôjo, T. Tavares, F.X. Malcata, Processing Methodologies of Wet Microalga Biomass Toward Oil Separation: An Overview, *Molecules*. 26 (2021) 641. <https://doi.org/10.3390/molecules26030641>.
- [33] M.A. Borowitzka, J. Beardall, J.A. Raven, eds., *The Physiology of Microalgae*, Springer International Publishing, Cham, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2>.
- [34] M.A. hattab, Microalgae Harvesting Methods for Industrial Production of Biodiesel: Critical Review and Comparative Analysis, *J. Fundam. Renew. Energy Appl.* 05 (2015). <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000154>.
- [35] N. Uduman, V. Bourniquel, M.K. Danquah, A.F.A. Hoadley, A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production, *Chem. Eng. J.* 174 (2011) 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.012>.
- [36] M.J. Griffiths, R.P. van Hille, S.T.L. Harrison, Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 989–1001. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9723-y>.
- [37] M. Mubarak, A. Shaija, T.V. Suchithra, Flocculation: An effective way to harvest

- microalgae for biodiesel production, *J. Environ. Chem. Eng.* 7 (2019) 103221. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103221>.
- [38] N. Sarigul, F. Korkmaz, İ. Kurultak, A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine, *Sci. Rep.* 9 (2019) 20159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4>.
- [39] S. Bai, B. Xi, X. Li, Y. Wang, J. Yang, S. Li, X. Zhao, Anaerobic digestion of chicken manure: Sequences of chemical structures in dissolved organic matter and its effect on acetic acid production, *J. Environ. Manage.* 296 (2021) 113245. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113245>.
- [40] R. Wang, N. Lv, C. Li, G. Cai, X. Pan, Y. Li, G. Zhu, Novel strategy for enhancing acetic and formic acids generation in acidogenesis of anaerobic digestion via targeted adjusting environmental niches, *Water Res.* 193 (2021) 116896. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116896>.
- [41] D.Y. Kim, Y.K. Oh, J.Y. Park, B. Kim, S.A. Choi, J.I. Han, An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions, *Bioresour. Technol.* 191 (2015) 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.020>.
- [42] S.B. Ummalyma, A.K. Mathew, A. Pandey, R.K. Sukumaran, Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation, *Bioresour. Technol.* 213 (2016) 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.114>.
- [43] V.M. Rwehumbiza, R. Harrison, L. Thomsen, Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling, *Chem. Eng. J.* 200–202 (2012) 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.008>.
- [44] S. Gao, J. Yang, J. Tian, F. Ma, G. Tu, M. Du, Electro-coagulation–flotation process for algae removal, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.037>.
- [45] P. Rafiee, S. Ebrahimi, M. Hosseini, Y.W. Tong, Characterization of Soluble Algal Products (SAPs) after electrocoagulation of a mixed algal culture, *Biotechnol. Rep.* 25 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00433>.