

**EFFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN
BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp***

**NELSON OSVALDO MENA LÓPEZ
MANUEL ALEJANDRO ORTEGÓN DÍAZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**EFFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN
BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp***

**NELSON OSVALDO MENA LÓPEZ
MANUEL ALEJANDRO ORTEGÓN DÍAZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingeniero Químico**

**Director
CRISÓSTOMO BARAJAS-FERREIRA
Ingeniero Químico M. Sc**

**Codirectores
ANA MARÍA ARDILA ÁLVAREZ
Ing. Química**

**ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

M SC. CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA por su dirección en este proyecto y darnos la oportunidad de desarrollar nuestro trabajo de grado.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS SOLANO por su guía y contribución en la investigación y finalización del trabajo de grado.

INGENIERA ANA MARÍA ARDILA ÁLVAREZ por la Colaboración prestada.

INGENIERO GUILLERMO ACERO encargado de los laboratorios de Ingeniería Química, por su atención y asistencia.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO Técnicos del laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su ayuda y enseñanza en el manejo de equipos e implementos necesarios para el desarrollo de la experimentación realizada.

A la Universidad Industrial de Santander, alma mater en nuestra formación intelectual y científica.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. METODOLOGÍA.....	15
1.1 Métodos de cultivo	15
1.2 Diseño experimental.....	15
1.3 Determinación de las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH.....	16
1.4 Etapa de floculación para el diseño experimental	17
1.5 Experimentación para las mejores condiciones de floculación	18
1.6 Influencia de la cantidad de metales y otros químicos presentes en la floculación.....	19
1.7 Extracción de Lípidos.....	19
2. RESULTADOS.....	21
2.1 <i>Chlorella vulgaris</i>.....	21
2.2.1 Adición de AlCl₃-ajuste de pH.....	21
2.1.2 Desarrollo de la floculación para el diseño experimental	24
2.1.3 Análisis estadístico	27
2.1.4 Evaluación de la floculación para las mejores condiciones a diferentes volúmenes de muestra	28
2.1.5 Metales e hidróxidos presentes en la floculación.....	29
2.1.6 Extracción de lípidos	30
2.1.7 Caracterización del extracto lipídico.....	31
2.2. <i>Nannochloropsis sp.</i>.....	33
2.2.1 Adición de floculante-ajuste de pH	33
2.2.2 Desarrollo de la floculación para el diseño experimental	35
3. CONCLUSIONES	43
4. RECOMENDACIONES.....	44
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental.....	16
Tabla 2. Eficiencia al finalizar la floculación para ambos métodos.....	23
Tabla 3. Eficiencia de la floculación y pH al finalizar el proceso.....	24
Tabla 4. Eficiencia de floculación y cantidad de biomasa recuperada para distintos volúmenes de muestra.....	29
Tabla 5. Porcentaje de cenizas presentes en las muestras a volúmenes variados.	30
Tabla 6. Cuantificación de metil ésteres de ácidos grasos.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento de floculación para el diseño experimental.	18
Figura 2. Proceso de extracción de lípidos.	20
Figura 3. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.....	21
Figura 4. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.	22
Figura 5. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.	23
Figura 6. Comportamiento de <i>C. vulgaris</i> en la etapa de floculación para el diseño experimental. 1.63 días (A); 5 días (B); 10 días (C); 15 días (D); 18.36 días (E)...	26
Figura 7. Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada.	27
Figura 8. Superficie de respuesta para la biomasa recuperada; pH vs Tiempo de cultivo.....	28
Figura 9. Comparación en la eficiencia de floculación a diferentes volúmenes. ...	29
Figura 10. Comparación del porcentaje de extracto lipídico en biomasa floculada y biomasa centrifugada.....	31
Figura 11. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.	33
Figura 12. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.	34
Figura 13. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.	35
Figura 14. Proceso de floculación para <i>Nannochloropsis</i> sp., de acuerdo al diseño experimental. 10 días de cultivo (A); 15 días de cultivo (B); 18.36 días de cultivo (C).....	36
Figura 15. Muestras de control para el diseño experimental. 10 días de cultivo (A); 15 días de cultivo (B); 18.36 días de Cultivo (C).	41

RESUMEN

TÍTULO: EFECTO DE LA FLOCULACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN BIOMASA DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y *Nannochloropsis sp**

AUTORES: NELSON OSVALDO MENA LÓPEZ, MANUEL ALEJANDRO ORTEGÓN DÍAZ**

PALABRAS CLAVE: Microalga, $AlCl_3$, pH, Sedimentación, Eficiencia, Extracción de lípidos.

Las microalgas son consideradas como un recurso de alto valor para biocombustibles, sin embargo para la extracción de lípidos es necesario recolectar la biomasa, para lo cual se deben implementar nuevas tecnologías que puedan reducir el costo energético requerido, siendo la floculación el método preferido para este proceso.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la floculación en la extracción de lípidos en las especies *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp*.

En este estudio se realizó un diseño de experimentos 3^3 con el software STATISTICA 7.0 evaluando la cantidad de floculante ($AlCl_3$), pH y tiempo de cultivo; se evaluó el mejor método de incorporación de floculante-ajuste de pH y finalmente se procedió a la extracción de lípidos. Para *Chlorella vulgaris* el ajuste de pH después de adicionar floculante logró mejores eficiencias de floculación (87.2-98.9%), en comparación al procedimiento inverso (67.8-85.9 %). Con el mejor método hallado se llevó a cabo el desarrollo del diseño experimental. La mejor eficiencia de floculación fue 99.7% con 100mg/L de $AlCl_3$, pH 7 y a mayor tiempo de cultivo; este resultado fue fácilmente escalable y se reportó un 2.7% de extracto lipídico. La producción de metil ésteres de ácidos grasos no se vio afectada por el uso de $AlCl_3$. Para *Nannochloropsis sp* también se encontró mejor eficiencia ajustando el pH después de adicionar el floculante, pero al desarrollar el diseño experimental el cultivo presentó sedimentación espontánea, por lo tanto no requirió el uso de floculante para la recolección de biomasa.

*Proyecto de grado

**Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: M. Sc Crisóstomo Barajas-Ferreira. Codirectores: Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano, Ing. Química. Ana María Ardila Álvarez

ABSTRACT

TITLE: FLOCCULATION EFFECT OF LIPID EXTRACTION IN BIOMASS *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 and *Nannochloropsis sp* *

AUTHORS: NELSON OSVALDO MENA LÓPEZ, MANUEL ALEJANDRO ORTEGÓN DÍAZ**

KEYWORDS: Microalgae, AlCl_3 , pH, Sedimentation, Efficiency, Lipid extraction.

Microalgae are considered a valuable source for biofuels. However, for the lipid extraction is necessary to harvest biomass. For which, the use of new technologies must be implemented to reduce the required energy cost, being the flocculation the preferred method for this process. The aim of this research is to evaluate the flocculation effect of lipid extraction in *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp*. In this research was a 3^3 experimental design with STATISTICA 7.0 software to evaluate the amount of flocculant (AlCl_3), pH and time of culture growth. The best method of addition of flocculant-pH adjustment was evaluated and lipid extraction was finally developed. With *Chlorella vulgaris* pH adjustment after adding flocculant achieves the best flocculation efficiency (87.2-98.9%) compared to the inverse method (67.8-85.9 %). Development of experimental design was implementing by the best method. The best flocculant efficiency was 99.7% with 100mg/L of AlCl_3 , pH 7 and longest time of culture growth. The result was easily scalable achieving 2.7% of lipid extract. AlCl_3 wasn't affect to the fatty acid methyl esters production. *Nannochloropsis sp* had best efficiency adjusting pH after adding flocculant but in the development of experimental design, the culture sedimented spontaneously hence, the flocculant was not necessary to biomass harvesting.

*Graduation Project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: M. Sc Crisóstomo Barajas-Ferreira. Co-directors: Bio. Andrés Fernando Barajas Solano, Ing. Ana María Ardila Álvarez

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son una fuente atractiva y alternativa de metabolitos como lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos y vitaminas, por lo cual se considera como un recurso valioso para la industria farmacéutica, alimentaria [1,2] y también para la producción de biocombustibles como metano, biohidrógeno y biodiesel [3,4]. Según Chisti [4] las microalgas poseen la capacidad de producir más lípidos que la mayoría de plantas oleaginosas y debido a su alta eficiencia pueden llegar a suplir la demanda mundial de biodiesel; sin embargo, para llevar a cabo la producción de biodiesel a partir de microalgas primero se necesita recuperar la biomasa del medio de cultivo, para lo cual existen varias tecnologías como la centrifugación [5], filtración [6], flotación [7] y floculación [8].

Uno de los puntos cruciales es la reducción en el consumo energético de los diferentes procesos para la obtención sostenible de los diferentes subproductos [9], para el caso de la concentración de biomasa la floculación es la opción preferida, ya que permite: a) la recolección de biomasa en grandes cantidades y a bajo costo [2]; b) es fácilmente escalable y se puede usar para una gran variedad de especies de microalga. La floculación actúa en la agregación de células en suspensión a partículas más grandes, cuando el floculante interactúa con la carga de superficie de las células neutralizándolas logrando la desestabilización de las células, facilitando su sedimentación [10]. Los floculantes empleados pueden ser inorgánicos como las sales de aluminio y cloruro férrico, que son relativamente baratos, eficientes y pueden usarse para la recuperación a grandes volúmenes de cultivo, aunque estas sales pueden contaminar la biomasa con metales reduciendo así la calidad de la extracción de los metabolitos [11]. También existen floculantes orgánicos como los poliméricos, que son biodegradables pero costosos [10-12]. La floculación también puede darse de manera espontánea debido a un aumento de pH en el medio produciendo aglomeración celular, o por sustancias poliméricas extracelulares presentes en el medio, aunque el mecanismo de este último actualmente es escasamente comprendido [8].

Se ha demostrado que la floculación por sales metálicas, puede llevarse a cabo bajo

condiciones ácidas o alcalinas [13]. Wu *et al.* [14] Evaluaron la floculación inducida por aumento de pH en tres especies de microalga de agua dulce y dos especies marinas, logrando una eficiencia superior al 90% en concentraciones medias y bajas de biomasa; esto puede ser explicado debido a que en condiciones alcalinas, cationes de sales de magnesio presentes en el medio forman hidróxido de Magnesio precipitado, el cual atrapa las células y facilita la sedimentación. Este fenómeno es conocido como floculación de barrido [14,15]. En pH ácidos es preferible el uso de sales metálicas de hierro o aluminio y según Adunan *et al.* [10] el pH óptimo de floculación con aluminio para las microalgas oscila entre 5.3 y 5.6; además la efectividad de sedimentación con este tipo de coagulantes depende de la concentración de biomasa inicial y dosis de floculante [13].

Uno de los mayores inconvenientes del uso de estas sales, es que requieren de altas concentraciones para llevar a cabo una floculación efectiva [16] y debido a su toxicidad que genera riesgo de contaminación, pueden afectar la calidad de los lípidos extraídos. Rwehumbiza *et al.* [17] evaluaron los efectos del aluminio como floculante para la especie *Nannochloropsis salina* y su efecto en la extracción de lípidos y metil ésteres de ácidos grasos para la producción de biodiesel, obteniendo eficiencias entre 79-99%, además demostraron que con el aumento en la concentración biomasa floculada se observa un decrecimiento exponencial del aluminio por peso de biomasa. Después de la extracción y conversión de lípidos a biodiesel, con una concentración de biomasa inicial de 20 g/L, se determinó que la concentración de aluminio es indetectable y que para concentraciones menores de biomasa inicial, decrece de dos a tres veces.

Debido a que factores como el pH, la concentración de biomasa, el tipo y la cantidad de floculante empleado influyen en la eficiencia de la floculación de las microalgas y en la extracción [13,14, 18], el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la floculación con sal metálica $AlCl_3$ en la producción de lípidos para la especie de agua dulce *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 y la especie marina *Nannochloropsis sp*; también se evaluó el escalamiento de estos efectos en el cultivo.

1. METODOLOGÍA

1.1 Métodos de cultivo

Chlorella vulgaris UTEX 1803 fue adquirida de la colección de cepas la Universidad de Texas (Texas, USA); *Nannochloropsis sp.*, fue aislada del Golfo de Morrosquillo (Sucre-Córdoba, Colombia).

Las cepas se cultivaron en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L es: NaNO₃ (2,94), MgSO₄.7H₂O (3,04 X 10⁻¹) NaCl (4,28 X 10⁻¹), K₂HPO₄ (4,31 X 10⁻¹), KH₂PO₄ (1,29), CaCl₂.2H₂O (1,70 X 10⁻¹) y micronutrientes (mg/L) ZnSO₄.7H₂O (3,07 X 10⁻²), MnCl₂.4H₂O (7,28 X 10⁻³), MoO₃ (4,93 X 10⁻³), CuSO₄.5H₂O (6,29 X 10⁻³), Co (NO₃)₂.6H₂O (1,68 X 10⁻³), H₃BO₃ (1,85 X 10⁻¹), EDTA (1,71 X 10⁻¹), KOH (5,53 X 10⁻¹), FeSO₄.7H₂O (1,79 X 10⁻²).

Las microalgas se mantuvieron en crecimiento en reactores de vidrio de 12 Litros. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire y ciclo luz-oscuridad 12:12 h.

1.2 Diseño experimental

Para el diseño experimental se tomó como referencia los datos de Garzón-Sanabria *et al.* [13], y se realizó con el programa STATISTICA 7.0., basado en una composición central, factorial 3³ de 17 experimentos (Tabla 1). Este fue realizado para evaluar el efecto de la variables de tiempo de cultivo (5, 10 y 15 días), pH (4, 7 y 10) y concentración de floculante (50, 100 y 150 mg/L).

Tabla 1. Diseño experimental

Prueba	Tiempo Cultivo (días)	Dosis de floculante (mg/L)	pH
1	1,63	100	7
2	5	50	4
3	5	50	10
4	5	150	4
5	5	150	10
6	10	16,3	7
7	10	100	1,9
8	10	100	7
9	10	100	7
10	10	100	7
11	10	100	12,02
12	10	183,6	7
13	15	50	4
14	15	50	10
15	15	100	4
16	15	100	10
17	18,3	100	7

1.3 Determinación de las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH

Debido a que el pH afecta a la floculación [15], se realizó una experimentación preliminar para determinar si las mejores condiciones de floculación se dan al

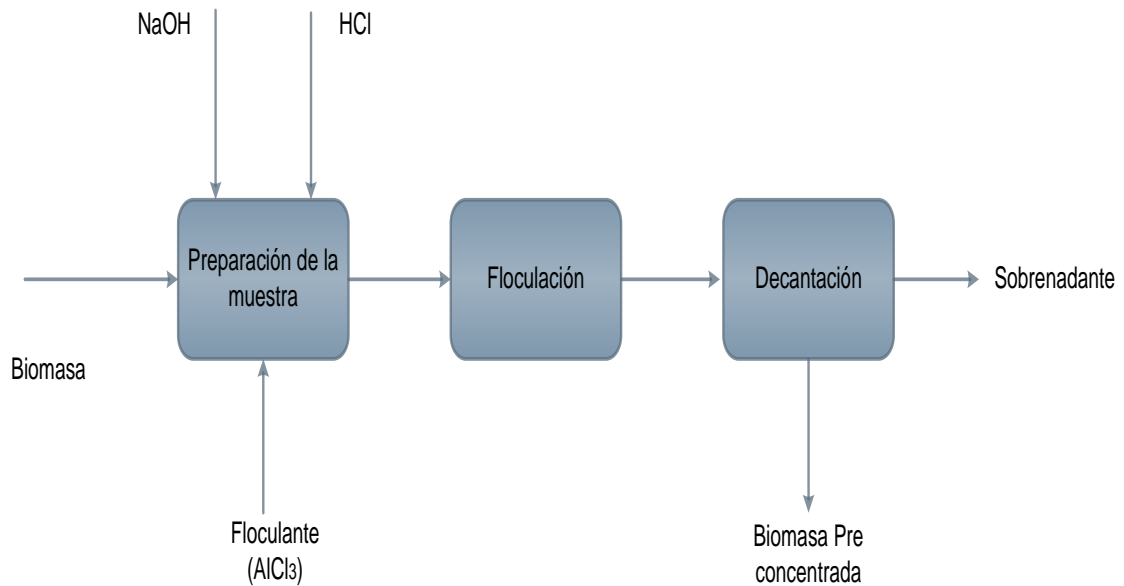
estabilizar el pH antes o después de agregar el floculante. Se utilizó como agente floculante una solución de 40g/L de cloruro de aluminio (AlCl_3) y se adiciono alícuotas de 50, 100 y 150mg/L a muestras de 100 mL, cada una con tres réplicas. El pH se ajustó a 4, 7 y 10 con HCl 1M y NaOH 1M. La experimentación se realizó tanto para la adición de floculante antes del ajuste de pH, como para la adición después del ajuste.

Se mezclaron las muestras con agitación magnética durante 2 minutos a 500 rpm seguido por un mezclado más lento durante 15 minutos a 60 rpm, para asegurar la hidrólisis del floculante y formación de agregados [14,17]. Terminada la etapa anterior, se midió el pH y se tomaron muestras de 10mL para medir densidad óptica en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300, Merck) a 500nm para *C. vulgaris* y a 750nm para *Nannochloropsis sp* en intervalos de 1 hora durante un tiempo de 5 horas.

1.4 Etapa de floculación para el diseño experimental

Para el desarrollo del diseño, se cultivaron microalgas con un inóculo de 1 g/L y 2.5 g/L de biomasa húmeda para *C. vulgaris* y *Nannochloropsis sp* respectivamente. La experimentación se llevó a cabo con las condiciones del diseño experimental. La adición de floculante, ajuste de pH, agitación de las muestras y las mediciones de absorbancia y pH, se desarrollaron de acuerdo al mejor método hallado en los experimentos previos; además se midió la concentración en peso seco con cada medición de densidad óptica para corroborar la linealidad entre ambas [19].

Figura 1. Procedimiento de floculación para el diseño experimental.



Para determinar la eficiencia de la floculación se utiliza la siguiente fórmula:

$$Eficiencia (\%) = \left(1 - \frac{Absorbancia\ final}{Absorbancia\ inicial}\right) \times 100$$

La concentración de biomasa recuperada se determina por el balance:

$$Biomasa\ recuperada\ (g/L) = biomasa\ inicial - biomasa\ final$$

1.5 Experimentación para las mejores condiciones de floculación

Determinadas las mejores condiciones de floculación halladas mediante el desarrollo del diseño experimental, se evaluó el escalamiento del proceso en volúmenes de cultivo de 100, 250, 500 y 1000mL. Al volumen de 1000mL se le separó la biomasa floculada del sobrenadante por medio de decantación para llevarla al proceso de extracción de lípidos.

1.6 Influencia de la cantidad de metales y otros químicos presentes en la floculación

Ya que se requirió el uso de floculante y otros compuestos para ajustar el pH los cuales contienen hidróxidos, sales metálicas, y otros componentes químicos, se realizó el procedimiento de cenizas para determinar la influencia de los mismos en el proceso. Para el procedimiento primero se pesaron crisoles vacíos, luego se tomaron muestras de sobrenadante y de biomasa floculada para depositarlas en los crisoles y pesarlos nuevamente; también se tomaron muestras de control con biomasa y sobrenadante sin floculante. Las muestras se llevaron al horno por 24 horas a 105°C y luego a un horno mufla (TERRIGENO) para la obtención de cenizas; en este procedimiento primero se dejó calentar las muestras a 105 °C por 12 minutos, luego a 250°C por 30 minutos y por último a 575 °C por 180 minutos. Finalmente las cenizas se pesaron y se realizó el correspondiente balance:

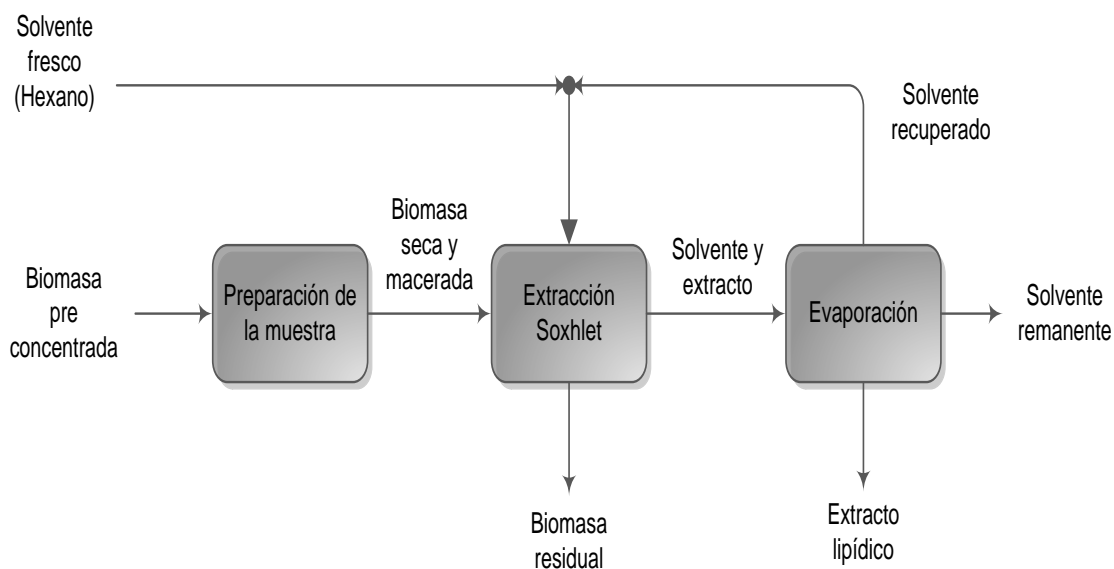
$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(Masa \text{ del Crisol} + Masa \text{ de cenizas}) - (Masa \text{ del Crisol})}{Masa \text{ de muestra inicial}} * 100$$

1.7 Extracción de Lípidos

Para la determinación del contenido lipídico, se usó la técnica de extracción sólido líquido o Soxhlet [20]. El equipo de extracción, consta de un matraz, un tubo Soxhlet y un condensador. El proceso se realizó para una muestra original y una réplica, la biomasa recuperada por floculación se llevó al horno durante 24 horas y a 105°C para su secado. La biomasa ya seca fue macerada, pesada y envuelta en un cartucho de papel filtro e introducida al tubo Soxhlet. El matraz vacío fue pesado y llenado con 250 mL de n-Hexano como solvente y fue montado en una manta de calentamiento (ELECTROTHERMAL) junto con el tubo Soxhlet y el condensador. El tiempo total del proceso fue de 16 horas regulando el flujo de agua utilizada y manteniendo la temperatura a 69°C. Una vez terminado, el matraz que contenía una mezcla de extracto lipídico y solvente se llevó a un proceso de evaporación para recuperar el solvente y concentrar el extracto en el matraz. El matraz con el

extracto lipídico fue pesado y posteriormente; este contenido se retiró del matraz y se guardó en recipientes herméticamente sellados para su posterior caracterización.

Figura 2. Proceso de extracción de lípidos.



Para determinar el porcentaje de extracto lipídico se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Extracto lipídico \%} = \frac{\text{Masa final del matraz} - \text{masa inicial del matraz}}{\text{masa inicial de la muestra}} * 100$$

El proceso también se realizó con biomasa sin floculante pre-concentrada por centrifugación (UNIVERSAL 320 R) a 3400 rpm durante 15 minutos. La extracción se realizó con el mismo procedimiento descrito para las muestras con floculante.

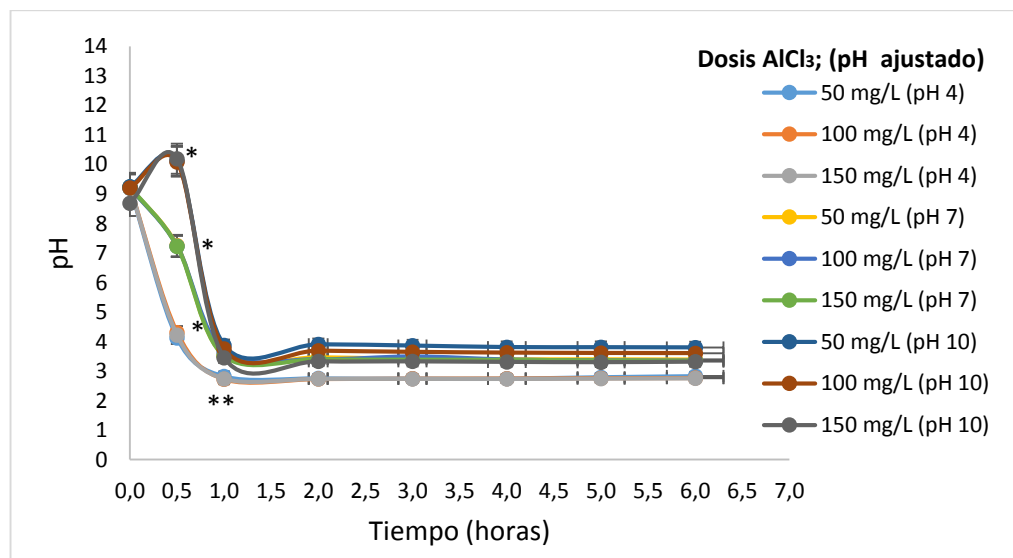
2. RESULTADOS

2.1 *Chlorella vulgaris*

2.2.1 Adición de AlCl_3 -ajuste de pH

En el procedimiento en el cual primero se fijó el pH (Figura 3) evidencia que en el momento de incorporar el floculante las muestras se acidifican debido a una fuerte formación de hidróxidos de aluminio de especie catiónica que son generados en medios ácidos; a medida en que aumenta el pH se producen hidróxidos menos cargados positivamente [21], por eso el AlCl_3 reduce un poco menos el pH en las muestras que fueron fijadas a valores más alcalinos. Las muestras no presentaron variaciones importantes de pH después de la primera hora, cuando que se dejó iniciar el proceso de floculación.

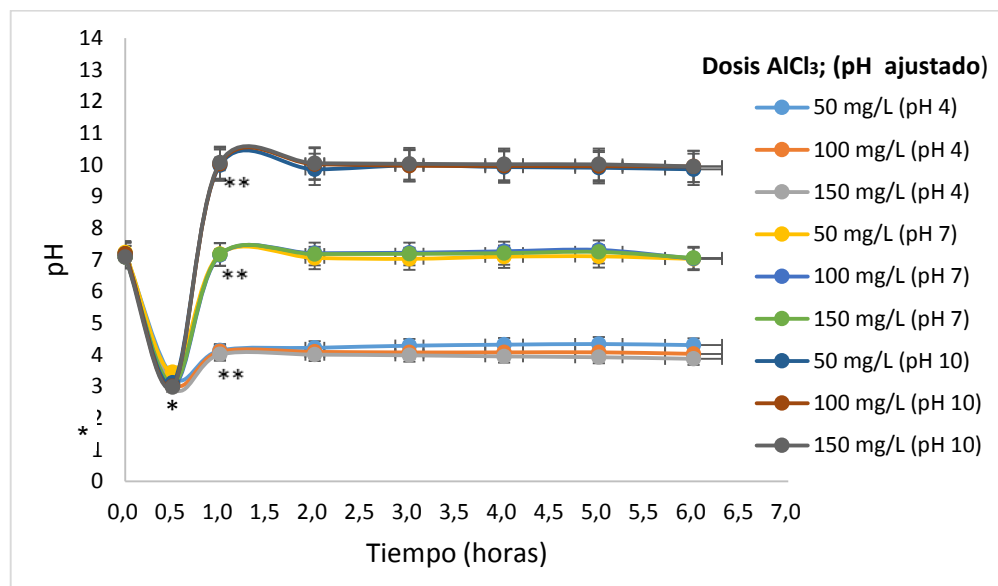
Figura 3. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.



* Ajuste de pH; * * Adición de AlCl_3 .

Como muestra la Figura 4, primero se adicionó el floculante, que disminuyó el pH en proporciones iguales en todas las muestras debido a que el pH inicial era el mismo para todo el muestreo; luego se ajustó el pH a las condiciones establecidas para dar inicio a la floculación y no hubo cambios significativos durante el transcurso del proceso.

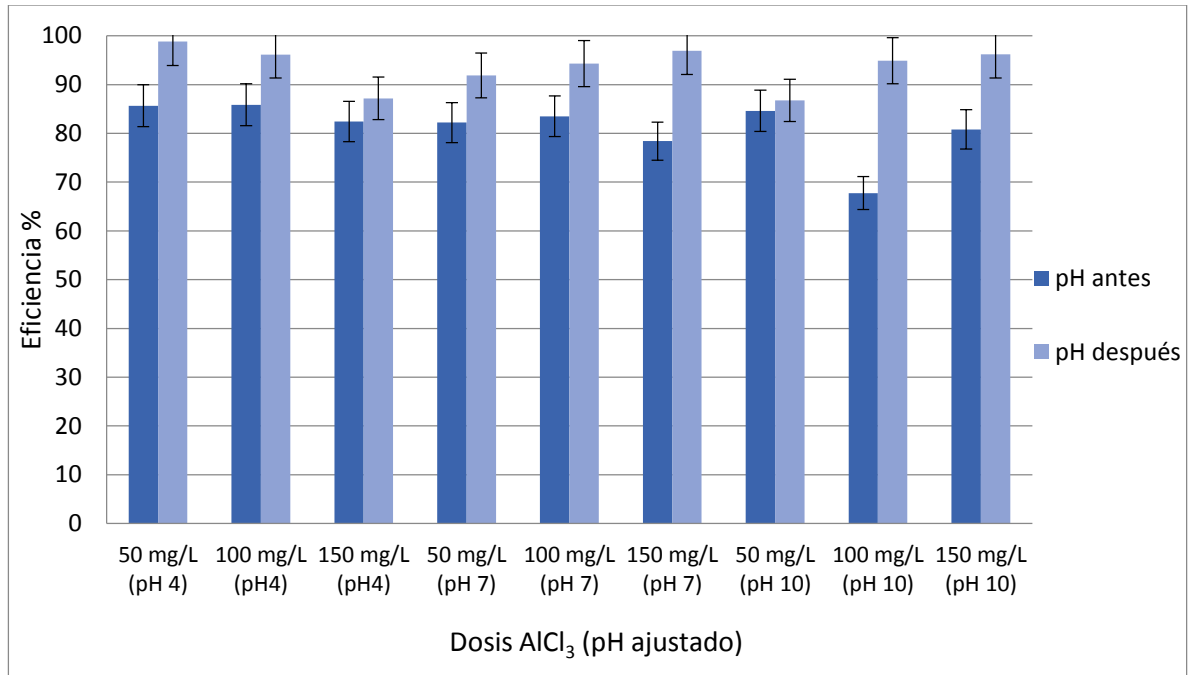
Figura 4. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.



* Adición de AlCl₃; ** Ajuste de pH.

En ambos métodos se ve que sin importar que valor tenga el pH al momento de empezar la floculación, siempre permanecerá estable. El mejor método entonces, fue determinado por la mejor eficiencia de floculación. La Figura 5, muestra que la recuperación de biomasa es más efectiva si primero se incorpora el floculante y luego se ajusta el pH en todos los experimentos. Actualmente no se ha reportado ninguna otra investigación de este tipo ya que convencionalmente el pH se ajusta antes de adicionar el floculante.

Figura 5. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.



Para las pruebas en las que se ajusta el pH después, se evidencia (Tabla 2) que se obtienen eficiencias desde un 87,2 % hasta un 98,9 %, y para el ajuste del pH antes, se reportaron valores en el rango del 67,8%, hasta 85,9 %, por lo tanto el diseño de experimentos se realizó acondicionando el pH después, dadas sus eficiencias más altas.

Tabla 2. Eficiencia al finalizar la floculación para ambos métodos.

	pH 4			pH 7			pH10		
AlCl ₃ (mg/L)	50	100	150	50	100	150	50	100	150
Eficiencia % (pH antes)	85,7	85,9	82,4	82,2	83,5	78,4	84,6	67,8	80,8
Eficiencia % (pH después)	98,9	96,2	87,2	91,9	94,3	96,9	86,8	94,9	96,2

2.1.2 Desarrollo de la floculación para el diseño experimental

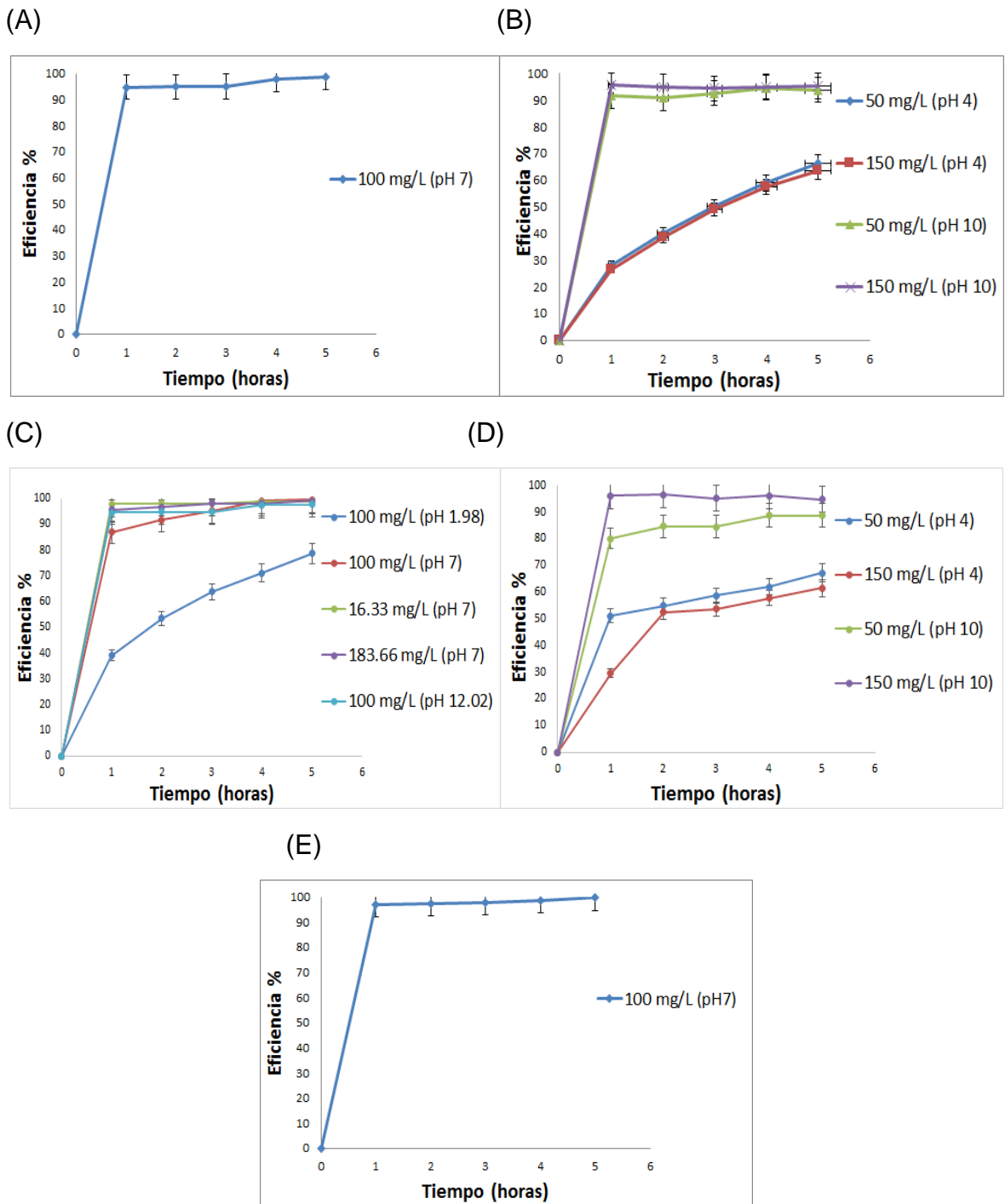
Con el diseño planteado, se lograron varios experimentos con eficiencias por encima del 95%; según los datos encontrados (Tabla 3), los resultados más relevantes son la prueba 8 con una recuperación del 99,5%, y la prueba 17 con un 99,7% de eficiencia; ya que las condiciones de pH y concentración de floculante fijadas inicialmente son las mismas para ambas, se tomó como mejor la prueba 17 debido a tener mejor floculación. Para todas las pruebas el valor de pH al finalizar el proceso permaneció casi constante con respecto al pH fijado al inicio de la floculación.

Tabla 3. Eficiencia de la floculación y pH al finalizar el proceso.

prueba	Tiempo de cultivo (días)	AlCl ₃ (mg/L)	pH	Eficiencia (%)
1	1,63	100	7,5	98,6
2	5	50	4,1	66,2
3		50	4,0	63,3
4		150	9,7	93,8
5		150	9,9	95,2
6		16,3	7,4	98,9
7	10	100	2,0	78,6
8		100	6,6	99,5
9		100	6,6	99,5
10		100	6,6	99,5
11		100	11,8	97,7
12		183,6	7,2	99,1
13		15	50	4,3
14	50		4,2	61,4
15	100		9,5	88,8
16	100		9,8	94,7
17	18,3		100	7,5

Las pruebas realizadas muestran una mayor eficiencia en los pH neutros y básicos (Tabla 3). En los experimentos con pH 7 (Figura 6; (A), (C), (E)), los altos valores de eficiencia se deben a que en este caso la floculación se da por neutralización de cargas y también por una rápida formación de hidróxidos precipitados [22]. En los pH alcalinos (Figura 6; (B), (C), (D)), se da una alta remoción de células debido a que el uso de base para el ajuste de pH a estos valores, forma hidróxidos polinucleares de aluminio, que son producto de la neutralización de la sal de aluminio y que reducen las cargas positivas de las partículas coloidales de hidróxido que puedan estar presentes, lo que contribuye a la formación de hidróxidos precipitados [21]. Este planteamiento es consistente con la experimentación realizada por Ohman & Wagberg. [23] para la neutralización de aluminio adicionando base, cuyas pruebas evidenciaron que por este método los sólidos sedimentables se forman a pH 7 y a valores más altos. También hay que tener en cuenta los estudios realizados por Henderson *et al.* [22] quienes demostraron que no se necesita la neutralización de cargas para obtener eficiencias por encima del 90%, por lo tanto la sedimentación se desarrolla principalmente por floculación de barrido; estas pruebas también se realizaron utilizando aluminio como coagulante para *C. vulgaris*. La eficiencia se ve disminuida en los pH ácidos (Figura 6; (B), (C), (D)), debido a que se encuentran muy por debajo del valor donde las cargas son cero y probablemente tampoco se encuentran a un valor de carga en donde la desestabilización de las células sea suficiente para dar altos valores de eficiencia.

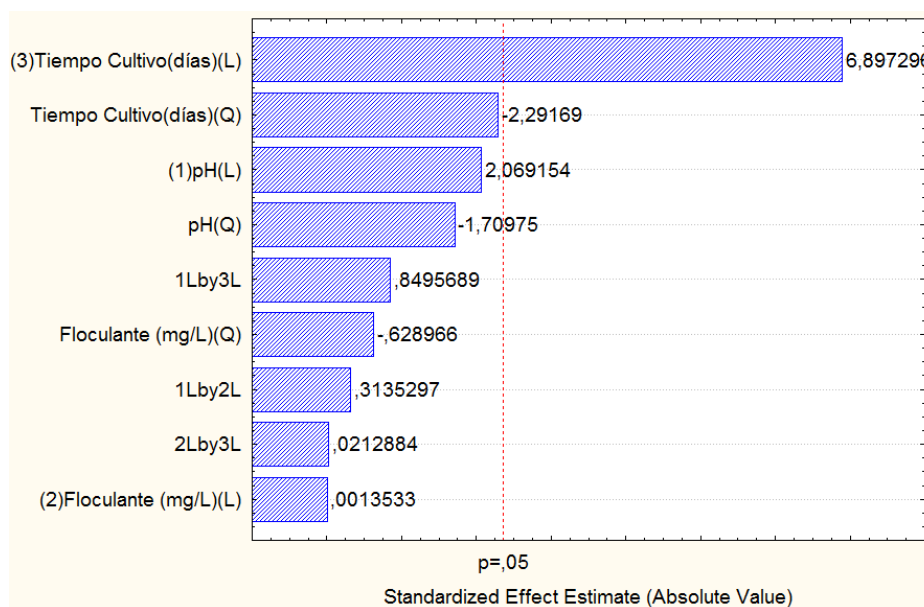
Figura 6. Comportamiento de *C. vulgaris* en la etapa de floculación para el diseño experimental. 1.63 días (A); 5 días (B); 10 días (C); 15 días (D); 18.36 días (E).



2.1.3 Análisis estadístico

Para poder ver la influencia de todas las variables evaluadas en el diseño experimental para la obtención de la mayor cantidad de biomasa recuperada, se desarrolló el diagrama de Pareto presentado en la Figura 7.

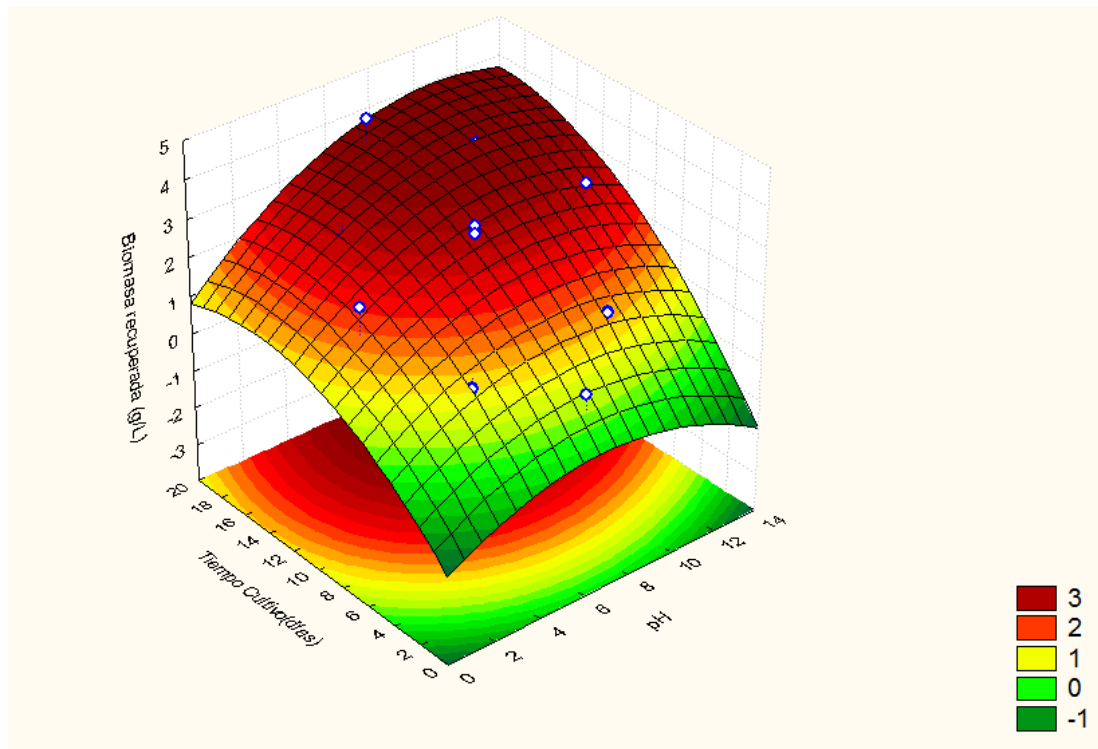
Figura 7. Diagrama de Pareto para la biomasa recuperada.



Según los resultados, la variable más significativa es el tiempo de cultivo, y con esto se deduce que la concentración de biomasa inicial es el factor más importante que influye en la cantidad de biomasa recuperada. Esto explica el hecho que la eficiencia en las pruebas del diseño de experimentos tenga una tendencia distinta a la de las pruebas realizadas para la determinación de las mejores condiciones de ajuste de pH y adición de floculante, ya que en este último no se evaluó la variable de tiempo de cultivo.

La superficie de respuesta (Figura 8) muestra que la mayor recuperación de biomasa para el diseño experimental se da en los tiempos más grandes y a un pH aproximadamente entre 7 y 14.

Figura 8. Superficie de respuesta para la biomasa recuperada; pH vs Tiempo de cultivo.



Como ya se mencionó, la mejor eficiencia de floculación fue la evaluada al día 18 de cultivo, a un pH de 7 y a una concentración de floculante de 100 mg/L. Comparando este resultado con la superficie de respuesta se encuentran en concordancia la cantidad de floculante empleado y el tiempo de cultivo; además el pH se encuentra en el rango obtenido.

2.1.4 Evaluación de la floculación para las mejores condiciones a diferentes volúmenes de muestra

Con la experimentación realizada a las mejores condiciones, se demuestra que el proceso es fácilmente escalable a volúmenes más grandes de 100 mL sin que haya cambios significativos en la eficiencia de floculación (Figura 9). La Tabla 4 muestra

que los valores de eficiencia son casi invariantes para todos los volúmenes evaluados y con una recuperación de más del 99%.

Figura 9. Comparación en la eficiencia de floculación a diferentes volúmenes.

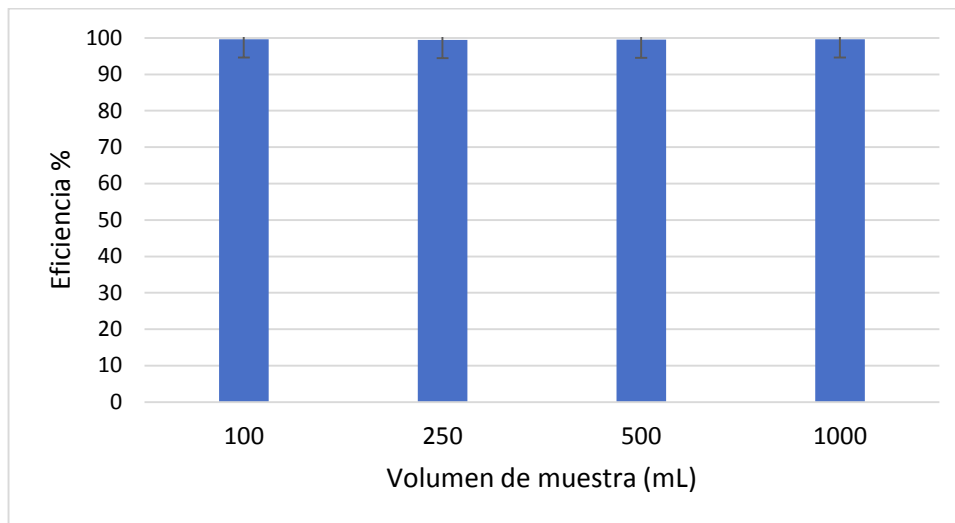


Tabla 4. Eficiencia de floculación y cantidad de biomasa recuperada para distintos volúmenes de muestra.

Volumen (mL)	Eficiencia (%)	Biomasa recuperada (g/L)
100	99,7	4,2
250	99,5	4,2
500	99,5	4,2
1000	99,6	4,2

2.1.5 Metales e hidróxidos presentes en la floculación

El contenido de cenizas no se ve afectado en diferentes volúmenes de muestra. El aumento de las cenizas en comparación con la muestra de control, es debido al uso de floculante para el proceso y de hidróxido de sodio para el acondicionamiento de pH. Se encontró mayor cantidad de cenizas en la biomasa que en el sobrenadante de las muestras floculadas, debido a la precipitación de hidróxidos responsables de la sedimentación de las células.

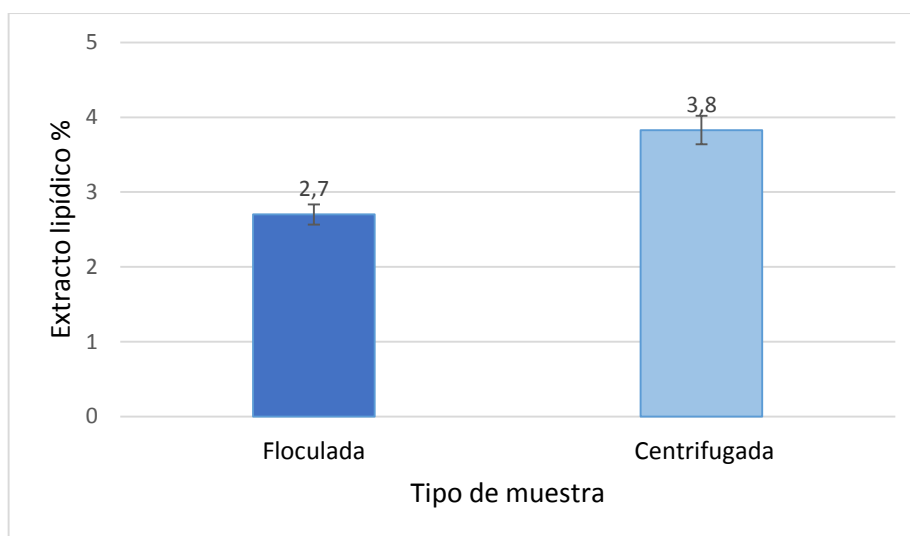
Tabla 5. Porcentaje de cenizas presentes en las muestras a volúmenes variados.

		Muestra floculada	Muestra de control
		% cenizas	% cenizas
100 mL	Sobrenadante	0,18	0,02
	biomasa	0,40	0,08
250 mL	Sobrenadante	0,15	0,02
	biomasa	0,32	0,08
500 mL	Sobrenadante	0,16	0,02
	biomasa	0,35	0,08
1000 mL	Sobrenadante	0,16	0,02
	biomasa	0,30	0,08

2.1.6 Extracción de lípidos

Al comparar la extracciones en biomasa centrifugada y floculada (Figura 10), se determinó que la muestra centrifugada alcanza un mayor porcentaje de extracto lipídico (3,8%) en comparación con la muestra floculada (2,7%). Estos resultados son similares a los hallados por *Lee et al* [24] para *C. vulgaris* cuyo valor de extracto lipídico para una muestra centrifugada fue aproximadamente del 4 % en peso. Con estos resultados hay que tener en cuenta que a pesar de que la cantidad de lípidos extraídos de la muestra con floculante es menor, es significativa dadas las ventajas que la floculación ofrece para la recuperación de biomasa.

Figura 10. Comparación del porcentaje de extracto lipídico en biomasa floculada y biomasa centrifugada.



2.1.7 Caracterización del extracto lipídico

Para la caracterización se realizó un análisis de ácidos grasos mediante la obtención de sus metil ésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) a dos muestras con extracto lipídico de biomasa floculada con AlCl_3 ; según las normas NTC 4967 y NTC 5013 (“Grasas y aceites animales y vegetales, Preparación y análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por Cromatografía de gases”. El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) AT 7890N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP88 (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) [88%-cianopropil-aril-polisiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,20 μm]. La inyección se realizó en modo Split (10:1) (Viny: 2 μL). Estas pruebas se realizaron con la colaboración del laboratorio de alimentos CICTA.

Según los resultados suministrados para las muestras con floculante (Tabla 6) el porcentaje de metil ésteres de ácidos grasos en la cantidad total de lípidos, fue en promedio un 52,8 % para la muestra original y un 57,1 % para la réplica, lo que demuestra que el floculante no afecta a la capacidad de *C. vulgaris* para la producción de biodiesel.

Tabla 6. Cuantificación de metil ésteres de ácidos grasos.

Nombre	Cantidad relativa (%)	
	Original	Réplica
Undecanoico (C11:0)	0,1	-
Láurico (C12:0)	0,3	-
Tridecanoico (C13:0)	0,5	0,9
Mirístico (C14:0)	1,2	1,3
Pentadecanoico (C15:0)	1,6	2
Palmítico (C16:0)	2,1	2,3
Palmitoleico (C16:1)	-	2,4
Heptadecanoico (C17:0)	2,8	2,3
Esteárico (C18:0)	3,1	2,6
Linoleico (C18:2n6c)	3,3	3,5
Araquídico (C20:0)	3,9	3,8
Heneicosanoico (C21:0)	5	5,5
Araquidónico (C20:4)	7,5	8,7
Docosadienoico (C22:2n6)	10	11,5
Nervónico (C24:1)	11,4	10,3
Total	52,8	57,1

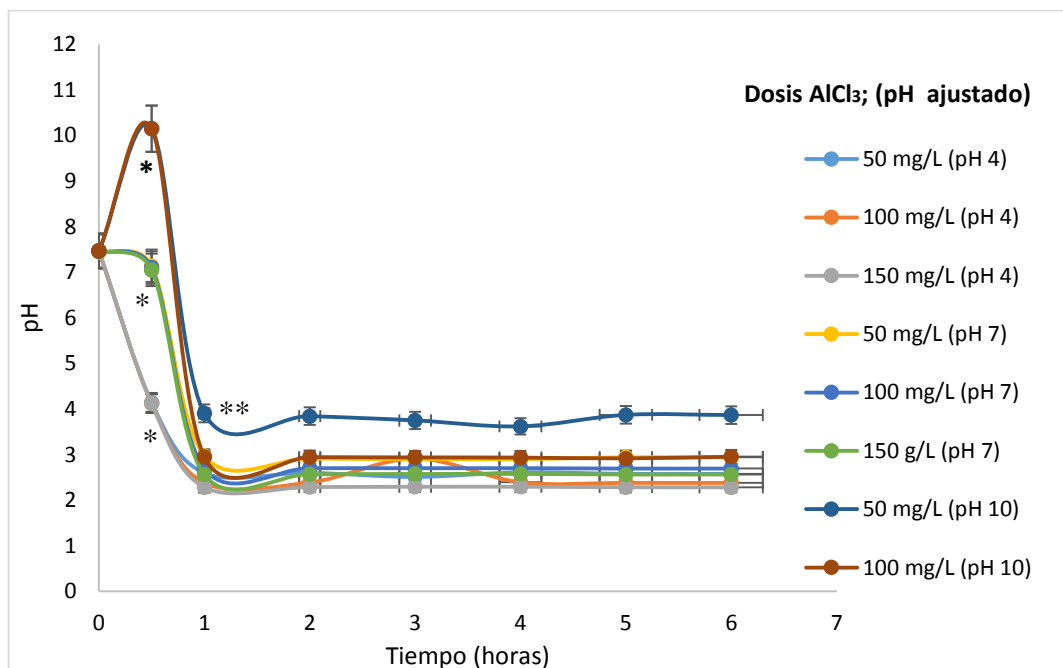
* Resultados suministrados por parte del laboratorio de alimentos CICTA.

2.2. *Nannochloropsis sp*

2.2.1 Adición de floculante-ajuste de pH

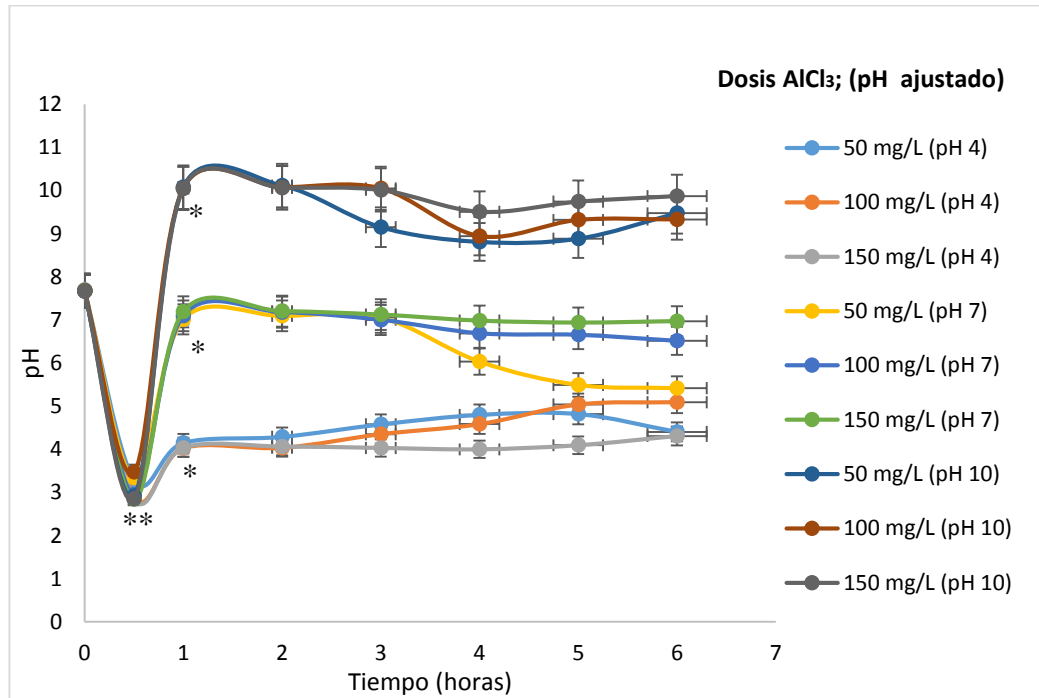
Al evaluar las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH para *Nannochloropsis*, muestra que en el comportamiento para los dos métodos descritos, (Figura 11; Figura 12) el pH permanece más o menos constante a lo largo del proceso de floculación, por lo tanto el método escogido para el desarrollo del diseño fue el que obtuvo mayor eficiencia.

Figura 11. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH antes de la adición de floculante.



* Ajuste de pH; * * Adición de AlCl₃.

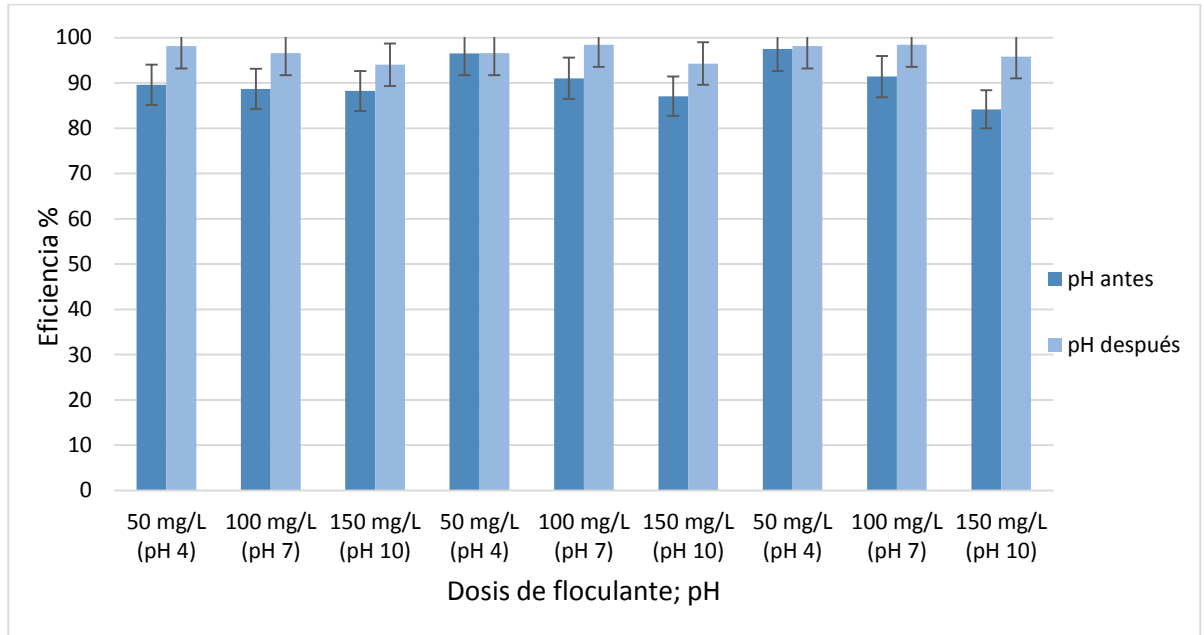
Figura 12. Comportamiento de pH durante el tiempo de floculación ajustando el pH después de la adición de floculante.



* Adición de AlCl₃; * * Ajuste de pH.

La Figura 13 muestra que se obtiene una mayor eficiencia de floculación ajustando el pH después de añadir el floculante en todos los experimentos del diseño experimental.

Figura 13. Comparación de la eficiencia de floculación para los dos métodos de adición de floculante y ajuste de pH.



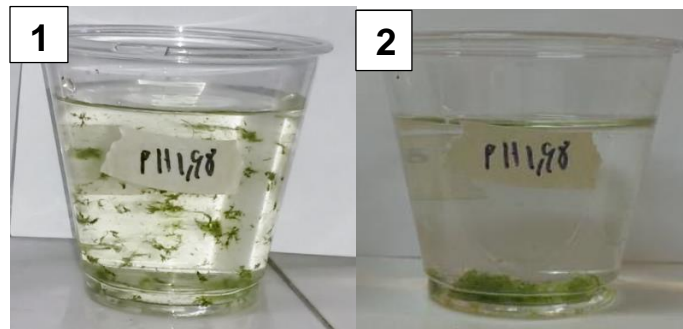
2.2.2 Desarrollo de la floculación para el diseño experimental

Según las pruebas realizadas para el diseño experimental con *Nannochloropsis*, se presentó floculación espontánea en todos los experimentos. Para las muestras correspondientes a 1,6 y 5 días se intentó medir la floculación por espectrofotometría, pero debido a que las células ya tenían aglomerados desde antes de iniciar la preparación de las muestras y a que la precipitación se daba inmediatamente, no fue posible este procedimiento; por lo tanto para las pruebas de 10, 15 y 18,3 días se llevó a cabo la experimentación de acuerdo al diseño y también se realizaron experimentos sin floculante como control; a todas las pruebas se le hizo registro fotográfico (Figura 14).

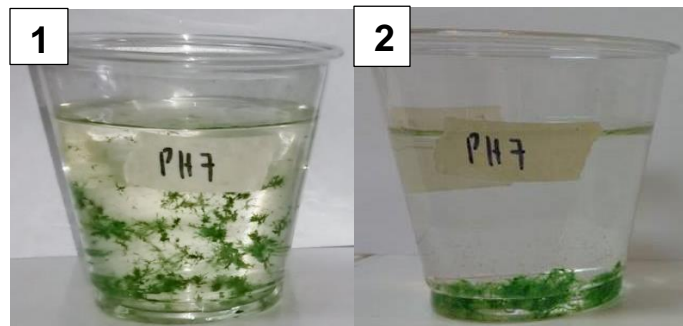
Figura 14. Proceso de floculación para *Nannochloropsis* sp., de acuerdo al diseño experimental. 10 días de cultivo (A); 15 días de cultivo (B); 18,3 días de cultivo (C).

(A)

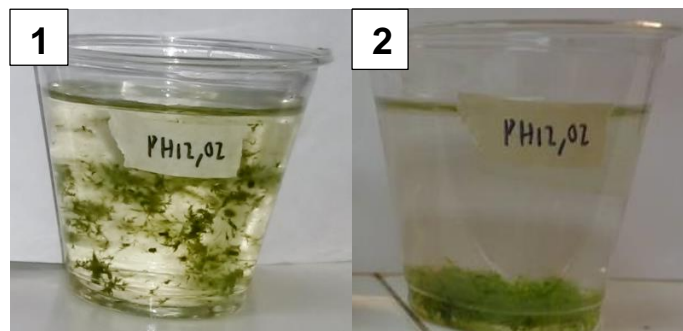
pH 1,9; sin AlCl_3 .



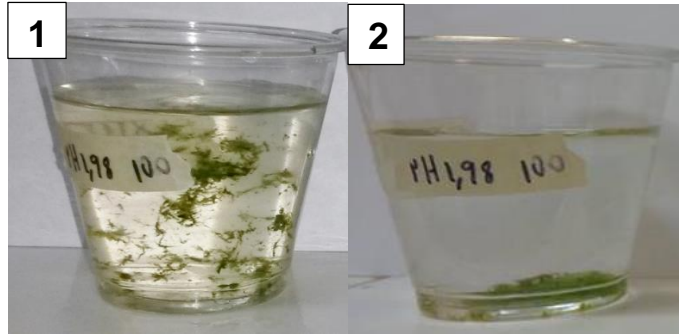
pH 7 sin AlCl_3 .



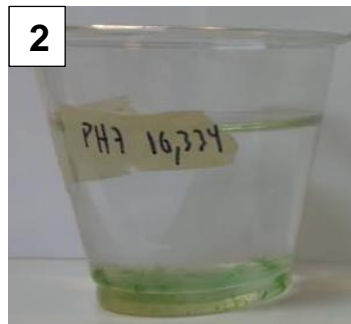
pH 12,02; sin AlCl_3 .



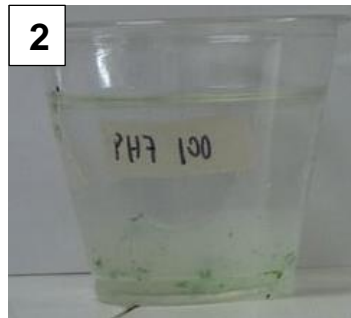
pH 1,9; 100 mg/L AlCl_3 .



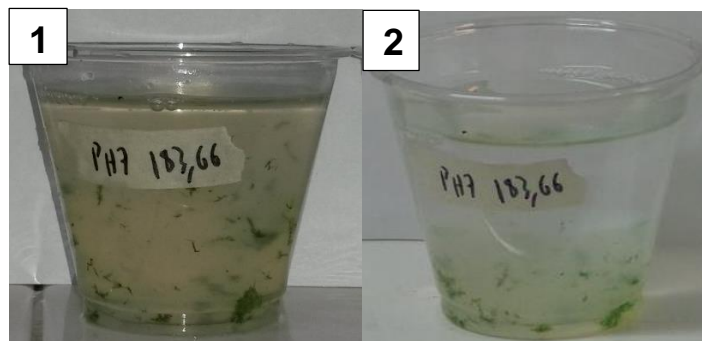
pH 7; 16,3 mg/L AlCl_3 .



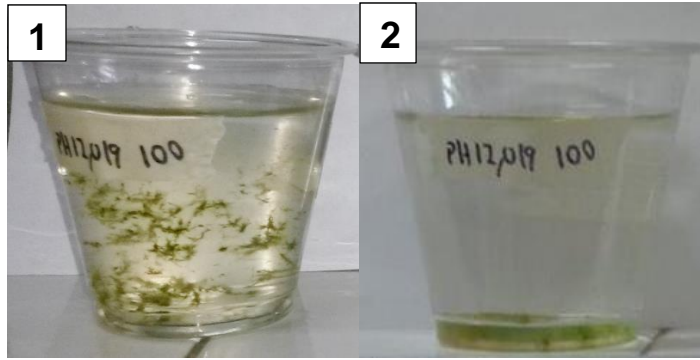
pH 7; 100 mg/L AlCl_3 .



pH 7; 183,6 mg/L AlCl_3 .

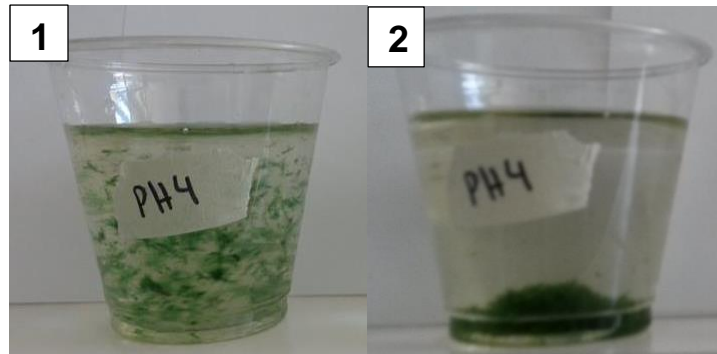


pH 12,02; 100 mg/L AlCl_3 .

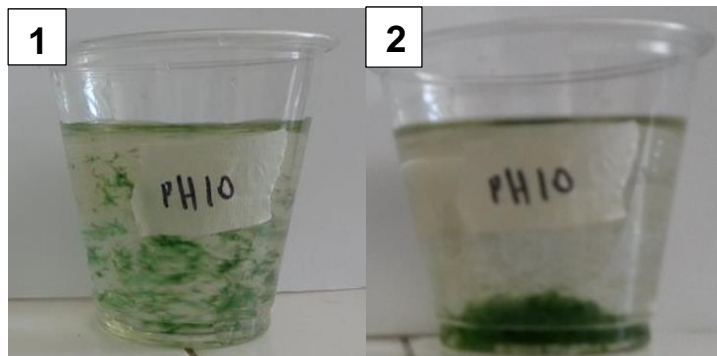


(B)

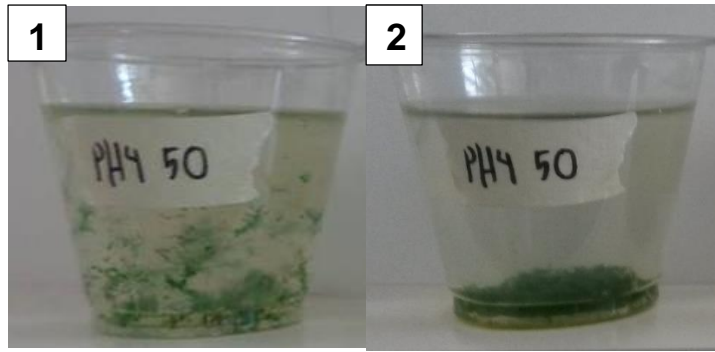
pH 4; sin AlCl_3 .



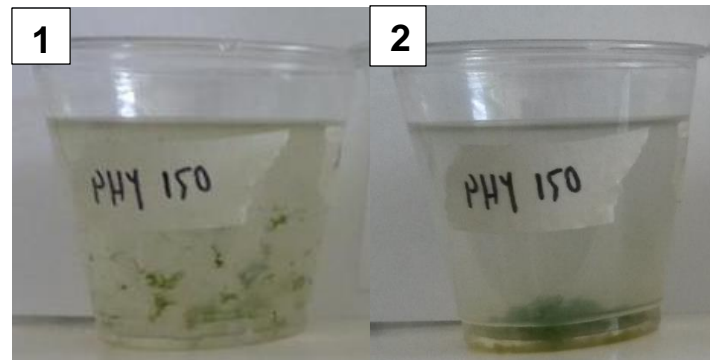
pH 10; sin AlCl_3 .



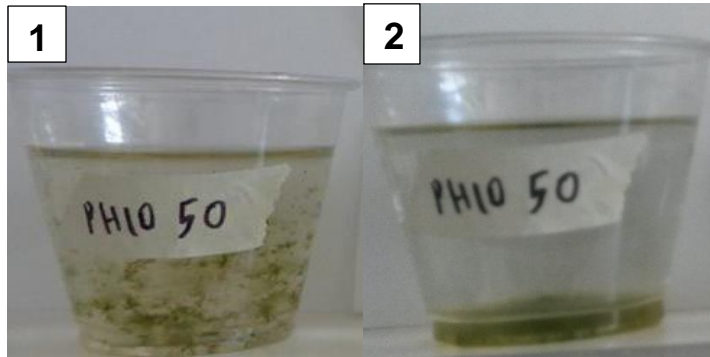
pH 4; 50 mg/L AlCl_3 .



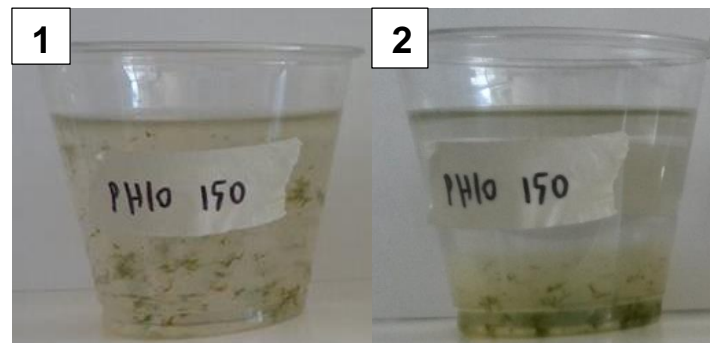
pH 4; 150 mg/L AlCl_3 .



pH 10; 50 mg/L AlCl_3 .

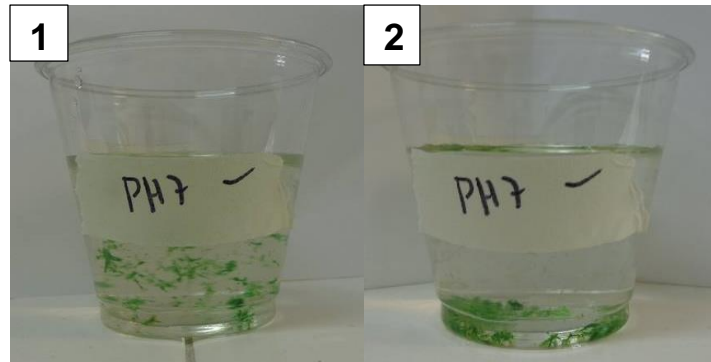


pH 10; 150 mg/L AlCl_3 .

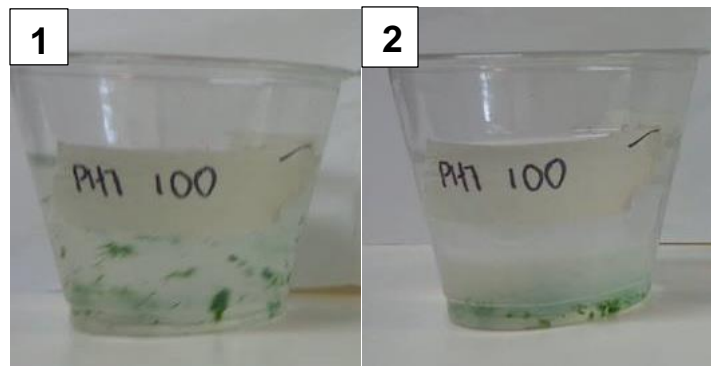


(C)

pH 7; sin AlCl_3 .



pH 7 100; mg/L AlCl_3 .

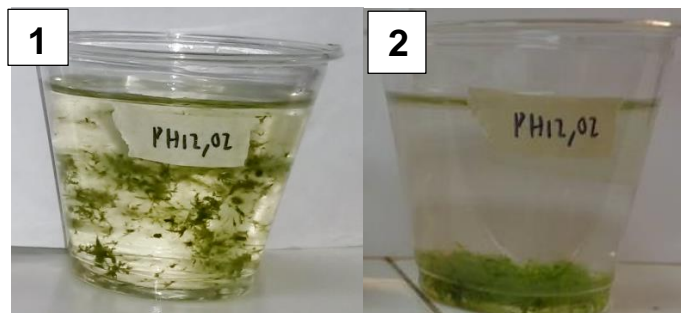
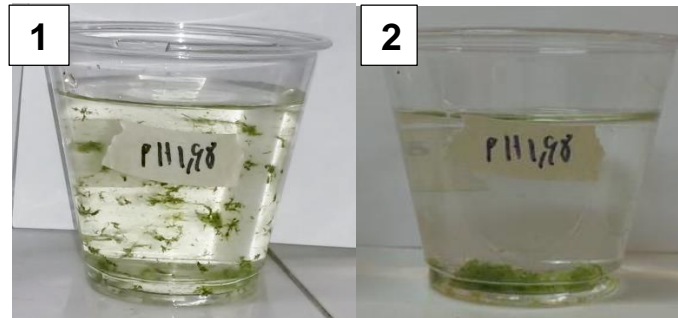
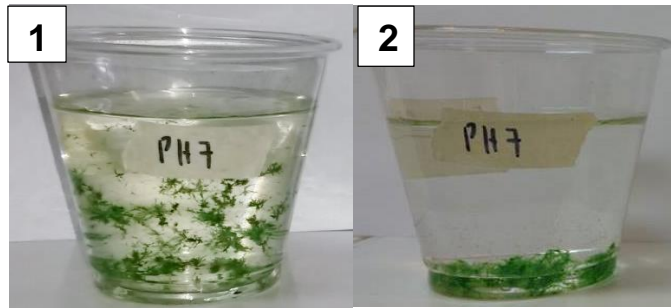


1 Muestra recién agitada; **2** Muestra segundos después de la agitación.

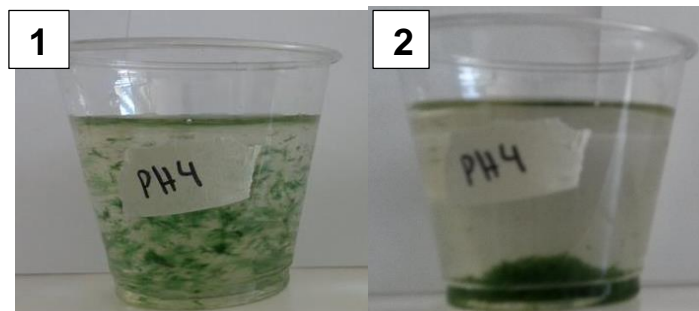
La Figura 15 evidencia que con las muestras de control no fue necesaria la incorporación de floculante y que el pH tampoco tuvo una influencia relevante en el proceso de sedimentación, ya que la precipitación se dio por igual en todos los experimentos.

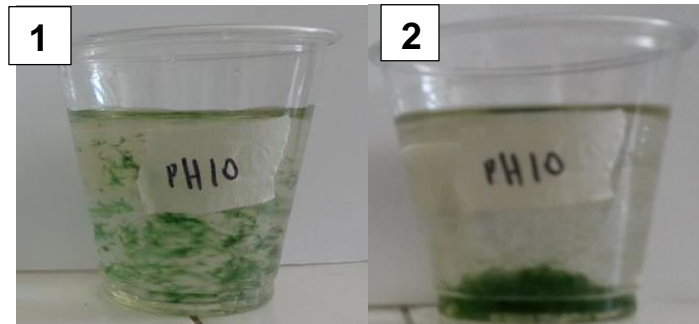
Figura 15. Muestras de control para el diseño experimental. 10 días de cultivo (A); 15 días de cultivo (B); 18,3 días de Cultivo (C).

(A)

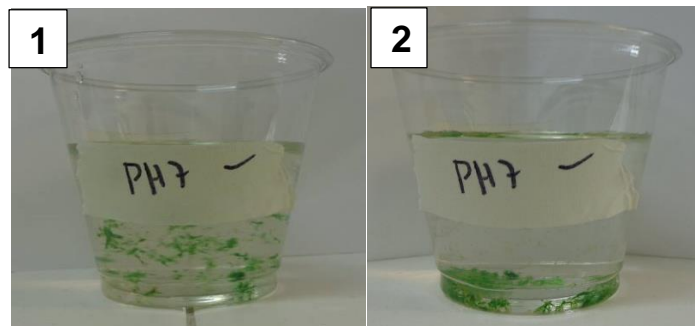


(B)





(C)



1 Muestra recién agitada; **2** Muestra segundos después de la agitación.

La diferencia de comportamiento de la biomasa utilizada para el diseño experimental, con la utilizada para la determinación de las mejores condiciones de adición de floculante y ajuste de pH, es evidente. El crecimiento fue distinto para ambos cultivos, ya que en el primero aquí descrito hubo formación de agregados que facilitaron la sedimentación; este comportamiento variable en el crecimiento se debe a que el cultivo de esta cepa se desarrolló en agua dulce y no en aguas marinas que es donde normalmente crece esta especie de microalga.

3. CONCLUSIONES

- El AlCl_3 no afecta a la producción de metil ésteres de ácidos grasos, haciendo de este método efectivo para pre-concentrar biomasa para la posterior obtención de biodiesel.
- Se demostró que ajustar el pH después de adicionar floculante es el mejor método para lograr altas eficiencias de floculación.
- Para obtener la mejor eficiencia de floculación, el proceso debe realizarse para la mayor concentración de biomasa; de esta manera se logró recuperar para *C. vulgaris* hasta un 99,7% de biomasa de los medios de cultivo, usando AlCl_3 como floculante.

4. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentación con diferentes tipos de floculante adicionándolo antes de ajustar el pH en las muestras para evaluar sus efectos.
- Evaluar la capacidad de crecimiento de las microalgas en un medio reciclado con $AlCl_3$.
- Hacer un estudio del crecimiento de *Nannochloropsis sp* en agua dulce para explicar las variables que influyen cuando se genera sedimentación espontánea en el medio.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Borowitzka. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol*, 7, 3–15.

[2] Borges, L., Morón –Villarreyes, J. A., Montes D'Oca, M. G., Abreu, P. C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and bioenergy*, 35, 4449-4454.

[3] Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329, 796–799.

[4] Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Advances*, 25, 294–306.

[5] Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert, R., Frampton, D.M.F., (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult. Eng*, 35 (3), 300–313.

[6] Zhang, Y., Tian, J.Y., Nan, J., Gao, S.S., Liang, H., Wang, M.L., Li, G.B., (2010). Effect of PAC addition on immersed ultrafiltration for the treatment of algal-rich water. *J. Hazard. Mater*, 186, 1415–1424.

[7] Chen, Y.M., Liu, J.C., Ju, Yih-Hsu., (1998). Flotation removal of algae from water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 49–55.

[8] Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, xx, 1-7.

[9] Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface*, 7, 703–726.

[10] Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* 2, 0127011–0127015.

[11] Molina Grima E, Belarbi E, Ación Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.*, 20(7-8), 491-515.

[12] Harith ZT, Yusoff FM, Mohamed MS, Din MS, Ariff AB. (2009). Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans* cells. *Afr J Biotechnol*, 8(21). 5971-5978.

[13] Garzon-Sanabria, A. J., Davis, R.T., Nikolov Z. L. (2012). Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. *Bioresource Technology*, 118, 418–424.

[14] Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y., Li, A., (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour. Technol.*, 110, 496–502.

[15] Gregory, J., Duan, J., (2001). Hydrolyzing metal salts as coagulants. *Pure Appl. Chem.*, 73, 2017–2026.

[16] Granados, M.R., Acién, F.G., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J.M., Molina Grima, E. (2012). Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102–110.

[17] Rwehumbiza, M.V., 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.

[18] Henderson, R.K, Parsons, S.A., Jefferson, B. (2008). The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae. *Water Res.*, 42, 1827–1845.

[19] Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R.P., Harrison S.T.L. (2011) Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119–123.

[20] Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytechnisches Journal*, 232, 461-465.

[21] Duan, J., Gregory, J., (2003) Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100–102, 475–502.

[22] Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B., (2008). Successful removal of algae through the control of zeta potential. *Sep. Sci. Technol.*, 43, 1653–1666.

[23] Ohman, L.-O., Wagberg, L., *Pulp Pap. J.*, (1997). *Sci.* 23, J475.

[24] Lee, Jae-Yon; Yoo, Chan; Jun, So-Young; et al. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, S75–S77.

BIBLIOGRAFÍA

Borges, L., Morón –Villarreyes, J. A., Montes D'Oca, M. G., Abreu, P. C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and bioenergy*, 35, 4449-4454.

Borowitzka. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J. Appl. Phycol*, 7, 3–15.

Chen, Y.M., Liu, J.C., Ju, Yih-Hsu., (1998). Flotation removal of algae from water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 49–55.

Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Advances*, 25, 294–306.

Duan, J., Gregory, J., (2003). Coagulation by hydrolysing metal salts. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100–102, 475–502.

Garzon-Sanabria, A. J., Davis, R.T., Nikolov Z. L. (2012). Harvesting *Nannochloris oculata* by inorganic electrolyte flocculation: Effect of initial cell density, ionic strength, coagulant dosage, and media pH. *Bioresource Technology*, 118, 418–424.

Granados, M.R., Acién, F.G., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J.M., Molina Grima, E. (2012). Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102–110.

Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface*, 7, 703–726.

Gregory, J., Duan, J., (2001). Hydrolyzing metal salts as coagulants. *Pure Appl. Chem.*, 73, 2017–2026.

Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R.P., Harrison S.T.L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119–123.

Harith ZT, Yusoff FM, Mohamed MS, Din MS, Ariff AB. (2009). Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans* cells. *Afr J Biotechnol*, 8(21). 5971-5978.

Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B., (2008). Successful removal of algae through the control of zeta potential. *Sep. Sci. Technol.*, 43, 1653–1666.

Henderson, R.K, Parsons, S.A., Jefferson, B. (2008). The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae. *Water Res.*, 42, 1827–1845.

Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert, R., Frampton, D.M.F., (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult. Eng*, 35 (3), 300–313.

Lee, Jae-Yon; Yoo, Chan; Jun, So-Young; et al. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, S75–S77.

Molina Grima E, Belarbi E, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.*, 20(7-8), 491-515.

Ohman, L.-O., Wagberg, L., *Pulp Pap. J.*, (1997).*Sci.* 23, J475.

Rwehumbiza, M.V., Harrison, R., Thomsen, L. (2012). Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. *Chemical Engineering Journal*, 200–202, 168–175.

Soxhlet, F. (1879).Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytechnisches Journal*, 232, 461-465.

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., (2010). Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain, Energy* 2, 0127011–0127015.

Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, xx, 1-7.

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329, 796–799.

Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y., Li, A., (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour. Technol.*, 110, 496–502.

Zhang, Y., Tian, J.Y., Nan, J., Gao, S.S., Liang, H., Wang, M.L., Li, G.B., (2010). Effect of PAC addition on immersed ultrafiltration for the treatment of algal-rich water. *J. Hazard. Mater.*, 186, 1415–1424.