

**CULTIVO Y FLOCULACIÓN DE MICRO ALGAS DE AGUA DULCE USANDO
POLÍMEROS A ESCALA DE LABORATORIO**

NAZIRA QUIZENA FERNANDEZ

ID: 000138059

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
FACULTAD DE ADMINISTRACIÓN E INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

**CULTIVO Y FLOCULACIÓN DE MICRO ALGAS DE AGUA DULCE USANDO
POLÍMEROS A ESCALA DE LABORATORIO**

NAZIRA QUIZENA FERNANDEZ

CUMPLIMIENTO PRÁCTICA EMPRESARIAL

MSc. YOLANDA GAMARRA HERNANDEZ.

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
FACULTAD DE ADMINISTRACIÓN E INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	9
1. OBJETIVOS	11
1.1 OBJETIVO GENERAL	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. RESEÑA HISTORICA	12
2.1 DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOLOGICA Y AGRICULTURA DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS A&M	12
3. DESCRIPCION DE ACTIVIDADES	15
4. REVISIÓN DE LITERATURA	16
5. METODOLOGIA	26
5.1 CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO	26
5.2 PREPARACION DE FLOCULANTES	29
5.2.1 Floclulantes FO	29
5.2.2 Quitosan	29
5.3 EXPERIMENTOS DE FLOCULACIÓN	30
5.3.1 Experimentos de floclulación para Floclulantes FO	30
5.3.2 Experimentos de floclulación para Quitosan	30
5.4 EFICIENCIA DE REMOCIÓN	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1 FLOCULACIÓN UTILIZANDO FO	32
6.1.1 Floclulación con FO 4990	32
6.1.2 Floclulación con FO 4550	34
6.1.3 Floclulación con FO 4290	36
6.1.4 Floclulación con Quitosan	37
7. CONCLUSIONES	42

8. RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	19
Figura 2. Floculación	22
Figura 3. Chitosan	25
Figura 4. Transferencia de cultivo de plato a medio líquido.	26
Figura 5. Transferencia de cultivo de frasco de 500ml a 2 L	26
Figura 6. Cultivos con una semana de crecimiento.	27
Figura 7. Muestras para medición de densidad óptica.	28
Figura 8. Conteo de células.	28
Figura 9. Microscopio.	28
Figura 10. Dilución simple para preparación de FO.	29
Figura 11. Preparación de Chitosan.	29
Figura 12. Floculación 1. FO 4990, con EOM.	32
Figura 13. Floculación 2. FO 4990, con EOM.	33
Figura 14. Floculación 3. FO 4990, sin EOM.	33
Figura 15. Floculación 2. FO 4550, con EOM.	34
Figura 16. Floculación 3. FO 4550, sin EOM. Replica de 7mg/L.	35
Figura 17. Floculación 1. FO 4290, con EOM.	36
Figura 18. Floculación 1. Chitosan, con EOM.	37
Figura 19. Floculación 2. Chitosan, sin EOM.	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Cumplimiento	47

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

CULTIVO Y FLOCULACIÓN DE MICRO ALGAS DE AGUA DULCE USANDO POLÍMEROS A ESCALA DE LABORATORIO

Nazira Quizena Fernández

Facultad de Ingeniería Ambiental

MSc. Yolanda Gamarra Hernández

RESUMEN

Para identificar el floculante óptimo, en cuanto a eficiencia de remoción de biomasa y ambientalmente amigable, teniendo en cuenta la afectación de la materia orgánica extracelular (EOM), se realizó harvesting en micro algas de agua dulce (*Chlamydomonas reinhardtii* PL16), por floculación, utilizando el polímeros catiónico natural quitosan y los polímeros catiónicos sintéticos FO 4990, FO 4550 y FO 4290, como agentes floculantes. Los resultados mostraron la afectación de la presencia de EOM en los cultivos, decreciendo la eficiencia de remoción de biomasa del medio, requiriendo así mayor cantidad de floculante para la remoción. En el caso de los polímeros sintéticos, fue requerido mayor nivel de cationicidad (%), para decrecer la dosis de floculante, en presencia de EOM. En ausencia de EOM no hubo una tendencia clara sobre la cantidad de polímero requerido, pero para el caso de los polímeros sintéticos, se necesitó, al menos tres veces menos de polímero fue requerido para lograr > 95 % de eficiencia de floculación. La dosis óptima del quitosan para obtener eficiencias de floculación > 95 %, en la presencia y en la ausencia de EOM difiere solo por 20% (50 y 40 mg/L respectivamente). Las mejores condiciones de floculación fueron logradas con el polímero sintético FO 4990 a las dosis de 10 y 1 mg/L, en la presencia y ausencia de EOM respectivamente. El floculante más amigable con el medio ambiente fue el quitosan ya que se caracterizó por ser un biopolímero catiónico natural, no tóxico, biodegradable, renovable, no corrosivo, fácil de tratar y aceptado ecológicamente.

PALABRAS CLAVES:

floculación, quitosan, FO 4990, FO 4550, FO 4290, materia orgánica extracelular.

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

CULTURE AND FLOCCULATION OF FRESHWATER MICROALGAE USING POLYMERS AT LABORATORY SCALE

Nazira Quizena Fernandez

Environmental engineering department

MSc. Yolanda Gamarra Hernandez

ABSTRACT

In order to identify the optimum flocculant in terms of removal efficiency and environmentally friendly, considering the effect of extracellular organic matter (EOM) was performed in harvesting of freshwater micro algae (*Chlamydomonas reinhardtii* PL16), by flocculation, using chitosan and synthetic cationic polymers FO 4990, FO 4550 y FO 4290. Showing the results, EOM significantly affect flocculation efficiency. In the presence of EOM, more flocculant is needed. Higher cationicity level (%) was required to decrease the amount of flocculant dosage in the presence of EOM. In the absence of EOM there was not a clear trend on the amount of polymer required, but for the synthetic polymers at least 3-fold less polymer was required to achieve > 95 % flocculation efficiency. The Chitosan dosage for > 95 % flocculation efficiency in the presence and absence of EOM differed only by 20 % (50 and 40 mg/L respectively). Best flocculation conditions were achieved with the synthetic FO 4990 polymer at a dosage of 10 and 1 mg/L in the presence and absence of EOM respectively and chitosan is the most environmentally friendly, since it is characterized by being a cationic natural biopolymer, non-toxic, biodegradable, renewable, non-corrosive, easy to deal with and accepted ecologically.

KEYWORDS:

Flocculation, chitosan, FO 4990, FO 4550, FO 4290, extracellular organic matter.

INTRODUCCIÓN

Recientemente, ha sido reportado, el éxito de expresión, de varias proteínas recombinantes, por el genoma del cloroplasto y el núcleo del alga *Chlamydomonas reinhardtii*, demostrando su habilidad en las aplicaciones biotecnológicas (Griesbeck, et al., 2006).

Harvesting es una técnica de separación de biomasa, del medio, de gran importancia en los últimos tiempos. Este es uno de los pasos más importantes para la extracción de proteínas de alto valor agregado, de las micro algas (Griesbeck, et al., 2006). Su importancia se debe a que en este paso puede llegar a implicar, dependiendo de la tecnología con la que se realice, grandes gastos energéticos y por ende, incurrir en altos costos.

Las mejores tecnologías actualmente empleadas para realizar harvesting en micro algas son, centrifugación, floculación, flotación, técnicas de electroforesis, coagulación electrolítica, flotación electrolítica y floculación electrolítica. Se ha demostrado, en estudios previos, que harvesting de micro algas, por floculación, es un método superior a los métodos de harvesting convencional, ya que permite, el tratamiento de grandes cantidades de cultivo, así como también es capaz de ser aplicado a una amplia gama de especies y no tiene requerimientos energéticos, haciéndola así, una alternativa económicamente viable (Uduman et al., 2010).

Así mismo, se ha comprobado que el quitosan (Divakaran, et al., 2001), como floculante natural, y los floculantes orgánicos sintéticos, han sido efectivos en floculación de micro algas de agua dulce (Uduman et al., 2010).

Por lo tanto, el propósito de este estudio es por medio de harvesting en micro algas de agua dulce (*Chlamydomonas reinhardtii* PL16), por floculación, identificar el floculante más eficiente en el proceso de floculación, es decir, que remueva la mayor cantidad de biomasa del cultivo, utilizando micro algas de agua dulce, en un periodo de 4 meses a partir de febrero 10 del 2013.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el floculante con mayor eficiencia en el proceso de floculación, es decir, que obtenga la mayor remoción de biomasa del cultivo utilizando micro algas de agua dulce.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar floculación en micro algas de agua dulce (*Chlamydomonas reinhardtii* PL16) que puedan ser utilizadas en procesos industriales.
- Analizar los resultados obtenidos en cuanto a eficiencia de floculación e influencia de la materia orgánica extracelular, utilizando diferentes floculantes, tales como FO 4990, FO 4550, FO 4290 y Quitosan.
- Seleccionar el floculante con mayor eficiencia de remoción de biomasa y amigable con el medio ambiente para la floculación de micro algas de agua dulce.

2. RESEÑA HISTORICA

2.1 DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOLOGICA Y AGRICULTURA DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS A&M

El departamento de Ingeniería Biológica y Agricultura de la Universidad de Texas A&M, es una de las más grandes en América del Norte, se encuentra entre las mejores de la nación, como lo demuestran los logros de los estudiantes y profesores. El departamento es administrado conjuntamente por la Facultad de Ingeniería Dwight Look y el departamento de Ciencias viva y agricultura. Texas A & M es de 100 kilómetros al noroeste de Houston, a 90 millas al este de Austin y 170 millas al sur de Dallas en las ciudades gemelas de Bryan / College Station.

La investigación en el laboratorio de bioseparaciones de la universidad de Texas A&M se centra en los siguientes intereses de investigación:

- Recuperación y purificación de biomoléculas recombinantes a partir de los sistemas transgénicos.
- Caracterización de la planta-componentes de interferencia para la purificación de proteínas.
- Bioprocesos, diseño y economía.

El objetivo del laboratorio de bioseparaciones es desarrollar nuevas estrategias rentables para la recuperación y purificación de proteínas recombinantes y nativas mediante la comprensión de las limitaciones que impone el sistema biológico y el producto.

Miembros del laboratorio con experiencia en bioquímica de proteínas, métodos analíticos, bioseparaciones y diseño de procesos, mediante el aprovechamiento de los conocimientos científicos y de ingeniería se esfuerzan por encontrar soluciones para una variedad de desafíos de bioprocusamiento y separaciones que enfrenta la actualidad en biotecnología industrial.

HISTORIA

Los cursos de Ingeniería Agrícola (riego, drenaje, fertilizantes y administración de fincas) eran enseñados en la universidad de Texas A & M en 1891. En 1911, se creó la Escuela de Agricultura y la Escuela de Ingeniería.

Los cursos de ingeniería agrícola se trasladaron al Departamento de Agronomía de la Escuela de Agricultura. El Departamento de Ingeniería Agrícola se creó en el Departamento de Agronomía en 1914, y en 1915 se convirtió en un departamento independiente. En 2005, el departamento celebró su 90^o año como un departamento.

En 1946 hubo una amenaza para el programa debido a la aparente falta de coordinación de ingeniería y rigor. El programa se convirtió administrado conjuntamente por los Decanos de las Facultades de Agricultura e Ingeniería en 1947 y en 1950, el Consejo de Ingenieros para el Desarrollo Profesional (predecesora de ABET) aprobó la acreditación del programa de estudios de cuatro años en Ingeniería Agrícola de la universidad Texas A & M. Así, el grado de ingeniería continúa celebrando sus 50 años de acreditación.

Un plan de estudios en agricultura mecanizada fue establecido y administrado por el Departamento de Ingeniería Agrícola en 1957. El grado y el nombre del programa se cambió a Sistemas de Gestión Agrícola (AGSM) en 1988 para enfatizar el enfoque de gestión técnica del plan de estudios.

El título de Doctor en Filosofía en Ingeniería Agrícola se estableció en 1967 y fue uno de los diez grados que ofrecen este tipo en los EE.UU. en ese momento. Además, la Maestría de la Agricultura y el Doctorado en Ingeniería fueron aprobados en 1974. La década de 1970 vio un crecimiento de calidad de los estudiantes y la inscripción en el departamento. El Informe Gourman clasificado como el segundo departamento del país en 1979. A partir de 1998, el programa de pregrado de ingeniería agrícola se situó todavía en segundo lugar en la nación detrás de la Universidad de Cornell, y el programa de posgrado se clasificó octavo. EE.UU. News y la revista World Report ha clasificado el número de graduados del programa departamental uno en los EE.UU., incluyendo la clasificación más reciente en 2003.

3. DESCRIPCION DE ACTIVIDADES

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES	
ACTIVIDADES	DESCRIPCIÓN
CAPACITACION PREVIA	Lectura de artículos científicos relacionados con los proyectos que se desempeñan actualmente en el laboratorio.
CAPACITACION SOBRE EL CULTIVO Y FLOCULACION DE LAS MICRO ALGAS	Capacitación realizada por el coordinador de laboratorio sobre los cultivos de micro algas y su posterior floculación.
CULTIVOS DE MICRO ALGAS DE AGUA DULCE	Cultivos de las micro algas, teniendo en cuenta los diferentes parámetros que se deben seguir para su óptimo crecimiento.
MONITOREOS A LOS CULTIVOS	Monitoreos diarios a los diferentes cultivos con el fin de evaluar su crecimiento, midiendo en estos el pH, conductividad, densidad óptica, conteo de células, luz y bombeo.
TRANSFERENCIA DE CULTIVOS	Transferencia de los cultivos cada tres días resuspendiendolos en nuevo medio, para así asegurar su óptimo crecimiento.
FLOCULACION	Floculación, con FO 4990, FO4550, FO4290 y Quitosan.
REUNIONES	Reuniones con los integrantes del laboratorio y el Dr. Nikolov sobre las diferentes evoluciones de los proyectos.
OTROS	Colaborar en actividades que se presenten esporádicamente.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

LAS MICROALGAS COMO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Estudios recientes han demostrado el potencial de las micro algas, como una fábrica de producción de la proteínas naturales y recombinantes, es decir, proteínas terapéuticas, que son difíciles de producir, y proteínas industriales. Las micro algas eucariotas son microorganismos fotosintéticos, que están siendo estudiados para expresar proteínas farmacéuticas y biotecnológicas, debido a su rápido crecimiento, fácil escala hacia arriba, rápida transformación, y el hecho de que no contienen toxinas y patógenos humanos, las hacen una alternativa segura para este propósito (Griesbeck et al, 2006).

Los sistemas de expresión bacterianos, que han sido utilizados para producir proteínas pequeñas y péptidos, no se pueden utilizar para producir proteínas humanas complejas, ya que fallan para llevar a cabo modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, que a menudo se requieren para la función de la proteína (Griesbeck et al., 2006). Además, las proteínas recombinantes producidas en sistemas bacterianos son a menudo cuerpos de inclusión insolubles que necesitan ser purificados y replegados, lo que dificulta los procesos y los hace costosos (Griesbeck et al., 2006).

El cultivo de micro algas transgénicas puede llevarse a cabo en estanques abiertos y / o en biorreactores cerrados. Sin embargo, los biorreactores cerrados, son más convenientes para el cultivo de material transgénico, ya que se puede tener un mejor control del flujo de genes a otras plantas y organismos; aunque, la genética de las microalgas para expresar proteínas de alto valor tienen varias mutaciones que dificultan su supervivencia en condiciones ambientales naturales (Griesbeck et al., 2006).

SISTEMAS DE EXPRESION PARA PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES

La selección del sistema de expresión para producir proteínas recombinantes está asociada al costo de producción de la proteína, la pureza, la integridad de la proteína, y el nivel de expresión en el sistema elegido (Walker et al., 2005). Los biosistemas más utilizados actualmente para producir proteínas recombinantes heterólogas comerciales son la fermentación bacteriana y la levadura, así como, cultivo de células de mamífero. La fermentación bacteriana y la levadura se ha utilizado durante mucho tiempo como una fuente importante de proteínas naturales (no transgénicas) debido a su rápido crecimiento y su bajo costo de producción, sin embargo, los sistemas bacterianos no para llevar a cabo modificaciones post-transcripcional y postraduccional, por ejemplo, proteínas de alto peso molecular no pueden ser producidos (Walker et al, 2005). Otro de los principales inconvenientes de los sistemas de fermentación bacteriana es la producción de las proteínas como cuerpos de inclusión insolubles, la presencia de endotoxinas, y proteasas, lo que complica el procesamiento (Walker et al., 2005). A pesar de que las levaduras son capaces de realizar modificaciones post-traduccionales, por lo general no se realiza correctamente y las proteínas terminan siendo hiperglicosilados.

También se ha aplicado el uso de animales como sistemas de expresión para producir proteínas de alto valor, sin embargo, su cultivo, mantenimiento y los procesos posteriores son costosos, como la producción a gran escala, y su potencial contaminación de la proteína con enfermedades o virus nocivos (Walker et al., 2005).

Las plantas terrestres, es otra manera de expresar transgenes y ofrece varias ventajas sobre las bacterias, levaduras, y los sistemas de expresión de mamíferos tales como, menor inversión de capital, capacidad de producir proteínas

recombinantes complejas, es decir, anticuerpos, enzimas, vacunas, hormonas, entre otros, y no representan un riesgo como una serie de patógenos humanos (Walker et al., 2005). Sin embargo, existe una preocupación por el flujo de transgenes a otras plantas por el polen.

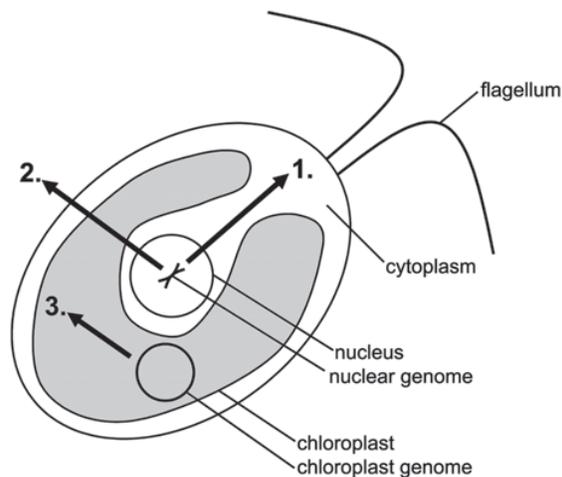
Las micro algas, son microorganismos fotosintéticos, tales como, procariotas (cianobacterias) y eucariotas, están siendo objetivo de investigación para expresar proteínas transgénicas. Más específicamente las micro algas eucariotas, tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella*, *Euglena*, y *Haematococcus*, son algunas de las cepas de algas que se han estudiado como sistemas modelo para producir proteínas naturales y recombinantes de interés (Griesbeck et al. , 2006; Walker et al, 2005). El uso de micro algas eucariotas como un biosistema para la producción de proteínas presenta ventajas adicionales sobre bacterianas, de levadura, de mamífero, y sistemas de plantas terrestres. Ellos ofrecen los beneficios de las bacterias, levaduras, y sistemas de la planta con respecto a un crecimiento rápido y bajo costo de producción, y como no tienen polen, no hay riesgo de flujo de transgenes. Cuando se compara con cultivos de células de mamíferos, las micro algas puede producir proteínas terapéuticas que se han determinado a ser difíciles de expresar en un costo mucho menor. Sin embargo, existen algunas limitaciones cuando se utiliza micro algas, como el sistema de expresión, es decir, el nivel de expresión de proteínas recombinantes necesita ser mejorado, y los métodos de purificación están aún por desarrollar.

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII COMO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE ALTO VALOR

Chlamydomonas reinhardtii es una micro alga verde unicelular eucariota que se utiliza como un sistema modelo para expresar diferentes proteínas recombinantes de aplicaciones industriales, así como farmacéuticos, debido a sus características

genéticas y su facilidad de transformación. *Chlamydomonas reinhardtii* puede expresar proteínas transgénicas en tres formas diferentes: 1) la expresión del transgén en el núcleo y a la proteína en el citoplasma, 2) la expresión del transgén en el núcleo y la secreción a través de retículo endoplasmático y aparato de Golgi, y 3) expresión de la proteína recombinante y la acumulación en el cloroplasto. (Griesbeck et al., 2006).

Figura 1. *Chlamydomonas reinhardtii*



Fuente: Diferentes expresiones del transgen en *C. reinhardtii* (Griesbeck et al., 2006.)

VENTAJAS DE LAS MICRO ALGAS COMO UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Algunas de las ventajas de la producción de proteínas recombinantes complejas en los sistemas de algas tales como anticuerpos monoclonales, vacunas, citoquinas, e inmunotoxinas son: producciones de costo, tiempo para hacer el transformante, producción a gran escala, y la expresión de proteínas multiméricas en el núcleo y cloroplasto (Mayfield et al., 2003).

Por otra parte, las proteínas recombinantes producidas en las plantas y las algas son menos riesgosas, ya que no contienen endotoxinas ni se propagan agentes virales de mamíferos, como en las bacterias y células de mamíferos respectivamente (Rasalaet al., 2010).

HARVESTING DE MICROALGAS POR FLOCULACIÓN

Harvesting es una técnica de separación de biomasa, del medio, de gran importancia en los últimos tiempos. Este es uno de los pasos más importantes para la extracción de proteínas de alto valor agregado, de las micro algas (Griesbeck, et al., 2006).

Varios métodos físicos, químicos y mecánicos se han probado para realizar Harvesting en micro algas, incluyendo la filtración de membrana, centrifugación, filtración a vacío de flujo inverso, ultrafiltración, flotación por aire, las ondas de ultrasonido, y la floculación. La floculación es un método ampliamente utilizado para el tratamiento de agua y se ha aplicado con éxito para las micro algas de agua dulce.

Una ventaja de esta técnica, usada para la separación de biomasa del medio, es que al finalizar el harvesting, las células de las algas permanecen intactas y vivas. En cambio, en la centrifugación a altas velocidades, suele romper las células, resultando en el contenido del medio (Divakaran, et al., 2001).

Varios factores que afectan el harvesting de micro algas por floculación son: dosificación de floculante, la concentración de células, fuerza iónica, materia orgánica extracelular (EOM), y el pH de los medios de comunicación (Garzón-Sanabria et al, 2012; Uduman et al, 2010).

Los EOM se comprenden de proteínas, hidratos de carbono, glicolato, lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, y pequeñas moléculas. Estos compuestos son liberados al medio a medida que crecen las células, por transporte activo y pasivo, autólisis y la descomposición bacteriana de células de las algas (Knappe et al., 2004).

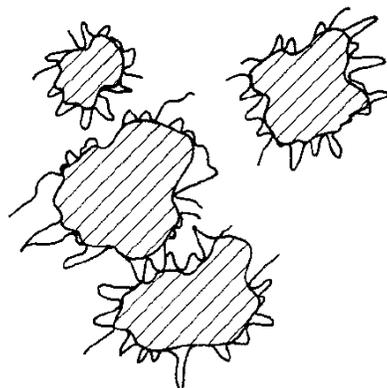
El incremento de EOM, varían el estado fisiológico de las algas, que dependen de la temperatura, las condiciones de luz, y la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la excreción de EOM es inducida con luz brillante (Knappe et al, 2004.). La acumulación de proteínas e hidratos de carbono varían con las especies de algas y el estado de crecimiento (Bernhardt et al., 1985). Las proteínas y los hidratos de carbono presentes en los EOM se han identificado como un problema potencial para el harvesting de micro algas a través de floculación y filtración de membrana, para tratamientos de agua. Por ejemplo, se ha identificado que las proteínas, interfieren con floculantes (Tirado-Miranda et al, 2003). El trabajo de Henderson et al. (2008a), proporciona información clara sobre cómo afecta la demanda EOM en la demanda de floculante, en cuatro diferentes especies de micro algas de agua dulce.

FLOCULACIÓN CON POLÍMEROS

El término floculación, se utiliza a menudo, para describir la agregación de partículas, con polímeros de peso molecular grandes o polielectrolitos, debido al mecanismo de transición (Rushton et al., 2000).

La floculación de las partículas es un fenómeno electrocinético que depende de la carga de la superficie global y distribución de carga, así como la fuerza iónica de la solución. La floculación es un proceso en el que las partículas estables en suspensión, en solución acuosa, son desestabilizadas por la adición de productos químicos, llamados floculantes, que fomentan la agregación y agrupación, por medio de la formación de flóculos. La reacción de la floculación es irreversible (Harrison et al., 2003).

Figura 2. Floculación



Fuente: Modelo de floculación. Tomado de Rushton et al., 2000.

La floculación con polímeros se logra mediante la formación de puentes entre las partículas; cadenas de polímeros actúan, por medio de la adsorción, sobre la superficie de una partícula y luego se extiende a las partículas cercanas hasta que se forme un tamaño óptimo de floculo (Rushton et al, 2000.).

Se ha comprobado que en la floculación, no es necesaria total neutralización de cargas, debido a que se han obtenido altas eficiencias de remoción, con polímeros no anionicos o floculantes con similar carga a las partículas floculadas, lo cual demuestra que la longitud del polímero y el efecto de puentes, es suficiente para la floculación (Rushton et al., 2000).

La mezcla de la suspensión, después de adicionado el floculante, es muy importante para dispersar y aumentar la tasa de colisiones entre las partículas. Sin embargo, si se mezcla demasiado rápido por más del tiempo requerido, se puede romper los floculos y así reducir la eficiencia de la floculación.

El peso molecular del polímero (longitud) es un factor importante para la eficiencia de la una floculación, si el peso molecular es demasiado bajo, puede ser posible que no se formen los puentes, y si es demasiado alta, el polímero puede difícilmente disolverse y dispersarse (Rushton et al., 2000).

Los polímeros sintéticos utilizados como floculantes han ganado mucha atención, ya que pueden elaborarse a base de diferentes monómeros (Rushton et al., 2000). Por otra parte, pueden ser diseñados para ser catiónicos, aniónicos y no iónicos, así como diferentes pesos moleculares, que amplían sus aplicaciones (Rushton et al., 2000).

QUITOSAN

El quitosan es un polímero lineal de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, producido en la desacetilación de la quitina, un polímero natural de gran importancia. La quitina es el segundo biopolímero más abundante en el mundo, después de la celulosa. Su precio a nivel industrial es de siete dólares por kilogramo y es producido por la empresa ALDRICH Chemistry.

Las principales fuentes explotadas son dos crustáceos marinos, camarones y cangrejos. Se encuentran en las conchas de estos crustáceos marinos, como desecho de las procesadoras de productos pesqueros y comercializadoras de productos con quitina. Las conchas contienen 15-40% de quitina, 20-40% de proteínas, y 20-50% de carbonato de calcio, seguidas por pigmentos y sales de metales en menores proporciones (Kurita, 2006). Encontrándose, la quitina, también en la cutícula de los krill (20-30%), calamares (20-40%), almejas y ostras (3-6%), cutículas de insectos (5-25%) y en la pared celular de hongos (10-25%) (Sandford, 2003).

El quitosan tiene propiedades únicas entre los biopolímeros, especialmente por la presencia de grupos amino primarios y su interés comercial debido al alto contenido de nitrógeno en comparación con la celulosa (Roberts, 1992). El quitosan es insoluble en cualquier solvente orgánico o agua. Sin embargo, es soluble en ácidos acuosos debido a la presencia de los grupos libres amino (Kurita, 2006).

El uso industrial potencial del quitosan es ampliamente reconocido. Este versátil material es usado en ingeniería biomédica, farmacia, odontología, oftalmología, biotecnología, química, cosméticos, textiles, papel, enología, industria de comida, agricultura y fotografía (Rinaudo, 2006; Harish and Tharanathan, 2007). En la medicina, la quitina y quitosan, han demostrado ser efectivos en suturas de heridas, demostrando buena cicatrización, biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Debido a su notable actividad hemostática, se han estado utilizando bandas de quitosan, por paramédicos en las fuerzas de Los Estados Unidos, en Iraq y Afganistán, para parar el sangrado instantáneamente. Así como también, fibras de algodón y esponjas de quitosan, son ahora comúnmente usadas, por veterinarios en Japón, para limpiar heridas de animales (Kurita, 2006).

El quitosan se caracteriza por ser un biopolímero catiónico natural (100% cationicidad y un peso molecular de 0.31×10^6 Da), no tóxico, biodegradable, recurso renovable, aceptado ecológicamente, eficaz contra bacterias, virus y hongos, posee la capacidad de encapsular y a su vez, eliminar contaminantes. Sus aplicaciones potenciales son de floculante para tratamientos de aguas, reducción de la turbiedad en efluentes de procesadoras alimenticias, coagulación de sólidos suspendidos, suspensiones orgánicas y minerales, floculación de suspensiones bacterianas, interacción con moléculas cargadas negativamente, recuperación de proteínas, eliminación de moléculas de colorante por procesos de adsorción, reducción de olores, tratamientos de lodos, filtración y separación, y polímero asistido para ultrafiltración (Renault, et al., 2009).

FLOCULANTES SINTETICOS

Son Floculantes orgánicos a base de acrilamida. La acrilamida es un producto químico intermedio (un monómero) empleado en la síntesis de poliacrilamidas. Se presenta como un polvo blanco cristalino. Es soluble en agua, etanol, metanol, dimetil éter y acetona; no es soluble en heptano ni benceno. Se polimeriza

rápidamente al alcanzar el punto de fusión o al ser expuesto a la luz UV. La acrilamida sólida es estable a temperatura ambiente, pero puede polimerizarse violentamente cuando se mezcla o expone a agentes oxidantes. En los estados unidos la producción anual es de 80 a 100.000 toneladas. Se emplea fundamentalmente como floculante en el tratamiento del agua de suministro a las poblaciones y en el procesado de la pulpa de papel. Se emplea también para retirar sólidos en suspensión de las aguas residuales de la industria antes de su vertido, reutilización o eliminación. Sin embargo existe un gran número de otras posibles aplicaciones, como aditivo en cosméticos, acondicionadores de suelos, procesado de minerales y en la formulación de agentes selladores para diques, túneles y alcantarillados. El hábito de fumar es una fuente conocida de exposición a la acrilamida.

Los floculantes FO 4990, FO 4550 y FO 4290, producidos por la empresa SNF manufacturer of flocculants and coagulants, son floculantes catiónicos, a base de poliacrilamida. Poseen una cationicidad en moles de 99%, 45% y 20% y un peso molecular de 6×10^6 , 8.5×10^6 y 9.5×10^6 Dalton respectivamente. Tienen un costo de \$4.0/kg por la compañía SNF FLOERGER (Francia).

Figura 3. Chitosan



Fuente: Autora del proyecto

5. METODOLOGIA

5.1 CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO

La especie de micro alga seleccionada para realizar harvesting por floculación fue *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta fue obtenida inicialmente por los colaboradores del laboratorio (UCSD University of California San Diego).

Se inició su cultivo en platos de agar, seguido por frascos de 500 mL y posteriormente 2L.

Figura 4. Transferencia de cultivo de plato a medio líquido.



Figura 5. Transferencia de cultivo de frasco de 500ml a 2 L



Los cultivos fueron crecidos en TAP media (tris-acetate-phosphate media) realizado con 50 mL/L de solución de Beijerinck, 8,5 mL/L de phosphate Buffer, 1 mL/L de trace hunter y 10 mL/L de Tris Acetate.

Así mismo, se crecieron a temperatura del cuarto (25 °C), expuestos 24 h del día a iluminación, mediante paneles fluorescentes (5000 lux), y mezclado por bombeo de aire estéril (filtros de 0.2 µm) continuamente.

Se inocularon dos cultivos independientes de *Chlamydomonas reinhardtii*, dejándose crecer por una semana bajo las condiciones descritas en la parte superior para los experimentos de floculación, y simultáneamente se iniciaron por transferencia cada tres días, nuevos cultivos en medios frescos para asegurar su crecimiento en la fase exponencial, y así tener suficientes cultivos cada semana para realizar los experimentos de floculación.

Figura 6. Cultivos con una semana de crecimiento.



Se realizó un monitoreo diario de densidad celular, por medio de la medición de densidad óptica a una longitud de onda de 750nm usando un espectrofotómetro DU640 Beckman Coulter (Brea, CA).

Figura 7. Muestras para medición de densidad óptica.



Las células fueron contadas usando un hemocitometro (BrighLine, Hausser Scientific, Horsham, PA).

Figura 8. Conteo de células.

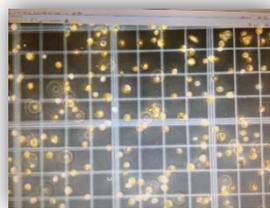


Figura 9. Microscopio.



Todos los experimentos de floculación fueron realizados cuando los cultivos se encontraban con una OD~ 1.0 y una densidad celular alrededor de 5×10^5 cel/mL.

5.2 PREPARACION DE FLOCULANTES

5.2.1 Floculantes FO. Se prepararon con 50mg del respectivo polímero (FO), disueltos en 50 mL de agua R.O, mezclados por una hora en mezclado rápido, por dilución simple, según las capacitaciones previas dadas por la empresa SNF al personal del laboratorio. La concentración final del floculante fue de 1g/L.

Las concentraciones del floculante se utilizan dependiendo de cada FO.

Figura 10. Dilución simple para preparación de FO.



5.2.2 Quitosan. Se agregó 1g de quitosan en 100ml de ácido acético al 1%, mezclando por 24 horas en 60 rpm. La concentración final de floculante fue 10 g/L.

Figura 11. Preparación de Chitosan.



5.3 EXPERIMENTOS DE FLOCULACIÓN

Los experimentos de floculación se realizaron con presencia de EOM (materia orgánica extracelular) y sin presencia de EOM. La extracción de EOM se realizó por medio de centrifugación a 6000 rpm por 6 minutos, y resuspendiendo el centrifugado en medio fresco a la misma concentración celular.

5.3.1 Experimentos de floculación para Floculantes FO. Se tomaron muestras de 50 mL del cultivo en beakers de 100 mL, agregándosele el floculante y mezclando en la placa de agitación magnética en 500 rpm por 40 segundos, seguido de 60 rpm por 2 minutos, al momento exacto en que se agregó el floculante. Al terminar el periodo de 2 minutos 40 segundos, las muestras fueron transferidas a cilindros gravimétricos de 50 mL. La densidad óptica fue medida periódicamente, durante un lapso de una hora, por medio de muestras a los 30 mL de los cilindros gravimétricos.

5.3.2 Experimentos de floculación para Quitosan. Se tomaron muestras de 50 mL del cultivo, en beakers de 100 mL, ajustando el pH a 6.5 con 1M HCl, seguido de la adición del Quitosan, y posterior ajuste del pH nuevamente, pero en este caso a 8.0 con 3M NaOH, agitándose en la placa de agitación magnética a 500 rpm por 2 minutos, seguido de 15 minutos a 60 rpm. Al culminar este periodo de tiempo, las muestras fueron transferidas a cilindros gravimétricos de 50 mL, en donde fue medida la densidad óptica por un lapso de una hora. A los 30 mL de cilindros gravimétricos fueron tomadas las muestras para la medición de densidad óptica.

5.4 EFICIENCIA DE REMOCIÓN

El asentamiento de la biomasa de las algas, tomo lugar en el cilindro gravimétrico de 50 mL por una hora. La eficiencia de remoción del floculante, fue calculada

usando la densidad óptica tomada a los 30 mL de los cilindros gravimétricos, al tiempo cero ($O.D_i$) y al transcurso de una hora de asentamiento de la biomasa ($O.D_f$).

$$ER = \left[1 - \left(\frac{O.D_f}{O.D_i} \right) \right] * 100$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

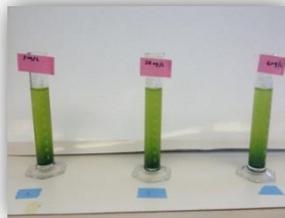
6.1 FLOCULACIÓN UTILIZANDO FO

6.1.1 Floculación con FO 4990

Floculación 1. Cultivos con EOM

FO 4990 [mg/L]	Eficiencia de remoción (%)
3	31
6	16
20	32

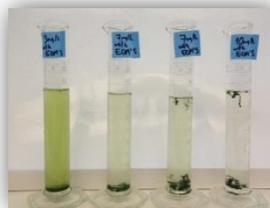
Figura 12. Floculación 1. FO 4990, con EOM.



Floculación 2. Cultivos con EOM

FO 4990 [mg/L]	ER(%)
3	56
7	92
7	91
10	99
10	97
10	98

Figura 13. Floculación 2. FO 4990, con EOM.



Floculación 3. Cultivos sin EOM

FO 4990 [mg/L]	ER(%)
7	96
3	97
1	94
1	95
1	95

Figura 14. Floculación 3. FO 4990, sin EOM.



Se observó que los resultados de la floculación 1 no fueron coherentes ya que la eficiencia de remoción con 3mg/L y con 20mg/L de floculante nos arrojó un resultado similar por esto, este experimento se descartó.

Cabe resaltar que el cultivo no se encontraba en óptimas condiciones, ya que mostraba presencia de contaminación, por esto solo se analizaron los experimentos de floculación 2 y 3.

Se realizaron duplicados, de las concentraciones que obtuvieron máximos porcentajes de remoción, con el fin de confirmar los resultados.

6.1.2 Floculación con FO 4550

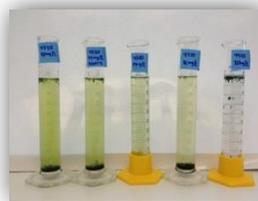
Floculación 1. Cultivos con EOM

FO 4550 [mg/L]	ER (%)
1	5
3	72
5	80
7	82

Floculación 2. Cultivo con EOM

FO 4550 [mg/L]	ER (%)
10	84
12	85
14	89
16	90
20	98
20	97
20	98

Figura 15. Floculación 2. FO 4550, con EOM.



Floculación 3. Cultivos sin EOM'S

FO 4550 [mg/L]	ER (%)
1	60
5	70
7	94
7	97
7	98

Figura 16. Floculación 3. FO 4550, sin EOM. Replica de 7mg/L.



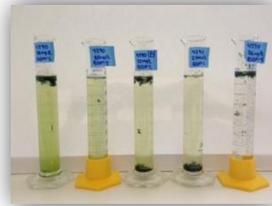
Cabe resaltar que la diferencia entre la primera eficiencia de remoción de 7mg/L y las dos siguientes, se debe al cultivo con el cual se realizó este experimento, ya que presentaba mayor cantidad de EOM'S que el otro cultivo.

6.1.3 Floculación con FO 4290

Floculación 1. Cultivos con EOM'S

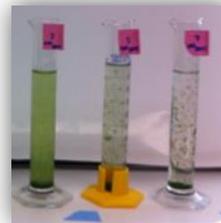
FO 4290 [mg/L]	ER (%)
3	34
5	41
7	48
16	80
20	91
22	92
24	95
26	99
26	98
26	97

Figura 17. Floculación 1. FO 4290, con EOM.



Floculación 2. Cultivos sin EOM'S

FO 4290 [mg/L]	ER (%)
3	80
5	86
7	99
7	95
7	98

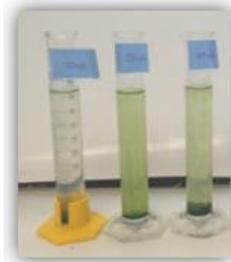


6.1.4 Floculación con Quitosan

Floculación 1. Cultivos con EOM'S

Chitosan [mg/L]	ER (%)
50	97
50	98
50	98
25	30
40	58

Figura 18. Floculación 1. Chitosan, con EOM.



Floculación 2. Cultivos sin EOM'S

Chitosan [mg/L]	ER (%)
25	47
30	82
40	98
40	98
40	99

Figura 19. Floculación 2. Chitosan, sin EOM.



Se realizaron duplicados, de las concentraciones que obtuvieron máximos porcentajes de remoción, con el fin de confirmar los resultados, y las dosis óptimas para cada uno de los floculantes con presencia de EOM fueron:

Floculantes	Dosis optima [mg/L]	Desviación estándar
FO 4990	10	98±1
FO 4550	20	98±0.6
FO 4290	26	98±1
Quitosan	50	97±2

Sin presencia de EOM fueron:

Floculantes	Dosis optima [mg/L]	Desviación estándar
FO 4990	1	95±0.6
FO 4550	7	95±2
FO 4290	7	97±2
Quitosan	40	97±2

Se analizaron los resultados obtenidos, en la floculación, acerca de las dosis óptimas, y se observó la influencia de la materia orgánica extracelular (EOM). Demostrando así, mayor eficiencia de remoción, al no haber presencia de EOM, en el cultivo. Ya que según las eficiencias de remoción arrojadas, los cultivos sin

EOM, necesitaron menor cantidad de floculante, que los cultivos con presencia de EOM, para alcanzar su máxima remoción.

Aunque no hubo una tendencia clara, en la cantidad de polímero requerido, para el caso de los polímeros sintéticos, fue requerido, al menos tres veces menos de polímero, para lograr eficiencias de remoción mayores al noventa y cinco por ciento.

En cuanto a los floculantes sintéticos, la densidad de carga y el peso molecular, influenciaron las eficiencias de remoción de biomasa.

Teniendo en cuenta que los floculantes quitosan, FO 4990, FO 4550 y FO 4290, poseen una cationicidad en moles de 100%, 99%, 45% y 20% y un peso molecular de 0.31×10^6 , 6×10^6 , 8.5×10^6 y 9.5×10^6 Dalton respectivamente. Y observando que la mayor eficiencia de remoción de biomasa, en menor dosis de floculante, la obtuvo FO 4990, el cual posee una de las mayores cationicidades (99%), seguido por FO 4550 (45%) y por último FO 4290 (20%), podemos decir que al floculante poseer a mayor densidad de carga, es necesario menor cantidad de floculante (si se encuentran con peso molecular similar), para obtener eficiencias de remoción superiores a 95%. Es decir, es económicamente viable, ya que se gasta menos cantidad de floculante en el proceso. Solamente cuando los pesos moleculares se encuentran en un rango cercano, como lo son en este caso los floculantes FO, ya que el quitosan, a pesar de su alta cationicidad (100%), posee un peso molecular 100 veces menor que el de los FO y por esto, necesita mayor cantidad de floculante.

A la hora de analizar, cuál es el floculante óptimo ambientalmente, observamos que los floculantes más usados actualmente, son aditivos minerales. Incluyendo sales de metales, tales como, polímeros sintéticos, del cual se destaca, la poliacrilamida, de la cual están hechos los polímeros sintéticos FO. Usando estas

sustancias químicas, se pueden llegar a producir grandes consecuencias ambientales, como un incremento en la concentración de metales en el agua (lo cual puede traer implicaciones a la salud humana), producción de grandes volúmenes de lodos tóxicos y dispersión de oligómeros de acrilamida los cuales también pueden ser perjudiciales para la salud.

Por esta razón, se han considerado, floculantes alternativos para las aplicaciones ambientales (Renault et al., 2008).

Los biopolímeros, son de gran interés ya que son naturales y tienen bajos costos, caracterizándose por poseer un comportamiento amigable con el medio ambiente y debido a que son biodegradables, sus sedimentos, producto de la floculación, pueden ser degradados eficientemente por microorganismos. Entre estos polímeros, el Chitosan puede ser considerado como uno de los floculantes más prometedores (Bratby, 2006).

El sulfato de aluminio es uno de los floculantes más usados actualmente en floculación para tratamiento de aguas. El desempeño del alumbre ya no necesita ser aprobado, debido a su apreciado bajo costo, facilidad de uso y disponibilidad. Sin embargo, produce gran cantidad de lodos que son difíciles de deshidratar, su eficiencia es totalmente dependiente del pH y cuando se forman los flocs en agua fría no son mecánicamente resistentes. En adición, el uso del aluminio es preocupante y el debate de su toxicidad sigue abierto. Ya que a altas concentraciones en agua pueden tener implicaciones en la salud humana, los floculantes ecológicos se presentan como una alternativa interesante para los procesos de floculación (Bratby, 2006).

Se ha incrementado el uso de floculantes sintéticos de origen polimérico orgánico, como lo son los usados en este trabajo. En comparación con el alumbre, algunas de las ventajas de estos polímeros son: requerimientos de dosis de floculante

inferiores, aumento de la tasa de separación de sólido y líquido que surge de tamaños de aglomerado más grandes, la eficiencia a bajas temperaturas, un volumen menor de los lodos, un proceso menos dependiente del pH y un nivel reducido de aluminio en el agua tratada. Productos basados en polímeros también mejoraran la decantación y aumentan la dureza del floc. Sin embargo, aunque se encuentra una amplia gama de polímeros sintéticos solubles en agua, los problemas potenciales asociados con su uso son la falta de biodegradabilidad y toxicidad de polímero (Bratby, 2006).

Es por esto que el quitosan es el floculante más amigable con el medio ambiente, ya que se caracteriza por ser un biopolímero catiónico natural, no tóxico, biodegradable (de esta manera, los lodos producidos, pueden ser degradados por microorganismos), renovable, no corrosivo, fácil de tratar y aceptado ecológicamente.

El costo estimado de la producción de quitosan está entre siete dólares por kilogramo, lo cual es suficiente para tratar 50.000 a 500.000 L de agua dependiendo de la concentración de algas, es más costoso que los polímeros sintéticos, como los polímeros de acrilamida, pero no es tóxico y es biodegradable, contribuyendo así al medio ambiente (Thome et al., 1997).

7. CONCLUSIONES

- ✓ La presencia de EOM afecta significativamente la eficiencia de floculación, necesitando así mayor cantidad de floculante para remover más del 95% de biomasa.
- ✓ La densidad de carga y el peso molecular, del floculante influyen en la eficiencia de remoción del cultivo.
- ✓ En el caso de los polímeros sintéticos, fue requerido mayor nivel de cationicidad (%), para decrecer la dosis de floculante, en presencia de EOM.
- ✓ En la ausencia de EOM no hubo una tendencia clara sobre la cantidad de polímero requerido, pero para el caso de los polímeros sintéticos, al menos 3 veces menos de polímero fue requerido para lograr > 95 % de eficiencia de floculación.
- ✓ La dosis optima del quitosan para obtener eficiencias de floculación > 95 %, en la presencia y en la ausencia de EOM difiere solo por 20% (50 y 40 mg/L respectivamente).
- ✓ Las mejores condiciones de floculación fueron logradas con el polímero sintético FO 4990 a las dosis de 10 y 1 mg/L, en la presencia y ausencia de EOM respectivamente.
- ✓ El floculante más amigable con el medio ambiente es el quitosan, ya que se caracteriza por ser un biopolímero catiónico natural, no tóxico, biodegradable, renovable, no corrosivo, fácil de tratar y aceptado ecológicamente.

8. RECOMENDACIONES

Una vez concluida la tesis, se considera interesante investigar sobre otros aspectos relacionados con las micro algas de agua dulce y su floculación, tales como la optimización de floculante, la influencia del peso molecular de los floculantes, las dosis óptimas de floculante en ausencia de materia orgánica extracelular y la floculación con agentes anionicos y neutros.

Teniendo en cuenta el crecimiento de las micro algas, también se considera importante investigar sobre su óptimo crecimiento y condiciones de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

BERNHARDT, H., 1985. Reaction mechanism involved in the influence of algogenic organic matter on flocculation. *Abwass. For.* 18, 18-30.

BOLTO, B., Gregory J., 2007. Organic polyelectrolytes in water treatment. 2007. *Water research* 41. 2301-2324.

BRATBY, J., 2006. Coagulation and flocculation in wáter and wastewater treatment. IWA.

DIVAKARAN, R., SIVASANKARA-PILLAI, V.N., 2001. Flocculation of algae using Chitosan. *Journal of Applied Phycology*: 14: 419-422, 2002.

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 Tecnology* 118 (2012) 418-424.

GRIESBECK, C., KOBL, I., HEITZER, M., 2006. *Chlamydomonas reinhardtii*, A protein Expression System for Pharmaceutical and biotechnological Proteins. *Molecular Biotechnology* 34, 213-220.

HARISH-PRASHANTH, K.V., THARANATHAN, R.N., 2007. Chitin/chitosan: modofications and their unlimited applications potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology* 18. 117-131.

HARRISON, R.G., TODD, P., RUDGE, S.R., PETRIDES, D.P., 2003. *Bioseparation Science and Engineering*. Oxford University Press, New York, NY.

HENDERSON, R., et al. 2008a. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid – liquid separation of algae. *Water Res.* 42, 1827 – 1845.

KURITA, K., 2006. Chitin and chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. Department of material and life science, Seikei University. Vol. 8, 203-226.

KNAPPE, D.R.U., et al. 2004. *Algae Detection and Removal Strategies for Drinking Water treatment Plants*. Awwa Research Foundation, Raleigh, NC.

MAYFIELD, S.P., FRANKLIN, S., LERNER, L., 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 438-442.

SANDFORD, PA., 2003. Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization. In: *advances in chitin science*, Vol.6, Varum, K.M., Domard, A., Smidsrod, O., eds. (Trondheim: NTNU) pp 35-42.

SHARMA, B.R., DHULDHOYA, N.C., Merchant, U.C., 2006. Flocculants-an Ecofriendly Approach. *J Polym Environ* 14:195-202.

SPECHT, E., MIYAKE-STONER, S., MAYFIELD, S., 2010. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 32: 1373-1383.

RASALA, B.A., et al. 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* 8, 719-733.

RENAULT, F., SANCEY, B., BADOT, P.M., CRINI, G., 2009. Chitosan for coagulation/flocculation process – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal* 45. 1337-1348.

RINAUDO, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 603-632.

ROBERTS, G., 1992. *Chitin chemistry*. London: MacMillan.

ROSEN, J.D., 2002. Acrylamide in food: is it a real threat to public health? A Position Paper of the American Council on Science and Health. Department of food science. New Brunswick NJ 08901-8520.

RUSHTON, A. 2000. *Solid-Liquid Filtration and Separation Technology*. WILEY-VCH, Weinheim.

TENNEY, M.W., ECHELBERG, W.F., SCHUESSELER R.G., PAVONI J.L., 1969. Algal Flocculation with Synthetic Organic Polyelectrolytes. *Applied microbiology*. Vol. 8, No. 6: 965-971.

THOME, J.P., JEUNIAUX, C., WELTROWSKI, M., 1997. Applications of chitosan for the elimination of organochlorine xenobiotics from wastewater. Goosen MFA, ed. Pp 309-331.

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.

WALKER, T., PURTON, S., BECKER, D.K., COLLET, C., 2005. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.* 24, 629-641.

ANEXOS

ANEXO A. Cumplimiento

CUMPLIMIENTO			
Actividades	Cumplió	No Cumplió	Observaciones
Capacitación previa	X		
Capacitación sobre el cultivo y floculación de las micro algas	X		
Cultivos de micro algas de agua dulce	X		
Monitoreos a los cultivos	X		
Transferencia de cultivos	X		
Procesos de floculación	X		
Reuniones	X		