

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA SEMILLA DE *Moringa oleifera*
COMO AGENTE FLOCULANTE PARA REMOCIÓN DE *Chlorella vulgaris* y
*Ankistrodesmus sp***

William Andrés Morales Flórez

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
2018**

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA SEMILLA DE *Moringa oleifera*
COMO AGENTE FLOCULANTE PARA REMOCIÓN DE *Chlorella vulgaris* y
*Ankistrodesmus sp***

William Andrés Morales Flórez

Para optar al título de Médico Veterinario y Zootecnista

**Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos
Acuáticos - GRITOX**

**Directora
Tatiana María Mira López**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
2018**

Nota de aceptación.

TATIANA MARIA MIRA LOPEZ
DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos – GRITOX. Por permitirme realizar este trabajo y por sus aportes a mi crecimiento académico, profesional y personal en el tiempo que he trabajado con ellos.

A la Doctora Tatiana María Mira López por compartir sus conocimientos, confianza y asesoría además del apoyo en cada momento en la realización de este trabajo.

El mayor agradecimiento a mis padres por el apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida, a sus consejos y enseñanzas que me han hecho llegar hasta lo que soy hoy.

TABLA DE CONTENIDO

1. LISTA DE FIGURAS	6
2. LISTA DE TABLAS.....	9
3. RESUMEN	10
4. INTRODUCCIÓN	11
5. OBJETIVOS	14
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
5.2 OBJETIVO ESPECIFICO	14
6. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS	15
6.1 Revisión de literatura.....	15
6.2 Inicio de inoculación de las cepas de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Ankistrodesmus</i> sp.	15
6.3 Escalamiento y mantenimiento de las cepas de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Ankistrodesmus</i> sp para la obtención de biomasa algal suficiente para la ejecución de la evaluación de floculación.....	19
6.4 Seguimiento de condiciones de cultivo de microalgas.....	22
6.5 Obtención de harina de la semilla de <i>Moringa oleífera</i>	23
6.6 Determinación de la dosis óptima de coagulante a base de harina de semilla de <i>Moringa oleífera</i> y eficiencias de coagulación para cosecha de microalgas..	29
7. RESULTADOS OBTENIDOS	33
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES.....	38
10. BIBLIOGRAFÍA	39

1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Montaje de sistema de aireación y revisión de condiciones	15
Figura 2. Revisión de sistema de iluminación	15
Figura 3. Pesaje en balanza a analítica.	16
Figura 4. Preparación de Agar–Agar + medio de cultivo.....	16
Figura 5. Primeros rayados de las muestras colectadas.....	17
Figura 6. Visualización de crecimiento algal en los rayados iniciales	17
Figura 7. Nuevos rayados microbiológicos con Agar-Agar + N.P.K.	18
Figura 8. Diluciones seriadas.	18
Figura 9. Proceso de escalamiento bajo normas de.	19
Figura 10. Visualización del proceso de escalamiento.	19
Figura 11. Visualización del proceso de escalamiento de <i>Ankistrodesmus sp.</i> , ...	19
Figura 12. Proceso de preparación de medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital).20	
Figura 13. <i>Ankistrodesmus sp</i> en crecimiento bajo condiciones de laboratorio medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)	20
Figura 14. <i>Chlorella vulgaris</i> en crecimiento bajo condiciones de laboratorio medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)	20
Figura 15. <i>Adecuación</i> , mantenimiento, reparación y desinfección de tanques acrílicos (Biorreactores) para el escalamiento de las cepas de microalgas en grandes volúmenes	21

Figura A16. Mantenimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en volúmenes grandes en cilindros acrílicos con aireación constante y seguimiento del crecimiento, con escalamientos periódicos	21
Figura A17. Biomasa algal en ambiente externo mantenido en medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)	21
Figura 18. Visualización las dos cepas de microalgas.	22
Figura 19. Mediciones de parámetros de agua.	23
Figura 20. Semillas descascaradas de <i>Moringa oleífera</i>	23
Figura 21. Semillas de <i>Moringa oleífera</i> con cáscara	24
Figura 22. Semillas descascaradas de <i>Moringa oleífera</i>	24
Figura 23. Molido de la semilla de <i>Moringa oleífera</i>	24
Figura 24. Pesaje de semilla molida en fresco	25
Figura 25. posterior secado de la semilla en horno.	25
Figura 26. Tamizaje de la harina.	25
Figura 27. Harina seca con partículas de tamaño homogéneo.	26
Figura 28. Liofilización de la harina.	26
Figura 29. Medición de humedad.	27
Figura 30. Pesajes iniciales de muestras.	27
Figura 31. Pesaje de cenizas en balanza analítica.....	27
Figura 32. Medición de proteína y procedimiento de titulación	28
Figura 33. Determinación de lípidos en equipo Soxhlet	28

Figura 34. Pesaje de dosis.	31
Figura 35. Fase de agitación rápida.	31
Figura 36. Fase de agitación lenta.	31
Figura 37. Visualización de la formación de flóculos.	32
Figura 38. Visualización de la formación de flóculos de microalgas después de la aplicación del biofloculante.	32
Figura 39. Evaluación de dosis de floculante en <i>Ankistrodesmus sp.</i>	34
Figura 40. Evaluación de dosis de floculante <i>C. vulgaris</i>	35

2. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de condiciones ambientales.	22
Tabla 2. Parámetros de calidad de agua.	23
Tabla 3. Composición bromatológica de la harina de semilla de <i>Moringa oleifera</i>	26
Tabla 4. Diseño experimental de evaluación de diferentes dosis de floculante y sus diferentes tiempos para <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Ankistrodesmus sp.</i>	30

3. RESUMEN

En acuicultura, microalgas como *C. vulgaris* y *Ankistrodesmus sp.*, tienen relevancia por su potencial en alimentación. Su cosecha tradicionalmente se realiza con compuestos químicos, sulfato de aluminio y cloruro de hierro. Causando efectos negativos por el consumo de estas sustancias. La floculación es un proceso alternativo para reducir la necesidad de tecnologías costosas y contaminantes, la harina de semilla de *Moringa oleífera* es potencial biofloculante, por presencia de proteínas catiónicas, bajo costo y poca toxicidad. Por lo anterior, el objetivo de este estudio, fue determinar la dosis de biofloculante con harina de semilla de *Moringa oleífera* para cosechar microalgas. Fue realizado un diseño factorial 5 x 4 completamente al azar: cuatro dosis de harina de *M. oleífera* (10, 15, 20 y 1.000 mg/L) y 50 mg/L de sulfato de aluminio (control), cuatro tiempos de floculación (5, 10, 15 y 20 minutos), con 6 réplicas por tratamiento. Para calcular la eficiencia de la floculación, se evaluó la absorbancia inicial y final a una longitud de onda de 650 nm. Encontrando que para *Ankistrodesmus sp* el control, en términos generales presentó la mejor eficiencia de floculación con respecto a las dosis evaluadas de floculante de semilla de MO; en el caso de *C vulgaris* se observó una eficiencia igual a la del control con una dosis de 1000 mg de floculante en todos los tiempos evaluados. Estos resultados muestran que la harina de semilla de MO actúa como biofloculante de *Ankistrodesmus sp* y *C vulgaris* mostrando su posible uso para la obtención de biomasa algal.

4. INTRODUCCIÓN

La investigación de alternativas biológicas para el cosechamiento de algas se basa en tres puntos principales, altos costos de operación con métodos sofisticados como la centrifugación, el ultrasonido o las filtraciones con micromembranas, eficiencia variable que depende del tipo de especies que se estén manejando y la contaminación secundaria y variación en los productos terminados por el uso de agentes químicos como el sulfato de hierro o el cloruro de aluminio que en su conjunto han resultado una salida parcial a la problemática existente en la recuperación de biomasa microalgal.

Sin embargo, la fase de cosecha y poscosecha de la biomasa algal representa un gasto considerable de energía y recursos que pueden representar cerca de un 35% del costo total de producción (Gudin,1986).

De este modo, desarrollar tecnologías para cosechar eficientemente microalgas podría optimizar la viabilidad económica de la producción algal con técnicas eficientes de gran interés industrial, las cuales, deben requerir menos consumo de energía y productos químicos y a su vez reducir costos. Además de no causar daño a los productos obtenidos durante el proceso de extracción.

La floculación podría ser una gran opción para cosechar microalgas a un costo muy razonable. Se han utilizado algunos floculantes inorgánicos como el cloruro de hierro (FeCl_3) y el sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)$) incluyéndose también algunos polímeros orgánicos sintéticos como los derivados de la poliacrilamida y de polietileno. A pesar de contar con muy buenas propiedades coagulantes, la biomasa cosechada de microalgas con este tipo de sustancia puede incidir en la calidad del producto por la presencia de algunas trazas de metales, lo que no la hace apta para utilizarse en el campo de fertilización de cultivos, alimentación animal como en la acuicultura, por la afectación en las propiedades organolépticas

de su carne y las repercusiones que trae consigo en la salud humana. Para este último caso se reporta la existencia de daños a nivel de salud por ser conductor en los procesos de alzhéimer y cáncer (Ahmad et al., 2011).

Los floculantes basados en biopolímeros naturales ejercen una función de biofloculantes, que cuando se cumplen las condiciones óptimas logran recuperar la biomasa de las microalgas de manera simple y rápida sin recurrir a ningún equipamiento especial o gasto energético (Lee et al., 2009). Aun así, existe la necesidad de investigar más sobre este tema para garantizar la viabilidad económica y la sostenibilidad de este proceso. Un ejemplo de materia prima que tiene propiedades biocoagulantes es la semilla de *Moringa oleífera* (MO), con la ventaja de que cada parte de la planta puede ser utilizada en la alimentación humana o con propósitos medicinales y farmacéuticos (Hamid et al., 2014) y cuyo crecimiento se da en zonas tropicales y subtropicales. La *M. oleífera* que ya ha sido incursionada en las investigaciones por sus propiedades, en países del continente Asiático como Malasia y en Suramérica para la cosecha de microalgas (Abdul Hamid et al, 2014), actualmente está a disposición en la región de la Orinoquia, que además presenta un rápido crecimiento y es económicamente asequible, lo que facilitaría su estudio (Talreja, 2010) y se contribuiría con la incursión de conocimiento regional, sobre la eficiencia en el uso de la harina de semillas de *Moringa oleífera* como una alternativa para la cosecha de algunas especies de microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp*, microalgas con alto potencial de producción de biomasa y de compuestos de alto valor agregado. La *Chlorella*, es una especie de clorófitas altamente estudiada en el mundo por alta adaptabilidad y porque en los mercados actualmente ocupa gran importancia monetaria. En el 2003, la producción de *Chlorella* reportó cerca de 2000 toneladas anuales, con fines netamente proteicos. También muy utilizada en el ámbito medicinal por sus propiedades contra fallas renales y por fomentar la producción de lactobacilos a nivel intestinal (Yamaguchi 1997; Brennan y Owende, 2010).

Esta biomasa es de gran importancia para la acuicultura ya que es la primera alimentación de las larvas y disminuye la mortalidad de dichos organismos. Usualmente, se ha dado alimentación a las larvas por su tamaño de la boca, por lo que el tamaño de partícula es esencial, además de que debe contener una matriz nutricional que garantice el buen desarrollo del pez (Hahn et al., 2007).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de la semilla de *Moringa oleífera* como agente floculante para remoción de *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp.*

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar la dosis óptima de coagulante a base de harina de semilla de *Moringa oleífera* para el cosechado de microalgas.

6. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

6.1 Revisión de literatura

Dando cumplimiento a las actividades propuestas dentro del cronograma, se llevó a cabo la revisión de literatura que consistió en búsqueda de guías de cultivo, atlas para el manejo de las cepas de microalgas y artículos científicos, entre otros materiales bibliográficos necesarios para la planeación y ejecución del objetivo del proyecto, para el análisis de resultados y para la escritura de informes.

6.2 Inicio de inoculación de las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp.*

Inicialmente se realizaron trabajos de mantenimiento y adecuación del área de trabajo, correspondientes al sistema de aireación e iluminación en el laboratorio donde se realizó el aislamiento, inoculación y montaje del cultivo de las cepas de microalgas (Figuras 1 y 2).



Figura 1. Montaje de sistema de aireación y revisión de condiciones



Figura 2. Revisión de sistema de iluminación

Se realizó el aislamiento de las cepas y se prosiguió a la etapa de inoculación y siembra inicial en medio F/Guillard y luego a medio a N.P.K. (Remital) esto llevado con la correspondiente verificación de las condiciones físicas y ambientales del cultivo de los cultivos de microalgas (Ver figuras 3 -6).



Figura 3. Pesaje en balanza a analítica (OHAUS EXPLORER PRO EP214) de micro y macro nutrientes para la preparación de medio de cultivo.



Figura 4. Preparación de Agar-Agar + medio de cultivo.

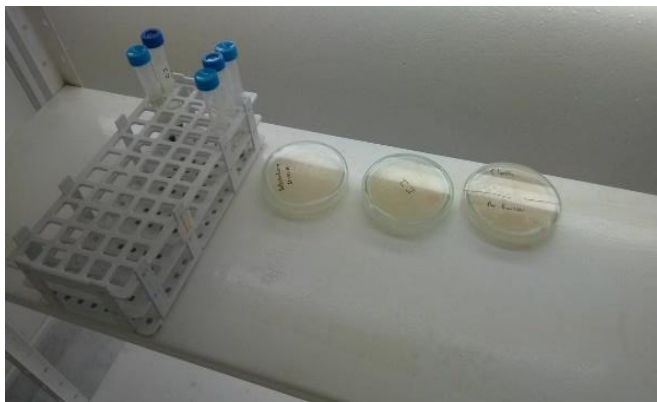
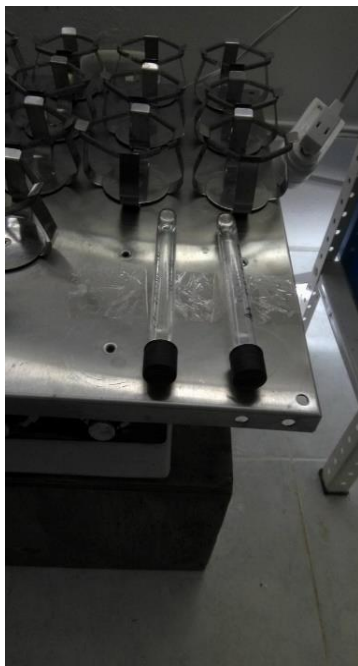


Figura 5. Primeros rayados de las muestras colectadas para su posterior proceso de aislamiento y diluciones seriadas que no presentaron crecimiento exponencial adecuado por lo cual se requirió repetir el proceso completó cambiando el medio de cultivo.

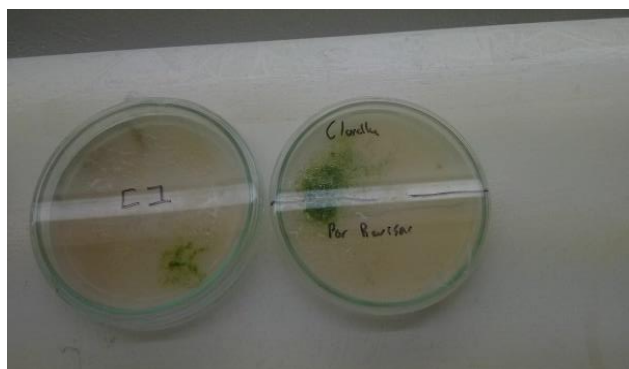


Figura 6. Visualización de crecimiento algal en los rayados iniciales

Posteriormente a lo presentado en el primer proceso de rayados y sembrados sin buenos resultados se prosiguió a repetir el proceso realizando el cambio a medio de cultivo por Remital ® N.P.K. con una dosis de 2 g/L para su crecimiento, mantenimiento y escalamiento de cultivo a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 12/12 (L:O) con lámparas de neón de 72 Watts y aireación constante suministrada por medio de un aireador (Sweetwater S-41, Florida, USA). Con el anterior procedimiento se observaron mejores resultados (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Nuevos rayados microbiológicos con Agar-Agar + N.P.K.



Figura 8. Diluciones seriadas para replicación de biomasa algal con observación macro de incremento celular por coloración característica del aumento de clorofila en los medios líquidos.

6.3 Escalamiento y mantenimiento de las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp* para la obtención de biomasa algal suficiente para la ejecución de la evaluación de floculación

Se realizó el seguimiento, control y verificación del crecimiento de las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp* para la obtención de biomasa algal realizando los respectivos escalamientos de volumen de cultivo con los correspondientes protocolos establecidos de manejo, bioseguridad y trabajo de laboratorio. (Figuras 9 –18).



Figura 9. Proceso de escalamiento bajo normas de bioseguridad desarrolladas en Cabina Horizontal de Flujo Laminar. TELSTAR aH-100



Figura 10. Visualización del proceso de escalamiento de *Chlorella vulgaris*, pasando de un volumen de 75cc a 250cc en medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)

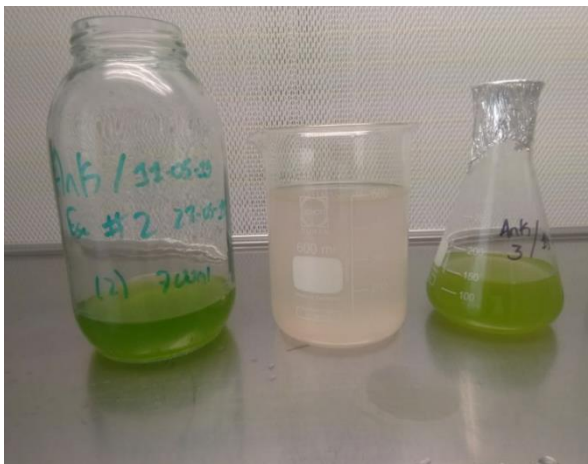


Figura 11. Visualización del proceso de escalamiento de *Ankistrodesmus sp*, pasando de un volumen de 150cc a 700cc en medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)



Figura 12. Proceso de preparación de medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital) y posterior utilización en escalamientos a mayores volúmenes



Figura 13. *Ankistrodesmus sp* en crecimiento bajo condiciones de laboratorio medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)



Figura 14. *Chlorella vulgaris* en crecimiento bajo condiciones de laboratorio medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)



Figura 15. Adecuación, mantenimiento, reparación y desinfección de tanques acrílicos (Biorreactores) para el escalamiento de las cepas de microalgas en grandes volúmenes



Figura A16. Mantenimiento de *Chlorella vulgaris* en volúmenes grandes en cilindros acrílicos con aireación constante y seguimiento del crecimiento, con escalamientos periódicos



Figura A17. Biomasa algal en ambiente externo mantenido en medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)



Figura 18. Visualización las dos cepas de microalgas hasta niveles de biomasa microalgal 450Lts para *Chlorella vulgaris* y 400Lts *Ankistrodesmus sp* en medio de cultivo NPK 17-6-18- (Remital)

6.4 Seguimiento de condiciones de cultivo de microalgas

Fueron evaluadas condiciones de calidad de agua del cultivo de las dos microalgas durante todo el tiempo del cultivo y en todas las fases. Fueron medidas las condiciones ambientales del laboratorio donde se mantenían las cepas y volúmenes menores (< 5 L) y en el invernadero dónde se mantienen los volúmenes mayores (> 5 L) dos a tres veces por día durante todo el tiempo de ejecución del Proyecto. Las variables medidas fueron Temperatura y humedad ambiental; y temperaturas y humedades máximas y mínimas, los resultados son expresados como promedio $\pm$ desviación estándar y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de condiciones ambientales del laboratorio Vs condiciones externas del invernadero.

Parámetro	Laboratorio	Invernadero
Temperatura (°C)	21,09 $\pm$ 0,69	28,34 $\pm$ 2,81
Humedad (%)	59,88 $\pm$ 7,85	71,11 $\pm$ 11,51
Temperatura máxima (°C)	21,61 $\pm$ 2,24	32,05 $\pm$ 3,53
Temperatura mínima (°C)	20,33 $\pm$ 0,63	22,80 $\pm$ 1,87
Humedad máxima (%)	66,26 $\pm$ 8,47	84,27 $\pm$ 9,82
Humedad mínima (%)	52,87 $\pm$ 8,21	54,71 $\pm$ 9,76

En los volúmenes mayores fueron evaluadas cada semana, condiciones de calidad de agua del cultivo, utilizando un fotómetro YSI 9500 (Figura 19). Las variables medidas fueron temperatura, pH, dureza, amonio y nitritos; los resultados son expresados como media $\pm$ desviación estándar y se muestran en la Tabla 2.



Figura 19. Mediciones de parámetros de agua de cultivo de microalgas

Tabla 2. Parámetros de condiciones de calidad de agua de los cilindros de cultivo.

Parámetro	<i>Chlorella vulgaris.</i>	<i>Ankistrodesmus sp.</i>
Temperatura (°C)	25,05 $\pm$ 0,18	25,10 $\pm$ 0,12
pH	4,55 $\pm$ 0,13	5,16 $\pm$ 0,69
Dureza(mg/L CaCO ₃)	108,33 $\pm$ 20,95	68,33 $\pm$ 7,20
Amonio (mg/L)	0,41 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,05
Nitritos (mg/L)	0,17 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,09

6.5 Obtención de harina de la semilla de *Moringa oleífera*

Se obtuvo material vegetal de *Moringa oleífera* correspondiente a vainas y semillas, las cuales fueron deshidratadas, secadas, separadas de la vaina y de la cáscara. Se molieron en el laboratorio de nutrición del IALL y fueron sometidas a

líoilizado para la posterior elaboración de la harina a utilizar en los ensayos preliminares y de calibración de floculación (Figuras 20 -28).



Figura 20. Vainas y semillas de *Moringa oleífera*



Figura 21. Semillas de *Moringa oleífera* con cáscara



Figura 22. Semillas descascaradas de *Moringa oleífera*



Figura 23. Molido de la semilla de *Moringa oleífera*



Figura 24. Pesaje de semilla molida en fresco para su posterior secado



Figura 25. posterior secado de la semilla en horno a 45°C por 18 horas



Figura 26. Tamizaje de la harina seca por ojo de 1000 μ m para homogenizar tamaño de partícula



Figura 27. Harina seca con partículas de tamaño homogéneo lista para la utilización de las dosis de biofloculante



Figura 28. Liofilización de la harina para ensayos preliminares con Liofilizador CHRIST alfa 1-2 LDplus

También se realizó un análisis bromatológico de la harina para la verificación de sus componentes (Figura 29 - 33), los resultados pueden ser observados en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición bromatológica de la harina de semilla de *Moringa oleifera*.

Materia seca (%)	Proteína bruta (%)	Extracto etéreo (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)
81,80	38,04	45,84	5,78	18,19



Figura 29. Medición de humedad en Equipo KERN MLS_N Vr. 2.0



Figura 30. Pesajes iniciales de muestras para determinación de Cenizas, Lípidos y Proteína



Figura 31. Pesaje de cenizas en balanza analítica



Figura 32. Medición de proteína y procedimiento de titulación



Figura 33. Determinación de lípidos en equipo Soxhlet

6.6 Determinación de la dosis óptima de coagulante a base de harina de semilla de *Moringa oleífera* y eficiencias de coagulación para cosecha de microalgas

Para evaluar la eficiencia de *Moringa oleífera* en la floculación y cosecha de *C. vulgaris* y *Ankistrodesmus sp.*, fue realizado un diseño factorial 5 x 4 (Dosis de floculante x Tiempos de floculación) completamente al azar: cuatro dosis de harina de *M. oleífera* (10, 15, 20 y 1.000 mg/L) y 50mg/L de sulfato de aluminio (control) y cuatro tiempos de floculación (5, 10, 15 y 20 minutos), con 6 réplicas por tratamiento. Como control se utilizó sulfato de aluminio $Al_2(SO_4)_3$ a una dosis de 50 mg.L⁻¹ de acuerdo a lo reportado por Léo et al. (2009) (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental de evaluación de diferentes dosis de floculante y sus diferentes tiempos para *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus sp.*

	Dosis (mg de Harina/L de Cultivo)	Tiempo de Agitación lenta (Min)
1	10	5
2	10	10
3	10	15
4	10	20
5	15	5
6	15	10
7	15	15
8	15	20
9	20	5
10	20	10
11	20	15
12	20	20

13	1000	5
14	1000	10
15	1000	15
16	1000	20
17	Control*	5
18	Control*	10
19	Control*	15
20	Control*	20

* 50 mg/L de $Al_2(SO_4)_3$

El proceso de floculación se realizó por el método de jarras, que consiste en colocar volúmenes de 400 ml de cultivo de microalgas en “jarras” (beaker 600 ml) 6 unidades experimentales en un floculador digital donde se agitan con un sistema de paletas. Se aplicaron las dosis de harina propuestas, y se mezclaron rápidamente a 150 rpm por 5 minutos c/u y luego un se agitaron lentamente en un tiempo de 5, 10, 15 y 20, minutos a 30 rpm. Posteriormente se dejó sedimentar el floc formado, durante 30 minutos antes de hacer las lecturas de absorbancia, las cuales se hicieron en cada una de las réplicas de los tratamientos a 650 nm en un fotómetro YSI® 9500. La eficiencia de floculación se estimó a partir de la diferencia entre la absorbancia antes y después de cada tratamiento. Procedimiento puede ser observado en las figuras 34 a la 38.



Figura 34. Pesaje de dosis de harina de semilla de Moringa como biofloculante

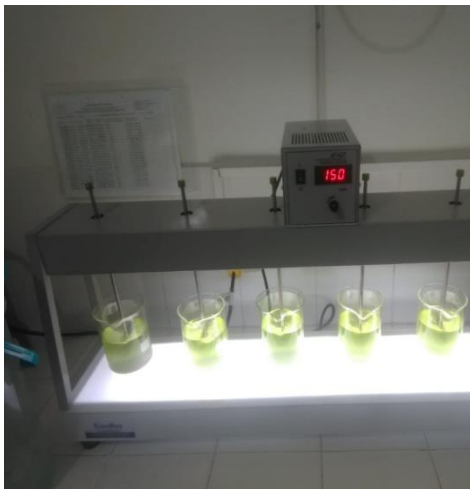


Figura 35. Fase de agitación rápida a 150 rpm/1m por 5 min (estándar para todos los tratamientos)



Figura 36. Fase de agitación lenta a 30 rpm/1m. en los diferentes tiempos establecidos como tratamientos: 5, 10, 15 y 20 min.

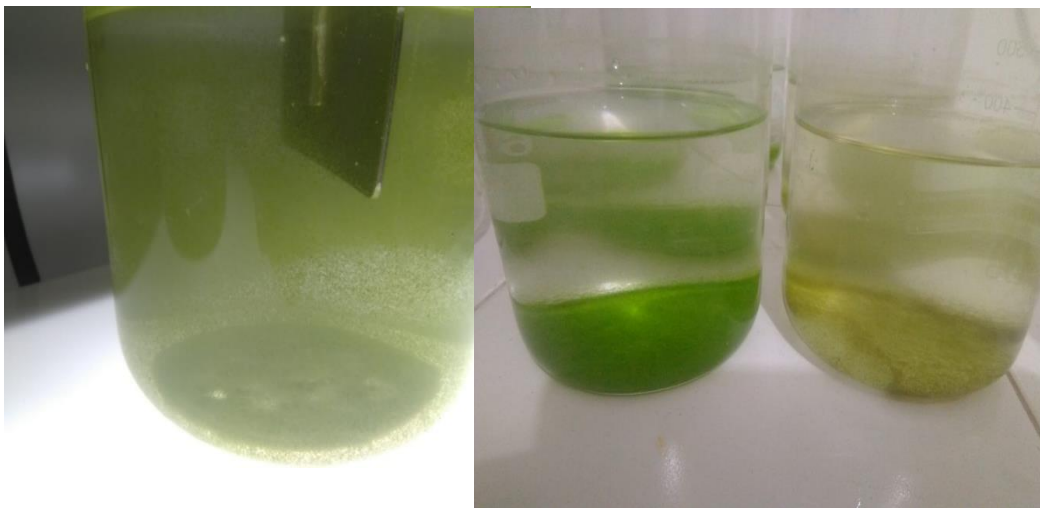


Figura 37. Visualización de la formación de flóculos de microalgas después de la aplicación de las dosis de biofloculante.



Figura 38. Visualización de la formación de flóculos de microalgas después de la aplicación del biofloculante a partir de harina de semilla de *Moringa oleifera* con las diferentes dosis y tiempos de agitación lenta evaluados

7. RESULTADOS OBTENIDOS

Los datos son expresados como media $\pm$ desviación estándar de la media. Luego de la comprobación de los supuestos estadísticos se comparó el comportamiento de las dosis en los diferentes tiempos y dentro de cada tiempo con con prueba de comparación múltiple de Tukey previo análisis anova *one way test*. Tanto la estadística descriptiva, como los análisis comparativos fueron realizados con el software Graphpad Prism Version 5.01.

Cuando se compararon las diferentes dosis en cada tiempo de floculación para *Ankistrodesmus sp.* (Figura 39, letras minúsculas diferentes) en 5, 10 y 15 minutos, todos los tratamientos fueron menos eficientes que el control ($p < 0.05$). Cuando se floculó a 20 minutos el tratamiento con 1000 mg/L de harina de semilla y el control fueron más eficientes que las dosis menores.

Para *C. vulgaris* (Figura 40, letras minúsculas diferentes) en 5 y 10 minutos la dosis de harina de 1000 mg fue la de mayor eficiencia de floculación; en 15 minutos la dosis de 1000 mg presentó la mayor eficiencia comparada con 10 y 15 mg de harina y con el control; finalmente, en 20 min de floculación, la dosis de 1000 mg fue la más eficiente comparada con las dosis menores y sin diferencia con respecto al control y el control, fue más eficiente que las dosis de 10 y 15mg de harina.

Al comparar la misma dosis de harina en los diferentes tiempos de floculación de *Ankistrodesmus sp* (Figura 39, letras mayúsculas diferentes), en la dosis de 10, 1000 mg y el control, la floculación fue igual en todos los tiempos; la dosis de 15 mg, solo fue menos eficiente con 5 min que con 15 min de floculación y la dosis de 20 mg, solo presentó diferencia significativa en los tiempos de floculación de 10 y 15 min.

En el caso de *C. vulgaris* (Figura 40, letras minúsculas diferentes), las dosis de 10 y 1000 mg no tuvieron diferencias entre los tiempos de floculación; la de 15 mg solo hubo mayor eficiencia con 15 min al compararla con la obtenida en 5 y 20 min; en la dosis de 20 mg, la eficiencia de floculación en 15 min fue mejor que la de 10 min; finalmente, el control fue más eficiente en el tiempo de 20min comparado con el de 5min.

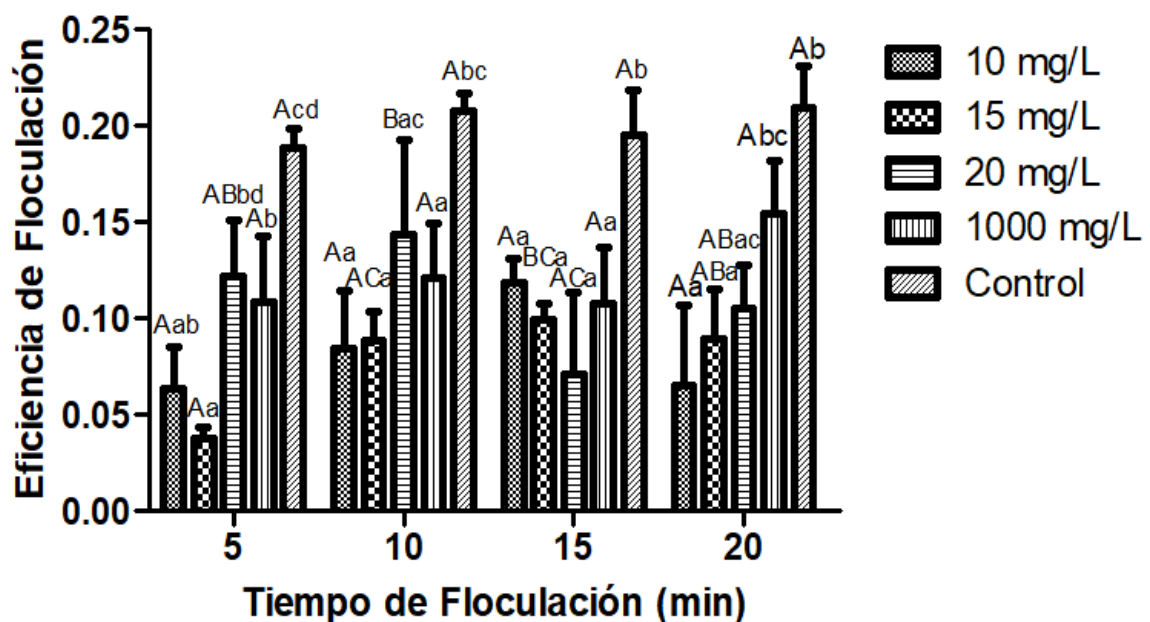


Figura 39. Evaluación de dosis de floculante y tiempos de floculación para *C. vulgaris*. Letras mayúsculas diferentes representan diferencia significativa de eficiencia de la misma dosis de floculante entre los diferentes tiempos y letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa de eficiencia entre las distintas dosis dentro del mismo tiempo.

Estos resultados demuestran que el efecto de la dosis de floculante y tiempo de floculación, dependen de la especie de microalga utilizada y que la harina de semilla de *Moringa oleifera* actúa como biofloculante de *Ankistrodesmus sp* y *C. vulgaris*, para la obtención de biomasa algal apta para ser usada como materia prima en la alimentación de peces.

Con los datos obtenidos para *C. vulgaris* se puede concluir que la harina de semilla de *Moringa oleifera* es una alternativa de biofloculante eficiente para la cosecha de microalgas de esta especie; además es posible decir que posee ventajas sobre el Sulfato de Aluminio (Control) al no poseer toxicidad ni residualidad

La dosis de 1000 mg harina de semilla de *Moringa* de tuvo mejores resultados que el control en los 4 tiempos, esta dosis como floculante se puede definir para este experimento como la dosis optima en la cosecha de *C. vulgaris*.

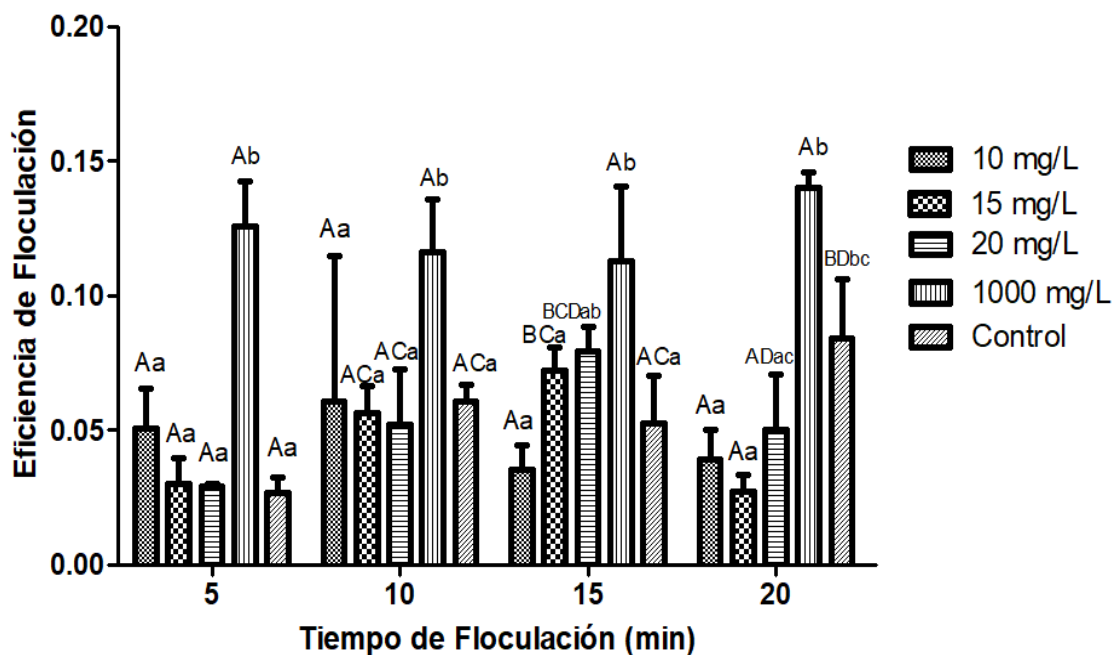


Figura 40. Evaluación de dosis de floculante y tiempos de floculación para *Ankistrodesmus sp.* Letras mayúsculas diferentes representan diferencia significativa de eficiencia de la misma dosis de floculante entre los diferentes tiempos y letras minúsculas diferentes representan diferencia significativa de eficiencia entre las distintas dosis dentro del mismo tiempo.

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, el mercado de microalgas está muy dominado por *Spirulina* y *Chlorella vulgaris* con una producción mundial combinada anual de 5000 t; que asciende al 50% de la producción total de algas en todo el mundo (E. Becker 2007). *C. vulgaris*, posee un tamaño pequeño (5-50 μm) y una baja densidad de microalgas en el rango de 1030-1140 kg / m³ (J. Liu et al 2013, C. Banerjee et al 2012, A Ghaly et al 2015) caso similar para *A. fusiformis* cuyo tamaño puede variar de 1 a 6 μm de ancho y 22-60 μm de largo(RRL Guillard et al 1972), lo que complica el proceso de cosecha sin la selección de un método de tratamiento adecuado. Por lo tanto, la recolección eficiente de microalgas ha sido uno de los principales focos en los últimos años, con énfasis en varios métodos de naturaleza química, biológica o física (Al Barros et al 2015) en este sentido, la aplicación del método de floculación y biofloculación resulta en una alternativa económica y eficiente frente a los componentes químicos utilizados comúnmente, en dónde; Idealmente la coagulación / floculación química debería: (i) no ocasionar contaminación de biomasa; (ii) conducir a una posterior sedimentación de biomasa de alta eficiencia; (iii) permitir la reutilización del medio de cultivo; (iv) considerar el impacto ambiental; y (v) ser barato y no tóxico cuando se aplica a gran escala (Molina et al 2003) Los floculantes químicos a pesar de poseer altas eficiencias de cosecha, el uso en el procesamiento de microalgas conlleva a problemas con el aluminio residual excesivo que conduciría a una contaminación potencial (H.-M. Oh et al 2001) y limitaciones en el reciclado del medio de cultivo con potencial para inhibir el posterior crecimiento de microalgas (A. Ghaly et al 2015, D. Vandamme et al 2013) estos lineamientos de reutilización y disminución de la residualidad se enfocan al uso de coagulantes naturales como el caso de MO, por su aporte de proteínas catiónicas actuando sobre la carga superficial sobre las microalgas. Estas cargas pueden neutralizarse mediante la adición de productos químicos conocidos como floculantes. Encontrándose estudios sobre floculación

de *Chlorella sp.* con proteínas de la semilla de MO descrita como un floculante eficaz con una eficiencia de floculación del 90% (Hamid et al., 2014) En estudios recientes en busca de alternativas de floculantes, se reveló que la recolección de *C. vulgaris* por bio-floculación utilizando polvo de siembra de la nuez de desbroce, *Strychnos potatorum*. La máxima eficiencia que se logró con esta semilla en polvo es 99.68% a una concentración de 100 mg / L a 150 rpm de velocidad de agitación a 35 ° C tiempo de asentamiento de 30 min. El estudio general expresó que la semilla en polvo de *S. potatorum* podría probablemente ser bio-floculante para biomasa de microalgas, contando con características similares a las de la harina de semilla de MO, siendo una alternativa prometedora ante floculantes químicos costosos e inseguros. Además, este tipo de biofloculante estableció su utilidad para cosechar células de microalgas de manera económica, efectiva y ecológica (Razack et al., 2015). Materias primas naturales con usos similares y de alta eficiencia como almidón de arroz y su potencial como floculante ecológico son las principales motivaciones para formular la investigación actual. (Sook Yan Choy et al 2018). De esta manera alternativas para la floculación con materias primas encontradas en la región como el caso de MO son viables, dentro de los resultados encontrados en este estudio. Además de haber observado en el caso de *C. vulgaris* que el uso de harina de semilla de MO tuvo resultados iguales o superiores al efecto del control utilizado, siendo este sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$). Ratificando su efecto positivo en busca de mejoras las tecnologías de cosecha y buscando el menor impacto contaminante sobre el producto final.

9. CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que el efecto de la dosis de floculante y tiempo de floculación, dependen de la especie de microalga utilizada . La harina de semilla de *Moringa oleifera* actúa como biofloculante de *Ankistrodesmus sp* y *C. vulgaris*, para la obtención de biomasa algal apta para ser usada como materia prima en la alimentación de peces.

Con las datos obtenidos para *C.vulgaris* se puede concluir que la harina de semilla de *Moringa oleifera*, es una alternativa de biofloculante eficiente para la cosecha de microalgas de esta especie; además, es posible decir que posee ventajas sobre el Sulfato de Aluminio (Control) al no poseer toxicidad ni residualidad.

La dosis de 1000 mg de harina de semilla de *Moringa*, tuvo mejores resultados que el control en los 4 tiempos, esta dosis como floculante se puede definir para este experimento como la dosis óptima de en la cosecha de *C. vulgaris*.

Para el caso de *Ankistrodesmus sp* todos los tratamientos tuvieron un desempeño inferior al control, pero el tratamiento que podría ser viable para reemplazar al Sulfato de Aluminio (Control), es la dosis de 1000 mg de harina de semilla de *Moringa oleifera* con un tiempo de floculación de 20 minutos por ser el único igual al control, siendo alternativa verde al uso de este químico.

Finalmente, se observó que el uso de harina de semilla de *Moringa oleifera* tiene un efecto de floculación positivo sobre cultivos celulares de microalgas de las especies *C. vulgaris* y *Ankistrodesmus sp*, bajo las condiciones de cultivo mantenidas, postulándose como alternativa para la cosecha de microalgas destinadas como materia prima para la elaboración diversidad de productos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- GHALY, A. HAMMOUD, A. Métodos de cosecha de microalgas para la producción industrial de biodiesel: revisión crítica y análisis comparativo J. Fundam. Renovar. Aplicación de energía , 5, 2015. p. 100 -154.
- SIRAJUNNISA, Abdul. SURENDHIRAN, Duraiarasan. SHELLOMITH, Santhalin. AS KEERTHANA, Muralikrishnan. Sign in Statistical optimization of harv... Statistical optimization of harvesting using a novel bio-source, Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands), ISSN: 2215-017X, Vol: 7, 2015 Page: 150-156.
- AHMAD AL, MAT.YASIN, NH. DEREK, CJC. Lim, JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15(1) 2011. :584-593.
- BARROS, AI ,. GONÇALVES, AL. SIMÕES, M, JCM. Pires Técnicas de cosecha aplicadas a las microalgas: una revisión Renovar. Sostener. Energy Rev. , 41 2015. pp. 1489 – 1500
- ALVES BAPTISTA, Aline. OLIVEIRA SILVA, Mariana. GUTTIERRES GOMES, Raquel. BERGAMASCO, Rosângela. FERNANDES VIEIRA, Marcelo. SALCEDO VIEIRA, Angélica Marquetotti. Protein fractionation of seeds of Moringa oleifera lam and its application in superficial water treatment. Separation and Purification Technology, ISSN: 1383-5866, Vol: 180, 2017. Page: 114-124
- ALREJA, T. Screening of crude extract of flavonoids of moringa oleifera against bacteria and fungal. *Journal of phytology*, 2(11) 2010. 31-35.
- BRENNAN, L. OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2), 2010.pp.557–577.

- BRILHANTE RAIMUNDA, Sâmia. NOGUEIRA SALES, Jamille Alencar. PEREIRA VANDBERGUE, Santos. CASTELO-BRANCO, Débora de Souza. COLLARES MAIA, Cordeiro. Rossana, de AGUIAR. DE SOUZA SAMPAIO, Célia Maria. DE ARAÚJO NETO, Paiva. MANOEL SANTOS, João Bosco. FEITOSA DOS SIDRIM, José Júlio. COSTA ROCHA, marcos fábio. Gadelha; Research advances on the multiple uses of Moringa oleifera: A sustainable alternative for socially neglected population. Asian Pacific journal of tropical medicine, ISSN: 2352-4146, Vol: 10, Issue: 7, 2017. Page: 621-630.
- BANERJEE, C. GUPTA, P. MISHRA, S. SEN, G. SHUKLA, P. BANDOPADHYAY, R.; Estudio de la floculación de algas injertada con poliacrilamida en almidón hacia aplicaciones en la cosecha de biomasa de algas En t. J. Biol. Macromol. , 51, 2012. pp. 456 – 461
- VANDAMME, d. FOUBERT i. MUYLAERT, k. La floculación como método de bajo costo para cosechar microalgas para la producción de biomasa a granel Trends Biotechnol. , 31, 2013. pp. 233 – 239
- BECKER e. Microalgas como fuente de proteína Biotechnol. Adv. , 25, pp. 2007. 207 – 210
- GUDIN C, tcb. Of solar energy into organic chemicals by microalgae. A. in B.P. 1986; 6:73–110. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. Advances in Biotechnological Processes,(6): 1986. 73-110.
- H.-M, Oh. SJ Lee, M.-H. Park, H.-S. Kim, H.-C. Kim. J.-H. Yoon. G.-S. Kwon, B.-D. Yoon; 2001. Cosecha de Chlorella vulgaris utilizando un biofloculante de Paenibacillus sp. AM49 Biotechnol. Letón. , 23, pp. 1229 - 1234
- J. Liu, Y. Zhu, Y. Tao, Y. Zhang, A. Li, T. Li , M. Sang , C. Zhang Microalgas de agua dulce cosechadas mediante floculación inducida por disminución del pH Biotechnol. Biocombustibles , 6 (2013) , pp. 1 – 11

- LÉDO, pg,.LIMA, rf. PAULO, j. DUARTE, ma. Estudio comparativo de sulfato de aluminio y semillas de Moringa oleífera para la depuración de aguas con baja turbiedad. Información tecnológica, 20(5): 2009. 3-12.
- MENDOZA, i. FERNÁNDEZ, n. ETTIENE, g. Uso de la Moringa oleifera como coagulante en la potabilización de las aguas Use of Moringa oleifera as coagulant in the water treatment. Ciencia, 8(8): 2000. 235–242
- MOLINA GRIMA, e. BELARBI, eh. ACIÉN FERNÁNDEZ, fg. ROBLES MEDINA, a. Chisti. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnol Adv;20: 2003. 491-515.
- PAPAZI, a. MAKRIDIS, p. Divanach, P. Harvesting Chlorella minutissima using cell coagulants. , (November 2008), 2010. pp.349–355.
- RRL Guillard , CJ Lorenzen.. Algas verde-amarillas con clorofilida C. J. Phycol. , 8, 1972.pp. 10 – 14.
- SITI HAJAR, Abdul Hamid. FATHURRAHMAN LANANAN, Helena Khatoon. AHMAD JUSOH, Azizah Endut. A study of coagulating protein of Moringa oleifera in microalgae bio-flocculationInternational Biodeterioration & Biodegradation, ISSN: 0964-8305, Vol: 113, 2016. Page: 310-317
- SOOK YAN, Choy. KRISHNA MURTHY, Nagendra Prasad. TA YEONG, Wu. MAVINAKERE ESHWARAIAH, Raghunandan. SIEW-MOI PHANG JOON CHING, Juan. RAMAKRISHNAN NAGASUNDARA, Ramanan. Starch-based flocculant outperformed aluminium sulfate hydrate and polyaluminium chloride through effective bridging for harvesting acicular microalga Ankistrodesmus. Algal Research, ISSN: 2211-9264, Vol: 29, 2018. Page: 343-353.
- SOOK YAN Choy; KRISHNA MURTHY Nagendra Prasad; TA YEONG Wu; MAVINAKERE ESHWARAIAH Raghunandan; SIEW-MOI Phang; JOON CHING Juan; RAMAKRISHNAN NAGASUNDARA Ramanan; Separation of Chlorella biomass from culture medium by flocculation with rice starch. Algal Research, ISSN: 2211-9264, Vol: 30, 2018. Page: 162-172.
- TEIXEIRA, cml. KIRSTEN, fv. TEIXEIRA, pcn. Evaluation of Moringa

oleifera seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 24(3) 2012.:557-563.

- YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan , with special reference to utilization of biomass and metabolites : a review. *Journal of Applied Phycology*, 1997. 487-502.