

## Evaluación del crecimiento celular en *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor de columna de burbujeo bajo diferentes espectros de luz.

Mario Octavio Martínez de la Cruz <sup>1</sup>, Juan Carlos Robles Heredia <sup>1,\*</sup>, Asteria Narváez García <sup>1</sup>, Claudia Alejandra Aguilar Ucán <sup>1</sup>, Yunuén Canedo López <sup>1</sup>, Alejandro Ruiz Marín <sup>1</sup>, José del Carmen Zavala Loria <sup>2</sup>, Harley Mauricio Nieves Huchin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de biotecnología, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen, Ciudad del Carmen, Campeche, México

<sup>2</sup> Universidad Internacional Iberoamericana. Calle 15 No. 36 entre 10 y 12. Colonia IMI III. C.P. 24560. San Francisco de Campeche, Campeche. México.

\*Autor de correspondencia: jrobles@pampano.unacar.mx.

**Energías Renovables** (Biocombustibles).

**Resumen:** En la presente investigación se evaluó crecimiento celular de la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes espectros de luz (blanca, azul, violeta, roja) a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en fotobiorreactores (FBR) de columna de burbujeo; finalizando cada experimento se realizó la extracción de la biomasa centrifugando el medio de cultivo a 4,000 rpm por 10 min. Se observaron máximos crecimientos celulares de  $1.33 \times 10^{-7}$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de luz blanca,  $8.83 \times 10^{-6}$  cel  $\text{mL}^{-1}$  luz azul,  $9.88 \times 10^{-6}$  cel  $\text{mL}^{-1}$  roja y  $7.50 \times 10^{-6}$  cel  $\text{mL}^{-1}$  luz violeta y una tasa máxima de crecimiento específico  $\mu = 0.0229 \text{ d}^{-1}$ . Por el alto crecimiento celular se puede indicar que no hubo daño por fotoinhibición; el máximo crecimiento celular, así como el mayor consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  (60%) se presentaron en condiciones de luz blanca.

**Palabras clave:** *Chlorella vulgaris*, fotobiorreactor, luz.

## Evaluation of the microalgal growth in *Chlorella vulgaris* in a bubble column photobioreactor under different light spectra.

**Abstract:** In the present investigation, cell growth of the *Chlorella vulgaris* microalgae was evaluated at different light spectra (white, blue, violet, red) at  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in bubble column photobioreactors (PBR); At the end of each experiment, the biomass extraction was carried out, centrifuging the culture medium at 4,000 rpm for 10 min. Maximum cell growths of  $1.33 \times 10^{-7}$  cell  $\text{mL}^{-1}$  white light,  $8.83 \times 10^{-6}$  cell  $\text{mL}^{-1}$  blue light,  $9.88 \times 10^{-6}$  cell  $\text{mL}^{-1}$  red and  $7.50 \times 10^{-6}$  cell  $\text{mL}^{-1}$  violet light and maximum specific growth rate  $\mu = 0.0229 \text{ d}^{-1}$ , were observed. Due to the high cell growth it can be indicated that there was no damage by photoinhibition; the maximum cell growth, as well as the highest consumption of  $\text{N-NH}_4^+$  (60%), occurred in white light conditions.

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, photobioreactor, light.

### Introducción

Muchos países han buscado fuentes de energía alternativas que sean sustentables y limpias; dentro de estas fuentes de energía renovables existen los biocombustibles que son de gran interés, ya que propician una reducción de las emisiones de gas de efecto invernadero (Mata et al., 2010). El biodiesel es un combustible líquido que recibe un gran interés debido a sus ventajas sobre el diésel fósil, (Demirbas, 2010).

Las microalgas son más viables como materia prima y alternativa para la obtención de biomasa para la producción de biocombustibles, debido a su crecimiento, no requiere grandes extensiones de tierras como los cultivos convencionales, utilizan aguas residuales o marinas sin competir con la alimentación humana, (Abomohra et al., 2013), al igual muchas especies de microalgas tienen un corto tiempo de duplicación con una alta eficiencia de fijación de  $\text{CO}_2$  de más de 10 veces en comparación con las plantas mayores como lo especifica Kim et al. (2017), ya que a diferencia de la biomasa lignocelulósica, las microalgas pueden producirse en estanques o biorreactores, minimizando el impacto de la producción de biomasa en la agricultura, pueden producirse durante todo el año, sus estructuras de pared celular no contienen lignina, que forma una barrera física para la hidrólisis enzimática (kim et al., 2014).

Las microalgas son fotoautótrofas, esto quiere decir que pueden utilizar la luz como única fuente de cuyas características espectrales y cantidad pueden afectar su fotosíntesis, tasa de crecimiento y composición de los componentes celulares, lo que afecta su valor nutricional para su uso energía (Mata et al., 2010). A su vez la calidad de la luz juega un papel importante en la composición bioquímica de la microalga, (Muller-Feuga et al., 2003; Dubinsky y Stambler, 2009). La luz roja está relacionada con una alta eficiencia de conversión de carbono de las células de

microalgas, mientras que las enzimas clave en la acumulación de triglicéridos de la fotosíntesis están controladas por la longitud de onda de la luz azul (Yan et al., 2016).

En estudios sobre la comercialización de microalgas como biomasa *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas* se conocen como los candidatos más apropiados para la materia prima de microalgas a base de carbohidratos en la producción de bioetanol (Brányiková et al., 2011; Cheng et al., 2011). Además, se sabe que el estrés ambiental cambia la composición de las microalgas y debe tenerse en cuenta para maximizar el contenido de carbohidratos de las microalgas. También que el control de factores ambientales como los nutrientes, la luz y la temperatura en el cultivo afectan tanto al crecimiento de las algas como a la composición de la biomasa. Por lo antes mencionado se estudió el efecto de la exposición a diferentes espectros de luz, utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*, como una alternativa para el crecimiento celular en fotobiorreactor de columna de burbujeo. Estos resultados servirán para que más adelante sean de utilidad para continuar con todo el proceso de esta investigación, ya que se pretende evaluar las condiciones más aptas para la producción de Biodiesel y Bioetanol por la microalga *Chlorella vulgaris*, considerando el tipo de luz que brinde los mejores rendimientos a partir de la biomasa obtenida (Datos preliminares: Martínez-de la Cruz, 2021).

## Materiales y Métodos

La microalga se aclimató a condiciones de cultivo de luz blanca continua ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), en los laboratorios de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Carmen, en Cd. del Carmen, Camp. México; para el medio de cultivo se requieren las siguientes soluciones: cinco soluciones de sales, una de metales traza (medio f/2 de Guillard y Ryther), (Guillard y Ryther, 1962) y una de vitaminas:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $15.6 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $7.0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ,  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $15.0 \text{ mg L}^{-1}$ ; la solución stock de los metales traza se prepararon soluciones independientes para cada metal traza:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.98 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.20 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $18.0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{NaMo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.63 \text{ g L}^{-1}$ ; se disolvieron  $3.15 \text{ g}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $4.36 \text{ g}$  de  $\text{Na}_2\text{EDTA}^+$  en  $900 \text{ mL}$  de agua destilada, para agregar  $1 \text{ mL}$  de cada una de ellas a la solución de EDTA mencionada, se aforó a  $1 \text{ L}$  y se agitó. La solución alcanzó un pH igual o menor a 2 (Robles-Heredia, 2014). Para la preparación de la solución con vitaminas se utilizó un producto comercial (vitamina FORZE VF Q-10) para obtener una concentración de tiamina  $4.33 \text{ g}$ ; se extrajo el contenido de 3 cápsulas, el cual se mezcló en  $100 \text{ mL}$  de agua destilada, posteriormente se filtró para evitar la presencia de residuos sólidos y se mantuvo en refrigeración continua (Ruiz-Marín et al., 2010).

Se utilizaron 4 fotobiorreactores utilizando botellas de PET con un volumen de  $2.5 \text{ L}$  de medio de cultivo en cada uno; para cada FBR se utilizaron 2 botellas del mismo material con capacidad de  $1 \text{ L}$ , una con  $500 \text{ mL}$  de agua destilada y la segunda con  $500 \text{ mL}$  de agua clorada al 20%; para la aireación y mezclado, se utilizaron dos bombas de aire para pecera ELITE 799, mangueras de  $4 \text{ mm}$  para inyectar el aire en la botellas con agua destilada y posteriormente conectarse al FBR con el medio y las células, de tal modo que se realice el proceso de mezclado; el aire expulsado del FBR, se hizo pasar a una solución clorada contenida en una segunda botella, (Robles-Heredia, 2014); Tres FBR fueron forrados con una capa de un derivado de celulosa la cual absorberá la luz y la reemite a distintas longitudes de onda: blanca ( $400\text{-}750 \text{ nm}$ ), azul ( $450\text{-}500 \text{ nm}$ ) y roja ( $620\text{-}750$ ). A su vez se utilizaron 5 Barras LED en la parte trasera y 5 en la delantera, en los lados se utilizaron 3 lámparas fluorescentes de  $1.3 \text{ W}$  de  $0.55 \text{ M}$  de largo, distribuidas de manera vertical, con la finalidad de obtener  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El flujo de aireación se mantendrá de manera constante a  $2.5 \text{ vvm}$  con la finalidad de mantener un mezclado homogéneo en el cultivo de acuerdo a la Figura 1.

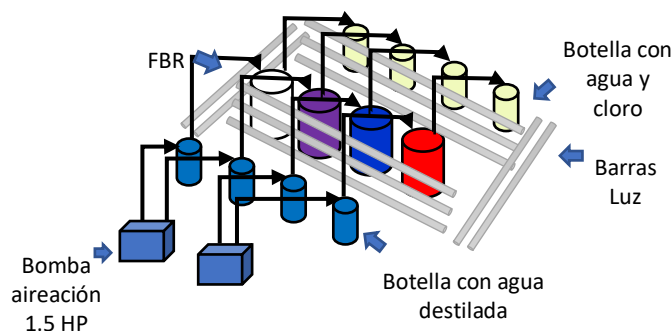


Figura 1. Ensamblado de los fotobiorreactores desde el compresor hasta la botella contenedora de cloro.

La densidad celular se verificó cada 24 h, mediante conteo celular con cámara Neubauer Hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad; se tomó 1 mL de muestra de cultivo y posteriormente se colocó en la cámara para ser observada al microscopio con un lente de 40x, posteriormente se realizó el conteo celular, como se presenta en Ecuación 1.

$$DC \text{ (cel mL}^{-1}\text{)} = \text{Células contadas} \times 10,000 \quad (1)$$

Para el método de biomasa peso seco se filtró un volumen de 10 mL del medio con biomasa microalgal utilizando un filtro a peso constante, como se presenta en Ecuación 2. El filtro con la muestra se introdujo en una estufa por 24 h a 130 °C, después de este tiempo se colocó en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente, el filtro se pesó y mediante diferencia de pesos se obtuvo el valor de la biomasa en peso seco de la muestra, donde BPS es biomasa peso seco, PF<sub>1</sub> es filtro con biomasa, PF<sub>0</sub> filtro sin biomasa y v es el volumen del medio filtrado de la muestra en mL (Robles-Heredia, 2014).

$$BPS(\text{gL}^{-1}) = PF_1 - PF_0 V * 1000 \quad (2)$$

Para realizar la determinación de consumo de nitrógeno se filtró 50 mL de medio de cultivo agregándole 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para mantenerse en refrigeración. Posteriormente se dividió en 2 muestras en matraces a 25 mL, a cada una se le agregó 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Después se preparó en 2 matraces 25 mL de solución indicadora de ácido bórico, a cada uno se les agregó 3 gotas de indicador Shiro Toshiro; las muestras de cultivo se destilaron en equipo Buchi micro kjeldahl y se colectaron 50 mL en los matraces con la solución de ácido bórico se tituló o estandarizó cada una de las muestras con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N hasta que la solución cambio de verde a morado. La concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se determinó como se presenta en Ecuación 3:

$$N - NH_4 = \frac{\text{Volumen de acido gastado} \times 0.02N \times 14}{\text{Volumen de muestra}} \times 1000 \quad (3)$$

El medio se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal. La biomasa recuperada, se congeló a -4.0°C para su conservación, posteriormente se liofilizó por un lapso de 3 días y se mantuvo en refrigeración constante (Ruiz-Marín et al., 2010). Al finalizar el medio se centrifugará a 4,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal, se recolectarán 5 mL de cultivo de microalgas por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Para conocer si existió diferencia significativa en los resultados obtenidos, se realizó análisis de varianza (por sus siglas en ingles ANOVA) para conocer si se obtenía una diferencia significativa en los resultados se utilizaba la prueba Tukey.

## Resultados y Discusión

En la Figura 2 se muestran las gráficas de crecimiento celular de cada experimento por cada 24 h. Como se puede apreciar se indica el desarrollo celular expresado en células x mL<sup>-1</sup> vs tiempo en horas por cada experimento.

Se observa una fase de adaptación en los 4 cultivos, seguido de una fase exponencial muy prominente en el cultivo con luz blanca, seguido del cultivo con luz azul, posteriormente los cultivos con luz roja y violeta, presentan un comportamiento similar de crecimiento, lo que puede sugerir de acuerdo a la literatura que en relación al desarrollo celular, la microalga se adapta mejor a las condiciones de luz blanca, tomando en cuenta las longitudes de onda y el metabolismo celular para que se presente esta situación, además de lo relacionado al tipo de mezclado por la aireación suministrada que se mantuvo constante a 2.5 vvm. De igual manera es importante señalar que los resultados son muy bajos comparados con otros estudios realizados, tomando en cuenta condiciones similares (Lysenko et al., 2021; Sadeghizadeh et al., 2017; Xin et al., 2017, Li et al., 2019).

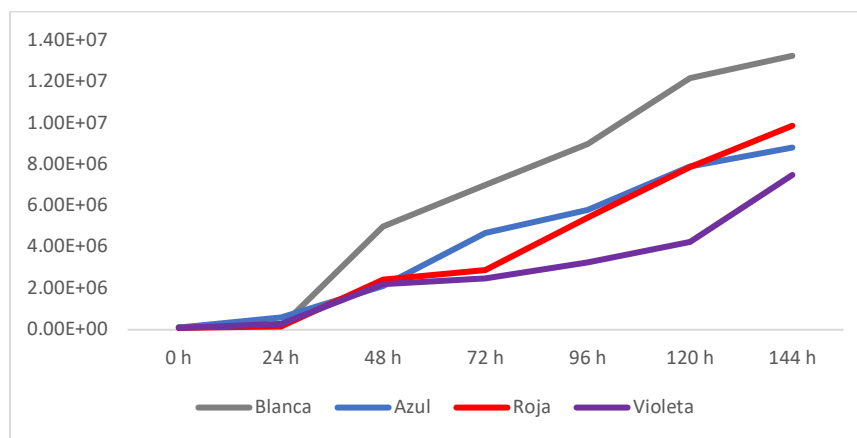


Figura 2. Gráficas de crecimiento celular (cel x mL<sup>-1</sup>) vs Tiempo (h)

En la Tabla 1 se indican los resultados de los parámetros de densidad celular, tasas específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y consumo de nitrógeno de los experimentos realizados; en la cual se puede observar que, comparando estos cuatro experimentos por triplicado, los mejores resultados se observaron en el experimento con espectro de luz blanca, obteniendo una densidad celular de  $1.33 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> y una tasa específica de crecimiento de  $0.0229$  d<sup>-1</sup>, así como un consumo de nitrógeno del 60%, siendo los máximos valores alcanzados del proceso de cultivo. Los experimentos a luz roja, azul y violeta tuvieron un consumo menor del 45-50% de nitrógeno amoniacal y su máxima densidad celular estuvo en el rango de  $7.50$  a  $9.88 \times (10^6$  cel mL<sup>-1</sup>), mientras que  $\mu$  estuvo en el rango de ( $0.160$  a  $0.0168$  d<sup>-1</sup>), se realizó una prueba de ANOVA para conocer si existió una variación significativa en los resultados, si se encontraba una diferencia significativa en los resultados se utilizaba la prueba Tukey, en la cual se pudo observar que los resultados en crecimiento celular y consumo de nitrógeno de los experimentos con luz roja, azul y violeta no tuvieron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). Los resultados obtenidos de crecimiento y remoción de nitrógeno ( $N-NH_4^+$ ), fueron bajos a los reportados por Yan et al. (2016), mientras que Sadeghizadeh et al. (2017) reportan en sus estudios una densidad celular mayor a  $17 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, una tasa específica de crecimiento mayor de  $0.1800$  d<sup>-1</sup> y consumos de ( $N-NH_4^+$ ) del 90%; esto sugiere que al haber un aumento en la densidad celular, las células de microalgas consumen el  $N-NH_4^+$  de su medio, siendo lo esperado en estos casos de cultivos con microalgas, ya que entre mayor número de células menor la cantidad de nutrientes de medio (Robles-Heredia, 2014; Haro y Perales, 2015; Kee-Lam et al., 2016). De acuerdo a los resultados obtenidos de crecimiento celular, como se puede observar, no hay fase de estabilidad, por lo que sería recomendable continuar el cultivo hasta llegar a dicha fase. (Datos preliminares: Martínez-de la Cruz, 2021).

Tabla 1. Experimentos en diferentes espectros de luz suministrados, datos promedio de máxima densidad celular, tasa de crecimiento específico  $\mu$ , consumo de nitrógeno y biomasa peso seco X.

Equipo	Espectro de luz	Máxima densidad celular (cel mL <sup>-1</sup> )	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Consumo N-NH <sub>4</sub> (%)	(X) gL <sup>-1</sup>
FBR	Blanca	$1.33 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$0.0229 \pm 1.16$ <sup>a</sup>	$60.00 \pm 21.31$ <sup>a</sup>	$1.26 \pm 0.28$ <sup>a</sup>
	Azul	$8.83 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$0.0168 \pm 0.90$ <sup>b</sup>	$50.00 \pm 17.91$ <sup>b</sup>	$0.894 \pm 0.47$ <sup>b</sup>
	Rojo	$9.88 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$0.0162 \pm 1.00$ <sup>b</sup>	$49.00 \pm 16.54$ <sup>b</sup>	$0.890 \pm 0.66$ <sup>b</sup>
	Violeta	$7.50 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$0.0160 \pm 0.86$ <sup>b</sup>	$45.00 \pm 17.68$ <sup>b</sup>	$0.80 \pm 0.84$ <sup>b</sup>

\*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ( $p \geq 0.05$ ); ( $\pm$  Desviación estándar).

## Conclusiones

En general se concluye que el espectro de luz blanca es el más adecuado para producción de biomasa microalga comparada con los otros espectros utilizados, la cual tiene una diferencia importante en los resultados obtenidos de las densidades celulares ( $1.33 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>), así como en la reducción de nitrógeno amoniacal (60% N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Estos resultados preliminares son necesarios para interpretar, en relación al crecimiento celular y los otros parámetros indicados, las condiciones de cultivo y tipo de luz que será la más apta para determinar la producción de biodiesel y de bioetanol en la microalga *Chlorella vulgaris*, siendo lo que se pretende obtener como finalidad principal de este estudio. Para esto de igual modo se estará utilizando la biomasa en primera instancia para conocer la productividad de lípidos

y posteriormente, la misma biomasa libre de lípidos se aprovechará para obtener bioetanol a partir de fermentación con levadura. De aquí la importancia de conocer en primer lugar estos resultados, para continuar con el desarrollo del trabajo de investigación.

## Bibliografía

- Abomohra, A. E.-F., Wagner, M., El-Sheekh, M., & Hanelt, D. (2013). Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: screening studies towards biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 931–936. doi:10.1007/s10811-012-9917-y
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers., 108(4), 766–776. doi:10.1002/bit.23016
- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R. (2011). Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36(12), 3541–3549. doi:10.1016/j.renene.2011.04.031
- Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12), 2738–2749. doi:10.1016/j.enconman.2010.06.010
- Dubinsky, Z; Stambler, N (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(), 163–176. doi:10.3354/ame01345
- Guillard, R.R.L & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229-239. doi:10.1139/m62-029
- Haro, S. & Perales, J. A. (2015). Cinética de consumo de nutrientes y crecimiento de un bloom de microalgas en un fotobiorreactor High Rate Algae Pond (HRAP) *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(3), 15-31.
- Kee-Lam, M., Iqram-Yusoff, M., Uemura, Y., Wei-Lim, J., Gek-Khoo, C., Teong-Lee, K. & Chyuan-Ong, H. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. *Renewable Energy*, 103(1), 197-207. doi:10.1016/j.renene.2016.11.032
- Kim, H. M., Oh, C. H., & Bae, H.-J. (2017). Comparison of red microalgae ( *Porphyridium cruentum* ) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 233, 44–50. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.040
- Kim, Kyoung Hyoun; Choi, In Seong; Kim, Ho Myeong; Wi, Seung Gon; Bae, Hyeun-Jong (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 153(), 47–54. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.059.
- Li, D., Yuan, Y., Cheng, D. & Zhao, Q. (2019). Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10. *Bioresource Technology*, 121783–. doi:10.1016/j.biortech.2019.121783
- Lysenko, V., Kosolapov, A., Usovab, E., Tatosyan, M., Vardunya, T., Dmitriev, P., Rajputa, V., Krasnov, V., & Kunitsinaa A.(2021). Chlorophyll fluorescence kinetics and oxygen evolution in *Chlorella vulgaris* cells: Blue vs. red light. *Jornal of plant physiology*, vol. 258-259.
- Martínez-de la Cruz, M.O. (2021). Tesis en desarrollo: Martínez del Cruz Mario.
- Mata, T., Martins, A. and Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp.217-232.
- Muller-Feuga, A., R R., Cahu, C., Robin J. & Divanach. P. (2003). Uses of microalgae in Aquaculture. Charapter 7, Live Feeds in Marine Aquaculture. PS Chow, SM Landhäusser. (2004). Un método para mediciones rutinarias del contenido total de azúcar y almidón en tejidos vegetales leñosos. *Árbol Physiol*, 24, pp. 1129 – 1136
- Robles-Heredia, J. C. (2014). Tesis: Evaluación de la productividad de lípidos en *chlorella vulgaris* y *scenedesmus obliquus* bajo dos modos de limitación de nitrógeno en fotobiorreactores tipo airlift y columna de burbujeo (tesis doctoral). Universidad Autonoma de Yucatán, Yucatán, México.
- Ruiz-Marin, Alejandro; Mendoza-Espinosa, Leopoldo G.; Stephenson, Tom. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semicontinuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 2010, 101, 58–64.
- Sadeghizadeh, A., Farhad dad F., Moghaddasi, L. & Rahimi R. (2017). CO2 capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243(1), 441-447.
- Shi, J., Pandey, P. K., Franz, A. K. Deng, H. & Jeannotte, R. (2016). *Chlorella vulgaris* production enhancement with supplementation of synthetic medium in dairy manure wastewater. *AMB Express*, 6(15), 1-9. doi:10.1186/s13568-016-0184-1.
- Xin, G., Xinyu, W., Haijun, L., Sanja, R., Shyam, S. & Shulin, C. (2017). Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Research*, 23, 20-27. doi:10.1016/j.algal.2016.12.018
- Yan, Cheng; Zhu, Liandong; Wang, Yanxin (2016). Photosynthetic CO2 uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods. *Applied Energy*, 178, 9–18. doi:10.1016/j.apenergy.2016.06.012