

ESTUDIO DEL EFECTO HIDRODINAMICO EN FBR DE COLUMNA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR, REMOCIÓN DE NITROGENO, PRODUCTIVIDAD DE LIPIDOS Y PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN CHLORELLA VULGARIS

Robles-Heredia J.C.^{1*}, Ruiz-Marín A.¹, Narváez-García A.¹, Escalante-Montejo L.E.,
Martínez-De la Cruz M., Canedo-López Y.¹, Pérez-Reda L.J.¹, Tamayo-Hernández F.A.¹,
Zavala-Loría J.C.²

¹ Universidad Autónoma del Carmen. C. 56 #4, Av. Concordia, Col. Benito Juárez, C.P.
24180. Ciudad del Carmen, Campeche, México.

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

*Autor para la correspondencia. e-mail: jrobles@pampano.unacar.mx Tel. 01-938-38-1-10-18 ext 2103.

Recibido: 14 de Septiembre 2019, Aceptado: 12 de Noviembre 2019.

Resumen

En el presente trabajo se analizaron diferentes parámetros bioquímicos como crecimiento celular, remoción de nitrógeno, productividad de lípidos y perfil de ácidos grasos en *Chlorella vulgaris* por efecto hidrodinámico variando la aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y condiciones de luz blanca continua en fotobiorreactor de columna por burbujeo; se realizaron cálculos hidrodinámicos de los FBR para determinar tasa de corte y posible existencia de estrés hidrodinámico a las condiciones de aireación propuestas; los valores alcanzados en la tasa de corte fueron reducidos (0.0025 a 0.0220 s⁻¹), observándose flujo de tipo homogéneo en todos los experimentos; sin embargo los valores máximos de crecimiento celular y tasa específica de crecimiento (μ) fueron de (5.75 x10⁶ cel mL⁻¹ y 0.0229 d⁻¹) respectivamente, de igual manera el mayor consumo de N (60%) y la mayor productividad de lípidos (8.98 mgL⁻¹d⁻¹) se alcanzaron durante el experimento a 0.75 vvm. En relación al análisis del perfil de ácidos grasos se observó mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los experimentos a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm, sin embargo, a 1.25 vvm, se obtuvo una mayor productividad de ácidos grasos saturados (SFA), con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) la mayor concentración se vio reflejada a 0.75 vvm. Los componentes con mayor presencia en el análisis del perfil de ácidos grasos fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2.

Palabras clave: Aireación, Hidrodinámica, fotobiorreactor, productividad de lípidos, perfil de ácidos grasos.

Abstract

In this work we analyzed different biochemical parameters such as cell growth, nitrogen removal, lipid productivity and fatty acid profile in *Chlorella vulgaris* by hydrodynamic effect varying the aeration to (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm and white light conditions continuous in column photobioreactor; hydrodynamic calculations of the FBR were carried out to determine the shear rate and possible existence of hydrodynamic stress at the proposed aeration conditions; the values reached in the shear rate were reduced (0.0025 to 0.0220) s⁻¹, observing flow of homogeneous type in all the experiments; however, the maximum values of cell growth and specific growth rate (μ) were (5.90x10⁶ cells mL⁻¹ and 0.0229 d⁻¹) respectively, as well as the highest N consumption (60%) and the highest productivity of lipids (8.98 mgL⁻¹d⁻¹) were reached during the experiment at 0.75 vvm. In relation to the analysis of the fatty acid profile greater presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) was observed in the experiments at 0.75 vvm, 1.75 vvm and 2.25 vvm, however, at 1.25 vvm, higher productivity of saturated fatty acids (SFA) was obtained; with respect to monounsaturated fatty acids (MUFA) the highest concentration was reflected at 0.75 vvm. The components with the highest presence in the fatty acid profile analysis were C12: 0; C20: 5N3; C24: 1; C 22: 0; C22: 2.

Keywords: Aeration, hydrodynamic, photo-bioreactor, lipids productivity, fatty acid profile.

Nomenclatura

Vvm	volumen de aire por volumen de medio por minuto
FBR	Fotobiorreactor
s ⁻¹	Unidad de tiempo inversa (por segundo)
N	Nitrógeno
%	Porcentaje
CO ₂	Bióxido de carbono
etc.	Etcétera
mL	Mililitros
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	micromoles por metro cuadrado por segundo
mg L ⁻¹	Miligramos por litro
C ₉₀	Concentración a 90 mg L ⁻¹
mg	Miligramos
L	Litros
PET	Politereftalato de etileno
N-NH ₄ ⁺	Ión amonio
NaCl	Cloruro de sodio
CaCl ₂	Cloruro de calcio

MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio hepta hidratado
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
°C	Grados centígrados
atm	Atmosferas
Hp	Caballos de potencia (horse power)
kg cm ⁻²	Kilogramo por centímetro cuadrado
C12:0	Ácido láurico
C20:5N3	Ácido cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico
C24:1	Ácido nervónico
C 22:0	Ácido behénico
C22:2	Ácido cis-13, 16-docosadienoico
h	Horas

Introducción

La población a nivel mundial debe resolver problemas relacionados a desabasto energético, por reducción en las reservas de combustibles fósiles (Harun et al. 2011, Rawat et al. 2011). De aquí la importancia de explorar nuevas fuentes de energía renovables (Park et al. 2011b). Así pues, la biomasa algal podría satisfacer cerca del 25% de las necesidades energéticas mundiales, proveyendo además otros productos biotecnológicos (Rawat et al., 2011).

El cultivo de microalgas ha llamado mucho la atención, debido primordialmente a sus aplicaciones en el secuestro de CO₂, producción de biocombustibles, para alimentación humana y animales, así como para producir biomoléculas de alta calidad. Se estima que existen un gran número de especies algales que están en el rango de 350,000 a 1,000,000, sin embargo, alrededor de 30,000 especies se han estudiado y analizado (Richmond 2004). Las microalgas son microorganismos que pueden coexistir en diversos hábitats naturales. La mayoría de estos microorganismos se consideran fotosintéticos, sin embargo, algunas microalgas pueden reproducirse de manera mixotrófica o heterotrófica (Lee 2004). Los requerimientos generales para un cultivo microalgal exitoso deben incluir luz (fotosintético y mixotrófico), carbono, macronutrientes tales como nitrógeno, fósforo, magnesio y silicatos, así como diferentes micronutrientes (dependiendo de la especie).

Ciertas especies de microalgas de manera natural contienen gran cantidad de lípidos, dichos compuestos pueden incrementarse por las variaciones de diferentes factores como: intensidad y tipo de luz, variaciones de temperatura, salinidad, intensidad de agitación, etc. (Mata et al., 2010; Widjaja et al., 2009).

Algunas especies de microalgas pueden almacenar cantidades importantes de triglicéridos o triacilglicérolas (TAG), que son la materia prima para producir biodiesel. La producción de biodiesel a partir de microalgas no solo depende de la biomasa alcanzada, sino también del contenido de aceite que contiene cada célula.

En especial la microalga *Chlorella vulgaris* es utilizada a menudo en los estudios de producción de biodiesel y otros metabolitos valiosos, por su capacidad de adaptación bajo diferentes condiciones de cultivo e incluso para crecer utilizando aguas residuales como medio de cultivo. (Li et al., 2012).

Las microalgas se pueden cultivar en sistemas abiertos como lagunas o estanques, o cerrados conocidos como fotobiorreactores (FBR) donde existe un mayor control de diferentes factores que pueden beneficiar en la producción de biomasa, producción de lípidos y de otros productos de alta calidad. Los FBR son de materiales transparentes y geometrías diversas, se iluminan interna o externamente; presentan altas productividades, mejoran la eficiencia fotosintética y capacidad de fijación de CO₂. Su inconveniente es su alto costo, por ello es necesario una mejora económica en la creación de FBR (Ho et al., 2012). En este tipo de sistemas se pueden utilizar diferentes tasas de aireación que pueden influir en el crecimiento de las microalgas durante el proceso de cultivo; el mezclado ayuda a que las células dentro del FBR tengan acceso a la fuente de luz y evita acumulación de oxígeno en el medio, de la misma manera evita que las microalgas se adhieran a las paredes del fotobiorreactor o que precipiten, lo que podría provocar un colapso y la muerte celular (Contreras-Flores et al., 2003).

El diseño adecuado de fotobiorreactores es una de las herramientas más importantes para el desarrollo de tecnología fototrófica. Algunas consideraciones en el diseño de fotobiorreactores son: 1) Eficiencia en el aprovechamiento de la energía luminosa, 2) Facilidad de escalamiento, 3) Mezclado eficiente y 4) Control de reacciones laterales. Además es recomendable un bajo estrés hidrodinámico en las células fotosintéticas; para alcanzar esta situación es necesario tomar en consideración ciertas condiciones hidrodinámicas de importancia para el diseño y desempeño de los fotobiorreactores de columna como son: gas hold up (gas remanente), velocidades superficiales de líquido y gas dentro del reactor, además de estimar la tasa de corte. (Grobelaar, 2010; Del campo et al., 2007; Piccolo, 2008; Ugwu et al., 2008; Monkonsit et al., 2011; Hincapie, 2010).

Es necesario considerar una tasa de aireación adecuada, con la finalidad de que las células no sedimenten y ocurra muerte celular por ausencia de luz. De igual modo, existe un límite superior en el nivel aceptable de turbulencia, debido a que las fuerzas hidrodinámicas tienen un efecto de estimulación sobre los procesos fisiológicos de las células algales. El incremento gradual de turbulencia, en algunas especies de microalgas, propicia un aumento en la tasa de crecimiento, ya que la generación de agitación favorece el suministro de luz y CO₂. Sin embargo, a mayor turbulencia, el crecimiento disminuye drásticamente, aumentando simultáneamente la velocidad superficial del gas causando un posible daño celular (Fernandez et al., 2012).

El principal problema en el cultivo de algas es el daño celular por esfuerzo de corte. Se conoce que el exceso de agitación causa turbulencia, afectando la estructura celular, disminuyendo el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provoca sedimentación y muerte celular. (Ugwu et al., 2008; Zitelli et al., 2006). La agitación mecánica y la ruptura de las burbujas dentro del reactor a menudo son causa de estrés hidrodinámico, provocando una limitación en el crecimiento y actividad metabólica de las células algales, (Grobelaar, 2010; Del campo et al., 2007).

De acuerdo a lo que se ha comentado en el presente trabajo se analizaron diferentes parámetros bioquímicos de la microalga *Chlorella vulgaris* por efecto hidrodinámico, variando la aireación a (0.75, 1.25, 1.75, 2.25) vvm y a condiciones de luz blanca continua en fotobiorreactor de columna por burbujeo.

Metodología

2.1 Aclimatación de la cepa

La especie microalgal se adquirió del cepario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México. La microalga se mantuvo en el medio de cultivo para su aclimatación por 30 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL, bajo iluminación externa continua mediante lámparas de luz blanca fría fluorescente con emisión luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se realizaron rutinas de transferencia cada día en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El material de cristalería se desinfectó con solución de hipoclorito de sodio al 5% (Robles-Heredia, 2014).

2.2 Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio a 90 mg L^{-1} de N-NH_4^+ (C_{90}), se prepararon 4 L de medio fresco, por cada litro de agua se agregaron 3 mL de nutrientes con la siguiente composición: 7 mg NaCl, 4 mg CaCl_2 , 2 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg KH_2PO_4 , 115.6 mg NH_4Cl , disueltos en 1L de agua, de igual forma se adicionaron metales traza y vitaminas considerando la técnica para medio de cultivo f/2 (Guillar and Ryther 1962), el medio preparado se esteriliza en autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y 30 atm; se deja enfriar para adicionar 4 mL de vitaminas por cada litro de medio (Robles-Heredia, 2014).

2.3 Preparación del inóculo

Para el inóculo se utilizaron 500 mL de solución a C_{90} , manteniéndose en agitación constante durante 5 días con el fin de obtener una concentración de 1×10^6 células mL^{-1} (cel x mL).

2.4 Preparación y ensamble de los fotobiorreactores

Para el ensamblado de fotobiorreactores se utilizaron botellas de PET con volumen de 3 L. Adicionalmente fue necesario el uso de botellas con volumen de 1L utilizando agua destilada estéril para hidratar el aire para agitación, el aire de salida se burbujea en agua clorada con la finalidad de no contaminar el entorno, se utilizaron mangueras de $\frac{1}{4}$ pulgada tipo industrial para inyectar el aire; 2 rotámetros verticales con carátula de nivel para controlar el flujo de aire; además de un compresor de 2.5 Hp de potencia y 8.5 kg cm^{-2} de presión. La Figura 1 ejemplifica el modo de operación de un FBR.

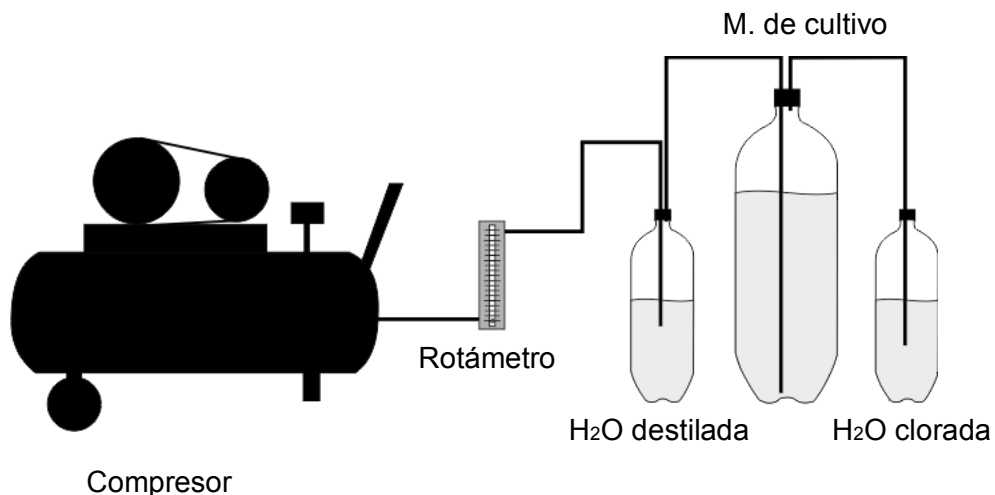


Figura 1. Sistema de cultivo.

En cada FBR se utilizó un volumen de operación de 2 L, iluminación externa, con lámparas de luz blanca fría fluorescente a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El mezclado se realizó inyectando aire y la agitación por burbujeo consistió en que por gravedad las células descendían y por la inyección de aire subían, el mezclado fue continuo durante el proceso de cultivo; la Figura 2 indica las variables utilizadas para obtener los datos iniciales para los cálculos hidrodinámicos.

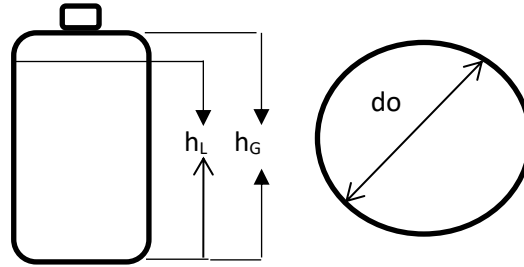


Figura 2. Dimensiones del equipo de columna de burbujeo

Donde las variables indicadas en la figura son las siguientes:

h_L es la altura del líquido en reposo sin entrada de aire (m); h_G es la altura de la columna incluyendo la retención de gas (m); d_o es el diámetro de la columna de burbujeo (m) y ρ_L es la densidad del líquido

2.5 Condiciones de aireación

En la Tabla 1 se indican los valores de flujo de aireación propuestos para cada experimento, considerando una variable de respuesta, una configuración, cuatro flujos y dos repeticiones.

Tabla 1: Diseño experimental para el cultivo en FBR con volumen operacional de 2 L

Variable de respuesta	Configuración	Tasas de aireación (vvm)
		0.75
Productividad de lípidos	Columna de burbujeo	1.25
		1.75
		2.25

2.6 Procedimiento para calcular los parámetros hidrodinámicos en el FBR.

Los datos indicados en la Tabla 2 fueron considerados para realizar los cálculos correspondientes a la tasa de corte.

Tabla 2. Datos iniciales para realizar el proceso de cálculo de la tasa de corte (γ) en el FBR.

vvm	h_G
0.75	0.21
1.25	0.22
1.75	0.23
2.25	0.24

Los siguientes datos fueron considerados como constantes para todos los experimentos:

$h_L = 0.205$ m; $d_o = 0.12$ m; $A_c = 0.036$ m²; $\rho_L = 998$ kg / m³.

La ecuación (1) se considera para calcular el flujo de aire total (F_g) expresado en (m³s⁻¹) corregido por la presión absoluta en el fondo del reactor y F_a como el flujo de aire suministrado en (L min⁻¹) (Robles-Heredia, 2014).

$$F_g = F_a \left(\frac{1}{60} \right) \left(\frac{1}{1000} \right) \quad (1)$$

Con las ecuaciones (2) y (3) se calcularon el área seccional de la columna (A_c) en (m²) y la velocidad superficial del gas (U_g), considerada como el flujo de gas por unidad de área dentro del sistema en (ms⁻¹), de acuerdo a Babcock et al, (2002).

$$A_c = b \times h \quad (2)$$

$$U_g = \frac{F_g}{A_c} \quad (3)$$

Con los valores de U_g para columna de burbujeo, la tasa de corte (Y) expresada en (s⁻¹) se calcula por medio de la ecuación (4) válida en el rango de $0.008 < U_g < 0.09$ ms⁻¹. (Cerri et al., 2008).

$$Y = 1000 U_g^{0.5} \quad (4)$$

El gas retenido ε se calcula con la ecuación (5), este determina el porcentaje de gas o aire retenido dentro del equipo por el incremento del volumen de aire cuando este es inyectado (Doran, 1995).

$$\varepsilon = \frac{h_G - h_L}{h_G} \quad (5)$$

h_L y h_G se definieron arriba (ver Figura 2)

Con la ecuación (6) se calcula la velocidad superficial del líquido (U_L) considerada como el flujo de líquido por unidad de área dentro del sistema (m s⁻¹), se puede calcular para columnas de burbujeo con un diámetro entre 0.1 y 7.5 m y $0 < U_g < 0.4$ ms⁻¹ (Doran, 1995)

$$U_L = 0.9(g d h U_g)^{0.33} \quad (6)$$

Donde g es aceleración de la gravedad en (ms⁻²), d_o es el diámetro de la columna en (m).

La potencia neumática PG/VL en (Wm⁻³), calculada con la ecuación (7), se considera como la energía o potencia generada por el gas o el aire inyectado en el equipo para ejercer por expansión el movimiento de agitación del fluido dentro del fotobiorreactor. (Doran, 1995):

$$PG/VL = \rho_L g U_g \quad (7)$$

Donde ρ_L es la densidad del líquido en (kg / m³), g es la gravedad en (ms⁻²).

2.7 Densidad celular

El conteo celular se realizó cada 24 h con cámara Neubauer Hematocitómetro de 0.1 mm; En caso necesario, con altas densidades celulares, se realizaban diluciones de la muestra en 1:10 mL para facilitar el conteo, posteriormente el número de células total del conteo se multiplicaba por un factor de 10 de acuerdo a la dilución tomando en cuenta según fuera el caso las ecuaciones (8 y 9) (Ruiz-Marín et al., 2010):

$$DC = \text{Células contadas} \times 10,000 \quad (8)$$

$$DC \text{ diluida} = \text{Células contadas} \times 10 \times 10,000 \quad (9)$$

2.8 Biomasa peso seco

Se filtraron 10 mL del medio con microalgas utilizando un filtro a peso constante, el filtro con la biomasa se introdujo en una estufa por 24 h a 130 °C. Transcurrido el tiempo, el filtro se colocó en un desecador por un lapso de 1 h para enfriarse, posteriormente se obtuvo el peso de la muestra seca mediante diferencia de pesos, considerando el volumen de muestra utilizado. El proceso se realizó cada 24 h hasta el final del proceso (Robles-Heredia, 2014).

2.9 Consumo de nitrógeno

Se tomó una muestra de 50 mL de medio de cultivo cada 24 h, se filtró y se le agregaron 5 gotas de H₂SO₄ para fijar el nitrógeno, posteriormente la muestra se dividió en 2 matraces Erlenmeyer con 25 mL cada uno, se les agregó 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Se agregó solución indicadora de ácido bórico en 2 matraces, cada una de 20 mL y se les agregó 3 gotas de indicador Shiro Toshiro. Posteriormente las muestras se destilaron en equipo Buchi micro kjeldahl y se colectaron 50 mL en los matraces con la solución de ácido bórico y se titularon con H₂SO₄ 0.02 N hasta que la solución viró de verde a morado. La concentración de N-NH₄⁺ se determinó con la siguiente ecuación (10) (Robles-Heredia, 2014):

$$N - NH_4 = \frac{\text{Volumen de ácido gastado} \times 0.02N \times 14}{\text{Volumen de muestra}} \times 1000 \quad (10)$$

2.10 Cosecha de la biomasa

Finalizado el tiempo de cultivo el volumen remanente se centrifugó a 10,000 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 espacio de 3 a 5 días y las muestras liofilizadas se mantuvieron en refrigeración a 0 °C (Ruiz-Marín et al., 2010).

2.11 Extracción y productividad de lípidos

La determinación se realizó por el método modificado de Bligh y Dyer (1959) de la siguiente forma: en tubos con rosca se colocaron muestras de 0.01 g de biomasa microalgal liofilizada, se mezclaron con 4 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua destilada, las muestras se sometieron a sonicación por 15 minutos para ruptura de la pared celular, inmediatamente se envolvieron en papel aluminio y se dejaron incubar en refrigeración por 24 h a 4 °C; transcurrido el tiempo, se les retiró el papel aluminio para sonicarlas por 5 min y centrifugarlas a 4000 rpm por 10 min, el líquido remanente de los tubos se transfirió a nuevos tubos con tapa de rosca y se les agregó 4 mL de agua para su lavado, se agitaron con vortex y nuevamente fueron centrifugadas, el agua de los tubos se retiró con pipeta Pasteur y se evaporó el cloroformo en baño María, posteriormente se les agregó 2 mL de mezcla 95% ácido clorhídrico-metanol y se introdujeron a un digestor marca Hach DRB 200 por 1 h a 100 °C, transcurrido el tiempo del digestor, se envolvieron en papel aluminio para ser guardadas en

refrigeración por 24 h a 4 °C. Posteriormente se les agregó 3 ml de hexano y se agitaron en vortex formando una bi-fase en la cual se extrajo la parte inferior con pipeta Pasteur, se agregaron 4 mL de agua a los tubos y se agitaron nuevamente con vortex, se extrajo el agua utilizando una pipeta Pasteur. Se envolvieron nuevamente en papel aluminio y se mantuvieron refrigeración por 24 h a 4 °C. Pasando el tiempo estimado, estas se evaporaron con baño maría, en el proceso de evaporación se le agregaron 3 mL de hexano antes de evaporación completa, las muestras se transfirieron a viales y se dejaron reposar por 24 h. El contenido de lípidos en la muestra se traduce a una composición de lípidos (% ww⁻¹) en base seca w , y esta a su vez se traduce en una productividad de lípidos P_L (en mg L⁻¹ d⁻¹) con la siguiente ecuación (11):

$$P_L = \frac{w_2 X_2 - w_1 X_1}{t_2 - t_1} \quad (11)$$

Donde X_i es la concentración másica de biomasa seca en el medio al tiempo t_i .

2.12 Perfil de ácidos grasos.

El análisis del perfil de metil-ésteres de ácidos grasos (FAME por sus siglas en inglés) se realizó usando un cromatógrafo de gases (GC) marca Agilent Technology 7890. Se inyectó 1 µL de la solución hexano-lípido al equipo GC con detector de ionización de flama (FID), y con columna de separación DB-23 (60 m longitud, 0.32 mm ID, 0.25 µm espesor). Condiciones cromatográficas: T del detector: 250 °C; T del inyector: 250 °C; Programa de temperatura del horno: 120 °C por 5 min, aumentar la temperatura a razón de 10 °C min hasta 180 °C, mantener por 30 min. Aumentar nuevamente a razón de 10 °C min hasta 210 °C y mantener por 21 min. (total 65 min); Flujo gas carrier: 15 psi; Split: 1:100; Gas portador: He alta pureza; Volumen de inyección: 1 µL. Los ácidos grasos presentes en las muestras se identificaron mediante: Comparación y análisis detallados de los espectros de metil-ésteres de ácidos grasos conocidos. Comprobación con los tiempos de retención de los picos en la muestra con los tiempos de retención de un patrón comercial de metil-ésteres de ácidos grasos (estándar). Para la identificación de los FAMES se utilizó una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (% peso) SupelcoTM 37 Componente FAME.

Los resultados del diseño experimental se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial completo (α : 0.05) mediante el programa STATISTICA V7.

Resultados y discusión

3.3 Parámetros hidrodinámicos calculados del FBR de columna de burbujeo.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados en el FBR de columna, a las condiciones de cultivo y tasas de aireación propuestas.

Como se ha indicado fue necesario considerar diversos datos como ya establecidos para poder iniciar los cálculos de acuerdo a las condiciones propuestas para obtener todo lo imprescindible en relación a los experimentos correspondientes.

En Tabla 3 se presentan los resultados de los cálculos realizados para obtener los parámetros hidrodinámicos del FBR de columna de burbujeo, considerando el procedimiento indicado en sección 2.6.

Tabla 3. Parámetros hidrodinámicos de columna de burbujeo a las tasas de aireación propuestas.

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	$F_g \times 10^{-4}$ (m^3s^{-1})	$U_g \times 10^{-3}$ (ms^{-1})	U_L (ms^{-1})	PG/VL (Wm^{-3})	Tasa corte (s^{-1})
Columna de burbujeo	0.75	0.25	1.59	0.050	15.55	0.0025
	1.25	0.41	2.65	0.062	25.91	0.0070
	1.75	0.58	3.71	0.069	36.28	0.0130
	2.25	0.75	4.77	0.075	46.65	0.0220

Según se plantea en el reporte realizado por (Morales et al., 2015), de acuerdo a los valores de los parámetros hidrodinámicos de Tabla 3, el régimen de trabajo del presente estudio estuvo en el rango de flujo de tipo burbujeo homogéneo.

En la Figura 3 se indica la relación entre densidad celular máxima y la tasa de corte a las tasas de aireación planteadas.

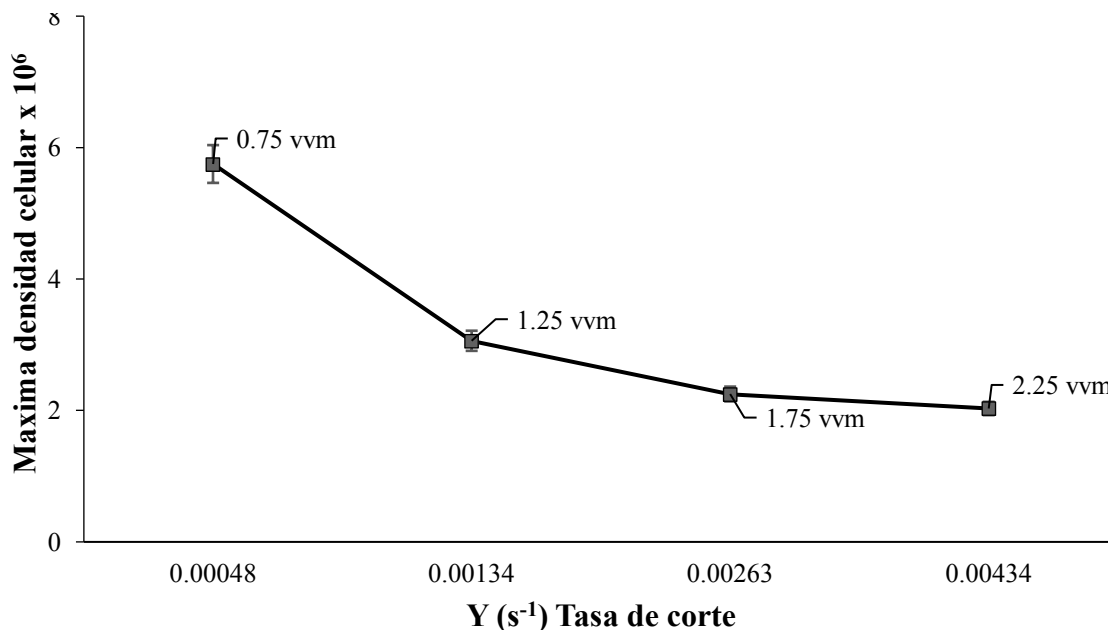
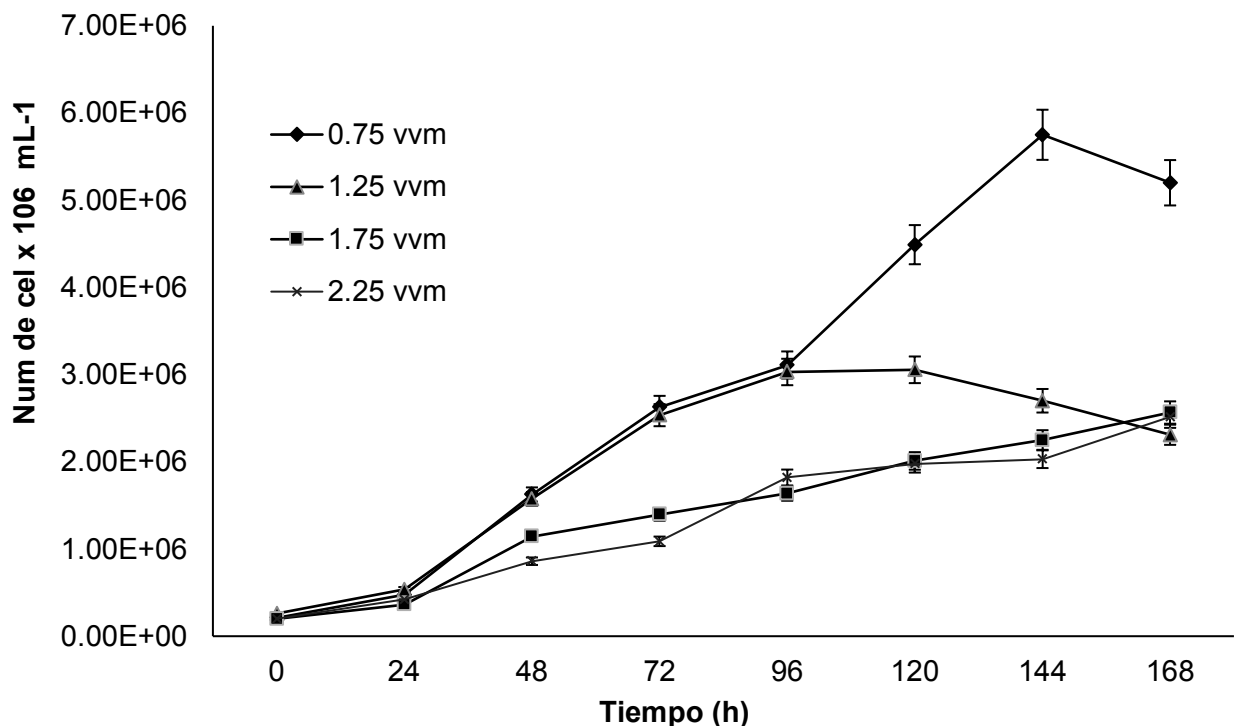


Figura 3. Densidad celular máxima vs tasa de corte a las tasas de aire indicadas.

De acuerdo a la Figura 3 se aprecia que conforme el flujo de aireación incrementaba, del mismo modo se observó que aumentaba la tasa de corte, sin embargo, ocurrió lo contrario con la concentración celular ya que conforme se incrementaba la tasa de aireación se observó un decremento en el número de células en cada experimento. En relación al FBR, Valdez-Cruz y Trujillo-Roldan (2006) señalan que la principal desventaja de estos sistemas, es que el estrés hidrodinámico que actúa sobre las células, es variable, debido a los cambios irregulares en el flujo en todas las direcciones y en el tiempo relacionado, durante cada experimento, estas son razones para posible daño sub-letal en las células por esfuerzo cizalla (Morales et al., 2015; Trujillo-Roldan y Galindo, 2003; Valdez-Cruz y Trujillo-Roldan, 2006; Robles-Heredia, 2014); además, otra posible causa sería el considerar la baja intensidad lumínica en los experimentos, provocando que las células no se adaptaran a las condiciones del medio de cultivo produciendo estos resultados (Morales et al., 2015).

Sin embargo, de acuerdo a lo observado, es importante señalar que no se apreció ningún tipo de deformación o anomalía en las células microalgales para constatar la existencia de daño subletal por las tasas de aireación planteadas. Otro aspecto a señalar es que la tasa específica de crecimiento del experimento a 0.75 vvm en comparación con los otros experimentos fue mayor, a pesar que se esperaba un mayor crecimiento celular mientras los flujos de aireación se incrementaban, por tanto se puede indicar que no sucedió lo que se pretendía de que a mayor flujo de aireación e intensidad lumínica moderada se lograra incrementar contenidos de biomasa y lípidos en la microalga, que repercutiera en una mayor productividad de lípidos.

3.2 Efecto de la tasa de aireación sobre crecimiento celular y consumo de nitrógeno. Se realizaron cuatro experimentos a tasas de aireación propuestas, a condiciones ricas de nutrientes y luz blanca continua, para evaluar el efecto sobre diferentes parámetros



bioquímicos. En la Figura 4 se indica el crecimiento celular de la microalga a las tasas de aireación propuestas (0.75, 1.25, 1.75 y 2.25 vvm), en condiciones ricas de nitrógeno (90 mg L⁻¹).

Figura 4. Curva de crecimiento de *C. vulgaris* cultivado en FBR.

Cada experimento inició a la misma concentración celular (1x10⁶ cel mL⁻¹), a las 24 h se observó fase de adaptación seguida de un ligero crecimiento en cada experimento, sin embargo, a partir de las 96 h y hasta las 144 h se observó un repunte en el crecimiento, presentándose fase exponencial durante el experimento a 0.75 vvm, con un máximo crecimiento de 5.75x10⁶ cel mL⁻¹ y fase de decaimiento inmediata; no obstante, los otros experimentos (1.25, 1.75 y 2.25 vvm) no superaron los 3.5x10⁶ cel mL⁻¹, por lo que se puede inferir que el aumento en la tasa de aireación tuvo una repercusión importante sobre el crecimiento algal, sin embargo, es importante indicar que el grado de agitación imperante en cada experimento no fue causante para provocar un efecto negativo por esfuerzo de corte, ya que de acuerdo a los resultados observados durante el desarrollo del proceso de cultivo, las células algales no presentaron algún tipo de deformación, de acuerdo a lo observado al microscopio, aspectos similares fueron reportados por (Sadeghizadeh et al., 2017; Shi et al., 2016 y Robles-Heredia 2014).

En la Tabla 4 se indican los resultados de los valores máximos alcanzados referidos a densidad celular, tasa específicas de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno de los experimentos realizados.

Tabla 4. Datos de valores máximos de densidad celular, tasa de crecimiento específico μ y consumo de nitrógeno de *C. Vulgaris* a las tasas de aireación propuestas.

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	Max densidad* celular (cel×10 ⁶ mL ⁻¹)	μ^* (d ⁻¹)	Consumo* N-NH ₄ ⁺ (%)
	0.75	5.75 ± 2.04 ^a	0.0229±1.16 ^a	60.00± 2.31 ^a
Columna de burbujeo	1.25	3.06 ± 1.18 ^b	0.0168±0.90 ^b	50.00± 1.91 ^b
	1.75	2.25 ± 0.77 ^b	0.0162±1.00 ^b	49.00± 1.54 ^b
	2.25	2.03 ± 0.75 ^b	0.0160±0.86 ^b	45.00± 1.68 ^b

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

De acuerdo a lo reportado en Tabla 4 se puede señalar, que la cepa se adaptó de mejor manera a las condiciones del experimento a 0.75 vvm, que a los demás experimentos, por lo que se puede indicar que la tasa de aireación influyó para su desarrollo, obteniendo los máximos resultados de densidad celular de 5.75x10⁶ cel mL⁻¹, tasa específica de crecimiento de 0.0229 d⁻¹ y un consumo de nitrógeno de 58%. Durante los experimentos a 1.25, 1.75 y 2.25 vvm se observó un consumo de nitrógeno menor al 50% y su máxima densidad celular sólo alcanzó 3x10⁶ cel mL⁻¹, del mismo modo la tasa de crecimiento específico (μ) no superó los 0.0168 d⁻¹; pruebas estadísticas de los datos obtenidos en estas condiciones de aireación indican que no existieron diferencias significativas. Se puede indicar que los resultados obtenidos de crecimiento y remoción de nitrógeno (N-NH₄⁺), estuvieron muy por

debajo de otros trabajos reportados (Sadeghizadeh et al. 2017; Robles-Heredia et al., 2014), donde se reportan valores de densidad celular mayor a 17×10^6 cel mL, tasa específica de crecimiento mayor de 0.18 d^{-1} y consumos de (N-NH_4^+) hasta del 90%; los valores observados en el presente trabajo, manifiestan lo que normalmente es de suponerse, que al no haber un aumento en la densidad celular, no existe el consumo de N-NH_4^+ correspondiente, estas consideraciones también fueron reportadas en otros trabajos, de manera similar (Robles-Heredia, 2014; Haro y Perales, 2015; Kee-Lam et al., 2016). Dados los escenarios de este trabajo, se puede mencionar la posibilidad que existiera algún tipo de perturbación debido a la agitación preponderante en cada experimento que inclusive pudiera provocar algún tipo de foto-inhibición por la cantidad de luz suministrada, afectando el crecimiento celular.

3.3 Efecto de la tasa de aireación sobre biomasa, contenido de lípidos y productividad de lípidos.

En la Tabla 5 se reportan los valores máximos obtenidos de biomasa peso seco, contenido de lípidos y productividad de lípidos a las diferentes tasas de aireación propuestas.

Tabla 5. Biomasa peso seco X , máximo contenido de lípidos w_{max} y máxima productividad de lípidos P_{Lmax} a las tasas de aireación propuestas.

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	X^* (g L^{-1})	w_{max}^* (% ww^{-1})	P_{Lmax}^* ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
Columna de burbujeo	0.75	0.420 ± 0.28^a	1.03 ± 1.62^a	8.98 ± 3.70^a
	1.25	$0.340 \pm 0.47_a$	$0.86 \pm 1.61_a$	$7.98 \pm 3.18_a$
	1.75	$0.298 \pm 0.66_b$	$0.65 \pm 3.10_b$	$6.72 \pm 2.48_b$
	2.25	$0.287 \pm 0.84_b$	$0.62 \pm 1.16_b$	$5.73 \pm 1.63_b$

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

Como se observa en Tabla 5, durante el experimento a 0.75 vvm se obtuvieron los máximos valores de todo el proceso, de biomasa peso seco con 0.420 g L^{-1} y contenido de lípidos de 1.03%, sin embargo, en relación a la productividad de lípidos, el valor fue similar con la del experimento a 1.25 vvm ($7.98 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Estudios realizados por Chiu et al., (2008) reportaron resultados de 1.2 g L^{-1} de biomasa a 0.25 vvm y utilizando una intensidad lumínica de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y Pham et al., (2017) 1.35 g L^{-1} de biomasa a 0.3 vvm, con una intensidad lumínica de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; por lo tanto se puede indicar que la cantidad de luz suministrada tiene una mayor influencia en la producción de biomasa que la aireación. De igual modo en otras investigaciones, han reportado que a mayores intensidades lumínicas, superiores a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtuvieron mayores cantidades de biomasa microalgal (Amini-Khoeyi et al., 2012; Hultberg et al., 2014; Jiang et al., 2016; Kim et al., 2015), de aquí el interés por experimentar si a mayor flujo de aireación y con una intensidad lumínica moderada se lograba obtener mayores contenidos de biomasa y lípidos en la microalga. Sin embargo, como se puede apreciar, los valores alcanzados de máximo

contenido de lípidos (1.03%) y productividad de lípidos (8.98 mg L⁻¹ d⁻¹) durante el experimento a 0.75 vvm, fueron reducidos comparados con otros estudios donde se manejaron condiciones con ciertas similitudes (Mandal y Mallick, 2009; Robles-Heredia 2014).

3.4 Perfil FAME de lípidos microalgales.

Cuando el propósito de la producción de lípidos en cultivos de microalgas es la producción de biodiesel, no sólo la productividad de lípidos es importante, sino también la fracción de los que se pueden convertir en FAME, es decir, la fracción TAG. Además, los tipos de ácidos grasos en los TAG son importantes en términos de la calidad del biodiesel resultante. Como se puede observar los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fueron los más abundantes en los experimentos a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm; solo en el experimento a 1.25 vvm, se obtuvo una mayor productividad de ácidos grasos saturados (SFA). Los principales componentes con mayor presencia en el análisis del perfil de ácidos grasos fueron C12:0; C20:5N3; C24:1; C 22:0; C22:2.

La prueba estadística de análisis de varianza, demostró que no hubo diferencias significativas entre los resultados SFA y PUFA, al igual los resultados de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en los experimentos a 1.25, 1.75 y 2.25 vvm no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$), mientras que el resultado de MUFA a 0.75 vvm, fue ligeramente superior. Dentro de las principales propiedades de los combustibles se encuentra el número de cetano (NC), el cual es un descriptor adimensional de la calidad de ignición de un combustible y se relaciona con el tiempo de retardo de la ignición que experimenta un combustible. Además el NC depende en gran medida de la naturaleza y estructura de un éster graso, de este modo es importante indicar que los compuestos saturados tienden a tener un NC alto, mientras que el NC disminuye con el aumento en insaturación (Knothe, 2010). En relación al NC y considerando los datos obtenidos de acuerdo al análisis FAME, las altas concentraciones de PUFA en los experimentos a 0.75 vvm, 1.75 vvm y 2.25 vvm sugieren que el biodiesel resultante sería de baja calidad considerando la baja presencia ácidos grasos saturados.

En la Tabla 6 se resume el perfil de FAME encontrado en los cultivos de *C. vulgaris* a los diferentes flujos de aireación propuestos.

Tabla 6. Perfil de FAME en lípidos de *C. vulgaris*. (Expresado cómo % en peso total de ácidos grasos*).

FAME	0.75 vvm	1.25 vvm	1.75 vvm	2.25 vvm
c12:0	23.81 (±0.38)	22.04 (±0.71)	23.73 (±2.02)	20.91 (±5.08)
c13:0	0.96 (±0.27)	0.93 (±0.14)	0.39 (±0.02)	0.84 (±0.69)
c18:0	1.78 (±0.07)	1.48 (±0.038)	1.6 (±0.13)	1.61 (±0.10)
c20:0	0.93 (±0.04)	n.d.	0.21(±0.11)	0.44 (±0.005)
c21:0	n.d.	n.d.	0.27(±0.04)	0.23(±0.07)

c22:0	5.25 (±6.95)	13.36 (±2.25)	8.83 (±8.73)	10.54 (±11.32)
c23:0	0.58 (±0.006)	1.23 (±0.079)	1.22 (±0.061)	1.49 (±0.25)
c17:1	0.85 (±0.11)	0.18 (±0.05)	0.28 (±0.45)	0.49 (±0.073)
c18:1N9T	0.06 (±1.09)	n.d.	n.d.	n.d.
c20:1	1.84 (±0.10)	0.5 (±0.31)	0.82 (±0.074)	1.28 (±0.15)
c22:1N9	2.01 (±0.11)	1.77 (±1.63)	2.6 (±0.20)	2.39 (±0.51)
c24:1	17.22 (±2.71)	7.55 (±1.63)	11.81 (±0.48)	13.1 (±5.41)
c18:2N6T	n.d.	n.d.	n.d.	0.27(±13.06)
c20:2	7.82 (±0.63)	0.46 (±0.053)	7.48 (±8.20)	8.31 (±9.03)
C20:3N3	n.d.	n.d.	0.34(±10.30)	0.74(±7.04)
C20:3N6	0.22 (±0.14)	0.17 (±0.093)	0.24 (±0.13)	0.25 (±0.16)
c20:4N6	3.32 (±0.2)	2.41 (±0.40)	2.98 (±0.13)	2.46 (±0.88)
c20:5N3	21.71 (±2.51)	15.34 (±3.02)	24.14 (±0.81)	24.38 (±8.37)
c22:2	8.35 (±0.31)	9.66 (±1.60)	14.71 (±1.88)	20.46 (±8.49)
c22:6N3	1.78 (±0.25)	1.17 (±0.05)	1.47 (±0.085)	1.51 (±0.34)
SFA	33.34(±8.57) _a	39.07(±8.67) _a	36.29(±8.73) _a	36.10(±7.83) _a
MUFA	22.00(±7.21) _a	10.03(±4.97) _b	15.53(±4.97) _b	17.27(±5.46) _b
PUFA	43.23(±7.39) _a	29.24(±8.75) _b	51.39(±8.75) _a	58.43(±9.74) _a

*Porcentajes en peso, Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($p \geq 0.05$); n.d.=no detectado, (± Desviación estándar).

Conclusiones

El crecimiento celular de cada experimento tuvo variaciones considerables en referencia a las tasas de aireación manejadas en cada uno de estos; mientras el flujo de aireación aumentaba en cada experimento el crecimiento celular se veía afectado de manera negativa; se observó que la mayor tasa de crecimiento celular ocurrió en el experimento a 0.75 vvm (5.75×10^6 cel mL⁻¹) teniendo un consumo de nitrógeno del 60% de su medio; se esperaba una mayor concentración celular y un consumo mayor de nitrógeno en cada comprobación a mayores

tasas de aireación agregadas a los FBR; es posible que este resultado ocurriera debido a que mientras las tasas de aireación aumentaban en cada experimento la turbulencia generada por este, combinada con la intensidad de lumínica utilizada pudiera producir una limitación en la actividad fotosintética que interfiriera en la capacidad de las células de reproducirse, adaptarse y consumir el N-NH₄⁺ de su medio.

El experimento a 0.75 vvm obtuvo los resultados más altos en su productividad de lípidos (8.98 mg L⁻¹), al igual que el mayor resultado en productividad de biomasa seca (0.420 g L⁻¹); por lo tanto, la cantidad de biomasa obtenida a final del experimento, tasa de crecimiento específico y productividad de lípidos se concluye que el experimento a 0.75 vvm en comparación con los otros experimentos realizados es el más adecuado para la productividad de lípidos y obtención de biomasa microalgal.

En relación al crecimiento celular, en cada experimento a las diferentes tasas de aireación estudiadas se obtuvieron valores donde se incrementó el valor inicial del inóculo, con resultados bajos comparado a otros estudios; los experimentos realizados presentaron un flujo de agitación tipo homogéneo, además, se puede indicar que no existió algún tipo de daño por estrés hidrodinámico a pesar de que la tasa de corte calculada aumentaba a mayor aireación, esto de acuerdo al crecimiento celular obtenido y a las características físicas que presentaron las células en el transcurso del proceso de cultivo.

Referencias

- Amini-Khoeyi, Z., Seyfabadi, J. & Ramezanzpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41-49.
- Babcock, R.W., Malda, J., Radway, C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 14, 169-184.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 8, 911–917.
- Cerri, M.O., Futiwaki, L., Jesus, C.D.F., Cruz, A.J.G., Badino, A.C. (2008). Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 51–57
- Contreras-Flores C., Peña-Castro J.M., Flores-Cotera L.B., Cañizares-Villanueva R.O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28, 450-456
- Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. & Lin, C. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99(9), 3389-3396.
- Del Campo, J.A., García-González, M., Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1163–1174.

-
- Doran, P. M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. London: Academic Press Limited.
- Knothe, G. (2010). Calidad del combustible biodiesel y la norma astm. *Palmas 31*(Especial), 162-171.
- Fernández, L., L.C., Montiel, M.J., Millán, O.P. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 12, 101-115.
- Grobbelaar, J.U. (2010). Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res*, 106, 135-134.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. (1962) Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229-239.
- Haro, S. & Perales J. A. (2015). Kinetics of Nutrient Uptake and Growth of a Bloom of Microalgae in a High Rate Algae Pond (HRAP) Photobioreactor. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(1), 15-31.
- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., Forde, G. (2011). Techno economic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy*, 3, 741-747.
- Hincapie, E. (2010). Design, construction and validation of an internally-lift airlift FBR. (Thesis of degree master of science). Faculty of the Russ College of Engineering and Technology of Ohio University. Ohio State, United States of America.
- Ho, S., Chen, C., Chang, J. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol*, 113, 244-252.
- Hultberg, M., Asp, H., Marttila, S., Bergstrand, K. J. & Gustafsson, S. (2014). Biofilm Formation by *Chlorella vulgaris* is affected by light quality. *Current Microbiology*, 69(5), 699-702.
- Jiang, L., Ji, Y., Hu, W., Pei, H., Nie, C., Ma, G. & Song, M. (2016). Adjusting irradiance to enhance growth and lipid production of *Chlorella vulgaris* cultivated with monosodium glutamate wastewater. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162(1), 619-624.
- 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.
- Kim, J., Lee, J. & Lu, T. (2015). A model for autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 99(1), 55-60.

-
- Lee, Y. K. (2004). Algal nutrition: Heterotrophic carbon nutrition. En Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, (116–124). Oxford: Blackwell Science.
- Lee, Y. K. (2016). Microalgae Cultivation Fundamentals. En Algae Biotechnology Products and Processes (1-2). Switzerland: Springer editors.
- Li, Y., Fei, X., Deng, X. (2012). Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass and Bioenergy*, 42,199-211.
- Mandal, S. y Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 281-291.
- Mata, T., Martins, A., Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- Monkonsit, S., Powtongsook, S., Pavasant, P. (2011). Comparison between Airlift Photobioreactor and Bubble Column for *Skeletonema costatum* cultivation. *Engineering Journal*, 15, 267-273.
- Morales, M., Cabello, J. and Revah, S. (2015). Gas Balances and Growth in Algal Cultures. *Algal Biorefineries*, 263-314.
- Pham, H., Kwak, H. S., Hong, M., Lee, J., Chang W. S. & Sim, S. J. (2017). Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 239(1), 211-218.
- Park, J., Craggs, R., Shilton, A. (2011b). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 10, 35-42.
- Piccolo T. (2008). Aquatic biofuels. 2019, de GlobeFish-FIIU.
- Rawat, I., Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424.
- Richmond, A. (2004). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd.
- Robles Heredia, J.C. (2014). 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 de Doctorado). Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L., Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 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.
- Trujillo-Roldan, M. A. y Galindo, E. (2003) El estrés hidrodinámico en cultivos celulares. *BioTecnología*, 8(1), 7-22.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, 4021–4028.
- Valdez-Cruz, N. A. y Trujillo-Roldan, M. A. (2006) El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(3-4), 269-280.
- Widjaja, A., Chien, C., Ju, Y., (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineer*, 40, 13-20
- Zittelli, G.C., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932–943.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma del Carmen todo el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.