



Desarrollo celular de *Chlorella vulgaris* en FBR de columna de burbujeo bajo distintos regímenes de luz

Mario Octavio Martínez de la Cruz ^{1,*}, Juan Carlos Robles Heredia ^{1,**}, Asteria Narváez García ¹, Francisco Anguebes Franseschi¹, María Concepción Tamayo Ordoñez², Alejandro Ruiz Marín¹, Yunuen Canedo López¹

¹ Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen, Calle 56 Núm. 4 Esq. Av. Concordia, Col. Benito Juárez, C.P. 24180, Ciudad del Carmen, Campeche, México.

² Universidad Autónoma de Coahuila, Blvr. Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Col. República, CP 25280, Saltillo, Coah., México.

E-mails de contacto: *mario.mtz.cruz@outlook.com, **jrobles@pampano.unacar.mx

Resumen

En la presente investigación se evaluó crecimiento celular de la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes espectros de luz (blanca, azul, violeta, roja) a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y flujo constante de aireación de 2.5 vvm, en fotobiorreactores (FBR) de columna de burbujeo; finalizando cada experimento se realizó extracción de biomasa, centrifugando el medio de cultivo a 4,000 rpm por 10 min. Los valores de máximo crecimiento celular fueron de $13.3 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ en luz blanca, $9.88 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ roja, $8.83 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ luz azul y $7.50 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ luz violeta; los datos de mayor crecimiento celular, así como mayor consumo de N-NH_4^+ (60%) y tasa de crecimiento específico μ (0.0229 d^{-1}) fueron a condiciones de luz blanca; por el crecimiento celular obtenido se puede indicar que no hubo daño por fotoinhibición; por tanto, según estos datos, se puede mencionar que las condiciones de aireación y luz blanca planteadas son las óptimas en relación al crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, fotobiorreactor, Microalga, Luz.

Abstract

In this research, cell growth of the microalga *Chlorella vulgaris* was evaluated at different light spectra (white, blue, purple, red) at $100 \mu \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and constant aeration flow of 2.5 vvm, in bubble column photobioreactors (FBR); At the end of each experiment, biomass extraction was carried out, centrifuging the culture medium at 4,000 rpm for 10 min. The maximum cell growth values were $13.3 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ in white light, $9.88 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ red light, $8.83 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ blue light and $7.50 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ purple light; the data of higher cell growth, as well as higher consumption of N-NH_4^+ (60%) and specific growth rate μ (0.0229 d^{-1}) they went to white light conditions; Due to the cell growth obtained, it can be indicated that there was no damage due to photoinhibition; Therefore, according to these data, it can be indicated that the conditions of aeration and white light proposed are the optimal ones in relation to the cell growth of *Chlorella vulgaris*.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Photobioreactor, Microalgae, light.



1. 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 [1]. El biodiesel es un combustible líquido que recibe un gran interés debido a sus ventajas sobre el diésel fósil [2].

Las microalgas son más viables como materia prima y alternativa para la obtención de biomasa ya que su crecimiento no requiere grandes extensiones de tierras como los cultivos convencionales, utilizan aguas residuales o marinas como medio de cultivo [3], al igual muchas especies de microalgas tienen un corto tiempo de duplicación con una alta eficiencia de fijación de CO_2 más de 10 veces en comparación con las plantas de cultivo convencional [4]; 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 [5].

Las microalgas son fotoautótrofas, esto quiere decir que pueden utilizar la luz como única fuente de energía 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 [1]. A su vez la calidad de la luz juega un papel importante en la composición bioquímica de las microalgas [6,7]; La luz roja está relacionada con una alta eficiencia de conversión de carbono de las células microalgales, mientras que las enzimas clave en la acumulación de triglicéridos de la fotosíntesis están controladas por la longitud de onda de la luz azul [8].

En estudios sobre la comercialización de biomasa a partir de microalgas, se ha observado que las cepas de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*, son las más apropiadas como materia prima por su rica producción de carbohidratos para su transformación en la producción de bioetanol [9,10]. 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. De igual manera, otros factores ambientales, por ejemplo, los nutrientes, la luz y la temperatura en el cultivo pueden afectar tanto al crecimiento de las algas como a la composición de la biomasa. Es por estas situaciones, que en el presente trabajo se estudió el efecto de la exposición a diferentes espectros de luz, utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*, como alternativa para el crecimiento celular en fotobiorreactor de columna de burbujeo.

2. Antecedentes

El cambio climático consiste fundamentalmente en el calentamiento del planeta que tiene lugar por el llamado efecto invernadero ocasionado por determinados gases entre los que destaca el dióxido de carbono (CO_2), producido principalmente durante la combustión de las fuentes de energía fósiles. De hecho, la mayor parte de la energía mundial se obtiene de recursos fósiles como el petróleo, el carbón y el gas natural [11], en tabla 1 se indican ciertos contaminantes químicos generados por la combustión del carbón. El calentamiento del planeta supone una grave amenaza para la población del futuro ya que puede ocasionar una considerable gama de problemas: elevación del nivel del mar, mayor frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos extremos, desaparición de determinadas especies de animales y plantas [12,1]. Esta situación demanda urgentemente un replanteamiento y conciencia, para utilizar fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO_2 (dióxido de carbono). Una opción energética promisoría que ha resultado muy atractiva en años recientes son las bioenergías que se pueden obtener a partir de biomasa [13,14].



Tabla 1. Principales contaminantes químicos generados por la combustión del carbón.

Gases y partículas	SO₂, CO₂, NO_x, CO, partículas.
Inorgánicos	Arsénico, Berilio, Cloruro de Hidrógeno, Fluoruro de Hidrógeno, Cadmio, Cromo, Cobalto, Plomo, Manganeso, Mercurio, Níquel, Fósforo, Selenio.
Orgánicos	Acetaldehído, Benceno, Etilbenceno, Metilcloroformo, Formaldehído, Naftaleno, Fenol, Tolueno, Tetracloroetileno, Acetato de vinilo, Xileno.

Los efectos contaminantes producidos por la combustión de los combustibles fósiles en las personas se manifiestan a corto, mediano y largo plazo, afectan principalmente a la población pediátrica, mujeres embarazadas, personas mayores y a las que padecen enfermedades respiratorias y cardiovasculares. Las enfermedades asociadas oscilan desde banales (conjuntivitis, rinitis, faringitis, entre otras) hasta graves y potencialmente mortales (bronquitis asmática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca e incremento del riesgo de cáncer) [15].

2.1 Energía de biomasa

Existen diversas fuentes de energía que son sustentables y limpias entre las cuales existen, hidráulica, solar, eólica, mareomotriz, entre otras; los biocombustibles pueden producirse a partir de diferentes materias primas de biomasa, actualmente se discuten como una fuente de energía alternativa prometedora debido a varias ventajas según la materia prima, los biocombustibles se pueden clasificar en cuatro generaciones principales [16-17].

- ❖ **Primera generación:** Incluyen la biomasa comestible como el maíz, la soja y el girasol [18]. El uso de biomasa comestible requiere cantidades significativas de fertilizantes, agua y grandes extensiones de tierras de cultivo que compiten con los cultivos alimentarios y plantearon el debate “alimento versus combustible [19-20].
- ❖ **Segunda generación:** Depende de la utilización de biomasa lignocelulósica no comestible, como paja de arroz, paja de trigo, aserrín y desechos municipales. Aunque los desechos lignocelulósicos se discuten como el primer candidato para la producción de biocombustibles debido a su abundancia, el desafío en su utilización es eliminar la lignina y superar la estructura recalcitrante para mejorar la accesibilidad de la celulosa y la hemicelulosa. Por lo tanto, el pretratamiento es un paso esencial, que requiere mucha energía, consume mucho tiempo y/o es costoso [21].
- ❖ **Tercera generación:** Las algas de tipo salvaje han atraído una enorme atención en la producción de biocombustibles de tercera generación [22].
- ❖ **Cuarta generación:** Mientras que las microalgas genéticamente modificadas se discuten actualmente como materia prima de biocombustibles de cuarta generación [23].

2.2 Microalgas

Se han estudiado diferentes fuentes de biomasa para obtener aceites y grasas, entre las que se encuentran las microalga, a las que se les atribuyen muchas ventajas como mayor eficiencia fotosintética en comparación con las plantas terrestres, altas tasas de producción de biomasa y la posibilidad de cultivarse a la vez de aprovecharse como un tratamiento terciario de aguas residuales, gracias a su capacidad de remoción y aprovechamiento de ciertos nutrientes presentes como nitrógeno o fósforo, al igual que proporcionan una mayor productividad de biomasa que los cultivos terrestres [2,24].



Muchas especies de microalgas son ricas en lípidos y proteínas, sin embargo, algunas especies como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, son conocidos por su contenido de carbohidratos particularmente alto de más del 50% del peso de las células secas en condiciones de cultivo específicas [25]; Además, la producción de biomasa depende de la especie de microalga, y el uso de una especie con una tasa de crecimiento rápida y alto contenido de carbohidratos es importante para la comercialización de la producción de bioetanol utilizando microalgas [26].

Algunas especies de microalgas pueden producir mayor cantidad de nutrientes, sometidas a condiciones con diversos factores bióticos y abióticos, como: intensidad de luz, variaciones de temperatura, salinidad, intensidad de agitación [1,26]. Al igual que ciertas especies de microalgas presentes en aguas contaminadas son utilizadas en tratamientos de aguas residuales por su elevada tolerancia. Además, varias de éstas también son utilizadas para fines comerciales específicos [27, 28, 29]. Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* han sido registrados en aguas residuales desde distintas procedencias [29,30].

La utilización de microalgas como materia prima para el desarrollo de biorrefinerías se ha estudiado con bastante interés en los últimos años, debido al potencial de esta materia prima para la obtención de biocombustibles y bioproductos; sin embargo, a pesar de los méritos antes mencionados, la viabilidad de la producción de biocombustibles a partir de microalgas aún no está bien establecida [2,3,31]. La interrupción celular y la extracción de componentes son el cuello de botella significativo en la producción de biodiesel y bioetanol a partir de biomasa microalgal; con respecto al cultivo, este se ha llevado a cabo de forma natural o artificial, desde lagos y estanques abiertos hasta fotobiorreactores altamente complejos y controlados. Sin embargo, para lograr una productividad por área de cultivo a escala comercial con una conversión eficiente de la energía, se deben diseñar sistemas de cultivos sostenibles y rentables [32]. Se han realizado muchos estudios para mejorar la producción de los compuestos objetivo seleccionando las especies de microalgas, ajustando el método de extracción u optimizando las condiciones de crecimiento de microalgas [33]. Sin embargo, muchos de estos métodos son ineficientes y/o requieren un procesamiento químico o físico de larga duración e insostenible que conduce a muchas cargas ambientales y costos elevados [34].

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa algal son las proteínas, las cuales pueden representar hasta el 50% del peso seco total y que sumadas a los lípidos y a los carbohidratos constituyen hasta el 90% del peso seco total, mientras que los minerales, los ácidos nucleicos, los pigmentos y los demás componentes menores suman el 10% restante [30], como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química (en % del peso seco total) de diferentes microalgas.

Especie	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	08-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	06-07
<i>Dunaliella Salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21



2.3 Sistema de cultivo

Los sistemas de cultivo abiertos son menos costosos de construir y operar, con mayores capacidades de producción. No obstante, las lagunas deben utilizar mayores cantidades de energía para homogeneizar sus nutrientes, el agua del sistema no debe bajar como 15 cm mínimo, estos sistemas requieren mayores extensiones de tierra, además son susceptibles a cambios climáticos, dificultando mantener un control de temperatura y se pueden contaminar con facilidad [36].

Los FBR son sistemas cerrados en los cuales podemos manipular factores que pueden beneficiar el proceso de cultivo, variando la cantidad de luz suministrada, las tasas de aireación, el mezclado, y así evitar la acumulación de oxígeno, [37]. Los sistemas de cultivo cerrado se pueden configurar dependiendo de las características físicas y biológicas de la especie microalgal, además reducen pérdidas de CO₂, permitiendo una mayor densidad de células y mayores productividades volumétricas [35].

2.4 Medio de cultivo

El medio de cultivo debe proporcionar los nutrientes suficientes para el crecimiento de las microalgas, como se muestra en la Tabla 3, los elementos fundamentales son Carbón, Nitrógeno, Fósforo y Azufre. Otros minerales esenciales son el Hierro, Magnesio, oligoelementos y, en algunos casos el Silicio [38].

Tabla 3. Nutrientes para el crecimiento de las microalgas.

Nutrientes	Ingredientes principales	Función	Rango conveniente
Carbono	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	Proporcionar carbono a la célula	1-10 gL ⁻¹
Nitrógeno	NO ₃ ⁻ , Urea, N ₂	Proporciona nitrógeno a la célula	10-2000mgL ⁻¹
Fosforo	Hidrofosfatos y fosfatos	Proporcionar Fosforo a la célula	10-500 mgL ⁻¹
Sulfuros	sulfato	Proporciona Azufre a las proteínas y las reacciones	1-200 mgL ⁻¹
Sales inorgánicas	K, Ca, Na, y Mg	Mantener la estructura y actividad celular	0.1-100 mgL ⁻¹
Elementos trazas	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Factores coenzima	0.01-10 mgL ⁻¹
Vitaminas	B, C, E	Ayuda a la división celular	0.01-100 gL ⁻¹

2.5 Factores que limitan el crecimiento de las microalgas

Varios parámetros de cultivo como la intensidad de la luz, el fotoperíodo, la temperatura, la salinidad, el pH, la mezcla, etc. influyen en el crecimiento de las microalgas. Por tanto, se hace imperativo optimizar y mantener estos parámetros durante el proceso de cultivo. Los parámetros generalizados y sus rangos óptimos se muestran en Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros que afectan el crecimiento microalgal, Depende del volumen y la densidad adaptados de FAO (por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*) [40].

Parámetros	Rango	Óptima
Temperatura (°C)	16-27	18-24
salinidad (gL⁻¹)	12-40	20-24
Intensidad de luz (μmolm⁻² s⁻¹)	1000-10,000	2,500-5000
fotoperiodos (luz: oscuridad)		16:8 (mínimo) 24:0 (máximo)
pH	7-9	8.2-8.7

2.6 Intensidad de luz y calidad

La cantidad y la calidad de la luz determinan la cantidad de energía disponible para que los organismos fotosintéticos realicen sus actividades metabólicas. Las microalgas requieren condiciones óptimas de

iluminación para una fotosíntesis eficiente. El fotoperiodo, la intensidad de la luz y la longitud de onda de la luz son algunos de los factores importantes que afectan la tasa de fotosíntesis. Las condiciones de luz afectan directamente el crecimiento, el contenido de pigmento, la cantidad de proteína y la cantidad de lípidos en las microalgas [40].

La iluminación artificial como las luces LED o lámparas pueden contribuir a una producción continua de energía lumínica, pero obviamente a mayor costo económico y energético [41]. Ante la necesidad de elección de luz artificial, es importante conocer el espectro de absorción de las algas cultivadas, que depende de los pigmentos mayoritarios presentes en ellas; la proporción óptima entre zona iluminada de un reactor y zona oscura se ha establecido en 15% y 85% respectivamente [41]. Es decir, el efecto de oscuridad que se produce en el fotobiorreactor es demasiado grande y las microalgas pasarían la mayor parte de su ciclo en oscuridad [42]. El problema del control de la luz como factor de gran influencia en el crecimiento de las algas es la imposibilidad de definirlo mediante un único parámetro, ya que entran en juego las intensidades, frecuencia de cambio luz-oscuridad, proporción de duración de los ciclos, hidrodinámica, configuración del reactor o estanque [41, 42, 43].

2.7 Metabolismo microalgal, fase luz y fase oscura

La acumulación de carbohidratos dentro de las células de las microalgas se debe principalmente a la fijación de carbono durante el proceso de fotosíntesis [44]. Específicamente, hay dos etapas en las reacciones fotosintéticas, conocidas como reacciones de luz y oscuridad (Figura 1) [45]. Durante las reacciones de luz, la energía de la luz se absorbe para dividir el agua en oxígeno y producir energía química (NADPH y ATP). Posteriormente, durante las reacciones oscuras, se utilizan nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y adenosín trifosfato (ATP) para reducir el CO_2 a carbohidratos a través del ciclo de Calvin-Benson [40]; la fijación de CO_2 es catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco) para formar dos compuestos de tres carbonos (3-fosfoglicerato) a partir de un compuesto de cinco carbonos (ribulosa 1,5-bifosfato) [45]. Uno de los compuestos de tres carbonos formados se usa luego como sustrato para la síntesis de carbohidratos, mientras que el otro se usa para continuar el siguiente ciclo de Calvin-Benson. Los carbohidratos generalmente se forman en los plástidos como componentes de almacenamiento (por ejemplo: almidón) o se convierten en los componentes estructurales en las paredes celulares (por ejemplo, celulosa, pectina y polisacáridos sulfatados) [46].

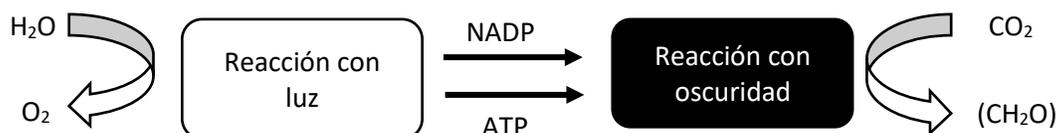


Figura 1. Reacciones luz y oscuridad en la reacción fotosintética [40].

3. Metodología experimental

La cepa de *Chlorella vulgaris* se aclimató a condiciones de cultivo autotróficas, 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 requirieron siete soluciones *stock*: cinco soluciones de sales (NH_4Cl , 15.6 mgL^{-1} ; NaCl , 7.0 mgL^{-1} ; CaCl_2 , 4.0 mgL^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mgL^{-1} ; KH_2PO_4 , 15.0 mgL^{-1}); una de metales traza (se prepararon soluciones independientes para cada metal traza: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.98 gL^{-1} ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.20 gL^{-1} ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 gL^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 18.0 gL^{-1} ; $\text{NaMo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.63 gL^{-1}) [50], posteriormente se disolvieron 3.15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 4.36 g de Na_2EDTA^+ en 900 mL de agua destilada y se agregaron 1 mL de cada una de las soluciones de metales traza, se aforó a 1 L y se agitó. La solución alcanzó un pH igual o menor a 2 [48]. Y finalmente una de vitaminas: para la preparación de la solución con vitaminas se extrajo el contenido de 3 cápsulas de un producto comercial (vitamina FORZE VF Q-10) y se disolvió en 100 mL de

agua destilada para obtener una concentración de tiamina 4.33 g, biotina 1 g y B₁₂ 0.0036 g; posteriormente se filtró para y se mantuvo en refrigeración [49].

Se utilizaron 4 botellas de polietilentereftalato (PET) como fotobiorreactores (FBR), con un volumen operacional de 2.5 L de medio de cultivo en cada uno; para el ensamble de cada FBR se utilizaron además 2 botellas de PET con capacidad de 1 L, una conteniendo agua destilada y la segunda agua clorada al 20%, ambas con volumen de 500 mL; se utilizaron dos bombas de aire ELITE 799 para agitación; cada sistema de cultivo estuvo interconectado mediante mangueras de 4 mm de diámetro; con la finalidad de que el aire proporcionado por las bombas se humidifique, éste pasa en primera instancia por la botella con agua destilada y posteriormente se adapta al FBR con medio de cultivo para la agitación; el aire saliente del FBR se transfirió a la solución clorada de la segunda botella para evitar contaminación al exterior [43]; 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: violeta (400-450 nm), azul (450-500 nm) y roja (620-700) y el cuarto se mantuvo sin forrar. 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 W de 0.55 M de largo, distribuidas de manera horizontal, con la finalidad de obtener 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodos de 12:12 h. El flujo de aireación fue constante a 2.5 vvm con la finalidad de mantener un mezclado homogéneo en el cultivo, para una correcta iluminación y evitar sedimentación (Ver Figura 2).

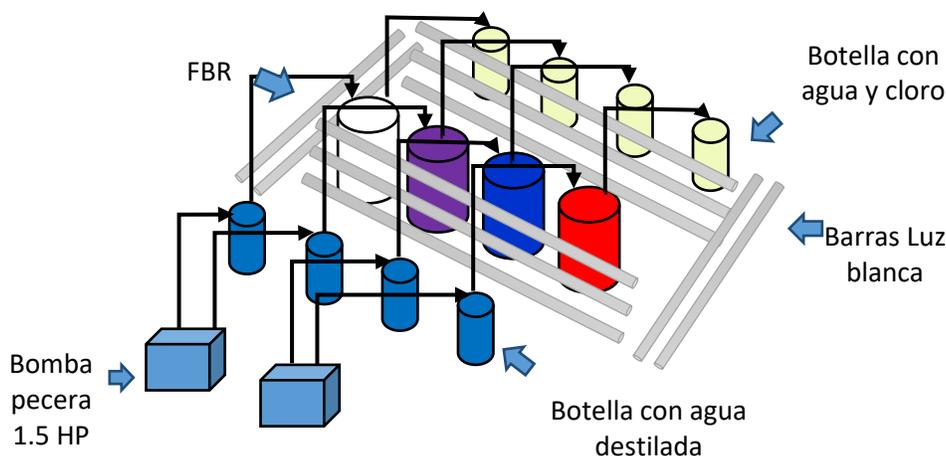


Figura 2. Ensamblado de los FBR desde la bomba hasta la botella contenedora de cloro.

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.

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

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. 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_1 es filtro con biomasa, PF_0 filtro sin biomasa y v es el volumen del medio filtrado de la muestra en mL [48].

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

Para realizar la determinación de consumo de nitrógeno se filtraron 50 mL de medio de cultivo agregándole 4 gotas de H_2SO_4 , para mantenerse en refrigeración. Posteriormente el volumen se separó en 2 muestras de 25 mL, a cada una se le agregó 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Después se prepararon 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 y esta se titularon con H_2SO_4 0.02 N hasta que la solución cambio de verde a morado. La concentración de $N-NH_4^+$ se determinó con la siguiente ecuación:

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

El medio se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal. La biomasa recuperada se congeló a $-4.0^\circ C$ para su conservación, posteriormente se liofilizó por un lapso de 3 días y se mantuvo en refrigeración constante [49]. Para conocer si existió diferencia significativa en los resultados obtenidos, se realizó análisis de varianza (por sus siglas en ingles ANOVA) con ayuda del programa Statdisk versión 12.0.2, si se obtenía una diferencia significativa en los resultados se utilizaba la prueba Tukey.

4. Resultados experimentales

En la Figura 3 se muestran los conteos celulares realizados a los experimentos cada 24 h. Observándose una fase de adaptación en los 4 cultivos pasando las primeras 24 h, seguido de una fase exponencial muy prominente en el cultivo con luz blanca con un máximo conteo de 13.3×10^6 celmL⁻¹.

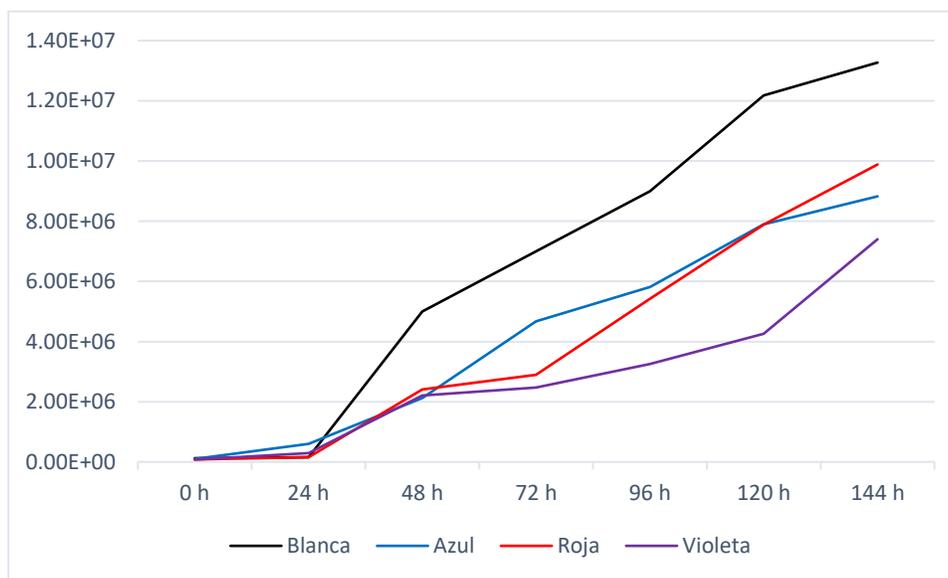


Figura 3. Gráficas de crecimiento celular (cel x mL⁻¹) vs Tiempo (h)



Por otra parte, se observa que el cultivo realizado con luz roja, presenta un máximo crecimiento de 9.88×10^6 celmL⁻¹, mientras que el experimento con luz azul, mostró un máximo desarrollo celular de 8.83×10^6 celmL⁻¹ y por último el experimento con luz violeta, presentó máximo crecimiento celular de 7.50×10^6 celmL⁻¹, los resultados obtenidos fueron inferiores a los reportados en otros trabajos en condiciones similares [50, 51, 52].

En la Tabla 5 se indican los resultados de los parámetros de densidad celular, tasas específicas de crecimiento (μ) y consumo de nitrógeno de los experimentos realizados; en los cuales se puede observar que, comparando estos cuatro experimentos los mejores resultados se obtuvieron durante el experimento con espectro de luz blanca, obteniendo una máxima densidad celular de 13.3×10^6 celmL⁻¹, tasa específica de crecimiento de 0.0229 d⁻¹ y consumo de nitrógeno de 60%. Mientras que los demás experimentos con espectros de luz (rojo, azul y violeta) estuvieron en el rango de 50 a 45% de consumo de nitrógeno, máxima densidad celular de 8.83×10^6 celmL⁻¹ y la tasa de crecimiento específico (μ) no superó los 0.0168 d⁻¹; 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 ($P \geq 0.05$).

Tabla 5. Experimentos en diferentes espectros de luz suministrados, datos promedio de máxima densidad celular, tasa de crecimiento específico μ , consumo de nitrógeno y biomasa peso seco X.

Equipo	Espectro de luz	Máx. densidad celular (celx10 ⁶ mL ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Consumo N-NH ₄ (%)	X (gL ⁻¹)
Columna de burbujeo	Blanco	13.3±2.04 ^a	0.0229±1.16	60.00± 21.31 ^a	1.26±0.28 ^a
	Rojo	9.88±1.18 ^b	0.0168±0.90	50.00± 17.91 ^b	0.894±0.47 ^b
	Azul	8.83±0.77 ^b	0.0162±1.00	49.00± 16.54 ^b	0.890±0.66 ^b
	Violeta	7.50±0.75 ^b	0.0160±0.86	45.00± 17.68 ^b	0.80±0.84 ^b

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

Los resultados obtenidos de crecimiento y remoción de nitrógeno (N-H₄⁺), fueron similares a los reportados por otros autores [53,54] de igual manera en otros estudios se indican valores de densidad celular mayor a 17×10^6 cel mL⁻¹, una tasa específica de crecimiento mayor de 0.1800 d⁻¹ y consumo de (N-NH₄⁺) del 90 %; esto sugiere que al haber un aumento en la densidad celular, las células microalgales consumen el N-NH₄⁺ de su medio [48,55], esta situación se observó en cada uno de los experimentos, sin embargo, en cada uno existió una longitud de onda diferente, lo que se manifestó de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, cabe mencionar que los resultados pudieran variar si se hubieran dejado por más tiempo hasta alcanzar la fase estacionaria o de estabilidad antes de la fase de muerte, ya que aún se observa una tendencia a seguir creciendo, según se observa en las gráficas. De acuerdo a estos resultados, se puede continuar realizando otros estudios y determinar en cuales condiciones de espectro de luz se pueden obtener otros productos como lípidos o bioetanol, para enriquecer este trabajo.

5. Conclusiones

En relación al crecimiento celular, en cada experimento a los diferentes espectros de luz se obtuvieron valores donde se incrementó el valor inicial del inóculo, con resultados similares comparado a otros estudios, sin embargo, en ningún experimento se observó algún tipo de daño por fotoinhibición de acuerdo a la intensidad lumínica proporcionada, esto se demuestra por el crecimiento celular obtenido y



las observaciones realizadas con ayuda del microscopio. En general se concluye que el espectro de luz blanca es el más adecuado para producción de biomasa microalgal, por las características que demuestra para que las plantas se desarrollen y produzcan biomasa, posteriormente se pueden desarrollar otros estudios para determinar las posibilidades de producir otros compuestos de importancia, como lípidos y carbohidratos como precedentes para obtención de biodiesel y bioetanol.

6. Agradecimientos

Los autores del presente Trabajo agradecen el apoyo brindado a la Universidad Autónoma del Carmen para el desarrollo del mismo.

7. Referencias

- [1] Mata T., Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- [2] Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12), 2738–2749. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>
- [3] El-Fatah Abomohra, A., 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-012-9917-y>
- [4] Kim, H. M., Oh, C. H. & Bae, H. (2017). Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 233, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.040>
- [5] Hyoun Kim, K., Seoung Choi, In., Myeong Kim, H., Gon Wi, S. & Bae, H. (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 153, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.059>
- [6] Muller-Feuga, A., Cahu R. C., Petirrojo, J. & Divanach. P. (2003). Uses of microalgae in Aquaculture. Chapter 7, Live Feeds in Marine Aquaculture. <https://doi.org/10.1002/9780470995143.ch7>
- [7] Dubinsky, Z., Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 163–176. doi:10.3354/ame01345
- [8] Yan, C., 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
- [9] Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766–776. doi:10.1002/bit.23016
- [10] 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
- [11] Takase, M., Zhao, T., Zhang, M., Chen, Y., Liu, H., Yang, L., & Wu, X. (2015). An expatriate review of neem, jatropha, rubber and karanja as multipurpose non-edible biodiesel resources and comparison of their fuel, engine and emission properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 495–520.
- [12] Roca Villanueva, B., Beltrán Salvador, M. & Gómez Huelgas, R. (2019). Cambio climático y salud. *Revista Clínica Española*, 219(5), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2019.01.004>



- [13] Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J.-G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.02.044>
- [14] Castro Martínez, C., Beltrán Arredondo, L. I. y Ortiz-Ojeda J. C. (2012). PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y BIOETANOL: ¿UNA ALTERNATIVA SUSTENTABLE A LA CRISIS ENERGÉTICA? *Ra Ximhai*, 8(3), 93-100.
- [15] Ferris i Tortajada, J., García i Castell, J., López Andreu, J. A., García i Domínguez F., Ortega García, J. A., Berbel Torneo, O., Guillen Fontalba, E., Ferris i García, V. y Cánovas Conesa, A. (2001). Enfermedades asociadas a la polución atmosférica por combustibles fósiles. Aspectos pediátricos. *PUESTA AL DÍA*, 57(3), 213-225
- [16] Xu, Y., Zhang, L., Chang, J., Zhang, X., Ma, L., Wang, T., & Zhang, Q. (2016). One step hydrogenation–esterification of model compounds and bio-oil to alcohols and esters over Raney Ni catalysts. *Energy Conversion and Management*, 108, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.10.062>
- [17] Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>
- [18] Rulli, M. C., Bellomi, D., Cazzoli A. De Carolis, G. & D’Odorico P. (2016). The water-land-food nexus of first-generation biofuels. *Scientific reports*. 22521. <https://doi.org/10.1038/srep22521>
- [19] Ashokkumar, V., Salim, M. R., Salam, Z., Sivakumar, P., Chong, C. T., Elumalai, S., Sureh V. & Ani, F. N. (2017). Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from brown marine macroalgae *Padina tetrastratica*. *Energy Conversion and Management*, 135, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.12.054>
- [20] Noraini, M. Y., Ong, H. C., Badrul, M. J. & Chong, W. T. (2014). A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.089>
- [21] Xu, S., Elsayed, M., Ismail, G. A., Li, C., Wang, S., & Abomohra, A. E.-F. (2019). Evaluation of bioethanol and biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* grown in biodiesel waste glycerol: A sequential integrated route for enhanced energy recovery. *Energy Conversion and Management*, 197, 111907. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.111907>
- [22] Gambelli, D., Alberti, F., Solfanelli, F., Vairo, D., & Zanoli, R. (2017). Third generation algae biofuels in Italy by 2030: A scenario analysis using Bayesian networks. *Ecopapers*, 103(c), 165-178. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2017.01.013>
- [23] Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>
- [24] Abascal, Fernández R. (2017). ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. MATRIZ DE REACCIONES Y OPTIMIZACIÓN. (Trabajo fin de Grado). Universidad de Cantabria, Cantabria, España.
- [25] 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(10), 3411-3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- [26] Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.*, 135, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- [27] Widjaja, A., Chien, C. and Ju, Y. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.07.007>



- [28]Park. J. B. K., Craggs R. J. & Shilton A. N. (2011a). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high-rate algal pond. *Water Research*, 45(20), 6637-6649. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>
- [29]Park. J. B. K., Craggs R. J. & Shilton. A. N. (2011b). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- [30]Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- [31]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(10), 3411-3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- [32]Abomohra, A. E.-F., Jin, W., Tu, R., Han, S.-F., Eid, M., & Eladel, H. (2016). Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 596–606. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>
- [33]Ardila Álvarez, A. M., López Matos, Y., Vásquez Cáceres, M. E., González Delgado A. D. y Barajas Solano A. F. Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *Tecnológicas*, 20(3), 83-94.
- [34]Sapci, Z., & Morken, J. (2014). The effect of algae species on biodiesel and biogas production observed by using a data model combines algae cultivation with an anaerobic digestion (ACAD) and a biodiesel process. *Energy Conversion and Management*, 79,519-524. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.12.010>
- [35]El-Dalatony, M. M., Salama, E.-S., Kurade, M. B., Kim, K.-Y., Govindwar, S. P., Rae Kim, J., Kwon E.E., Min, B., Jang, M., Oh, S., Chang, S. W., Jeon, B.-H. (2018). Whole conversion of microalgal biomass into biofuels through successive high-throughput fermentation. *Chemical Engineering Journal*, 360, 797-805. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.042>
- [36]Arredondo vega, B. O. & Voltolina D. (2007). *MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL*. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1403>
- [37]Hernández Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología Marina y Oceanografía*, 49(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- [38]Contreras Flores C., Peña Castro J., Flores Cotera L. y Cañizares Villanueva R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *INTERCIENCIA*, 28(8).
- [39]Ramírez Carmona, M. E., Rendón Castrillón, L. & Vélez Salazar, Y. (2013). *Microalgas para la industria alimenticia*. Universidad pontificia bolivariana.
- [40]FAO, 1991. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department, USA.
- [41]Kendirlioglu-Şimşek, G. & Kadri-Cetin, A. (2017). Effect of different wavelengths of light on growth, pigment content and protein amount of *Chlorella vulgaris*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(12), 7974-7980.
- [42]Ruiz Martínez A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anarómicamente. Tesis de posgrado. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.
- [43]Richmond, A. (2000). Biotecnología de microalgas en el cambio de milenio: una visión personal., 12 (3-5), 441–451. doi: 10.1023 / a: 1008123131307
- [44]Sánchez Saavedra M. P., Voltolina, D. (2002). Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures *Ciencias Marinas*, 28(3), 273-279. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v28i3.225>



- [45]Ho, S., Huang, S., Chen, C., Hasunuma, T., Kondo, A. & Chang, J. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- [46]Richmond, A. & Hu, Qiang. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Second.
- [47]Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., Chang, J.-S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1-10.
- [48]Guillard, R.L.L & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- [49]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 Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- [50]Ruiz Marin, A., Mendoza Espinosa, L. G.; Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semicontinuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58– 64.
- [51]Lysenko, V., Kosolapov, A., Usova, E., Tatosyan, M., Varduny, T., Dmitriev, P., Kunitsina, A. (2021). *Chlorophyll fluorescence kinetics and oxygen evolution in Chlorella vulgaris cells: Blue vs. red light*. *Journal of Plant Physiology*, 258-259, 153392. doi:10.1016/j.jplph.2021.153392
- [52]Sadeghizadeh, A., Dad. Farhad. F., Moghaddasi, L. & Rahimi, R. (2017). CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*. 243. 10.1016/j.biortech.2017.06.147.
- [53]Xin Y., Lu Y., Lee Y., Wei L., Jia J., Wang Q. Wang D., Bai F., Hu H., Hu Q, Liu J., Xu J. & Xu J. (2017). Producing Designer Oils in Industrial Microalgae by Rational Modulation of Co-evolving Type-2 Diacylglycerol Acyltransferases. 10(12) 1523-1539 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.011>
- [54]Haro, S. y 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. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua Morelos, México.
- [55]Kim J., Yoo G., Lee H., Lim J. Kim K., kim C. W., Park M. S. & Yang J. (2012). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae, 31(6), 862-876. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.006>