



## EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR, REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR *CHLORELLA VULGARIS* A DIFERENTES CONDICIONES DE AIREACIÓN EN DOS TIPOS DE FOTOBIOREACTORES ANULARES

### EVALUATION OF CELL GROWTH, NITROGEN REMOVAL AND LIPID PRODUCTION BY *CHLORELLA VULGARIS* TO DIFFERENT CONDITIONS OF AIREATION IN TWO TYPES OF ANNULAR PHOTOBIOREACTORS

J.C. Robles-Heredia<sup>1\*</sup>, J.C. Sacramento-Rivero<sup>2</sup>, A. Ruiz-Marín<sup>1</sup>, S. Baz-Rodríguez<sup>2</sup>  
Y. Canedo-López<sup>1</sup>, A. Narváez-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen. C. 56 #4, Av. Concordia, Col. Benito Juárez, C.P. 24180. Ciudad del Carmen, Campeche, México.

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, C.P. 97203. Mérida, Yucatán, México.

Received December 14, 2015; Accepted April 11, 2016

#### Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de las condiciones hidrodinámicas a diferentes tasas de aireación (1.4, 1.8 y 2.3 vvm) y la geometría de dos fotobiorreactores anulares (*airlift* y *columna* de burbujeo) con iluminación interna sobre el crecimiento celular, remoción de nitrógeno y producción de lípidos de *Chlorella vulgaris*. Se aplicó un modo de cultivo con reducción de nitrógeno en dos etapas para fomentar la acumulación de lípidos. El inóculo se cultivó con una concentración inicial de 90 mg L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (suficiencia de nitrógeno) y al término de la fase exponencial se diluyó en fotobiorreactores con volumen de 11 L, a concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (reducción de nitrógeno). Los resultados mostraron que con tasas de aireación similares el régimen hidrodinámico en ambos equipos fue apreciablemente diferente, presentándose mayor turbulencia en *airlift*. Sin embargo, el aumento en la tasa de corte y en la agitación no causó daño celular, ni fotoinhibición. Se alcanzaron crecimientos celulares de hasta 12×10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>, el consumo de nitrógeno se mantuvo siempre entre el 16 y el 19% y las tasas de corte se calcularon en el rango de 120-340 s<sup>-1</sup>. Las mayores productividades de lípidos se alcanzaron a 1.8 vvm con (0.650 y 0.528) mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en columna de burbujeo y *airlift* anulares, respectivamente. **Palabras clave:** tasa de corte, tasa de aireación, fotobiorreactores.

#### Abstract

In this work the effect of the hydrodynamic conditions to different aeration rate (1.4, 1.8, and 2.4 vvm) and two internally lit, annular FBR geometries (*airlift* and bubble column) on cell growth, nitrogen removal and lipid production of *Chlorella vulgaris* were evaluated. A two-step nitrogen reduction cultivation mode was used for promoting lipid accumulation. The inoculum was cultivated at an initial concentration of 90 mg L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nitrogen sufficiency) and at the end of the exponential phase it was fed to 11 L FBR at a sufficient dilution to start with 20 mgL<sup>-1</sup> of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nitrogen reduction). The results showed that at similar aeration rates, very different hydrodynamic regimes were attained in each FBR, being more turbulent in the *airlift* geometry. However, the degree of stirring and mixing did not cause cell damage or photoinhibition. Cellular growth of up to 12 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> were observed, nitrogen consumption was always between 16 and 19%, and calculated shear rates were in the range of 120-340 s<sup>-1</sup>. The major lipid productivity was reached at 1.8 vvm (0.650 and 0.528) mg·L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in annular bubble column and *airlift* geometries, respectively.

**Keywords:** shear rate, aeration rate, photobioreactors.

## 1 Introducción

Diversos estudios han demostrado que algunas especies de microalgas pueden almacenar cantidades

importantes de triglicéridos o triacilglicerolos (TAG), que son la materia prima para producir biodiesel. La mezcla de cadenas de ácidos grasos saturados y no saturados (C<sub>12</sub> a C<sub>22</sub>) presente en muchas de las

\* Corresponding author. E-mail: jrobles@pampano.unacar.mx  
Tel y fax. 01-938-38-1-10-18, Ext. 2103

microalgas, es propicia para producir biodiesel (Mata y col., 2010; Xin y col., 2010). Algunas especies de microalgas suelen alcanzar un alto contenido de lípidos (20-50% de peso celular seco) y es posible incrementar su contenido mediante el control de diversos factores bióticos y abióticos del cultivo, como la intensidad de luz, el fotoperiodo, la temperatura, nutrientes, el modo y la intensidad de agitación (Robles-Heredia y col., 2015). El rendimiento total de lípidos a partir de microalgas no solo depende de la concentración de biomasa alcanzada, sino también del contenido de aceite celular; cabe señalar que bajo condiciones de estrés por limitación de nutrientes, el crecimiento celular tiende a disminuir mientras que el contenido de lípidos aumenta (Fernández y col., 2012; Mujtaba y col., 2012), por lo tanto, la variable más importante para maximizar la producción de biodiesel a partir de cultivos de microalgas es la productividad de lípidos dada en gramos de lípidos por litro de cultivo por día (Mujtaba y col., 2012; Griffiths y col., 2012).

El cultivo de microalgas a escala industrial se puede realizar en sistemas abiertos tales como estanques (*raceways*) y en sistemas cerrados llamados fotobiorreactores (FBR). En ambos sistemas, la fuente y la intensidad de luz son factores críticos que afectan el rendimiento del crecimiento fototrófico de la microalga (Mata y col., 2010).

Los sistemas de cultivo abierto normalmente son menos costosos de construir y de operar, más durables que los FBR y con una mayor capacidad de producción. Sin embargo, requieren mayor extensión de tierra; más susceptibles a las condiciones del clima, sin control de temperatura e iluminación, propensos a contaminación y autosombreado, pudiendo llevar al cultivo a un colapso total, (Grobbelaar, 2010).

Los FBR ofrecen algunas ventajas como un mejor control sobre las condiciones de cultivo y parámetros de crecimiento, previenen evaporación, reducen pérdidas de CO<sub>2</sub>, permiten mayor densidad celular, mayores productividades volumétricas, y ofrecen mayor seguridad y protección del ambiente, previniendo la invasión por microorganismos. Sin embargo, algunas desventajas pueden ser mencionadas como: sobrecalentamiento, acumulación de oxígeno, dificultad en el escalamiento, alto costo de construcción y operación, posible daño celular de estrés por corte y deterioro del material usado en la fotoetapa (Monkonsit y col., 2011; Fernández y col., 2012). Estas desventajas pueden solventarse mediante un adecuado diseño de reactor.

El mezclado es una variable importante, ya que

garantiza que las células dentro del equipo puedan tener acceso a la luz y evitar la acumulación de oxígeno en el medio de cultivo; así como también impedir la precipitación de las células o su adhesión a las paredes del equipo. Para cualquier tipo de FBR usado en el cultivo algal, se requiere un mezclado eficaz con el fin de producir una dispersión uniforme de las microalgas en el medio de cultivo, eliminando así los gradientes de concentración, luz, nutrientes y temperatura. Sin embargo, altas velocidades a menudo no son prácticas debido a que se incrementan las tasas de corte que a menudo dañan a las células (Natsunome y Yoshimoto 2013). Se ha documentado que el exceso de la agitación mecánica genera turbulencia, lo que puede originar daños permanentes en la estructura celular afectando el crecimiento y la producción de metabolitos; por el contrario, una agitación escasa puede provocar sedimentación y muerte celular. (Grobbelaar 2010; Monkonsit y col., 2011; Fernández y col., 2012).

Dentro de los FBR de columna vertical se pueden mencionar dos configuraciones: tipo *airlift* y *columna* por burbujeo convencional. En comparación con los de tipo horizontal, presentan una mejor desgasificación, impidiendo la acumulación de oxígeno, el cual inhibe el crecimiento algal. La columna por burbujeo es un recipiente simple en la que se inyecta el gas por la parte inferior y el mezclado aleatorio se produce por las burbujas ascendentes. Un reactor tipo *airlift* consiste en dos regiones de flujo: descendente (*downcomer*) y ascendente (*riser*), las cuales pueden disponerse concéntricamente o conectadas cíclicamente. El movimiento continuo del líquido y su consecuente capacidad de mezclado se debe a la constante adición de una corriente de gas en la zona ascendente, generando una convección forzada para el líquido (Martínez, 2011; Monkonsit y col., 2011; Hincapie, 2010).

Las diferencias hidrodinámicas en los equipos *airlift* columna de burbujeo, pueden repercutir sobre las propiedades físicas y bioquímicas de las células microalgales durante el proceso de cultivo; debido a estas diferencias se puede mencionar que a una misma tasa de aireación la configuración *airlift* puede provocar mayor turbulencia y pobre crecimiento celular debido al fenómeno de fotoinhibición por exceso de luz por el número de veces que las células acceden a la fuente de luz, además de otros aspectos negativos como el estrés hidrodinámico por esfuerzo de corte (Monkonsit y col., 2011). El interés de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones hidrodinámicas a diferentes tasas de aireación, sobre

distintos parámetros bioquímicos como el crecimiento celular, la remoción de nitrógeno y la acumulación de lípidos de *Chlorella vulgaris* en cultivos con limitación de nitrógeno utilizando dos geometrías de FBR (columna de burbujeo anular y *airlift* anular).

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Selección de la cepa y el medio de cultivo

La microalga *Chlorella vulgaris* se obtuvo del cepario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México. Se seleccionó por su alto potencial para la producción de biodiesel, proveniente de su alta productividad y perfil de ácidos grasos (Griffiths y col., 2012), así como su capacidad de desarrollarse en agua residual urbana, medios comerciales y en condiciones de limitación de nitrógeno (Widjaja y col., 2009; Gouveia y Oliveira, 2009; Chiu y col., 2008; Solovchenko y col., 2008). Para la aclimatación, *C. vulgaris* se cultivó en medio de cultivo (pH: 7) con una composición similar al efluente del tratamiento primario de una planta urbana de tratamiento de aguas residuales (Ruiz-Marin y col., 2010), como sigue: 7 mg NaCl, 4 mg CaCl<sub>2</sub>, 2 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 115.6 mg NH<sub>4</sub>Cl, todas disueltas en 1 L de agua destilada. Metales traza y vitaminas fueron adicionados de acuerdo al procedimiento para medio f/2 de Guillard y Ryther (1962). Durante la aclimatación (1 mes), la microalga fue transferida a medio de cultivo fresco cada siete días a 28±1 °C y una intensidad de luz de 100 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### 2.2 Proceso de cultivo

Durante el desarrollo experimental, inicialmente, *C. vulgaris* fue cultivada en medio enriquecido (90 mg L<sup>-1</sup>); posteriormente, dichos cultivos fueron sometidos a una reducción de nitrógeno a concentración de nitrógeno de 20 mg L<sup>-1</sup>, similar a lo descrito por Robles-Heredia y col. (2015) del cultivo madre (ver sección 2.1), se tomó una fracción y se transfirió a cuatro semilleros tipo columna de burbujeo, agregando 200 mL a cada uno con una concentración de 15×10<sup>-4</sup> cel·mL<sup>-1</sup>; en cada reactor se agregó medio de cultivo fresco iniciando el cultivo a una concentración de 90 mg L<sup>-1</sup> de N y volumen de operación de 2.5 L, se suministró aireación continua de 0.4 vvm (Flujo volumétrico de aire por minuto

por unidad de volumen de medio) y con iluminación externa proporcionada con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de 12,000 lux. El crecimiento celular se monitoreó por conteo celular en cámara Neubauer utilizando un microscopio óptico con lente de 40x. Durante la fase de crecimiento exponencial (5 días), el volumen de los cuatro reactores se diluyó (40-50%) para inocular dos FBR de 11 L, de manera que al agregar el remanente de medio fresco la concentración inicial de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio fuera de 20 mg L<sup>-1</sup>. Cada cultivo se mantuvo y monitoreó durante 5 días, durante los cuales se muestrearon 100 mL de cada reactor para determinar conteo celular en cámara Neubauer cada 12 h, y biomasa seca, consumo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y productividad de lípidos cada 24 h.

### 2.3 Descripción de los fotobiorreactores de prueba

El cultivo se realizó paralelamente en dos FBR: un *airlift* anular (AA) y una columna de burbujeo anular (CBA), ambos con volumen de operación de 11 L y altura total de 0.95 m. La CBA consiste en dos tubos verticales de vidrio concéntricos; la fuente de luz es una lámpara de luz blanca tipo fluorescente ubicada dentro del tubo interno, con una intensidad de 16000 lux. La trayectoria de luz radial (distancia entre el exterior del tubo interno y el interior del tubo externo) es de 5 cm para no favorecer el autosombreado. El aire se inyectó a través de cuatro difusores cilíndricos fabricados de material plástico y estructura porosa distribuidos radialmente en la base. En el reactor CBA, el flujo de aire inyectado impulsa el medio de cultivo hacia la parte superior y, por acción de la gravedad las células descienden, este proceso de mezclado es continuo mientras dura el periodo de cultivo.

En cuanto al reactor AA, la construcción es exactamente igual que el reactor CBA, pero con adición de un tubo de acrílico transparente o baffle (*draft tube*) entre el tubo interno de iluminación y el tubo externo, para que se lleve a cabo el mezclado por efecto *airlift*. El aire se inyecta en la sección formada entre el baffle y el tubo interno, por donde se realiza el flujo ascendente (*riser*) y en la parte superior del baffle el fluido desciende (*downcomer*) entre el baffle y el tubo externo de vidrio. Las dimensiones principales de ambos FBR se indican en las Figs. 1 y 2; en la Tabla 1 se incluyen los parámetros de diseño correspondientes a la operación con 11 L de medio de cultivo.

Los parámetros que se indican en Tabla 1 son los siguientes:  $h_L$  es la altura del líquido en reposo sin flujo de gas (*liquid holdup*),  $h_G$  es la altura de

la columna incluyendo la retención de gas,  $h_B$  es la distancia entre la base y el deflector,  $d_o$  es diámetro interno del tubo exterior,  $d_{bi}$  y  $d_{bo}$  son los diámetros interno y externo del deflector, respectivamente;  $A_c$ ,  $A_r$  y  $A_d$  son las áreas seccionales en la CBA, y en el riser y downcomer del AA, respectivamente. La sección  $A_b$  es el área libre entre el riser y el downcomer en el AA, y corresponde a la superficie de un cilindro imaginario de diámetro  $d_{bo}$  y altura  $h_B$  (ver Fig. 2).

### 2.4 Diseño experimental

Para estimar el efecto de las diferentes condiciones de operación sobre la productividad de lípidos, se estableció un diseño factorial 2x3 con 2 repeticiones

siendo la variable respuesta la productividad de lípidos, y considerando los factores como: geometría del FBR en 2 niveles (*airlift* columna de burbujeo) y la tasa de aireación en 3 niveles (1.4, 1.8 y 2.3 vvm), empleando como límite inferior de aireación 0.91 vvm en *airlift* y como límite superior 3.4 vvm en columna de burbujeo. La geometría del FBR está a su vez relacionada con la tasa de corte prevalente en el mismo, esperándose una mayor tasa de corte en el riser del FBR-AA que en la columna anular CBA. Los resultados del diseño experimental se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial completo ( $\alpha: 0.05$ ) mediante el programa STATISTICA V7.

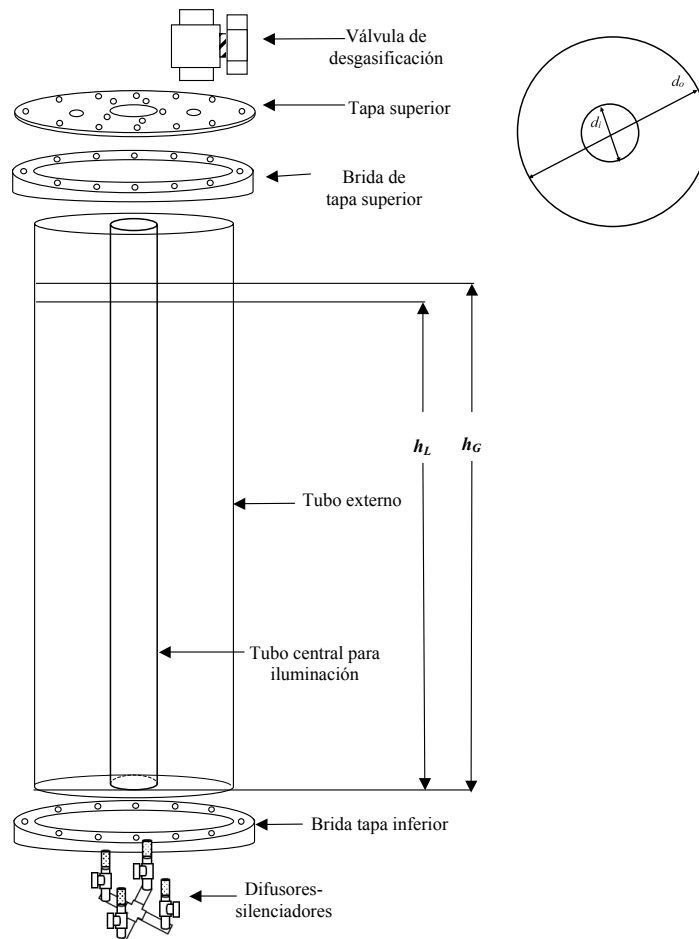


Fig. 1. Dimensiones y características del fotobiorreactor CBA.

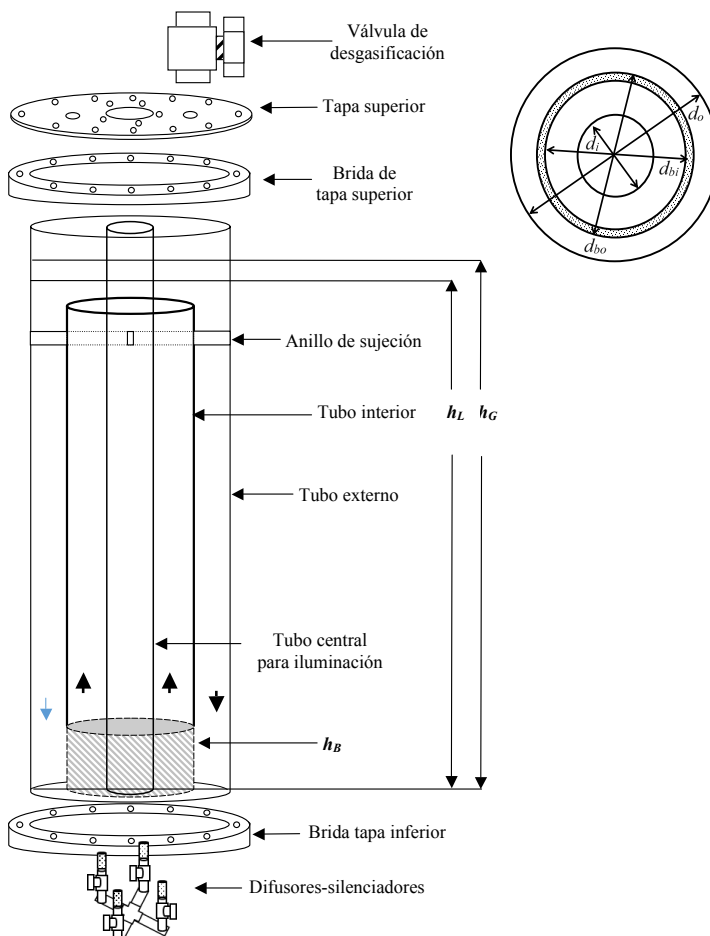


Fig. 2. Dimensiones y características del Fotobiorreactor AA. El área sombreada es la denominada área libre entre el riser y el downcomer  $h_B$ .

Tabla 1. Parámetros de diseño y variables de operación de los FBR

Parámetro	CBA	AA
$V/m^3$	0.011	0.011
$h_L/m$	0.8	0.86
$h_B/m$		0.05
$d_o/m$	0.144	0.144
$d_{bo}/m$		0.1016
$d_{bi}/m$		0.0953
$d_i/m$	0.0542	0.0542
$A_c/m$	0.0140	
$A_r/m$		0.0048
$A_d/m$		0.0082
$A_b/m$		0.016
Relación L/D	3.6	4.0
Superficie iluminada/volumen de medio/ $m^{-1}$	10.9	12.1

## 2.5 Cálculo de la tasa de corte

Para relacionar la geometría del FBR (columna anular o *airlift* anular) con la tasa de corte prevalente dentro del mismo, se reconoce que la tasa de corte característica ( $\gamma$ ) en el FBR es función de la velocidad superficial del gas  $U_g$ , de manera que para una columna de burbujeo:

$$\gamma = 1000U_g^2 \quad (1)$$

La Ec. 1 es válida en el rango de  $0.008 < U_g < 0.09 \text{ m s}^{-1}$  y  $1000 \text{ m}^{-1}$  para columnas *airlift* anulares (Ceri y col., 2008). En el caso de un *airlift*, la tasa de corte característica es la que existe en el *riser*, y la tasa de corte se calcula con la misma ec. (1), pero usando la velocidad del gas en el *riser*  $U_{gr}$ . La potencia neumática ( $PG/V_L$ ) en ( $\text{W m}^{-3}$ ), se considera como la energía o potencia generada por el flujo de entrada de gas o aire inyectado al equipo para ejercer por expansión el movimiento de agitación del fluido dentro del fotobiorreactor. Para una columna de burbujeo se calcula con ec. 2 de acuerdo a Doran y col. (1995).

$$\frac{PG}{V_L} = \rho L_g U_g \quad (2)$$

Para un reactor *airlift* (Chisti, 1989):

$$\frac{PG}{V_L} = \rho L_g U_{gr} \left( \frac{A_r}{A_r + A_d} \right) \quad (3)$$

en donde:

$$U_g = U_{gr} \left( \frac{A_r}{A_r + A_d} \right) \quad (4)$$

De esta manera, se puede ver que la potencia neumática en ambos FBR es la misma para cada valor de la tasa de aireación.

## 2.6 Determinación de la productividad de lípidos

Una vez concluido el tiempo de cinco días de la etapa de cultivo en ambos FBR, se realizó la obtención de la biomasa mediante floculación utilizando una solución de quitosano de acuerdo a la técnica de Romero y Ferrán (2001), modificada para este trabajo, se consideró al quitosano ya que presenta propiedades de inmovilización celular y evita la dispersión (Salazar-Leyva y col., 2014). Posteriormente, la biomasa cosechada se congeló y liofilizó por 48 h, a una temperatura de  $-40^\circ\text{C}$  y una presión de 0.133 mbar. La determinación de lípidos totales se realizó por el método reportado por Bligh y Dyer (1959) modificado como sigue: una muestra de 10 mg de biomasa

liofilizada se mezcló con 4 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 0.5 mL de agua destilada; la mezcla se sometió a sonicación por 15 minutos y centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos, se retiró el sobrenadante, al cual se le agregaron 2 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 15 minutos para observar la bifase. Con pipeta Pasteur se retiró la fase superior acuosa y la fase inferior lípido-cloroformo se secó con nitrógeno gaseoso para retirar el cloroformo y concentrar lípidos. De la misma forma se prepararon 2 blancos. Al concentrado de lípidos en cada tubo se le agregaron 3 mL de dicromato ácido de potasio al 2%, se colocaron en baño maría a  $100^\circ\text{C}$  por espacio de 15 minutos. Después de enfriar en baño de agua se agregaron 4.5 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y se enfrió a temperatura ambiente para leer absorbancia en el espectrofotómetro a 590 nm. Previamente, el valor de absorbancia  $A$  se correlacionó con la concentración de lípidos  $C_L$  (en  $\text{mg L}^{-1}$ ), utilizando un estándar de tripalmitina, resultando en la siguiente ecuación:

$$C_L = 0.5874A - 0.036 \quad r^2 = 0.99 \quad (5)$$

El contenido de lípidos en la muestra se traduce a una composición de lípidos ( $\% \text{ ww}^{-1}$ ) en base seca  $w$ , y esta a su vez se traduce en una productividad de lípidos  $P_L$  (en  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) con la siguiente ecuación:

$$P_L = \frac{w_1 X_1 - w_2 X_2}{t_1 - t_2} \quad (6)$$

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

## 3 Resultados y discusiones

### 3.1 Efecto de la tasa de aireación en el crecimiento celular y el consumo de nitrógeno

En la Fig. 3 se muestran las curvas de crecimiento celular en el semillero y en los FBR a las diferentes tasas de aireación estudiadas. Este modo de cultivo se denomina cultivo en dos etapas, en donde la primera etapa (el semillero) crece bajo suficiencia de nitrógeno ( $90 \text{ mg L}^{-1}$ ) y en la segunda (los FBR) se reduce considerablemente la concentración de nitrógeno (a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) de acuerdo a Robles-Heredia y col. (2015), para estimular la sobreproducción de lípidos intracelulares en la microalga, a expensas de un crecimiento celular reducido. En la Tabla 2 se indican los datos de crecimiento (valor máximo de densidad celular, tasa específica de crecimiento  $\mu$  y consumo de  $\text{N-NH}_4^+$ ) para todas las tratamientos experimentales.

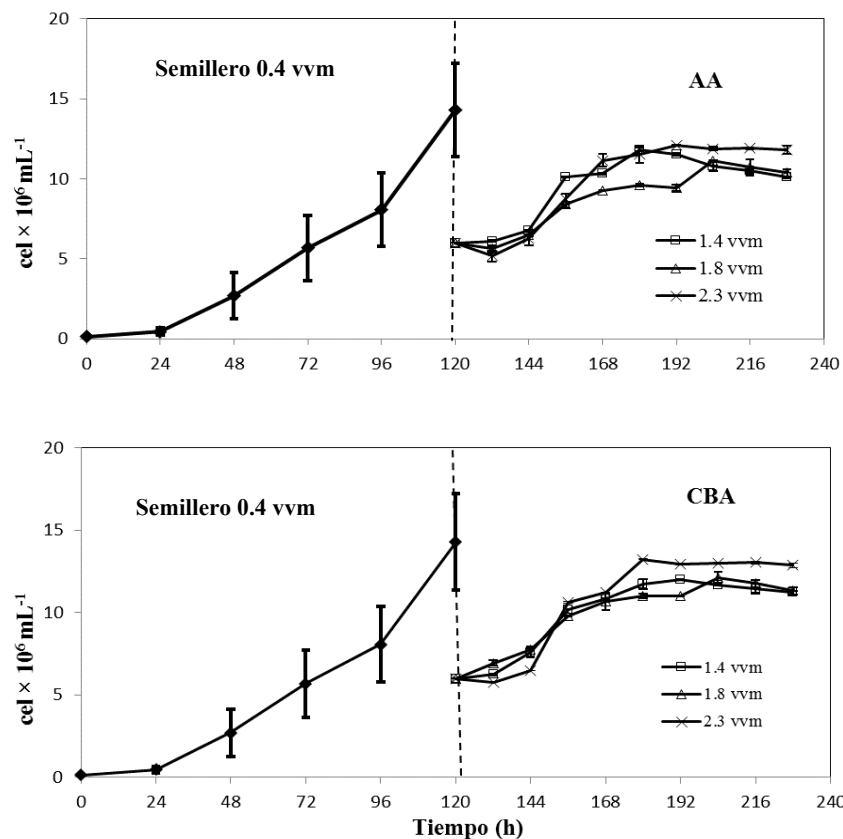


Fig. 3. Crecimiento celular en el semillero y en ambos equipos a las tasas de aireación propuestas.

 Tabla 2. Datos promedio de máxima densidad celular, tasas de crecimiento específico  $\mu$  y consumo de nitrógeno de *C. vulgaris* en ambos FBR a las tasas de aireación propuestas.

Tasa de aireación (vvm)	AA			CBA		
	Máx. densidad celular ( $\text{cel} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Consumo $\text{N-NH}_4^+$ (%)	Máx. densidad celular ( $\text{cel} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ )	$\mu$ ( $\text{d}^{-1}$ )	Consumo $\text{N-NH}_4^+$ (%)
1.4	11.82±0.11 <sup>a</sup>	0.312±0.002 <sup>a</sup>	32.6±1.0 <sup>a</sup>	12.00±0.03 <sup>a</sup>	0.288±0.014 <sup>a</sup>	32.2±1.0 <sup>a</sup>
1.8	11.11±0.02 <sup>a</sup>	0.336±0.021 <sup>a</sup>	30.3±1.7 <sup>a</sup>	12.11±0.34 <sup>a</sup>	0.288±0.021 <sup>a</sup>	30.3±0.3 <sup>a</sup>
2.3	12.11±0.00 <sup>b</sup>	0.504±0.014 <sup>b</sup>	34.2±0.4 <sup>a</sup>	13.03±0.03 <sup>b</sup>	0.432±0.002 <sup>b</sup>	38.8±0.2 <sup>a</sup>

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

A condiciones suficientes de nitrógeno, los reactores semilla alcanzaron altos valores en la densidad celular de  $14.3 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$  y en la tasa específica de crecimiento ( $\mu = 0.93 \text{ d}^{-1}$ ). Mientras no exista inhibición del crecimiento celular por limitación de nutrientes, la tasa de aireación resulta ser un factor

que favorece en el contacto de las células y la luz, reduciendo el efecto de autosombreado, esto puede ser observado de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 2) en donde con el incremento de la tasa de aireación a valores de 2.3 vvm, en ambos FBR (CBA y AA) se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en

los parámetros de crecimiento en comparación con los demás tratamientos.

Las curvas de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$  se presentan en la Fig. 4 sobrepuestas a las curvas de crecimiento en ambos FBR y a las diferentes tasas de aireación. El consumo de nitrógeno se mantuvo constante en todas las corridas, entre un 30 y 38% del nitrógeno disponible, sin mostrar diferencias significativas (Tabla 2). Estos valores de consumo de nitrógeno fueron bajos en comparación con los reportados por Mata y col. (2010) y Gouveia y Oliveira (2009). En la Fig. 4 se observa que el consumo de nitrógeno, aunque ocurre lentamente, continúa incluso después de que ha terminado la fase exponencial de crecimiento. Esto indica que si bien existió un cambio en el metabolismo algal al pasar del reactor semilla a los FBR, redireccionando el uso del nitrógeno disponible a metabolitos de almacenamiento, la limitación del crecimiento no se debió exclusivamente a la escasez de nitrógeno en el medio. Una posible explicación a este comportamiento es que las células se adaptaron para continuar con el desarrollo celular sin resentir la escasez de nitrógeno, es decir no ocurrió un estrés por nutrientes, manteniendo el metabolismo adquirido en la etapa del semillero, para continuar el crecimiento, a diferencia de lo reportado por Gouveia y Oliveira (2009); Takagi y col. (2000); Mazzuca-Sobczuka y Chisti (2010); Li y col. (2008); Solovchenco y col. (2008), donde sí se presentó la insuficiencia de nitrógeno y el fenómeno de estrés por nutrientes. Del mismo modo, al alcanzar la fase estacionaria y por el crecimiento celular, las microalgas tendrían mayor dificultad en acceder a la luz para realizar el proceso de fotosíntesis y consumir nitrógeno únicamente para mantener sus funciones celulares y producir metabolitos de almacenamiento (Gouveia y Oliveira 2009; Scragg y col., 2002; Sheehan y col., 1998).

Los valores alcanzados de  $\mu$  en ambos FBR (mostrados en la Tabla 2) fueron similares estadísticamente a (1.4 y 1.8) vvm; del mismo modo los valores de máxima densidad celular promedio en ambos equipos (AA y CBA) no presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 2). De la Figura 4 y la Tabla 2, también es posible indicar, que las tasas específicas de crecimiento aumentaron de manera similar conforme se incrementaba la tasa de aireación en cada tratamiento, mostrando diferencias significativas únicamente con respecto a una tasa de aireación de 2.3 vvm, donde se alcanzó una mayor  $\mu$  y densidad celular para ambos reactores. Tomando en consideración lo anterior y de acuerdo a los incrementos del crecimiento celular y tasa

específica de crecimiento ( $\mu$ ) alcanzados a las tasas de aireación de 1.8 y 2.3 vvm, se puede mencionar que no existieron aspectos relacionados a fotoinhibición, ni estrés por corte o sedimentación, dado que se presentaron las condiciones de agitación y mezclado adecuado.

Se observa que las máximas densidades celulares se alcanzaron entre las 60 y 72 horas a tasa de aireación de 2.3 vvm, tanto en *airlift* como en columna de burbujeo. Los valores de remoción de nitrógeno no fueron los esperados, los resultados sugieren que no se alcanzaron condiciones de limitación de N, esto probablemente a que las células consiguieron una pronta adaptación a bajas concentraciones de nitrógeno, sosteniendo su metabolismo y crecimiento desde la etapa del reactor semilla. Cabe señalar que en el reactor semilla no se obtuvo un consumo de nitrógeno alto (85-90%), de tal forma que al disminuir la concentración de nitrógeno al final de la primera etapa (semillero) de  $60 \text{ mg L}^{-1}$ , a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  en los FBR, las microalgas no resintieron la disminución de nitrógeno en el medio.

Los parámetros de crecimiento observados pueden relacionarse con los datos hidrodinámicos calculados; los datos de la potencia de bombeo y tasa de corte característica de acuerdo a cada una de las tasas de aireación utilizadas se indican en Tabla 3. Los regímenes de flujo bifásico fueron diferentes en cada equipo, de acuerdo a las velocidades superficiales del gas aplicadas en cada FBR. Para caracterizar el flujo bifásico aire/medio de cultivo dentro de los FBR, se utiliza comúnmente una clasificación de patrones de flujo como burbujeo homogéneo, *slug* (tapón), *churn* (turbulento heterogéneo) y anular, de acuerdo a Brill y Mukherjee (1999). Los puntos operacionales para cada FBR ubicados en un mapa de flujo bifásico mostrando estos patrones se muestran en la Fig. 5.

Se observa que el flujo en el reactor AA se mantuvo en régimen *slug*, mientras que en reactor CBA se desarrolló siempre como tipo de burbujeo homogéneo. Estos regímenes tienen importantes diferencias en el grado, tipo de agitación y mezclado. A una misma potencia de bombeo, la velocidad superficial del gas en el *riser* del AA es mucho mayor que en la CBA debido a que la sección de flujo es menor. Consecuentemente, la tasa de corte en flujo *slug* es considerablemente mayor que en burbujeo homogéneo, debido a la mayor turbulencia generada entre ambas fases. En la Fig. 6 se comparan la tasa específica de crecimiento medida contra la tasa de corte característica calculada de cada geometría. se observa que a pesar de aumentar casi dos veces la



tasa de corte en un mismo FBR, no se obtuvo un efecto negativo en las tasas de crecimiento, como se ha reportado en reactores con valores altos de tasa de corte (Hincapie, 2010); se descarta así que exista en este rango experimental daño subletal en las células por esfuerzo de corte; por el contrario, a mayores tasas de aireación dominó el efecto de agitación y mezclado sobre el esfuerzo de corte, mejorando el intercambio de gases y la accesibilidad de luz, logrando a su vez tasas específicas de crecimiento más altas.

Por otra parte, la Fig. 7 relaciona la concentración celular máxima  $X_{max}$  y la tasa de corte calculada. Se observa una tendencia importante de un aumento de la  $X_{max}$  con la tasa de aireación (y la tasa de corte) hasta alcanzar una valor crítico en el que el aumento de la

tasa de corte no influye más en  $X_{max}$ . Estos valores máximos se encontraron en 2.3 vvm para CBA y en 1.4 vvm para AA. Se identifica así que el efecto global de la tasa de aireación en el crecimiento celular es el de acelerar el crecimiento de *C. vulgaris* debido a un mejor mezclado, hasta alcanzar el valor máximo de densidad celular que permitan la transferencia de masa (más probablemente  $\text{CO}_2$  del gas hacia la célula) o la iluminación disponible para fotosíntesis. En las Fig. 6 y 7 también se incluyen dos tasas de aireación que se probaron fuera del diseño experimental (0.91 vvm para AA y 3.4 vvm para CBA). Estos dos valores se realizaron únicamente para confirmar las tendencias en las tasas de corte ya discutidas.

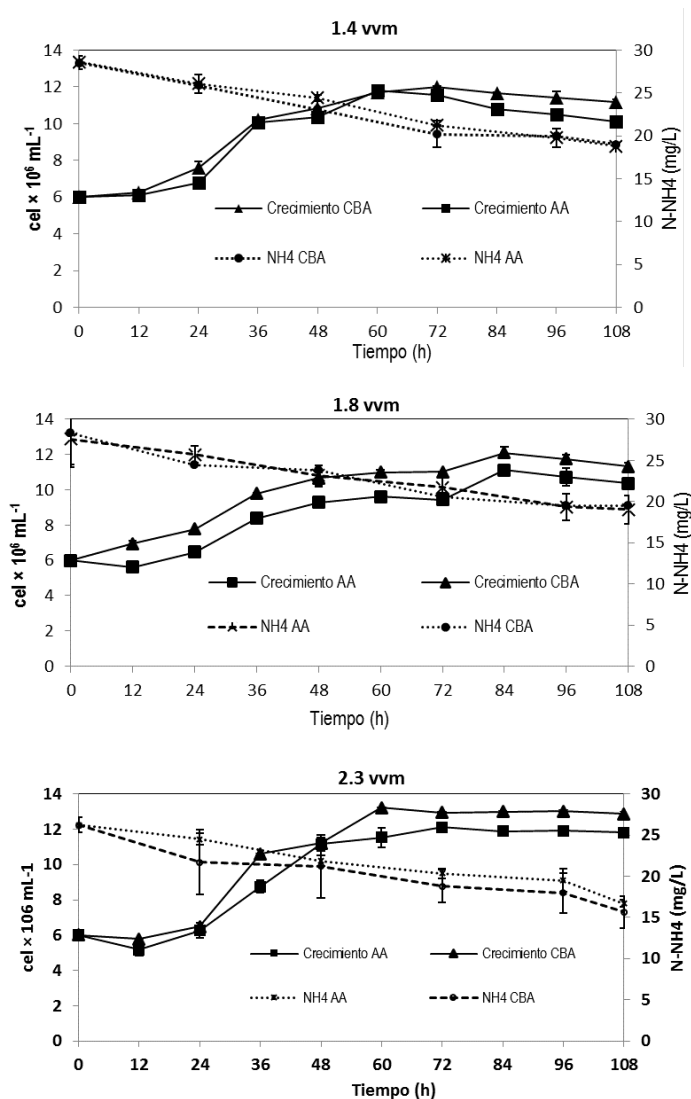


Fig. 4. Curvas de crecimiento y consumo de nitrógeno de *C. vulgaris* a las diferentes tasas de aireación en los FBR.

Tabla 3. Datos hidrodinámicos calculados a las tasas de aireación estudiadas en ambos FBR.

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	$PG/VL$ ( $Wm^{-3}$ )	$U_g$ ó $U_{gr}$ ( $ms^{-1}$ )	$\gamma$ ( $s^{-1}$ )
CBA	1.4	176	0.018	134
	1.8	235	0.024	155
	2.3	294	0.030	173
AA	1.4	176	0.052	228
	1.8	235	0.070	264
	2.3	294	0.087	295

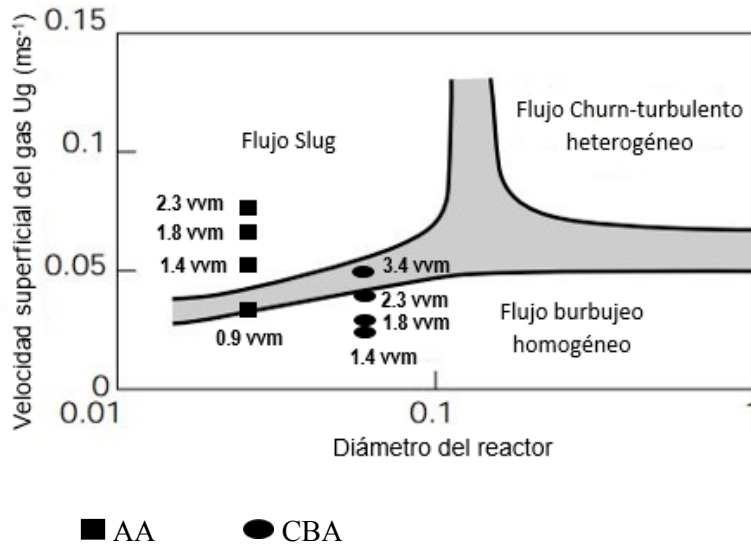


Fig. 5. Regímenes de flujo bifásico de los puntos experimentales.

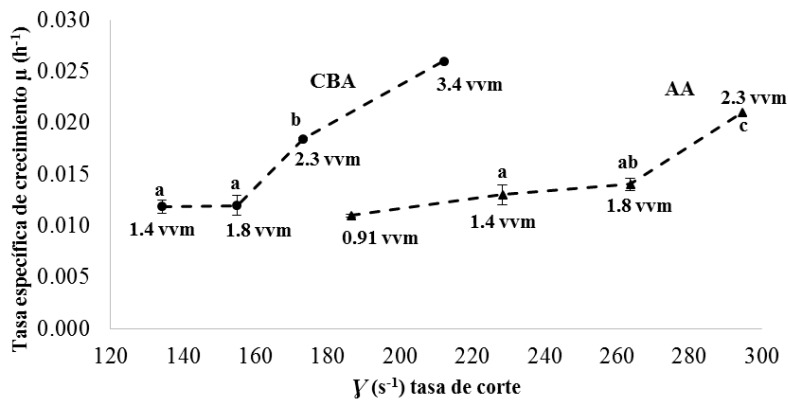


Fig. 6. Tasa de crecimiento máxima vs tasa de corte a las tasas de aireación indicadas en ambos equipos. Letras diferentes indican diferencias significativas de tasa de corte a las tasas de aireación propuestas de acuerdo a prueba Tukey ( $p \geq 0.05$ ).

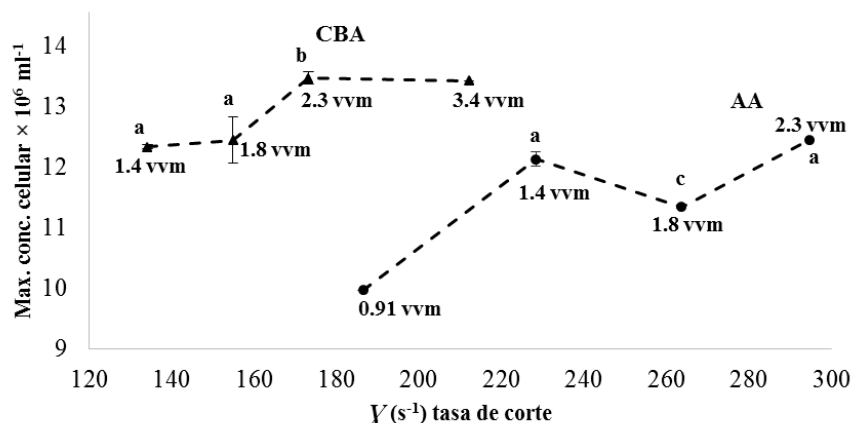


Fig. 7. Máxima concentración celular vs tasa de corte a las tasas de aire indicadas en ambos equipos. Letras diferentes indican diferencias significativas de tasa de corte a las tasas de aireación propuestas de acuerdo a prueba Tukey ( $p \geq 0.05$ ).

Debido a la tasa de aireación suministrada y configuración que presentan ambos equipos, es posible que las células presenten cambios en su metabolismo y crecimiento. Con el propósito de identificar si existe algún tipo de daño celular por esfuerzo de corte en ambos FBR, se compararon los valores de la *Tasa de corte*, proporcional al esfuerzo de corte o también conocido como efecto cizalla, calculados a las diferentes tasas de aireación propuestas en el diseño experimental (1.4, 1.8 y 2.3 vvm).

En el reactor AA, el régimen de flujo y configuración provocaron que las velocidades superficiales de gas y líquido presentaran valores más altos que en CBA, lo cual se relaciona con mayores tasas de corte conforme se incrementaban las tasas de aireación. Estas diferencias se relacionan con la configuración de cada reactor y en algunos casos pueden ser causa de daño celular, sin embargo, algunas especies se pueden adaptar a condiciones de esfuerzos de corte elevados.

De acuerdo a la Figura 6, se puede indicar que a pesar que el equipo AA presentó valores de tasas de corte alrededor de 1.5 veces mayores que en el equipo CBA, con flujos de aireación similares no se presentó un efecto negativo en las tasas de crecimiento específico, eliminando la posibilidad de que existiera daño subletal en las células por esfuerzo cizalla, en este rango experimental. Por el contrario, se puede señalar que a mayores tasas de aireación dominó el efecto de agitación y mezclado sobre el esfuerzo de corte, produciendo tasas específicas de crecimiento más altas.

De acuerdo al resultado anterior, se puede demostrar que mediante una ligera modificación a la geometría del FBR es posible cambiar sustancialmente la agitación característica del sistema, y reducir el tiempo de cultivo necesario para alcanzar la máxima densidad celular. Sin embargo, es aceptado que la configuración de los equipos y la tasa de aireación suministrada pueden presentar diferencias en las propiedades de las células microalgales durante el cultivo (Rodolfi y col., 2009; Xu y col., 2006). Por esto, se debe verificar si este cambio de régimen no causa afectaciones en otros parámetros importantes del cultivo, como el contenido de lípidos, el peso de biomasa seca, entre otros. Esto se analiza en la siguiente sección.

De la misma manera, en la Fig. 6 se puede observar que la máxima tasa de aireación fue a 1.8 vvm, ya que al incrementar el flujo de aireación, se manifiesta un aumento en la tasa específica de crecimiento. Lo que puede ser indicativo de que existe un punto crítico alrededor de este valor (1.8 vvm) en el que *C. vulgaris* adapta su metabolismo reaccionando a turbulencias mayores para incrementar su crecimiento. De acuerdo a esto, se puede interpretar que a tasas de aireación menores, las células tendrían mayor dificultad en acceder a la fuente de luz para realizar la fotosíntesis, presentándose autosombreado y/o menor agitación, consumiendo el nitrógeno necesario, únicamente para mantener sus funciones, producir metabolitos y otros productos de almacenamiento (Gouveia y Oliveira 2009; Scragg y col., 2002; Sheehan y col., 1998).

### 3.2 Efecto de la tasa de aireación en la producción de lípidos

Se monitoreó el contenido de lípidos en base seca  $w$  y la concentración de biomasa seca  $X$  cada 24 h en los FBR, con el objetivo de realizar una cinética de la productividad de lípidos PL para cada experimento, calculada con la ec. (6). Las cinéticas obtenidas se presentan en las Figs. 8 y 9.

En la Fig. 8 se puede observar que en general el contenido de lípidos fue bajo, entre 8 y 10%, menor en un rango entre 22-30% que en otros estudios (Soto-León y col., 2014; Widjaja y col., 2009; Gouveia y Oliveira, 2009; Sheehan y col., 1998).

Lo anterior probablemente esté relacionado a que no se presentó un efecto de limitación de nitrógeno en la segunda etapa de cultivo de los FBR, lo cual ocasionó un bajo contenido de lípidos. De acuerdo a esta condición, se puede señalar que la concentración de nitrógeno al final de la primera etapa del semillero fue más alta de lo que se esperaba ( $45 \text{ mg L}^{-1}$ ), por consiguiente, al realizar la dilución a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  en

los FBR, el volumen de inóculo en relación al número de células no presentó desde un inicio el efecto de limitación de nitrógeno, a pesar de que el crecimiento celular durante el proceso de cultivo en los equipos (CBA y AA) se duplicó. Esta situación hace suponer que las microalgas se adaptaron para continuar con su metabolismo de crecimiento y al no resentir el cambio por la reducción o limitación de nutrientes del medio de cultivo en los FBR, las células crecieron en número, sin que logran producir mayor cantidad de lípidos para su almacenamiento.

Esta situación de bajo rendimiento lipídico, se relacionó con los resultados de bajo consumo de nitrógeno en todos los tratamientos. En los experimentos en AA el contenido de lípidos disminuyó a lo largo del cultivo, con excepción del cultivo a 1.8 vvm, en donde disminuyó durante las primeras 48 h pero se observó un pico máximo a las 72 h. Este valor (10.3%) fue también el máximo observado en todas las curvas. El mismo comportamiento se observa para la CBA.

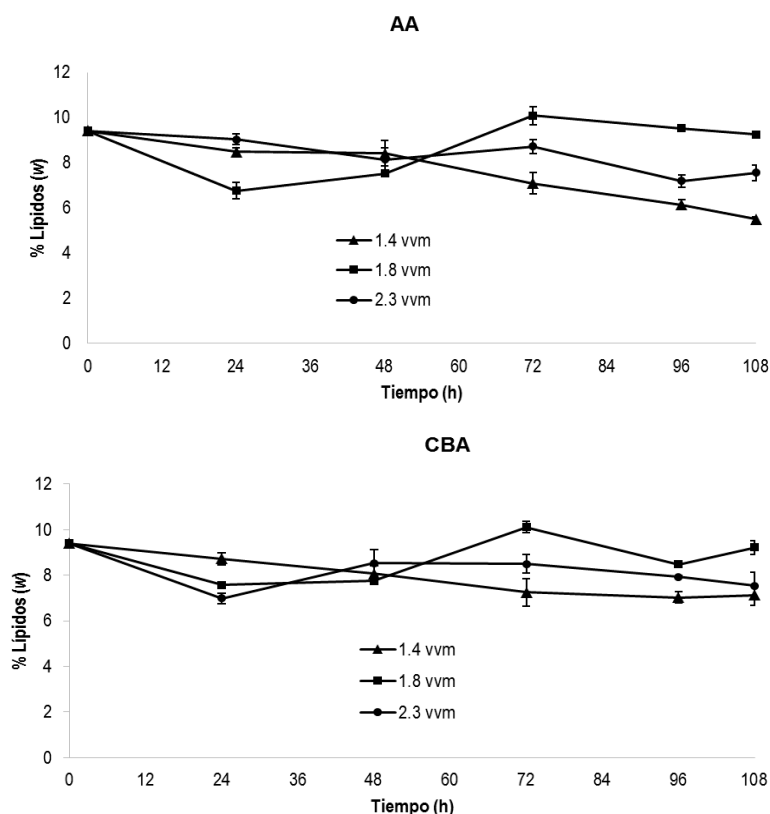


Fig. 8. Cinéticas del porcentaje de lípidos (base seca) en ambos FBR a las tasas de aireación estudiadas.

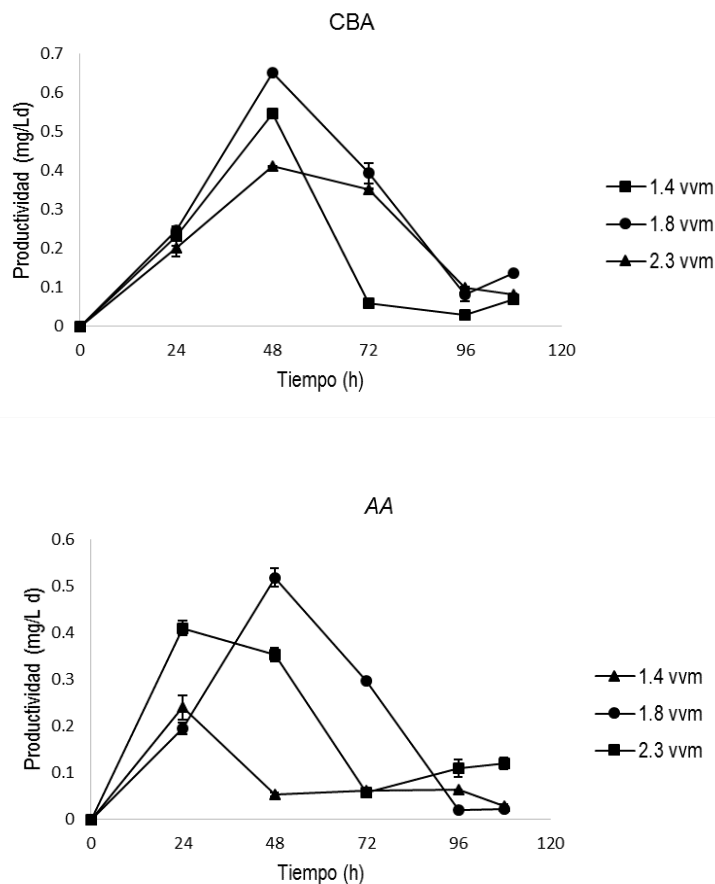


Fig. 9. Cinéticas de la productividad de lípidos en ambos FBR a las tasas de aireación estudiadas.

Los valores de las productividades de lípidos máximas ocurren después de 48 h de cultivo en el AA y 24 h en la CBA (ver Fig. 9), con la excepción notable en esta última del experimento a 1.8 vvm que ocurrió después de 48 h. El comportamiento de las cinéticas de productividad obedece a que la densidad celular alcanza un máximo alrededor de las 48 horas y el contenido de lípidos se mantiene relativamente constante, por lo que mientras el tiempo va incrementando, la productividad disminuye, según la ec. (6).

La Tabla 4 muestra los resultados relativos a la producción de lípidos en ambos FBR a las diferentes tasas de aireación. Se observa que las variaciones en el contenido de lípidos solamente son significativamente diferentes a la tasa de aireación de 1.8 vvm para ambos FBR. Los cambios observados en la productividad de lípidos son mayormente afectados por el contenido de lípidos  $w$ , más que por la concentración de biomasa

seca  $X$ , ya que estadísticamente no se observan diferencias significativas en los datos obtenidos de la biomasa en ambos FBR a esa tasa de aireación (ver Tabla 4).

Aunque el mayor porcentaje del incremento de productividades se presentó en el AA (120%), en la CBA se observó la productividad de lípidos más alta ( $0.65 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Ya que los valores de contenido de lípidos no fueron muy diferentes entre geometrías, la diferencia de productividad se le puede atribuir a que en la CBA se alcanzaron mayores crecimientos celulares.

De acuerdo a los valores alcanzados en la Figura 9 y Tabla 4, se observa que en CBA se obtuvo el mayor valor de productividad de lípidos ( $0.650 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) a las 48 horas con respecto a todas las tasas de aireación; además como ya se ha mencionado, el crecimiento celular tiene mayor repercusión en relación al valor alcanzado de las productividades lipídicas.

Tabla 4. Biomasa seca  $X$ , contenido de lípidos  $w$  y productividad de lípidos  $P_L$  máxima en ambos FBR a las tasas de aireación propuestas.

FBR	Tasa de aireación (vvm)	$X$ (g L <sup>-1</sup> )	$w_{max}$ (% ww <sup>-1</sup> )	$P_L$ máxima (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Incremento en $P_L^\dagger$ (%)
AA	1.4	0.13 ± 0.042 <sup>a</sup>	8.36 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.012 <sup>a</sup>	
	1.8	0.27 ± 0.042 <sup>b</sup>	10.37 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.528 ± 0.002 <sup>b</sup>	120
	2.3	0.16 ± 0.021 <sup>a</sup>	9.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.408 ± 0.025 <sup>c</sup>	70
CBA	1.4	0.22 ± 0.056 <sup>a</sup>	8.54 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.552 ± 0.026 <sup>b</sup>	
	1.8	0.30 ± 0.010 <sup>b</sup>	10.28 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.650 ± 0.019 <sup>d</sup>	17
	2.3	0.24 ± 0.041 <sup>a</sup>	8.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.410 ± 0.016 <sup>c</sup>	-26

\*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a prueba Tukey ( $p \geq 0.05$ ); ( $\pm$  Desviación estándar). <sup>†</sup>Incremento de la productividad de lípidos con respecto a 1.4 vvm.

En relación al reactor AA la mayor productividad (0.528 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se obtuvo a las 48 h a la tasa de aireación de 1.8 vvm, posteriormente se observa un decaimiento hasta el final del experimento, esto se debió a una reactivación por la agitación, afectando el crecimiento celular, generando un incremento celular. Los resultados alcanzados de productividades de lípidos no fueron los esperados ya que estuvieron en el rango de 0.2 a 0.650 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, es decir menor en un 40%, comparados con otros estudios que utilizaron condiciones similares en el proceso de cultivo con microalgas (Mujtaba y col., 2012; Griffiths y col., 2012; Gouveia y Oliveira, 2009; Mazzuca-Sobczuka y Chisti, 2010), lo que confirma el hecho de que no existió el efecto esperado de limitación de N durante el proceso de cultivo en los FBR, como se ha mencionado. La mayor productividad de lípidos se alcanzó a la tasa de aireación de 1.8 vvm con 0.650 en la CBA y 0.528 mg L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> en el AA.

## Conclusiones

El interés de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones hidrodinámicas a diferentes tasas de aireación, sobre distintos parámetros bioquímicos como el crecimiento celular, la tasa de crecimiento específico, la remoción de nitrógeno y la acumulación de lípidos de *Chlorella vulgaris* en cultivos con limitación de nitrógeno utilizando dos geometrías de FBR (columna de burbujeo anular y *airlift* anular).

En relación al crecimiento celular, los valores de  $\mu$  en ambos FBR, fueron similares estadísticamente en 1.4 vvm con 0.312 d<sup>-1</sup> y en 1.8 vvm con 0.336 d<sup>-1</sup> para el reactor AA, mientras que en CBA los valores de  $\mu$  fueron de 0.288 d<sup>-1</sup> para las mismas tasas de aireación (1.4 y 1.8) vvm. Del mismo modo los valores

de máxima densidad celular promedio en ambos equipos no presentaron diferencias significativas entre ellos (11.82 y 11.11)×10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> a (1.4 y 1.8) vvm para el reactor AA, mientras que en reactor CBA la densidad celular promedio fue (12.00 y 12.11)×10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> a (1.4 y 1.8) vvm. Sin embargo, las tasas específicas de crecimiento aumentaron (0.504 y 0.432) d<sup>-1</sup> en AA y CBA respectivamente, conforme se incrementaba la tasa de aireación en cada tratamiento, mostrando diferencias significativas únicamente con respecto a una tasa de aireación de 2.3 vvm para ambos FBR. De acuerdo a los incrementos del crecimiento celular y tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) alcanzados a las tasas de aireación de 1.8 y 2.3 vvm, se puede mencionar que no existieron aspectos relacionados a fotoinhibición, ni estrés por corte o sedimentación, dado que se presentaron las condiciones de agitación y mezclado adecuado.

Ambos equipos presentaron flujos de agitación diferentes según las tasas de aireación propuestas. Slug en *airlift*, y burbujeo homogéneo en columna de burbujeo, sin embargo, en ninguno se observó algún tipo de daño celular de acuerdo a la tasa de corte calculada, según se demuestra por el crecimiento celular obtenido y las características físicas observadas en las células. No se alcanzaron condiciones de limitación de N, esto probablemente a que las células consiguieron una pronta adaptación a bajas concentraciones de nitrógeno, sosteniendo su metabolismo y crecimiento desde la etapa del reactor semilla, donde no se obtuvo un consumo de nitrógeno alto (85-90%), de modo que al disminuir la concentración de nitrógeno (45 mg L<sup>-1</sup>) al final de la primera etapa (semillero) a 20 mg L<sup>-1</sup> en los FBR, las microalgas no resintieron la disminución de nitrógeno en el medio.

Aun cuando se observó que al aumentar la tasa de aireación también incrementó el crecimiento celular no se alcanzó la mayor producción de lípidos posible en estas geometrías de biorreactor. En general el contenido de lípidos fue bajo, entre 8 y 10%, menor en un rango entre 22-30% que en otros estudios.

En CBA se obtuvo el mayor valor de productividad de lípidos ( $0.650 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) a las 48 horas con respecto a todas las tasas de aireación. En relación al reactor AA la mayor productividad ( $0.528 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) se obtuvo a las 48 h a la tasa de aireación de 1.8 vvm, posteriormente se observa un decaimiento hasta el final del experimento, esto se debió a una reactivación por la agitación, afectando el crecimiento celular, generando un incremento celular. Los resultados alcanzados de productividades de lípidos no fueron los esperados ya que estuvieron en el rango de 0.2 a  $0.650 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , es decir menor en un 40%, comparados con otros estudios que utilizaron condiciones similares.

Aunque el mayor porcentaje del incremento de productividades se presentó en el AA (120%), en la CBA se observó la productividad de lípidos más alta ( $0.65 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Ya que los valores de contenido de lípidos no fueron muy diferentes entre ambas geometrías principalmente a la tasa de aireación de 1.8 vvm ( $10.37$  y  $10.28$ )  $\%_{ww}^{-1}$ , la diferencia de productividad se le puede atribuir a que en la CBA se alcanzaron mayores crecimientos celulares.

Lo resultados obtenidos probablemente se relacionen a que no se presentó un efecto de limitación de nitrógeno en la segunda etapa de cultivo de los FBR, lo cual ocasionó un bajo contenido de lípidos, como ya se ha comentado.

## Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de los proyectos 145521 y Ciencia Básica 179857.

## Nomenclatura

A	absorbancia
AA	airlift anular
$A_b$	área libre entre el riser y el downcomer, $\text{m}^2$
c.a.	cerca

CBA	columna de burbujeo anular
cel $\text{mL}^{-1}$	células por mililitro
$d_{bi}$	diámetro interno del deflector, m
$d_{bo}$	diámetro externo del deflector, m
$d_h$	diámetro hidráulico
$d_i$	diámetro del tubo interior donde se realiza la iluminación, m
$d.i.$	diámetro interno
$d_o$	diámetro externo del tubo exterior, m
FBR	fotobiorreactor
$F_g$	flujo de entrada de aire, $\text{m}^{-3} \text{ s}^{-1}$
G	aceleración de la gravedad, $\text{m s}^{-2}$
$h_B$	distancia entre la base y el deflector, m
$h_G$	altura de la columna incluyendo la retención de gas, m
$h_L$	altura del líquido en reposo sin entrada de gas, m
$k_B$	coeficiente de pérdida por fricción
$\text{L Ha}^{-1}$	litros por hectárea
$\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	miligramos por litro por día
n.d.	no detectable
$P_L$	productividad de lípidos
rpm	revoluciones por minuto
Ton	tonelada
$U_g$	velocidad superficial gas, $\text{ms}^{-1}$
$U_L$	velocidad superficial líquido, $\text{ms}^{-1}$
vvm	flujo volumétrico de aire (por minuto) por unidad de volumen de medio, $\text{min}^{-1}$
$\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	micro ermio por metro cuadrado por segundo
<i>Símbolos griegos</i>	
$\Gamma$	tasa de corte, $\text{s}^{-1}$
$\varepsilon$	fracción de gas retenido
$\varepsilon_d$	fracción de gas retenido en el downcomer
$\varepsilon_r$	fracción de gas retenido en el riser
$\mu$	tasa específica de crecimiento, $\text{s}^{-1}$
$\rho$	densidad de líquido, $\text{kg m}^{-3}$

## Referencias

- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 8, 911-917.
- Brill, J. P. y Mukherjee H. (1999). *Multiphase Flow in Wells*, Society of Petroleum Engineers. No. 17.
- Cerri, M.O., Futiwaki, L., Jesus, C.D.F., Cruz, A.J.G. y Badino, A.C. (2008). Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift

- bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 39, 51-57.
- Chisti, Yusuf. (1989). *Air Lift Bioreactors*. New York: Elsevier Applied Science.
- Chiu, S., Kao, C., Tsai, M., Ong, S., Chen, C., y Lin, C. (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology* 100, 833-838.
- Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. y Lin, C. (2008). Reduction of CO<sub>2</sub> by a high density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology* 99, 3389-3396.
- Doran, P.M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press Limited, London.
- Gouveia, L. y Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 269-74.
- Fernández, L., L.C., Montiel, M.J., Millán, O.P. (2012). *Producción de Biocombustibles a partir de Microalgas*. Ra Ximhai 101-115. ISSN: 1665-0441.
- Griffiths, M.J., Hille, R.P. y Harrison, S.T. L. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology* 24, 998-1001.
- Grobbelaar, J.U. (2010). Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynthesis Research* 106, 135-134.
- Guillard, R.L.L and 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.
- Hincapie, E. (2010). Design, construction and validation of an internally-lift airlift FBR. A thesis presented to the faculty of the Russ College of Engineering and Technology of Ohio University In Partial fulfillment of the requirements for the degree Master of Science.
- Li, Q., Du, W. y Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology* 80, 749-756.
- Martínez, G., L. (2011). Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas. Tesis presentada para obtención del grado de doctor, Universidad de León. España.
- Mata, T. M., Martins, A. A. y Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217-232.
- Mazzuca-Sobczuka, T., Chisti, Y. (2010). Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 100-108.
- Monkonsit, S., Powtongsook, S., y Pavasant, P. (2011). Comparison between airlift Photobioreactor and Bubble Column for *Skeletonema costatum* cultivation. *Engineering Journal* 15, ISSN 0125-8281.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C. y Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology* 123, 279-283.
- Natsume, T. y Yoshimoto, M. (2013). A method to estimate the average shear rate in a bubble column using liposomes. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 52, 18498-18502.
- Robles-Heredia, J.C., Sacramento-Rivero J.C., Canedo-López, Y., Ruiz-Marín, A. y Vilchiz-Bravo, L.E. (2015). A multistage gradual nitrogen-reduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 32, 335-345.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. y Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 100-112.
- Romero, L.T. y Ferrán C. (2001). Floculación de *Chlorella* sp. con la utilización de quitosano. *Revista de Investigaciones Marinas* 22, 57-62.



- Ruiz-Marin, Alejandro, Mendoza-Espinosa, Leopoldo G. y 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.
- Salazar-Leyva, J.A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J. C., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J.M., Valenzuela-Soto, E.M., Carvallo-Ruiz, M.G., Lugo-Sánchez, M.E. y Pacheco-Aguilar, R.. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 129-150
- Scragg, A.H., Illman, A.M., Carden, A. y Shales, S.W. (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 29, 67-73.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. y Roessler, P. (1998). *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae*. NREL/TP-580-24190.
- Solovchenco, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. y Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *Journal of Applied Phycology* 20 245-251.
- Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I. E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C. y Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de *Tetraselmis suecica*: Proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 723-737.
- STATISTICA V7 (data analysis software system), version 7 (StatSoft, Inc., 2004).
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K. y Yoshida, T. (2000). Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 112-117.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H. y Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99, 4021-4028.
- Widjaja, A., Chien, C. y Ju, Y. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 13-20.
- Xin, L, Hong-ying, H, Ke, G. y Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494- 5500.
- Xu, H. Miao, X. y Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 126, 499-507.