

## EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ILUMINACION-AIREACION DE FOTOBIOREACTORES DE COLUMNA EN CULTIVOS DE CHLORELLA VULGARIS.

### EFFECT OF LIGHTING-AERATION CONDITIONS OF PHOTOBIOREACTORS OF COLUMN IN CHLORELLA VULGARIS CROPS.

Pérez García A. J.<sup>1\*</sup>, Robles Heredia J. C.<sup>1</sup>, Ruiz Marin A.<sup>1</sup>, Narváez García A.<sup>1</sup>, Canedo Lopez Y.<sup>1</sup>, L. J. Pérez Reda <sup>1</sup>, Ovalle Gallegos W. <sup>1</sup>

Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen. Calle 56, No.4. ESQ. Av. Concordia. Colonia: Benito Juárez, C.P. 24180. Ciudad del Carmen, Campeche. MÉXICO.  
jrobles@pampano.unacar.mx

#### RESUMEN

El biocombustible hoy en día tiene una gran importancia ya que las emisiones de gases de efecto invernadero siguen acumulándose drásticamente en la atmósfera como resultado de las actividades humanas y la industrialización. En la actualidad, los biocombustibles líquidos tienen gran importancia ya que se producen de diferentes fuentes renovables de biomasa como soya, aceite de palma, microalga, etc. La microalga *Chlorella vulgaris* es una especie del género Chlorophyta, estos son microorganismos fotoautotróficos y unicelulares los cuáles

a través de la fotosíntesis convierten la energía luminosa en energía de reserva en forma de lípidos, carbohidratos, clorofila, proteínas, etc., ya que tiene el doble de beneficios que los biocombustibles comunes. En este trabajo se evaluó el efecto de la iluminación-aireación de un fotobiorreactor de columna sobre diferentes parámetros de la microalga *Chlorella vulgaris*, como son: consumo de N, biomasa peso seco, crecimiento celular y contenido de lípidos. El medio de cultivo se preparó empleado los siguientes reactivos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5gr.),  $\text{CaCl}_2$  (0.4 gr.),  $\text{NaCl}$  (0.7 gr.),  $\text{MgSO}_4$ .

7H<sub>2</sub>O (0.2 gr.), NH<sub>4</sub>Cl (11.56gr.), solución de metales y vitaminas. El cultivo fue realizado en fotobiorreactores de polietilentereftalato (PET) con un volumen de operación de 2 L, por duplicado, con inóculo aclimatado. Cada 24 horas se monitoreó el consumo de N, biomasa peso seco, crecimiento celular y contenido de lípidos hasta su fase exponencial.

**Palabras clave:** Tasa de aireación, biomasa algal, densidad celular, perfil de ácidos grasos

## ABSTRACT

Biofuel today is of great importance as greenhouse gas emissions continue to accumulate drastically in the atmosphere as a result of human activities and industrialization. At present, liquid biofuels are of great relevance since they are produced from different renewable sources of biomass such as, soy, palm oil, microalgae, etc. The microalga

*Chlorella vulgaris* is a species of the genus Chlorophyta, these are photoautotrophic and unicellular microorganisms which through photosynthesis converts the light energy into reserve energy in the form of lipids, carbohydrates, chlorophyll, proteins, etc., since it has the double the benefits of common biofuels. In this work we will evaluate the effect of the illumination-aeration of column photobioreactor on different parameters of *Chlorella vulgaris* microalgae such as: N consumption, dry weight biomass, cell growth and lipid content. The culture medium was prepared with KP<sub>2</sub>HO<sub>4</sub> (1.5 g), CaCl<sub>2</sub> (0.4 g), NaCl (0.7 g), MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0.2 gr.), NH<sub>4</sub>CL (11.56gr.), Solution of metals and vitamins. The culture will be carried out in photobioreactor of polyethylene terephthalate (PET) with an operation volume of 2 L, in duplicate, with acclimated inoculum. Every 24 hours their N consumption, dry weight biomass,

cell growth and lipid content will be monitored until their exponential phase.

**Keywords:** biomass, *Chlorella vulgaris*, photobioreactors, light intensity, lipid productivity

## INTRODUCCIÓN

Ciertas especies de microalgas tienen una gran cantidad de lípidos. Sometiéndolas a condiciones con diversos factores bióticos y abióticos, así como: intensidad de luz, variaciones de temperatura, salinidad, intensidad de agitación, estas pueden obtener mayor volumen de lípidos [1]. La microalga *Chlorella vulgaris* es utilizada a menudo en estudios de producción de biodiesel ya que presenta la capacidad de crecer en aguas residuales como medio de cultivo [2]. La producción de biodiesel a partir de microalgas no solo depende de la biomasa alcanzada, sino también del

contenido de aceite que contiene cada célula. Algunas especies de microalgas pueden almacenar cantidades importantes de triglicéridos o triacilglicerolos (TAG), que son la materia prima para producir biodiesel. El fotobiorreactor (FBR) es un sistema cerrado donde es posible manipular factores que sean capaces de afectar el medio. Se pueden utilizar diferentes tasas de aireación que logran influir en el crecimiento de las microalgas durante el proceso de cultivo, el mezclado ayuda a que las células dentro del FBR tengan acceso a la fuente de luz y evita acumulación de oxígeno en el medio. De la misma manera elude que las microalgas se adhieran a las paredes del fotobiorreactor o que precipiten, lo que podría provocar un colapso y la muerte celular [3].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Metodología

#### Preparación del medio de cultivo.

Para hacer un medio enriquecido (f/2) a 90 mg L<sup>-1</sup> (C90): Se prepararon 4 litros de medio fresco, se le agregaron 3 mL de sales, 3 mL metales traza; el medio se esterilizó en autoclave a 120°C y 30 atm (atmosferas), se dejó enfriar para adicionar 3 mL de vitaminas por cada litro de agua [4]. En la **Tabla 1**, se encuentran las medidas utilizadas para la elaboración de las soluciones stock de

**Tabla 1.-** Composición del medio f/2 para la solución stock de sales.

Sales( nutrientes)	Concentración (mg l)
NH <sub>4</sub> Cl	115.6
NaCl	7.0
CaCl <sub>2</sub>	4.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0

#### Preparación de vitaminas

Para la preparación de la solución con vitaminas se utilizó un producto comercial (vitamina FORZE VF Q-10) para obtener una concentración de

sales. Para la preparación de la solución stock de los metales traza se prepararon soluciones independientes para cada metal traza con las concentraciones indicadas en la **Tabla 2**, se disolvieron 3.15 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O y 4.36 g de Na<sub>2</sub>-EDTA+ en 900 mL de agua destilada, para posteriormente agregar 1 mL de cada una de ellas a la solución de EDTA mencionada, se aforó a 1 L y se agitó. La solución debe alcanzar un pH igual o menor a 2 [5].

**Tabla 2.-** Composición del medio f/2 para la solución stock de metales traza.

Metales traza	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.98
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.20
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.00
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	18.00
NaMo·2H <sub>2</sub> O	0.63

acuerdo a como se indica en **Tabla 3**. Se extrajo el contenido de 3 cápsulas, el cual se mezcló en 100 mL de agua destilada, posteriormente se filtró para evitar la

presencia de residuos sólidos y se mantuvo en refrigeración continua [6].

**Tabla 3.-** Composición del medio f/2 para la solución stock de vitaminas.

<b>Vitaminas</b>	<b>Concentraciones g (100 mL)-1</b>
Tiamina	0.1
Biotina	0.1
B12	0.2

### **Preparación de los inóculos.**

Antes de iniciar con los experimentos se realizaron nuevos inóculos utilizando una cepa de la microalga *Chlorella vulgaris*, en 1.5 L de medio fresco en un matraz de 2L, el cual se mantuvo sellado con papel aluminio y cinta adhesiva. El nuevo medio se mantuvo con iluminación continua por aproximadamente 2 semanas y se agitaba manualmente para evitar la decantación de las células. Posteriormente se trasladaron 800 mL de cepa a 8 matraces de 250 mL y se agregaron 100 mL de medio fresco en cada uno, los matraces se sellaron y se mantuvieron en constante agitación con ayuda de un Shaker, hasta que

alcanzaron una concentración de microalgal de  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> aproximadamente. El resto de la cepa del matraz de 2 L se le agregó 1 L de medio fresco y se mantuvo sellado en iluminación constante para hacer nuevos inóculos. El medio de cultivo y los inóculos, se manejaron con los estándares necesarios con la finalidad de evitar contaminantes externos; realizando el traspaso en una campana de flujo laminar para evitar contaminación por microorganismo externos que puedan ocasionar factores bióticos innecesarios para el medio. Para el desarrollo del proyecto todo el material utilizado se desinfectó lavando con una solución de hipoclorito de sodio al 5% [5].

### **Preparación y ensamble de los fotobiorreactores.**

Se utilizaron dos botellas de polietilentereftalato previamente lavadas,

con capacidad de 1 L, para agregar 500 mL de agua destilada con la finalidad de hidratar el medio, evitando el posible consumo o evaporación del medio de cultivo. De la misma manera se utilizaron otras dos botellas con 500 mL de agua clorada al 20%, para prevenir con ésto una posible contaminación al exterior [5]. El sistema de ensamble del proceso se montó de la siguiente manera: se conectó un extremo de la manguera de presión a un soplador regenerativo de 0.33 HP y el otro extremo a la parte inferior de dos rotámetros. Mientras que en la parte superior de los rotámetros se conectó una manguera industrial de 1 m de largo. El extremo restante de la manguera, se introdujo en la botella con agua destilada hasta el fondo, por uno de los 2 orificios previamente hechos para la manguera industrial. En el segundo orificio de la botella de agua destilada, se acopló una manguera industrial de 0.7 m de largo a una profundidad de 3 cm, el

otro extremo de esta manguera de 0.7 m se introdujo en el FBR con el medio microalgal para promover el proceso de mezclado. En el orificio sobrante de la tapa del FBR, se le unió otra manguera de 0.7 m de largo para capturar el aire expulsado y transferirlo a una solución clorada contenida en una segunda botella.

### **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 [5].

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

Donde BPS es biomasa peso seco, PF<sub>1</sub> es filtro con biomasa, PF<sub>0</sub> filtro sin biomasa y V es el volumen del medio filtrado de la muestra en mL.

### **Densidad celular.**

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.

### **Consumo de nitrógeno.**

Para realizar la determinación de consumo de nitrógeno se procedió de la siguiente manera: se filtraron 50 mL de medio de cultivo agregándole 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para mantenerlos en refrigeración.

Posteriormente se dividió en 2 muestras, colocándolas cada una en matraces de 25 mL, a cada una se le agregaron 5 mL de solución amortiguadora de boratos y 4 gotas de NaOH 6N. Después en 2 matraces y por separado se colocaron 25 mL de solución indicadora de ácido bórico, a cada uno se les agregaron 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 se titularon con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N hasta que la solución cambió de verde a morado. La concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se determinó con la siguiente ecuación:

$$N - NH_4 = \frac{\text{Volumen de acido gastado} \times 0.02N \times 14}{\text{Volumen de muestra}} \times 1000 \quad (2)$$

Los resultados se muestran en la **tabla 4**:

**Tabla 4.-** Tasas de aireación propuestas, datos promedio de máxima densidad celular, tasa de crecimiento específico, consumo de N-NH<sub>4</sub> y tipo de filtro de luz.

Equipo	Tasa de aireación (vvm)	Max. Densidad celular (celx10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	μ (d <sup>-1</sup> )	Consumo de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	Tipo de luz
Columna de burbujeo	3	0.925824±0.266402	0.010803681	0.923730±0.193643	VIOLETA

± Desviación estándar.

### Cosecha de la biomasa.

El medio se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min para concentrar la biomasa microalgal. La biomasa recuperada se congeló a -4.0 °C para su conservación, posteriormente se liofilizó por un lapso de 3 días y se mantuvo en refrigeración constante.

### Perfil de FAME (PERFIL DE ACIDOS GRASOS)

La fase logarítmica de la productividad de biomasa se representa por  $\frac{dX}{dt} = \mu X$ , esto quiere decir que la productividad de lípidos se puede calcular con la siguiente ecuación.

$$P_L = \frac{d(wX)}{dt} = w\mu X \quad (3)$$

La  $w$  se puede expresar como la cantidad de lípidos en peso seco y  $\mu$  como la velocidad específica de crecimiento con la fórmula:

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

Donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos del proceso de cultivo durante la fase logarítmica. Para el proceso de cultivo la productividad de lípidos se puede calcular cuando  $\mu$  es indefinida (fase estacionaria), aproximando la productividad de biomasa a  $\Delta X/\Delta t$ , utilizando la siguiente ecuación.

$$P_L = \frac{\Delta(wX)}{\Delta t} \quad (5)$$



### Procedimiento de cálculo de parámetros hidrodinámicos.

Se indicó que  $F_g$  es el flujo de entrada de aire total en ( $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) corregido para la presión absoluta en el fondo del reactor, y  $F_a$  es el flujo de aire suministrado en ( $\text{L min}^{-1}$ ) [5].

$$F_g = F_a \left( \frac{1}{60} \right) \left( \frac{1}{1000} \right) \quad (6)$$

La velocidad superficial del gas se considerada como el caudal de gas por unidad de área dentro del sistema ( $U_g$ ) en  $\text{m s}^{-1}$ , siendo  $A_c$  el área transversal de la columna ( $\text{m}^2$ ) donde  $b$  es base y  $h$  la altura del cilindro [5].

$$A_c = b \times h \quad (7)$$

$$U_g = \frac{F_g}{A_c} \quad (8)$$

Con los valores de  $U_g$  para columna de burbujeo, se calcula la tasa de corte en ( $\text{s}^{-1}$ ), mediante las ecuaciones válidas para el rango de  $0.008 < U_g < 0.09 \text{ ms}^{-1}$  [7].

$$Y = 1000 U_g^2 \quad (9)$$

La retención de gas  $\varepsilon$  determina el porcentaje de gas o aire retenido en el interior del equipo por el aumento de volumen al inyectar aire [8].

$$\varepsilon = \frac{h_G - h_L}{h_G} \quad (10)$$

La velocidad superficial de líquido considerada como el caudal de líquido por unidad de área dentro del sistema,  $U_L$  ( $\text{m s}^{-1}$ ), puede calcularse para columnas de burbujeo con diámetro entre 0.1 y 7.5 m y  $0 < U_g < 0,4 \text{ ms}^{-1}$  por la relación [8].

$$U_L = 0.9 (g d h U_g)^{0.33} \quad (11)$$

$$P_G / V_L = \rho_L g U_g \quad (12)$$

Donde  $\rho_L$  es la densidad del líquido en ( $\text{kg m}^3$ ),  $g$  es la gravedad en ( $\text{m s}^{-2}$ ). El resumen de los cálculos para las cinco variables se enlista en la **Tabla 5**.

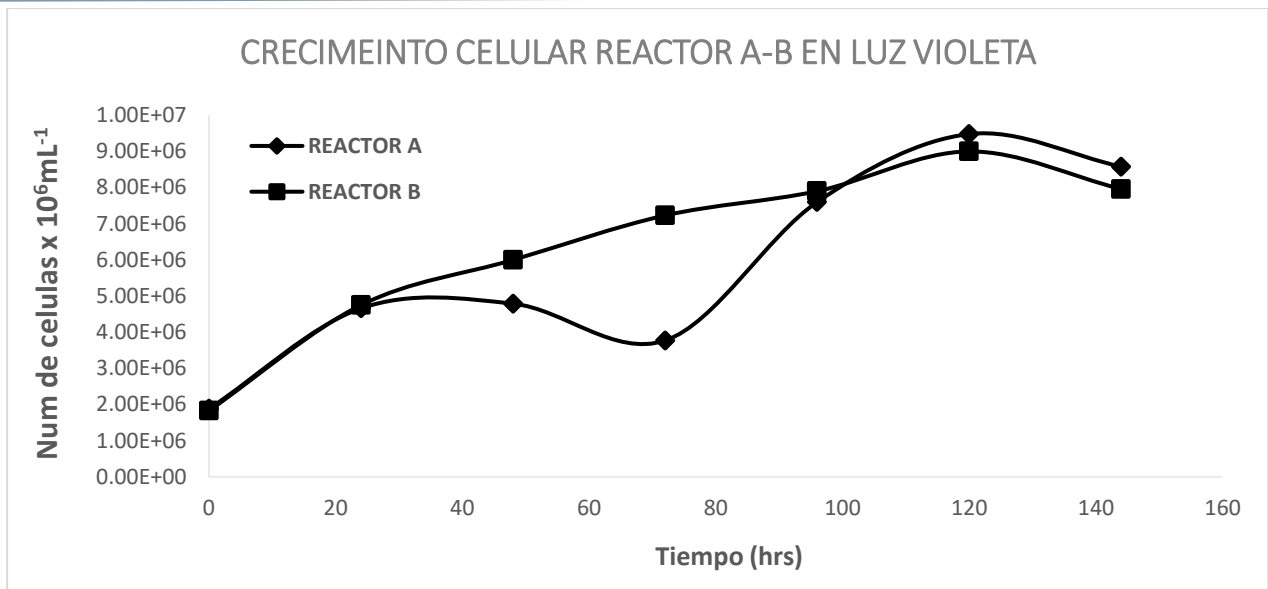
**Tabla 5.-** Datos hidrodinámicos calculados para columna de burbujeo

tasa de aireación (VVM)	Fg (m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )	Ug (ms <sup>-1</sup> )	UL (ms <sup>-1</sup> )	PG/VL (Wm <sup>-3</sup> )	tasa de corte (s <sup>-1</sup> )
2	6.67E-05	0.001666044	0.11980751	16.2880166	0.002757061

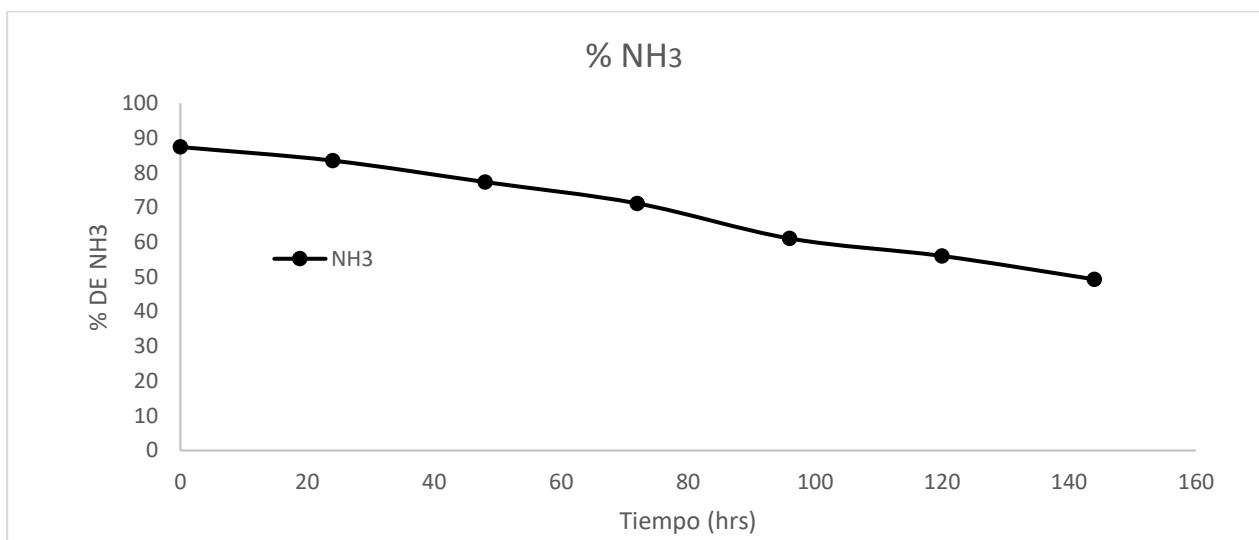
## RESULTADOS

Durante la evaluación de crecimiento para la microalga *Chlorella vulgaris* bajo iluminación de luz violeta se observó una cinética de crecimiento típica con una fase de adaptación (lag) irregular durante las primeras 80 horas, debido a la cantidad de aireación suministrada, puesto que al ser una dosis de aire elevada la microalga sufrió de estrés por agitación [5]. El contenido de biomasa algal y densidad celular en este cultivo se vio afectado positivamente por la

agitación ya que la microalga alcanzó un mezclado homogéneo haciendo que estas obtuvieran una cantidad de luz continua mejorando su rendimiento fotosintético [9]. La máxima concentración de biomasa peso seco (g L<sup>-1</sup>) y densidad celular (cel ml<sup>-1</sup>) fueron obtenidas en aquellos cultivos con aireación de 3 VVM con respecto al % de NH<sub>3</sub> ya que indica que entre más densidad celular el % de NH<sub>3</sub> disminuye, como se puede apreciar en las **Figuras 1 y 2** [9].



**Figura. 1.-** Curva de crecimiento de Chollera Vulgaris cultivado en FBR con tipo de filtro en luz violeta con 3 VVM



**Figura. 2.-** Curva de % de NH<sub>3</sub> de Chollera Vulgaris en FBR con tipo de filtro en luz violeta con 3 VVM

Por otro lado, el contenido de clorofila mostró un decremento con respecto al tiempo de cultivo. En general, las máximas concentraciones de clorofila fueron observadas en la mínima fase

logarítmica de crecimiento para cada una de las tasas de aireación propuestas. Los resultados obtenidos hasta este momento muestran que las condiciones de cultivo tuvieron efectos importantes en

la tasa de crecimiento y contenido de clorofila, demostrando que la combinación de aireación y fuente de luz crea un estrés positivo que la microalga adapta favorablemente. Un análisis es que las moléculas del aire o agua dispersan los tonos azules y violetas en todas las direcciones, y permiten que pase la energía suficiente para realizar una reacción fotosintética superior a la que realizan con luz solar o luz artificial blanca [10].

## CONCLUSIONES

Es un hecho que los factores de la aireación y el espectro de luz empleado para el cultivo de *Chlorella vulgaris* mostraron influencia en los cultivos. En el presente estudio, la tasa de crecimiento para cada uno de los tratamientos mostró un ligero decremento conforme entraba a la fase exponencial, esto debido a que la microalga no esperaba los cambios que se presentaron en su medio. La luz

violeta conlleva a propiedades que podrían favorecer al incremento de clorofila y carotenoides sin llegar a afectar el crecimiento. Conforme a los resultados obtenidos con la longitud de onda violeta se espera que las microalgas de los siguientes experimentos (Azul y amarillo) tengan una adaptación similar, destacando que estos experimentos todavía se encuentran en desarrollo, sin embargo, los futuros resultados obtenidos podrían hacer que la combinación de espectros y aireación generen una nueva ventana de oportunidades para la mejora en la obtención de aceite microalgal.

## 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.
2. Li, Y., Fei, X. & Deng, X. (2012). Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene

- expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass and Bioenergy*, 42, .199-211.
3. Coral Contreras-Flores, Julián Mario Peña-Castro, Luis Bernardo Flores-Cotera y Rosa Olivia Cañizares-Villanueva. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas.
  4. 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), 450-456.
  5. Robles-Heredia, J. C. (2014). *Evaluación de la productividad de lípidos en Chlorella vulgaris y Scenedesmus obliquus bajo dos modos de limitación de nitrógeno en fotobiorreactores tipo airlift y columna de burbujeo* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
  6. E. García-Martínez, B. Ayala-Torres, O. Reyes-Gómez, A. Zorro, A. Barajas-Solano, and C. Barajas-Ferreira. (2016). "Evaluation of a two-phase extraction system of carbohydrates and proteins from *Chlorella vulgaris* utex 1803," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 49, 355–360.
  7. Dubois, M., Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A., Smith F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugar and related substances", *Analytical Chemistry*, Vol. 28, 350-356.
  8. Doran, P.M. (1995). *Bioprocess engineering principles*. Academic Press Limited. London.
  9. Griffiths, M., van Hille, R. and Harrison, S. (2011). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J Appl Phycol*, 24(5), 989-1001.
  10. Amini-Khoeyi Z, Seyfabadi J, Ramezanzpour Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International* 20: 41-49.

