

Residuos Agroindustriales como Fuente de Carbono para Producción de Biomasa y Biorremediación con Microalgas Nativas de Lagunas de Oxidación

[#]D. A. Castro Cepeda^{#1}, J.A. Vidales Contreras[#], C. Chaidez Quiroz^{*}, J. M. Márquez-Reyes[#],
A. I. Luna Maldonado[#], V. E. Aguirre Arzola[#].

[#]Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, General Escobedo, Nuevo León, México.

^{*}Laboratorio Nacional Para La Investigación en Inocuidad Alimentaria, Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A.C., Sinaloa, México.

¹dcastrocepeda@gmail.com

Resumen—A nivel mundial se reconoce que la ganadería es de las principales fuentes de gases de efecto invernadero, como los son el CO₂, CH₄ y NH₃, siendo que, junto con el insistente uso de combustibles fósiles y deficiente gestión de residuos agroindustriales, hace suponer que se alcanzarán 2.8°C de incremento en la temperatura global para finales del siglo XXI. En los últimos años se ha puesto atención en el uso de microalgas y cianobacterias para el tratamiento biológico de aguas residuales en efluentes secundarios. En este trabajo se ha observado la presencia de la posible cianobacteria *Spirulina* (*Arthrospira*) en muestras de agua procedentes de una laguna de oxidación para tratamiento de agua residual municipal en Marín N.L. Simultáneamente, se ha evaluado la producción de biogás a partir del estiércol de cerdo al 60% en una emulsión preparada a nivel laboratorio para utilizar el CO₂ en el crecimiento y producción de biomasa de la cianobacteria detectada en los efluentes colectados

Palabras clave— Microalgas, Remoción de Nutrientes, Residuos Agroindustriales, Aguas Residuales, Biomasa.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se reconoce que la combustión de combustibles fósiles es la principal causa del calentamiento global. Sin embargo, la ganadería es también una de las principales fuentes de gases de efecto invernadero (GEI) y específicamente la fermentación de estiércoles el proceso más relevante de su emisión a la atmósfera [1]. Lo anterior, aunado a una demanda creciente por combustibles, alimento y la deforestación. Lo anterior, se refleja en una tendencia creciente en las emisiones de CO₂, CH₄ y NO_x haciendo suponer que para finales del presente siglo se alcanzarán los 2.8°C en el calentamiento global, con respecto a la era preindustrial [2], muy por encima de los 1.5°C que se estableció como límite máximo para contener este calentamiento por el Acuerdo de París 2015, durante la XXI Conferencia sobre Cambio Climático [3]. En este sentido, el incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera sigue latente tanto que ha alcanzado 421 ppm en 2022, un aumento de 1.8 ppm con respecto al año anterior. Estos valores,

calculados por la NOAA [4] son comparables a los del periodo del Plioceno, hace 4.1-4.5 millones de años.

En el caso específico de México, el ganado bovino y porcino son también de los de mayor aportación a los GEI; por ejemplo, en el periodo de 1990-2018 las emisiones a partir de la fermentación entérica y la digestión del estiércol en el país fueron en promedio 55,058.9 Gg de CO₂ al año, presentando un incremento del 7.4% en ese periodo [5].

Entre las diversas opciones para contener el calentamiento global se encuentran las microalgas que funcionan como biocatalizadores en la conversión del CO₂ a compuestos metabólicos fotosintéticos, donde el 50% de la biomasa en peso seco es obtenido a partir de esta conversión. Por esta razón, nunca como en las últimas décadas se ha investigado el secuestro de CO₂ como fuente de carbono en la producción de microalgas [6-7], ya que este gas es necesario para sus procesos biológicos; además, de luz, pH, temperatura y nutrientes. Bajo este enfoque, la fijación de CO₂ mediante microalgas puede ser una opción para la disminución de los GEI además de producir productos de valor agregado y ser una opción en el tratamiento de aguas residuales.

Con respecto al cultivo de estos microorganismos, diversos experimentos han observado que los rangos de concentraciones de CO₂ para la producción de biomasa y fijación del gas son alrededor del 0.03% al 15%, siendo *Chlorella vulgaris* de las especies de menor concentración, con alrededor del 4%. Sin embargo, el pH es de relevancia para evitar la pérdida por volatilización tanto de CO₂ como de otros gases importantes en la producción de biomasa [8-10] y generación de productos de valor agregado como alientos y biocombustibles [11]

En los últimos años, el uso de microalgas nativas ha sido estudiado para el tratamiento de efluentes secundarios de aguas residuales para la producción de biomasa [12] mediante consorcios nativos [13]. En todos los sistemas de tratamiento existen consorcios alga-bacteria donde estos desempeñan un papel fundamental en la eliminación

sinérgica de nutrientes, gracias al complejo intercambio nutricional y de metabolitos entre las microalgas y las bacterias asociadas [14]. Un ejemplo de estos sistemas son las lagunas de oxidación donde la diversidad de microalgas es un componente intrínseco que hace posible la remoción de nutrientes de los efluentes de agua residual que son vertidos en estos sistemas para su tratamiento.

El propósito del presente trabajo de investigación es aislar e identificar microalgas nativas para la producción de biomasa y remoción de nutrientes en un ambiente enriquecido con biogás proveniente de la fermentación de estiércol porcino. Los objetivos específicos son: a) Aislar especies nativas de microalgas a partir de una laguna de oxidación, b) Evaluar en un sistema a nivel laboratorio la adición de CO₂ a partir de la fermentación de estiércol porcino, c) Examinar los valores de remoción de nutrientes y producción de biomasa a partir del sistema experimental.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Colecta de microalgas en laguna de oxidación.

Las muestras de agua fueron tomadas por muestreo puntual de una laguna de oxidación en Marín, Nuevo León (25°52'41.91"N, 100° 2'44.34"O, Imagen 1) con el uso de frascos de boca ancha. El montaje experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana en el Centro de la Facultad de Agronomía (FA-UANL).

Los datos abióticos de la toma de muestra fueron temperatura (°C) y el pH, así como materia orgánica (DQO) y parámetros fisicoquímicos como carbonatos, bicarbonatos, calcio, magnesio, sulfatos, sodio, cloro, aniones y cationes en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas en la Unidad Marín.

B. Producción de biogás.

Se contabilizó la producción de biogás producido a partir de muestras de estiércol de cerdo durante un periodo de 20 días por el método de desplazamiento de volumen con tres tratamientos; 40 g de estiércol y 20, 40 y 60% de agua destilada en botellas de vidrio de 120 mL realizando una prueba estadística para la comparación de medias en la producción de biogás a un nivel de significancia de p menor igual a 0.05 con tres repeticiones y un control.

C. Identificación morfológica de microalgas.

Para la identificación de las especies se implementaron las claves dicotómicas de [15-19]. Las microalgas fueron colectadas en una muestra de agua residual de 1 L. La muestra fue colocada en tubos cónicos de sedimentación de 1 L y se dejó reposar 16 h para la sedimentación de la materia orgánica. Del sobrenadante del embudo de sedimentación, se tomó una alícuota para su observación al microscopio y la detección y cuantificación, mediante la cámara de Sedgwick-Rafter, de la microflora y microfauna dominante utilizando un microscopio VE-BC3 Plus (VELABTM) con cámara digital en el cabezal y el programa TCapture (v. 3.4.0.605) para la captura de imágenes en un equipo de computación

conectado a la cámara. Una vez determinada la concentración del o los microorganismos dominantes se procedió a inocular con 50 mL de sobrenadante 450 mL de medio Zarrouk (MZ) de acuerdo con Prasad y col. [20] y Adir y Col. [21] en un matraz Erlenmeyer de 500 mL para evaluar su capacidad de crecimiento bajo una intensidad de luz de 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ y bombeo de aire estéril para evitar contaminación de macroorganismos en el aire con bombas OC-5 (OceanAqua®) a 500 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a una temperatura de 35°C durante dos semanas y un fotoperiodo de 16:0. Alícuotas de 1 mL fueron tomadas diariamente de los matraces de crecimiento con micropipeta Pasteur de vidrio esterilizadas dentro de campanas de flujo laminar. El conteo se realizó siguiendo una trayectoria horizontal y otra vertical desde el inicio de la celda hasta el final. Las células de cada trayectoria se dividen entre el número de celdas cuantificadas. La concentración se determinó mediante la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\text{Ec. 1 } \# \text{células} = \frac{\sum(\text{Células totales})}{\sum(\text{Celdas totales})} * 1000 \text{ mL} \quad (1)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PRELIMINARES

A. Caracterización fisicoquímica del agua

En la Tabla 1 se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos de la zona de muestreo. Los valores muestran un carácter de moderada alcalinidad, el cual podría predisponer la presencia de cianobacterias pertenecientes al grupo de *Arthrospira* debido a la alta presencia de bicarbonatos que mantienen a la laguna como una fuente adecuada para el riego agrícola, ya que forma parte del proceso final de la laguna de oxidación y tiene baja cantidad de sodio, aunque condicionada por la cantidad de cloro.

TABLA I.

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LA LAGUNA DE OXIDACIÓN, MARÍN, NL. SE = SALINIDAD EFECTIVA, SP = SALINIDAD POTENCIAL, RAS = RELACIÓN DE ABSORCIÓN DE SODIO, CSR = CARBONATO DE SODIO RESIDUAL, PSP = PORCIENTO DE SODIO PROBABLE.

Parámetro	Unidad	Valor
pH		8.9
CE	mS	0.66
Ca ⁺	Meq•L ⁻¹	6
Mg ⁺	Meq•L ⁻¹	1.7
CO ₃	Meq•L ⁻¹	0
HCO ₃	Meq•L ⁻¹	4.4
Cl ⁻	Meq•L ⁻¹	2.55
SO ₄	Meq•L ⁻¹	0.0
Aniones	Meq•L ⁻¹	7
Na ⁺	Meq•L ⁻¹	0
Cationes	Meq•L ⁻¹	7.7
SE	Meq•L ⁻¹	3.3

SP	Meq•L ⁻¹	2.55
RAS	Meq•L ⁻¹	0
CSR	Meq•L ⁻¹	0
PSP	%	0
DQO	419	mgO ₂ /L

B. Producción de gas

A partir de las técnicas mencionadas, se ha evaluado la proporción de humedad adecuada para la producción de CO₂ proveniente de las excretas porcinas a las cepas por seleccionar de microalgas. En la Fig. 1 se puede observar que a partir del segundo día se presenta el aumento en la cantidad de gas producido incluso aunque no haya diferencia significativa ($p>0.05$) conforme al promedio en la producción de gas entre los tres tratamientos.

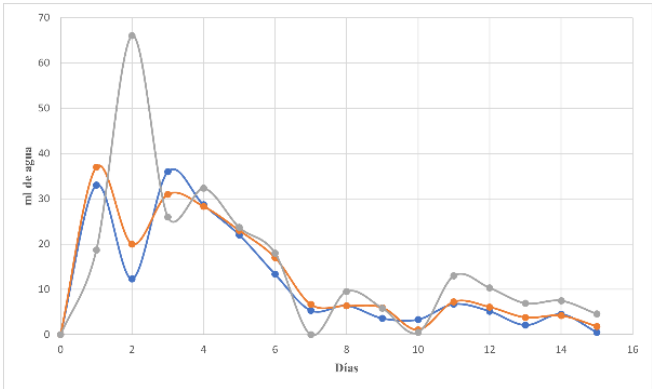


Fig. 1. Promedio de agua (mL) desplazada con respecto a la concentración de humedad en 40 g de estiércol porcino fresco a través del tiempo. Simbología: 20% = azul, 40% = naranja, 60% = gris.

C. Identificación de microalgas

Adicionalmente se ha logrado identificar al momento seis posibles géneros. Morfológicamente caracterizados mediante las y claves dicotómicas que se describen a continuación (Fig. 2). Esta observación permite distinguir que *Spirulina* (*Arthrospira*) es la de mayor dominancia.

Euglena Ehrenberg (1830)
Euglenaceae
Euglenales

Las células contienen grandes cuerpos paramilonares y los cloroplastos son numerosos. Células alargadas-cilíndricas, grandes cuerpos paramilonares, en forma de bastoncillos. Células libres (Fig. 2.A).

Ankistrodesmus Corda
Selenastraceae
Sphaeropleales

Células solitarias, vagamente agrupadas en haces, entremezcladas con otras algas, sin envoltura de mucílago, estrechamente afiladas hacia cada extremo, a veces rectas, generalmente curvadas; cloroplasto parietal, c pirenóide, fitoplancton de estanques y lagos, metafiton de acequias, estanques y lagos (Fig. 2.C).

Haematococcus Flotow
Haematococcaceae
Chlamydomonadales

Las células son esféricas, varias vacuolas contráctiles distribuidas irregularmente y un cloroplasto en forma de copa con múltiples pirenóides. La acumulación de hematocromo suele provocar el color rojizo de los protoplastos (Fig. 2.D).

Planktosphaeria G.M. Smith
Schizochlamydeaceae
Sphaeropleales

Células esféricas, unidas dentro de una amplia envoltura de mucílago incoloro que a menudo es muy fina (células raramente solitarias), células dentro de una colonia normalmente contiguas, cloroplastos (en células maduras) varios discos parietales (angulares, de cinco lados), cada uno con un pirenóide, puede formar zoosporas biflageladas, metafiton de cunetas, pantanos, estanques y lagos (Fig.2. E).

Chlorella Beijerinck
Trebouxiophyceae
Chlorellales

Células esféricas, ovoides o elipsoides, solitarias o agrupadas, cloroplasto en forma de copa o de placa, con o sin pirenóide, fitoplancton de estanques y lagos (Fig. 2 B).

Arthrospira Stizenberger ex Gomont
Microcoleaceae
Oscillatoriales

Los filamentos son solitarios y flotan libremente en el plancton, o están unidos en finas esteras, de color verde azulado. Sin toxicidad conocida. Los tricomas son o cortos, cilíndricos, isopolares, enrollados en espiral de forma regular o rara vez algo irregular, normalmente con espirales relativamente grandes, a veces atenuados en los extremos, con una anchura de espiral variable, ligeramente no constreñidas, generalmente no móviles o raramente móviles (deslizándose con rotación en sentido horario o antihorario) (Fig. 2.F y G).



Fig. 2. Géneros de cianobacteria y microalgas presentes en la laguna de oxidación. a) *Euglena*, b) *Chlorella*, c) *Ankistrodesmus*, d) *Haematococcus*, e) *Planktonosphaeria*, f) y g) *Spirulina* (*Arthrospira*). Aumento de 40x.

El conteo en la alícuota de la muestra de agua residual mostró un total de 111,250 células en un mililitro, por lo que los 500 mL al ser inoculados con 50 mL del sobrenadante del agua residual se incorporaron al medio de cultivo 5.5 millones de células que representó el 10% de inóculo. El análisis de crecimiento se presenta en el Fig. 3. En esta figura es posible observar que el comportamiento de esta cepa de *Spirulina*, presente en la laguna de oxidación durante el análisis de su crecimiento se observó un primer pico de 29,385 células·mL⁻¹ al cuarto día, seguido de un descenso a 23,014 células·mL⁻¹. El ajuste del fotoperiodo de 24:0 a 16:8 permitió observar un segundo pico de 30,471 células·mL⁻¹ dos días después por lo que es necesario seguir evaluando estas condiciones ya que no existe demasiada información con respecto al aislamiento de cepas nativas de *Arthrospira* [22, 23] y las condiciones adecuadas para su cultivo, como lo son: salinidad, pH, luz, fotoperiodo, temperatura, agitación y CO₂ [22-29].

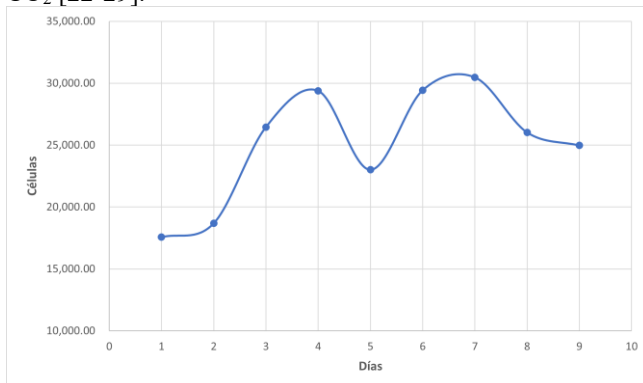


Fig. 3. Desarrollo de crecimiento de *Spirulina* (*Arthrospira*). A partir del quinto día el fotoperiodo cambió de 24:0 a 16:8 y se observa un aumento en el crecimiento hasta su muerte al décimo día.

IV. CONCLUSIÓN PARCIAL

Al momento se han logrado identificar seis géneros de microalgas y cianobacterias pertenecientes a la laguna de oxidación con un carácter alcalino apto para riego. A continuación, se elegirán las especies que muestren un mejor

crecimiento en laboratorio para evaluar su crecimiento con biogás al 60% de humedad y biorremediación.

AGRADECIMIENTOS.

Por el gran apoyo para poder cumplir con los objetivos del programa de posgrado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la Beca Nacional para poder y seguir con mis estudios y desarrollo profesional en la investigación.

REFERENCIAS.

- [1] S. R. S. Dungal, H. Tian, B. Zhang, S. Pan, c. Lu, and J. Yang, "Methane emission from global livestock sector during 1890–2014: Magnitude, trends and spatiotemporal patterns", *Global Change Biology*, vol. 23, pp. 4147–4161, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13709>.
- [2] W. Nordhaus, "Projections and Uncertainties about Climate Change in an Era of Minimal Climate Policies", *American Economic Journal: Economic Policy*, vol.10, num. 3, pp. 333–60. DOI: <https://doi.org/10.1257/pol.20170046>.
- [3] G. Cabestany Ruiz, La XXI Conferencia Internacional sobre Cambio Climático (COP21) y sus implicaciones para México. Temas Estratégicos No. 36. Instituto Belisario Domínguez, Senado de la República, México, 2016. Disponible en: <http://bibliodigitalibd.senado.gob.mx/handle/123456789/3203>.
- [4] (2022). NOAA. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. Disponible en: <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>.
- [5] A. Galicia Naranjo, J. A. Benjamín Ordóñez, A. Munguía Bárcenas, J. V. Venegas Mancera, L. E. Ortega Treviño y M. J. Ordóñez Díaz, "Estimación de las emisiones de gases de efecto invernadero provenientes del ganado en México, 1990-2018." *Realidad, Datos Y Espacio Revista Internacional De Estadística Y Geografía*, vol. 12, no. 3, pp. 114-123, 2021. Disponible en: <https://rde.inegi.org.mx/index.php/2022/01/03/estimacion-de-las-emisiones-de-gases-de-efecto-invernadero-provenientes-del-ganado-en-mexico-1990-2018/>.
- [6] E. J. Olguín, "Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery", *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 5, pp. 1031-46, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>.
- [7] I. Hamed, "The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, no. 6, pp. 1104-1123, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>.
- [8] W. Klinthong, Y. H. Yang, C. H. Huang, and C. S. Tan, "A Review: Microalgae and Their Applications in CO₂ Capture and Renewable Energy", *Aerosol and Air Quality Research*, vol. 15, no. 2, pp. 712–742. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>.
- [9] V. C. Eze, S. B. Velasquez Orta, A. Hernández García, I. Monje Ramírez, and M. Orta Ledesma, "Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration", *Algal Research*, vol. 32, pp. 131-141, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.015>.
- [10] K. A. Mohammed, I. Adubakar, G. Tanimu and S. Abdurrazak, "The Effect of Carbon dioxide Concentration on the Rate of Microalgae Growth, CO₂ Uptake and Nutrient Removal from Wastewater", *Nigerian Journal of Renewable Energy*, vol.

- 17(1&2), pp. 79-91, 2017. Available: https://www.researchgate.net/publication/348714272_The_Effect_of_Carbon_dioxide_Concentration_on_the_Rate_of_Microalgae_Growth_CO2_Uptake_and_Nutrient_Removal_from_Wastewater.
- [11] R. K. Oruganti, K. Katam, P. L. Show, V. Gadhamshetty, V. K. K. Upadhyayula, and D. Bhattacharyya, "A comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant removal", *Bioengineered*, vol. 13, no. 4, pp. 10412-10453, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056823>.
- [12] J. D. Wehr, R. G. Sheath, and J. P. Kocielek, *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press, 2015.
- [13] J. Komárek, and J. Komárková Legnerová, "Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico", *Preslia*, vol. 74, no. 3, pp. 207-233, 2002.
- [14] D. E. Aguirre Cavazos, S. Moreno Limón, S. M. Salcedo Martínez, "Especies de algas de ríos de Nuevo León, México: nuevos registros para el estado", *Polibotánica*, vol. 46, pp. 1-25, 2018. DOI: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.1>.
- [15] J. D. Wehr, and R. G. Sheath, *Freshwater Algae of North America*. Academic Press, California, USA, 2003.
- [16] L. Barsanti, and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* (3rd Ed.), Taylor & Francis Group, 2014.
- [17] S. Aiba, and T. Ogawa, "Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture", *The Journal of General Microbiology*, vol. 102, no. 1, pp. 179-182, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-179>.
- [18] R. A. Andersen, *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, London, 2005.
- [19] K. H., Ogbonda, R. E. Aminigo, and G. O. Abu, "Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp.", *Bioresource Technology*, vol. 98, no. 11, pp. 2207-2211, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028>.
- [20] R. N. Prasad, K. Sanghamitra, A. Gutierrez Mora, J. Gallardo Valdés, B. Rodriguez Garay, J. L. Ibarra Montoya, and G. Vega Valero, "Isolation, Identification and Germplasm Preservation of Different Native *Spirulina* Species from Western Mexico", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 4, pp. 65-71, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.412A2009>.
- [21] N. Adir, S. Bar-Zvi, and D. Harris, "The amazing phycobilosome", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1861, no. 4, pp. 148047, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.07.002>.
- [22] M. Babu, K. Ashok, J. Senthil, and T. Kalaiyarasu, "Effect of pH on *Arthrospira platensis* production", *Alochana Chakra Journal*, vol. 9, no. 5, pp. 2297-2305, 2020. Available: https://www.researchgate.net/publication/341312500_EFFECT_OF_pH_ON_ARTHROSPIRA_PLATENSIS_PRODUCTION.
- [23] N. U. F. Niangoran, D. Buso, G. Zissis, and T. Prudhomme, "Influence of light intensity and photoperiod on energy efficiency of biomass and pigment production of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*)", *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, vol. 28, no. 37, pp. 1-8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1051/ocl/2021025>.
- [24] H. Tayebati, F. P. Shariati, N. Soltani, and H. S. Tehrani, "The effect of different light variables on *Spirulina* growth and its component", *The 11th International Chemical Engineering Congress & Exhibition At: Fouman-Iran*, 2020. Available: https://www.researchgate.net/profile/Hanieh-Tayebati/publication/345775863_The_effect_of_different_light_variables_on_spirulina_growth_and_its_component/link/s/5fad8f8045851507811353f4/The-effect-of-different-light-variables-on-spirulina-growth-and-its-component.
- [25] M. Kumar, J. Kulshreshtha, and G. P. Singh, "Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature", *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, no. 3, pp. 1128-1135, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300034>.
- [26] R. Chaiklahan, N. Khonsarn, N. Chirasuwan, M. Ruengjitchatchawalya, B. Bunnag, and M. Tanticharoen, "Response of *Spirulina platensis* C1 to High Temperature and High Light Intensity", *Kasetsart Journal - Natural Science*, vol. 41, pp. 123-129, 2007. Available: <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/244297>.
- [27] I. M. Rafiqul, A. Hassan, G. Sulebele, C. Orosco, and P. Roustaiian, "Influence of Temperature on Growth and Biochemical Composition of *Spirulina platensis* and *S. fusiformis*", *Iranian International Journal of Science*, vol. 4, no. 2, pp. 97-106, 2003.
- [28] D. Selvendran, "Large Scale Algal Biomass (*Spirulina*) Production in India", *Das, D. Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, Springer International Publishing, pp. 151-167, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_7.
- [29] Y. S. Kim, and S. H. Lee, "Quantitative analysis of *Spirulina platensis* growth with CO₂ mixed aeration", *Environmental Engineering Research*, vol. 23, no. 2, pp. 216-222, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4491/eer.2017.193>.