

Revista Científica y Tecnológica UPSE

Ensayos de laboratorio para la obtención de biomasa algal en un fotobiorreactor discontinuo

Laboratory test for the production of algae biomass in a batch photobioreactor



Cristhian David Chicaiza Ortiz * (1,2,4) <https://orcid.org/0000-0003-3970-4550>, José Gerardo León Chimbolema (2) <https://orcid.org/0000-0001-9202-8542>, Sofía Godoy Ponce (2) <https://orcid.org/0000-0002-6479-4343>, Ginno Andrés Alvarado Ávila (1) <https://orcid.org/0000-0003-1827-0327>, Ángel Chicaiza Ortíz (3) <http://orcid.org/0000-0002-2405-2783>.

(1) Universidad Estatal Amazónica – Sede Académica El Pangui, Ecuador.

(2) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

(3) Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador.

(4) Grupo Internacional de Fomento a la Excelencia, Quito, Ecuador.

Resumen

La viabilidad económica y energética de procesos basados en el uso de biomasa de microalgas requiere un sistema de cultivo eficiente. La obtención de biomasa algal se genera con base en la capacidad para crecer relativamente rápido, recolectarse a diario y cultivarse en estanques de tierra o fotobiorreactores cerrados que ocupan tierras de cultivo marginales. El objetivo del presente trabajo fue producir biomasa algal en un fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio. El equipo contó con 15 litros de capacidad, lámparas LED de 841.91 Lx distribuidos en 6 cilindros de acrílico. El cultivo se realizó por tres semanas. Los primeros tres cilindros contuvieron cepas de *Chlorella vulgaris* los otros tres *Scenedesmus sp.* Para el control de tiempo de exposición a la luz, se usó un temporizador, programado en fotoperíodos de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, se suministró dióxido de carbono (CO₂) atmosférico al cultivo a través de una bomba de aire con un caudal de 0.0378 cm³ de CO₂ /s, se realizaron también controles diarios de pH, ajustándolo a un rango entre 7.5 y 8.5, al igual que los valores de absorbancia, medidos a 750 nm, para evaluar el crecimiento de las microalgas. La biomasa fue sedimentada en recipientes de 20 litros, el sobrenadante fue retirado, la biomasa húmeda se centrifugó por 6 minutos a 840 rpm, conservando únicamente el pellet. Como resultado, las muestras liofilizadas conservaron las propiedades de la biomasa seca: 6.59 g de *C. vulgaris* y 9.74 g de *Scenedesmus sp.*, las 2 muestras se guardaron en refrigeración, se concluyó que existe que hubo mayor producción de *C. vulgaris* frente a *Scenedesmus sp.*

Abstract

The economic and energetic feasibility of microalgae-based processes requires an efficient cultivation system. Algal biomass is generated based on the ability to grow relatively fast, be harvested daily and cultivated in earthen ponds or closed photobioreactors that occupy marginal farmland. The objective of the present work was to produce algal biomass in a laboratory-scale batch photobioreactor. The equipment had a capacity of 15 liters, LED lamps of 841.91 Lx distributed in 6 acrylic cylinders. The culture was carried out for three weeks. The first three cylinders contained strains of *Chlorella vulgaris* and the other three *Scenedesmus sp.* For the control of light exposure time, a timer was used, programmed in photoperiods of 12 hours of light and 12 hours of darkness, atmospheric carbon dioxide (CO₂) was supplied to the culture through an air pump with a flow rate of 0.0378 cm³ of CO₂ /s, daily pH controls were also performed, adjusting it to a range between 7.5 and 8.5, as well as absorbance values, measured at 750 nm, to evaluate the growth of the microalgae. The biomass was sedimented in 20 liter containers, the supernatant was removed, the wet biomass was centrifuged for 6 minutes at 840 rpm, keeping only the pellet. As a result, the freeze-dried samples retained the properties of the dry biomass: 6.59 g of *C. vulgaris* and 9.74 g of *Scenedesmus sp.*, the 2 samples were kept refrigerated, it was concluded that there was a higher production of *C. vulgaris* compared to *Scenedesmus sp.*

Palabras clave:

Scenedesmus,
Chlorella vulgaris,
Biotecnología Ambiental,
microalgas,
fotobiorreactor.

Keywords:

Scenedesmus,
Chlorella vulgaris,
Environmental Biotechnology,
microalgae,
photobioreactor

Recibido: noviembre 1/2021 **Aceptado:** mayo 21/2021 **Publicado:** junio 25/2021

Forma de citar: Chicaiza Ortiz, C.; León Chimbolema, J.; Godoy Ponce, S.; Alvarado Ávila, G.; Chicaiza Ortíz, A. (2021). Ensayos de laboratorio para la obtención de biomasa algal en un fotobiorreactor discontinuo. Revista Científica y Tecnológica UPSE, 8 (1) pág. 01-07. DOI: 10.26423/rctu.v8i1.541

* Autor para correspondencia: cristhianchicaiza@hotmail.com

1. Introducción

La producción industrial presenta una tendencia constante a incrementarse en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo sin considerar en la mayoría de los casos las repercusiones ambientales, lo que incide directamente sobre la demanda energética y la necesidad de agua en varios sectores, incluyendo la agricultura, el transporte, sectores comerciales y domésticos (Sarin, A., 2012). La demanda actual de energía es cubierta mayoritariamente por fuentes convencionales contaminantes como por ejemplo el consumo de gas natural y la energía hidroeléctrica que con frecuencia conllevan la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera, dando lugar a la degradación atmosférica y a una alteración del ambiente (Perera, F., 2018; Elegbede, I., et al. 2017).

Las microalgas son organismos unicelulares que actúan como productores primarios cruciales en todo el mundo, que se encuentran típicamente en ambientes marinos y de agua dulce. La mayoría de ellos pueden vivir fotoautotórficamente, reproducirse rápidamente y acumular biomasa en un período corto de manera eficiente (Zhi-Cong, L., Ming-Hua, L., 2019)

Existe interés por encontrar soluciones sostenibles frente a los conflictos ambientales a los que en la actualidad el planeta se ve inmerso (Sandoval, M., 2013). Cuando estos conflictos requieren una atención inmediata, se generan atractivas propuestas con microalgas en los que se combinan el potencial de cosechar coproductos valiosos de forma concomitante, como biopolímeros, proteínas y alimentos para animales con el compuesto activo de las microalgas que a menudo se promocionan como el "oro verde" de la biotecnología (Cooney, M., Young, G., Nagle, N., 2011).

En los países en desarrollo, no existen un número significativo de proyectos que busquen optimizar sus procesos y abaratar costos (Khan, M.I., J.H. Shin, and J.D. Kim, 2018; Shiho, M., et al., 2012). Existen varios cuellos de botella primarios en las tecnologías actuales, incluida la baja eficiencia de conversión de biomasa, la bioinvasión del entorno externo, las fuentes de nutrientes limitadas o costosas y la gran cantidad de energía y capital para la cosecha, y el estancamiento de su progresión industrial (Yimin, C., Changan, X., 2017)

La combinación de la producción de biocombustible con el tratamiento ambiental hace que las microalgas sean una materia prima más viable (Yimin, C., Changan, X., 2017) por su capacidad de acumular niveles muy altos de lípidos, lo que genera interés en el aprovechamiento de proteínas y alimentos. (Borowitzka, M.A. y N.R. Moheimani, 2012; Perera, F., 2018, et al., 2017).

En Ecuador, y dentro del contexto de la producción de biomasa algal hay esfuerzos iniciales para su uso, aprovechamiento (Puente Insuasti, E.H., 2019; Li, M.,

Hu, D., y Liu, H., 2014; Herdoíza, J.A., 2017; Patiño, M., 2016) y sus aplicaciones en las diferentes industrias. Uno de los varios casos relacionados, es el tratamiento de aguas residuales para remoción de nutrientes con microalgas nativas ecuatorianas (Benítez, M., et al., 2018), investigación que relaciona una de las aplicaciones de este estudio.

El reto de las instituciones a nivel superior y centros de transferencia tecnológica es desarrollar proyectos que permitan el aprovechamiento de sistemas biológicos, generen recursos para la población y desarrollen nuevas líneas de investigación, por cuanto se vuelve imprescindible este tipo de investigaciones.

2. Materiales y métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Los taxones que se utilizaron fueron *Scenedesmus* sp. y *Chlorella vulgaris*, que fueron obtenidas de La Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCE-SI) y de la Universidad de Cuenca. Las microalgas fueron mantenidas con las condiciones adecuadas para su desarrollo y mantenimiento. En ese sentido, se utilizó luz artificial proveniente de lámparas fluorescentes, mismas que estaban distribuidas frente a frente, cuyo valor promedio de intensidad lumínica es igual 841.91 Lx (Chicaiza C., et al 2017), en fotoperíodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, mantenidas en Erlenmeyer de 250 mL, con un medio de cultivo basado en un fertilizante comercial, Nitrofoska foliar al 5% (m/v). La inyección de aire se realizó por 5 min, bombeando de forma continua con una pipeta Pasteur al interior del medio de cultivo, este procedimiento se llevó a cabo desde la incorporación de las muestras al laboratorio de biotecnología hasta la realización de la tesis.

Posterior al mantenimiento señalado, se llevó a cabo el cultivo de los dos taxones bajo los siguientes lineamientos: todos los materiales fueron esterilizados en una autoclave TUTTNAUER 2340E a 120 °C, 15 psi, 30 minutos, previo a cada ensayo. Además, el medio de cultivo utilizado fue Blue Green Medium (BG11), se preparó una solución patrón, a partir de la cual se realizó una dilución al 10% (v/v); para el primer lote de producción, se cambió la concentración de una de las sales más representativas, NaNO₃ en el medio de cultivo, con el fin de identificar la dosis óptima de producción, los valores de NaNO₃ (g/L) correspondieron a 1.5, 2.0, 2.5. Posteriormente, se utilizó el valor óptimo encontrado, correspondiente a 2.0 g/L en el segundo lote. Se inoculó 5mL de cada taxón en los 3 primeros cilindros se utilizó *C. vulgaris* y en los 3 restantes se empleó *Scenedesmus*, con el uso de 6 Erlenmeyer de 500 mL. Cabe señalar que, se realizó un ajuste de pH en el rango entre 7.5 y 8.5 con NaOH al 20 % (m/v) y HCl 2.0 N, el control de pH y

temperatura se llevó a cabo de manera diaria, mientras duró el experimento. Este proceso fue llevado a cabo bajo las medidas de bioseguridad del laboratorio para evitar contaminación.

El fotobiorreactor utilizado tiene una capacidad máxima de 15 L; consta de una base hexagonal, con espejos en su interior para optimizar la concentración lumínica. La parte superior tiene un sistema eléctrico en paralelo de las lámparas LED de 8000 lm de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, un termómetro, un sistema de aireación continua, y un pH-metro (figura 1).

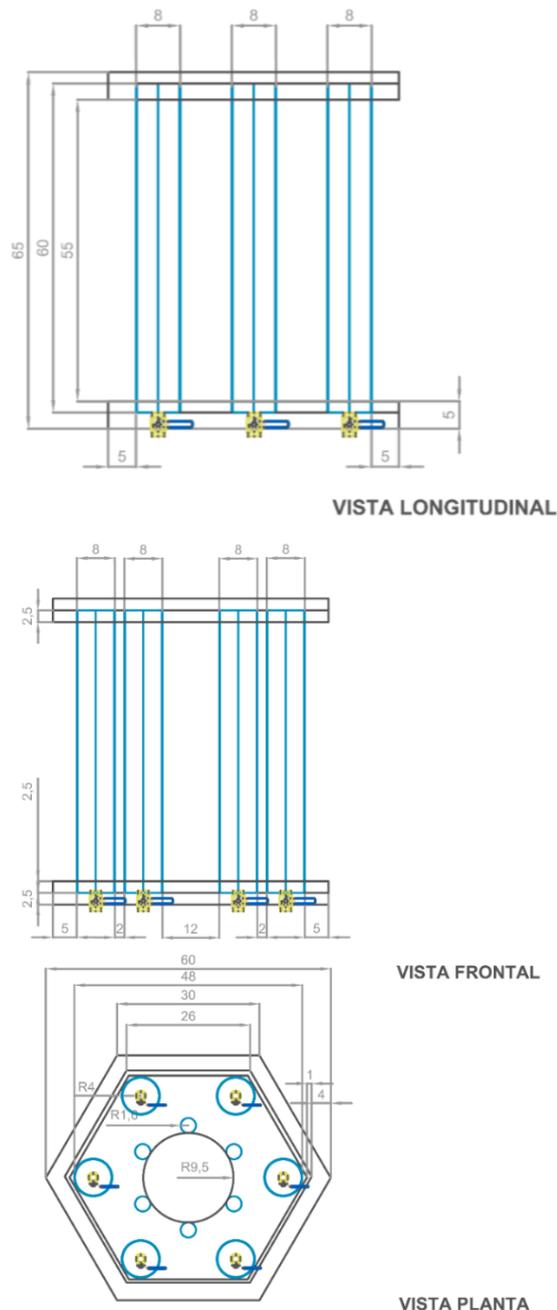


Figura 1. Fotobiorreactor discontinuo. Fuente: Autoría propia

Para determinar la intensidad lumínica, dentro de los cilindros, se usó el sensor-Unit Weather Cobra 4 Weather, con el cual se realizaron tres mediciones y se obtuvo un valor promedio. Se realizaron controles cada 24 horas del crecimiento de las microalgas mediante la medición de absorbancia en el espectrofotómetro UV HELIOS β V.60 a una longitud de onda 750 nm, para cada análisis se empleó 10 mL de muestra; se utilizó la ecuación (Eq.1), desarrollada por los investigadores del laboratorio de Biología de la PUCE-SI ($R^2=0.98$), para convertir a número de células por mL a partir de la absorbancia.

$$\text{Concentración (x104 células/mL)} = 5209.4 \times \text{Abs} - 70.679 \text{ (Eq. 1)}$$

Los productos resultantes fueron colocados en recipientes plásticos, con un volumen de 20 L. Los 3 primeros cilindros de *Chlorella vulgaris* se ubicaron en un recipiente y el contenido de los 3 restantes cilindros, correspondientes a *Scenedesmus* se pasó a otro recipiente de la misma capacidad. La biomasa húmeda se centrifugó a 840 rpm por 6 min, desechándose el sobrenadante y conservando en refrigeración el pellet, como se indica en la Figura 2.

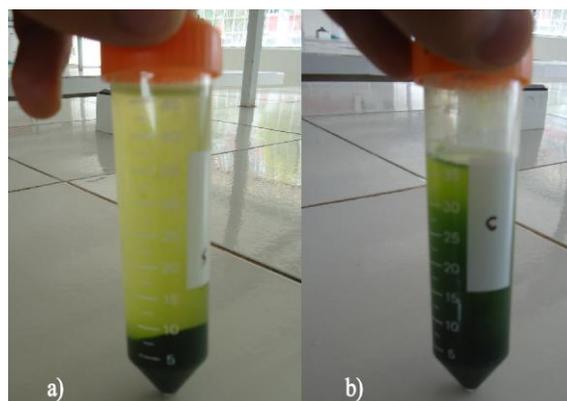


Figura 2. Biomasa húmeda a) Scenedesmus Sp b) Chlorella sp. Fuente: Autoría propia.

Posteriormente, se liofilizaron las muestras con el equipo THERMO - MICRO MODULYO por 4 horas. Adicional a ello, se llevaron las muestras a un espectrofotómetro infrarrojo JASCO FT-IR 4100 para determinar los grupos funcionales más representativos.

3. Discusión y resultados

La intensidad lumínica medidas en los seis cilindros se registran en la Tabla 1.

La Tabla 2 indica la producción de microalgas y una variación mínima de temperatura, cuya media fue de 27.08 °C. En los cilindros con una concentración igual a 2 g/L de NaNO₃, la densidad algal al final del proceso fue de 7446.49x10⁴ células/mL y 3825.95x10⁴ células/mL para *C. vulgaris* y *Scenedesmus*,

respectivamente. Estos son los valores más representativos en comparación a las otras variaciones del medio de cultivo en este estudio.

Tabla 1. Intensidad lumínica en el fotobiorreactor detallada por cilindro.

Número de cilindro	Medición (Lx)	Promedio (Lx)	Promedio (μ mol fotón $m^{-2} s^{-1}$)
2	795.20 809.40 798.75	801.12	10.83
3	976.25 986.90 994.00	985.72	13.32
4	873.30 866.20 859.10	866.20	11.71
5	773.90 766.80 759.05	766.58	10.36
6	874.20 844.90 883.95	874.35	11.82

Fuente: Autoría propia.

La curva de crecimiento se desarrolló con normalidad, que se válida con estudios de otros autores (Chacón et al, 2004; Nanduca et al, 2015). Se distingue la fase de latencia hasta la primera semana, mientras que la fase exponencial alcanza el décimo séptimo día, posterior a ello se presentó la fase estacionaria del cultivo. Ren et al (2017) propone en un estudio similar, sobre el cultivo de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor, un tiempo de cosecha máximo de 34 días, es decir durante la fase estacionaria, porque si se excede esta etapa, la cantidad de biomasa disminuye, ante las limitaciones de sustrato y pueden dejar de ser eficientes en la remoción de ciertos contaminantes en aguas residuales o incluso la producción de lípidos, vinculado a la producción de biocombustibles (Cobos et al, 2014).

El segundo lote de producción, basados en las concentraciones óptimas del primer lote se muestra en la Tabla 3, donde se mantuvo una temperatura promedio de 27.08 °C. Además, los datos indican un patrón regular hasta el día 12, con una fase de crecimiento hasta el día 5; después, la curva presenta la fase de declive o muerte celular en las seis unidades de análisis debido a un incremento del pH en la mayoría de las

unidades, excepto en el cilindro 5, donde el crecimiento es exponencial y sobresale hasta el final.

Tabla 2. Primer lote de producción de microalgas.

Días	Concentración ($\times 10^4$ células/mL)						Temperatura promedio (°C)
	Número de cilindro						
	1	2	3	4	5	6	
1	49.1	49.1	49.1	57.8	57.8	57.8	25.9
3	153.3	174.2	200.2	163.7	163.7	54.4	25.7
4	127.3	309.6	455.5	528.4	528.4	637.8	26.6
5	325.2	528.4	564.9	851.4	851.4	590.9	25.8
6	507.6	1007.7	945.2	1549.4	1549.4	700.3	26.1
7	502.4	1012.9	356.5	2013.1	2013.1	429.4	25.4
10	1486.9	2273.6	1617.2	4034.3	4034.3	1361.9	25.2
11	1096.2	1877.6	1299.4	4518.8	4518.8	1169.2	26.3
12	919.1	1955.8	726.4	4633.4	4366.4	950.4	25.8
13	1012.9	2732.0	1018.1	5612.8	5612.8	893.1	25.9
14	1210.8	2836.2	773.2	5216.9	5216.9	580.5	26.2
17	1653.6	4404.2	1554.7	5289.8	5289.8	1429.6	25.7
18	1742.2	5268.4	1612.0	4148.9	4148.9	1455.7	25.9
19	1789.1	5373.1	1705.7	3497.8	3497.8	1476.5	25.6
20	1700.5	5732.6	1752.6	3049.8	3049.8	2820.5	25.9
21	2057.6	5982.6	1882.9	2513.2	2513.2	1497.4	26.2
22	2497.6	7399.6	2455.4	3904.1	3904.1	1856.8	25.8
23	2471.5	7446.6	2528.8	3826.0	3829.0	1841.2	25.6

Fuente: Autoría propia.

Tabla 3. Segundo lote de producción de microalgas.

Días	Concentración ($\times 10^4$ células/mL)						Temperatura promedio (°C)
	Número de cilindro						
	1	2	3	4	5	6	
1	1455.3	1445.3	1445.3	1278.6	1278.6	1278.6	26.6
2	1981.8	1643.2	1932.9	1700.5	1684.9	1955.8	26.5
5	3372.7	4430.2	3945.8	3362.3	2284.0	2721.6	25.8
6	3591.5	4326.1	4013.5	3445.7	2804.9	2487.1	26.2
7	4524.0	4539.6	3971.8	4383.4	4289.6	2700.7	25.8
8	4487.6	4461.5	3560.3	4206.2	1778.7	2211.0	26.3
12	6555.7	4727.2	3747.8	5192.0	2226.7	3206.0	29.0
13	1653.6	4404.2	1554.7	4909.5	5289.8	1429.6	28.6
14	1096.2	1877.6	1299.4	2362.1	4518.8	1169.2	26.8
15	919.1	1955.8	726.4	2591.3	4633.4	950.4	27.2
16	1012.8	2732.0	1018.1	3279.0	5612.8	893.1	28.3
19	1210.8	2836.2	773.2	3153.9	5216.9	580.5	27.6
20	1653.6	4404.2	1554.7	4909.5	5289.8	1429.6	26.9
21	1742.2	5269.0	1612.0	4805.3	4148.9	1455.7	27.5

Fuente: Autoría propia.

La Tabla 2 presenta los 6 cultivos de los dos taxones, en los cilindros 1-3 se cultivó *Chorlella vulgaris*, y en los cilindros 4-6, *Scenedesmus* sp. En el segundo y quinto cilindro, las concentraciones NaNO_3 fueron las más adecuadas para el crecimiento de los dos géneros, que presentó una tendencia exponencial en los días 12-13, posteriormente la densidad algal se mantuvo estable. Mientras que en los restantes cilindros (1, 3, 4 y 6), la tendencia de crecimiento se requirió más tiempo para su desarrollo.

Se obtuvo un resultado de biomasa liofilizada de 6.59 g y 9.74 g para *C. vulgaris* y *Scenedesmus*, respectivamente, como se indica en la Figura 3. Existió una relación de aproximadamente 150% más de *Scenedesmus* en comparación a *C. vulgaris* en las 3 semanas, relación que es similar a la obtenida por (Chacón, 2004).

Una de las limitaciones del estudio fue que, las muestras tomadas en la medición de absorbancia afectaron el volumen final al no poder reincorporarse, dando un volumen igual a 1.08 L.

En relación de la biomasa seca con el volumen de cultivo, para *C. vulgaris*, la producción equivaldría a 1.02 g/L. Mientras que para el cultivo de *Scenedesmus* se alcanzó una producción de 1.52 g/L, que equivale a 72.20 mg/L.d-1 La cantidad biomasa obtenida es similar a la obtenida en otros trabajos de investigación basados en el cultivo de los mismos géneros de microalgas (Chun-Yen et al, 2015) incluso mayor en que otros trabajos, donde se reporta un rendimiento de biomasa de 0.52 g/L para el tratamiento de aguas residuales (Kee-Lam, M., Keat-Teong., L., 2014).



Figura 3. Liofilización de las muestras: *Scenedesmus* (izquierda) y *Chlorella vulgaris* (derecha). **Fuente:** Autoría propia.

Enfocado a la identificación de estos dos géneros. En este sentido, los picos asignados a 1637 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} corresponden al espectro de proteínas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus*, bandas que se debieron esencialmente a la vibración de estiramiento (stretching vibration) de C=O al igual que la combinación de vibraciones de flexión N-H y de estiramiento C-N en complejos de amida, respectivamente (Özer., et al., 2012). De igual manera, para el espectro de los lípidos se tienen los picos 2925 cm^{-1} y 2921 cm^{-1} para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus*, respectivamente (Figuras 4 y 5).

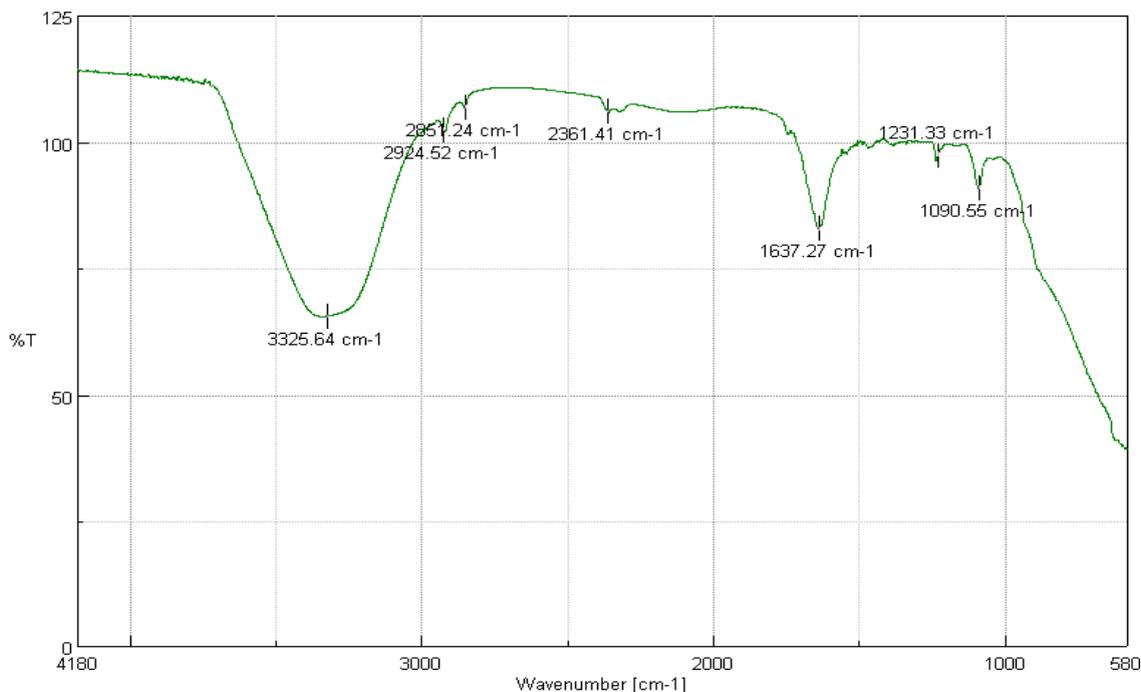


Figura 4. Identificación de grupos funcionales por Espectroscopía Infrarroja para *Chlorella vulgaris*. **Fuente:** Autoría propia

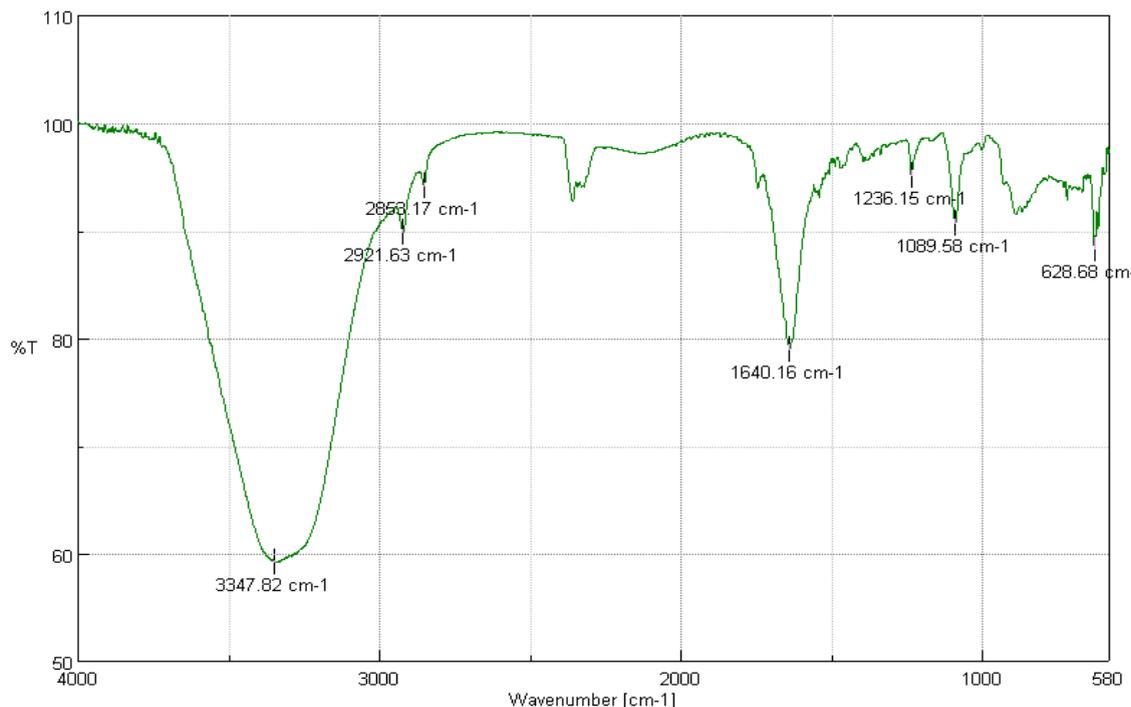


Figura 5. Identificación de grupos funcionales por Espectroscopía Infrarroja para Scenedesmus. **Fuente:** Autoría propia

4. Conclusiones

La dosis óptima, empleando el medio de cultivo BG11, fue utilizando una concentración de 2 g/L de NaNO₃. La producción de Scenedesmus frente a lo generado por *Chlorella vulgaris* fue mayor en un 1.5 veces, respecto a la de biomasa seca, después de 3 semanas de cultivo.

5. Agradecimiento

El presente estudio fue llevado a cabo en varios laboratorios, por lo cual se agradece al MSc. Diego Vinueza, MSc. Christian Camacho, responsables de las áreas de productos naturales y análisis instrumental de la ESPOCH. De igual manera se agradece al químico farmacéutico Robert Gutiérrez de la Universidad de Guayaquil, quien colaboró en la fase de construcción del equipo.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Benítez, M., et al., (2018). Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae. *Environmental Technology*. p. 2977-2985
- [2] Borowitzka, M.A. and N.R. Moheimani, (2012). *Algae for Biofuels and Energy*. Springer. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=z3TWPBw>

o lexoC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false

- [3] Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., & Morales, E. (2014). Uso de *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp en la remoción de nitrógeno, fósforo y dco de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas*, 38 (2). p. 6-7 Recuperado a partir de <https://www.produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/26>
- [4] Chicaiza Ortiz, C.D., et al., 2017. Diseño y construcción de un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal (tesis de pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/6309/1/236T0251.pdf>
- [5] Cobos M., Castro J., Cerdeira L.,(2014), Potencial Biotecnológico para la Producción Sustentable de Biodiesel de Microalgas Oleaginosas Aisladas del Río Itaya, Loreto. *Ecología Aplicada*, 13, pp. 169-175
- [6] Cooney, M., Young, G., Nagle, N., (2011). Extraction of Bio-oils from Microalgae. *Separation & Purification Reviews*. p. 291-325
- [7] Chun-Yen, C., Yu-Han, C., Hsin-Yueh, C., (2015) Outdoor cultivation of *Chlorella vulgaris* FSP-E in vertical tubular-type photobioreactors for

- microalgal protein production. *Algal Research*. pp.266.
- [8] Elegbede, I., et al. (2017), Risk analysis and development of algae biofuel from aquatic and terrestrial systems. *Energy Procedia*, 128: p. 324-331.
- [9] Herdoíza, J.A., (2017). Uso de microalgas para la optimización de la relación carbono nitrógeno en estiércol porcino (tesis de pregrado) Universidad de las Américas, Quito, Ecuador. Disponible en: http://190.15.141.105/Record/0029_03eaf569c74c5be483bc31a07c278c06/Details
- [10] Kee-Lam, M., Keat-Teong, L. (2014) Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale sequential-baffled column photobioreactor for biomass and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*. 88. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.08.063>
- [11] Khan, M.I., J.H. Shin, and J.D. Kim, (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*,. 17 (1): p. 36.
- [12] Li, M., D. Hu, and H. Liu, (2014) Photobioreactor with ideal light-dark cycle designed and built from mathematical modeling and CFD simulation. *Ecological Engineering*,. 73 p. 162-167.
- [13] Nanduca, H., Barahona, L. (2015). Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus sp.* para la producción de lípidos (tesis posgrado) Centro de Investigación Yucatán AC, Yucatán, Estados Unidos Mexicanos. Disponible en: <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/385>
- [14] Patiño, M., (2016). Diseño de un fotobioreactor industrial para cultivo de microalgas destinadas a la producción de biodiesel en la ciudad de Guayaquil (tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/35072>
- [15] Özer, T., et al., (2012). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützinger 1833. *African Journal of Biotechnology*, 11: p. 3817-3824.
- [16] Perera, F., Pollution from Fossil-Fuel Combustion is the Leading Environmental Threat to Global Pediatric Health and Equity: Solutions Exist. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018. 15(1).
- [17] Puente Insuasti, E.H., (2019). Evaluación del comportamiento productivo de cobayos en crecimiento alimentados con la microalga *Arthrospira platensis*, (tesis pregrado), Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Ibarra, Ecuador. p. 84. Disponible en: <https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/506/1/1.INFORME%20FINAL.pdf>
- [18] Ren H, Tuo J, Addy MM, Zhang R, Lu Q, Anderson E, Chen P, Ruan R (2017). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale photobioreactor using real centrate wastewater with waste glycerol for improving microalgae biomass production and wastewater nutrients removal. *Bioresour Technol*. 245. p. 1130-1138.
- [19] Sandoval, M.A., (2013), Diseño, construcción y puesta en marcha de un fotobioreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella sp* en el laboratorio de biotecnología y energías renovables de la EMPRESA ELÉCTRICA QUITO, (tesis pregrado), ESPE, Universidad de las Fuerzas Armadas: Sangolquí, Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6487/1/T-ESPE-047130.pdf>
- [20] Sarin, A., (2012) Biodiesel: Production and Properties. Royal Society of Chemistry. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=72klFb2goSUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [21] Shiho, M., et al., (2012) Business Evaluation of a Green Microalgae *Botryococcus Braunii* Oil Production System. *Procedia Environmental Sciences*. 15: p. 90-109.
- [22] Yimin, C., Changan, X., (2017). Microalgae: a robust “green bio-bridge” between energy and environment. *Critical Reviews in Biotechnology*. p. 351-368. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355774>
- [23] Zhi-Cong, L., Ming-Hua, L., (2019). Transgenic microalgae as bioreactors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. p. 3195-3213. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1680525>