

© 2021 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 24: 1-9, 2021.  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.342>

## Bioencapsulado de *Fischerella* sp.: crecimiento, metabolismo y concentración del inóculo

Esmeralda Alonso-Santos<sup>1</sup>, Ma. Nieves Trujillo-Tapia<sup>1,2</sup>  
Pedro Cervantes-Hernández<sup>3</sup> y Eustacio Ramírez-Fuentes<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Ambiental, <sup>2</sup>Instituto de Ecología e <sup>3</sup>Instituto de Recursos, Universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Ciudad Universitaria s/n. San Pedro Pochutla 70900, Oaxaca, México. E-mail: \*eustacio@angel.umar.mx

### RESUMEN

La inmovilización de microorganismos y su aprovechamiento en la agricultura como biofertilizantes o para biocontrol, es un tópico en desarrollo, y también un aspecto importante a considerar en la concentración es el inóculo para bioencapsularlos sin afectar el crecimiento y producción de sus metabolitos. Las células de *Fischerella* sp. fueron encapsuladas con alginato de calcio empleando diferentes porcentajes de inóculo (1, 5, 10 y 20%), determinando el peso seco (PS), concentración del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y ficobiliproteínas en la biomasa. El crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp. fue mayor en el bioencapsulado vs células libres, al incrementarse 2.8 veces más el valor del PS y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del género en estudio. En la concentración del inóculo (20%) el valor del PS fue de 0.032 µg mL<sup>-1</sup>, y estadísticamente presentó diferencias significativas. A diferencia de las células libres, el bioencapsulado protege a las células del estrés biótico y abiótico, manteniendo la actividad metabólica y viabilidad por periodos de tiempo más largos. El bioencapsulado de *Fischerella* sp. para la producción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y su uso como biofertilizante en la agricultura, es una alternativa vs el uso de fertilizantes químicos.

**Palabras clave:** alginato, biofertilizante, cianobacterias, inmovilización celular.

### Bioencapsulation *Fischerella* sp.: growth, metabolism and inoculum concentration

### ABSTRACT

Immobilized microorganisms and their use in agriculture as biofertilizers or for biocontrol, is a developing topic; and the concentration of inoculum for bioencapsulation, without affecting the growth and production of metabolites by the microorganism, is an important aspect to consider. *Fischerella* sp. cells they were encapsulated with calcium alginate using different percentages of inoculum (1, 5, 10 and 20%), and dry weight, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and phycobiliproteins concentration in biomass were determined. Growth and metabolism of *Fischerella* sp. was higher in bioencapsulated vs free cells. Dry weight and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> of *Fischerella* sp. was increased 2.8 times more in bioencapsulated vs free cells. Dry weight value was 0.032 µg mL<sup>-1</sup> with the concentration of 20% inoculum, and statistically showed significant differences. Unlike free cells, bioencapsulation protects cells from biotic and abiotic stress, maintaining metabolic activity and viability for longer periods of time. Bioencapsulated from *Fischerella* sp. to produce NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and its use as a biofertilizer in agriculture, is an alternative versus use of chemical fertilizers.

**Keywords:** alginate, biofertilizer, cyanobacteria, cell immobilization.

## INTRODUCCIÓN

**L**a técnica del encapsulado de las células microbianas ha sido ampliamente utilizada en la agricultura, la industria farmacéutica y alimentaria (entre otras), como una estructura o cápsula que permite la protección, liberación y funcionamiento del ingrediente activo (Schoebitz, López & Roldán, 2013). Para el encapsulado o inmovilización celular, se ha propuesto el uso de polímeros biodegradables que en las últimas décadas han recibido mucha más atención debido a su potencial aplicación en los campos relacionados a la protección ambiental y el mantenimiento de la salud física (Vroman & Tighzert, 2009). De los biopolímeros existentes, el ácido alginico o alginato, es producido por algas marinas, principalmente las feofitas (pardas) como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperboreana* y *Eklodia cava*; aunque no es exclusivo de estas algas, algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii* y cepas de *Pseudomonas*, son capaces de producir alginato.

El alginato es el biopolímero más comúnmente utilizado para la bioencapsulación de diferentes microorganismos como, *Azospirillum brasilense* (Bashan, 1986; Yabur *et al.*, 2007; Bashan, Salazar & Puente, 2009; Trejo *et al.*, 2012); *Pseudomonas fluorescense* (van Elsas *et al.*, 1992; Bashan & González, 1999; Russo, Basaglia, Tola & Casella, 2001); *Bacillus subtilis* (Young, Rekha, Lai & Arun, 2006; Rekha, Lai, Arun & Young, 2007; Trivedi & Pandey, 2008); *Chlorella sorokiniana* (Yabur, Bashan & Hernández-Carmona, 2007; Trejo *et al.*, 2012), entre otros. Sin embargo, la bioencapsulación de las cianobacterias es un campo poco estudiado.

Las cianobacterias son un excelente sistema utilizado como modelo metabólico dinámico que puede proporcionar a los biotecnólogos nuevos genes y biomoléculas para diversos usos en la agricultura, la industria y la sustentabilidad ambiental (Prasanna, Jaiswal & Kaushik, 2008). El uso de cianobacterias como biofertilizante en los cultivos se conoce desde el siglo pasado, principalmente en el arroz con ventajas como: promover la actividad microbiológica, mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo, así como participar en el reciclaje de nutrientes y beneficiar la productividad de los cultivos (Miransari, 2010; Singh, Pandey & Singh, 2011); también por su capacidad de fijación de nitrógeno (ej. *Fischerella*, *Nostoc*, *Anabaena*) contribuyen aportándolo al cultivo y de esta manera promover la disminución del uso de fertilizantes químicos en cultivos como el maíz (Trujillo-Tapia & Ramírez-Fuentes, 2016). El bioencapsulado de cianobacterias con alginato de calcio, es una alternativa viable para mejorar las condiciones de aplicación, rendimiento y eficiencia del biofertilizante; protege al microorganismo de los factores de estrés biótico y abiótico (contaminantes, organismos antagónicos, temperatura, sequedad, luz UV y estrés mecánico), creando un microambiente que conduce a un tiempo de vida útil más largo y al mantenimiento de la actividad metabólica por largos periodos

de tiempo, no sólo durante el almacenamiento sino también después de la aplicación (Vemmer & Patel, 2013). Además, se ha demostrado que las células fotosintéticas inmovilizadas presentan mayor eficiencia y estabilidad (Cortez, Nicolau Flickinger & Mota, 2017).

La investigación realizada en el campo de la inmovilización de microorganismos, reporta diversas técnicas para el bioencapsulado y su uso como inoculantes para el desarrollo de las plantas (Schoebitz *et al.*, 2013), o bien, en el desarrollo de métodos para obtener mejores resultados como agentes de control biológico (Vemmer & Patel, 2013) e inclusive en la remoción de contaminantes de agua residual (de-Bashan & Bashan, 2010); sin embargo, observamos un vacío de conocimiento con respecto a la concentración del microorganismo que se utilizará como inóculo para la elaboración de los bioencapsulados.

Por lo anterior, en el presente trabajo tuvimos como objetivos: 1) demostrar que el bioencapsulado de *Fischerella* sp., en perlas de alginato de calcio es una alternativa viable para su crecimiento; y 2) obtener la mejor concentración de un inóculo probada para el crecimiento de *Fischerella* sp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento, identificación y crecimiento de *Fischerella* sp.

La cepa de *Fischerella* sp., se obtuvo a partir de un consorcio de cianobacterias aisladas en el suelo agrícola de la zona de Bajos del Arenal, Oaxaca. La muestra de 10 g de suelo se inoculó en un matraz de 250 mL que contenía 200 mL de medio de cultivo BG11° (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman & Stanier, 1979) (Cuadro I) para aislar las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (CFN). Después de 14 días a partir de la inoculación, *Fischerella* sp. se aisló mediante diluciones seriadas (Andersen & Kawachi, 2005) y se identificó morfológicamente (Holt, Krieg, Sneath, Stanley & Williams, 1994). Posteriormente se cultivó en el mismo medio (BG11°) con un fotoperiodo 12:12 luz-oscuridad ( $75.60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  y aireación constante de  $2 \text{ L min}^{-1}$  (bomba de aire de 25 w) durante 30 días para obtener suficiente biomasa para el proceso de bioencapsulado.

### Bioencapsulado de *Fischerella* sp.

La técnica basada en Bashan (1986) fue utilizada para el encapsulado de la cianobacteria. Un mililitro de biomasa de *Fischerella* sp. (0.07 de densidad óptica, 675 nm) se mezcló homogéneamente en 100 mL de una solución al 2% de alginato de calcio (obtenido de *M. pyrifera*, CICIMAR-IPN, México); la mezcla (alginato-cianobacterias) se colocó en una bureta graduada de 25 mL y lentamente se adicionó a una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) al 10% para formar el bioencapsulado (perlas); una vez formadas se dejaron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 1 minuto, posteriormente se retiraron y lavaron en repetidas ocasiones con agua destilada estéril, para remover el exceso del  $\text{CaCl}_2$ . Con los 100 mL de la solución

**Cuadro I. Medio de cultivo para el crecimiento de *Fischerella* sp., BG11 (con nitrógeno) y BG11° (sin nitrógeno), en el ensayo de bioencapsulados vs células libres.**

Reactivo	BG11°	BG11
	(g L <sup>-1</sup> )	
NaCl	0.23	0.23
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075	0.075
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036	0.036
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (ácido cítrico)	0.006	0.006
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (EDTA)	0.001	0.001
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.04	0.04
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> (Citrato férrico)	0.006	0.006
NaNO <sub>3</sub>	-	0.015
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	0.02
<b>*Solución de oligoelementos</b>	<b>1 (mL L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1 (mL L<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.286	0.286
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.181	0.181
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.022	0.022
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.039	0.039
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0079	0.0079
CoCl <sub>2</sub>	0.00494	0.00494
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	0.05

al 2% de alginato de calcio se produjeron aproximadamente 400 bioencapsulados.

**Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp. bioencapsulada vs células libres**

Se establecieron dos tipos de cultivo en lote para el crecimiento de *Fischerella* sp.: i) cultivo en lote de células libres, y ii) cultivo en lote de células bioencapsuladas en alginato de calcio; además se utilizaron dos medios de cultivo, el medio mineral (BG11) (Rippka et al., 1979) y un medio mineral sin nitrógeno (BG11°) (Cuadro I).

El cultivo de células libres se realizó mezclando 5 mL (0.07 de densidad óptica, 675 U.A.) del inóculo de *Fischerella* sp. en 500 mL de medio mineral (BG11 y BG11°), empleando un matraz de 1 L marca Duran. Para el cultivo con los bioencapsulados de *Fischerella* sp. se colocaron aproximadamente 400 perlas (previamente elaboradas) en un matraz de 1 L marca Duran conteniendo el medio mineral (BG11 y BG11°).

El cultivo de células libres y bioencapsuladas se mantuvieron en condiciones controladas durante la cinética, con un ciclo

de 12:12 luz:oscuridad (75.60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), aireación de 2 L min<sup>-1</sup> (bomba de aire de 25 w) y una temperatura constante de 25 ± 2 °C; el pH del cultivo fue de 7.0.

El crecimiento de *Fischerella* sp., se determinó por peso seco (PS). Durante la cinética se tomó semanalmente una alícuota de 5 mL del cultivo de células libres y se filtraron con una bomba para vacío. Por otra parte, 50 perlas de cada tratamiento se disolvieron en 5 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 4% durante 24 horas. En ambos cultivos se procedió de acuerdo con el método de Arredondo-Vega, Cordero-Esquivel & Voltolina (2017).

El metabolismo celular en ambos cultivos (células libres y bioencapsuladas) se evaluó con la cuantificación extracelular de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), clorofila “a” (Cl “a”), carotenos totales (CT), carbohidratos intracelulares totales (CHT) y de ficobiliproteínas: ficocianinas (FC), aloficocianinas (AFC) y ficoeritrinas (FE). Se tomó semanalmente (durante la cinética) una alícuota de 5 mL del cultivo de células libres previamente filtradas (40 mm de diámetro y poro de 5-8 μm) y se procedió al análisis de acuerdo al método para cada metabolito. Por otra parte, 50 perlas de cada tratamiento se disolvieron en 5 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 4% durante 24 horas, posteriormente se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 minutos a 25 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se volvió a suspender en agua destilada, se agitó vigorosamente y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones durante 10 minutos. La cuantificación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cl “a”, CT y CH se estimó por el análisis espectrofotométrico (Beckman DU-530). El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a 630 U. A., de acuerdo con el método del fenato (APHA-AWA-WPCF 1992); Cl “a” y CT a 470 y 750 U. A. (respectivamente), por el método de Sukenik, Carmeli & Berner (1989); los CH a 485 U. A. (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956). La extracción y cuantificación de las ficobiliproteínas (FC, AFC y FE) se realizó por congelación y descongelación reiterada (Siegelman & Kycia, 1978). La concentración de ficobiliproteínas se calculó utilizando las ecuaciones basadas en los coeficientes de extinción específicos para pigmentos en cianobacterias:

$$FC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = [A_{615} - 0.474 (A_{652})] / 5.34$$

$$AFC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = [A_{652} - 0.208 (A_{615})] / 5.09$$

$$FE \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = [A_{562} - 2.41 (FC) - 0.849 (AFC)] / 9.62$$

A<sub>652</sub>, A<sub>615</sub> y A<sub>562</sub> representan la absorbancia medida a 652, 615 y 562 U.A. (Siegelman & Kycia, 1978).

**Concentración del inóculo de *Fischerella* sp. para los bioencapsulados**

Se diseñó un experimento para evaluar el crecimiento celular y la actividad metabólica de *Fischerella* sp., probando diferentes concentraciones del inóculo al momento de elaborar los bioencapsulados; se tomaron 1, 5, 10 y 20 mL del cultivo de cianobacterias para obtener inóculos de 1, 5, 10 y 20%,

respectivamente y el control (perlas sin cianobacterias). En cada matraz de 500 mL conteniendo 250 mL del medio de cultivo BG11° se colocaron los bioencapsulados y se mantuvieron en las mismas condiciones: un ciclo de 12:12 luz:oscuridad ( $75.60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), aireación de  $2 \text{ L min}^{-1}$  y una temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 35 días. Cada tratamiento se hizo por duplicado. La determinación del crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp. fue como se mencionó anteriormente.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y la comparación entre medias utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) calculada a  $\rho < 0.05$ . El procedimiento estadístico se llevó a cabo con el software Statistica 7.0.

## RESULTADOS

### Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp.: Bioencapsulada vs células libres

El crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp. fue superior en el bioencapsulado en comparación con las células libres. Los valores de PS (Figura 1) y  $\text{NH}_4^+$  de *Fischerella* sp. se incrementaron en 2.8 veces más en el bioencapsulado vs las células libres; y fueron significativamente diferentes ( $\rho < 0.05$ ). La concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el bioencapsulado se incrementó con el tiempo (semana 1 a la 8); pasó de  $6.78 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $23.45 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el incremento fue de 3.4 veces; la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en las células libres pasó de  $5.28$  a  $6.06 \mu\text{g mL}^{-1}$  con un incremento de 1.1 veces (Figura 2).

La concentración de CHT en el bioencapsulado fue 2.2 veces mayor en comparación con las células libres (Cuadro II) y significativamente diferente ( $F_{[1, 64]} = 220.08$ ,  $\rho = 0.000$ ). Con

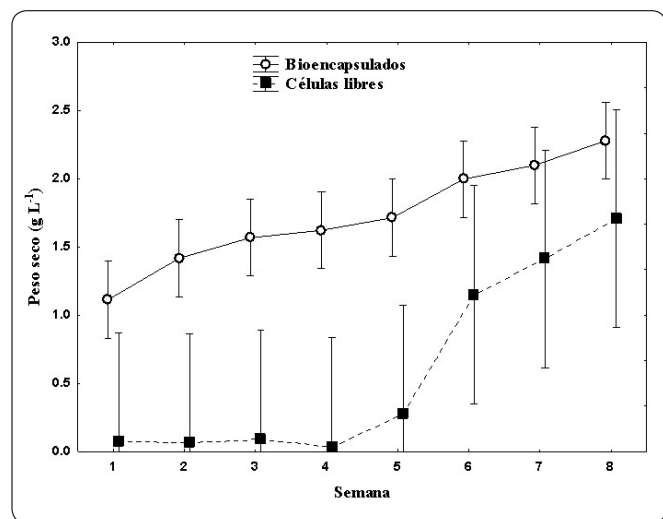


Figura 1. Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) en células de *Fischerella* sp. bioencapsulados vs células libres, durante la cinética de 8 semanas.

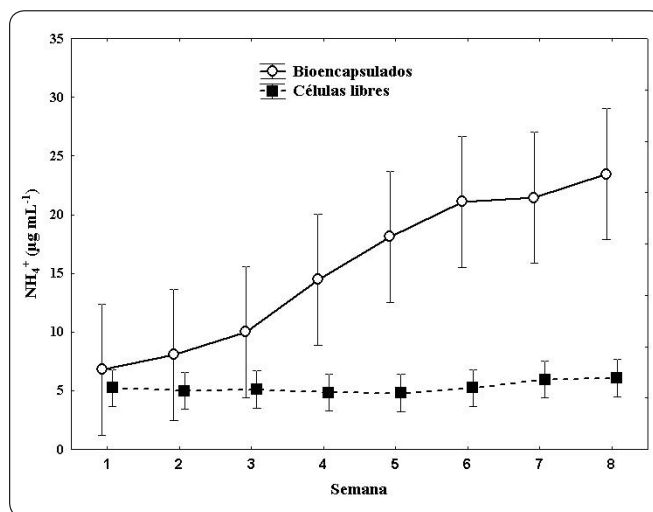


Figura 2. Producción continua de  $\text{NH}_4^+$  en células de *Fischerella* sp. bioencapsulados vs células libres, durante la cinética de 8 semanas.

relación al análisis de FC, AFC y FE; en los tres parámetros, los valores obtenidos fueron mayores en el bioencapsulado vs células libres (Cuadro II), sin presentar diferencias significativas ( $\rho < 0.05$ ).

De los parámetros analizados, únicamente la concentración de CT y Cl "a" en las células libres fue mayor comparado con el bioencapsulado. El valor de CT y Cl "a" en células libres fue de 3.1 y 4.5 veces más (respectivamente) que en el bioencapsulado; en ambos casos existió diferencia significativa ( $\rho < 0.05$ ) (Cuadro II). La concentración de Cl "a" en el bioencapsulado pasó de  $0.0405 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 1) a  $0.3879 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 8); por su parte, la concentración de Cl "a" en las células libres fue de  $0.111 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 1) y se incrementó hasta llegar a  $1.172 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 8). La concentración de CT en el bioencapsulado pasó de  $0.010 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 1) a  $0.094 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 8); en las células libres la concentración fue de  $0.030 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 1) y se incrementó semanalmente hasta llegar a  $0.225 \mu\text{g mL}^{-1}$  (semana 8).

Con respecto a la cinética de *Fischerella* sp. bioencapsuladas y en células libres en el medio de cultivo sin nitrógeno (BG11°) y con nitrógeno (BG11), los resultados obtenidos muestran que el PS, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y CHT, fueron mayores en el medio BG11 vs BG11°. El valor de PS,  $\text{NH}_4^+$  y CHT en el medio BG11 fue de  $2.08 \text{ g L}^{-1}$ ,  $19.42$  y  $85.66 \mu\text{g mL}^{-1}$  (respectivamente) y en el medio BG11° mayor que  $1.76 \text{ g L}^{-1}$ ,  $14.87$  y  $75.53 \mu\text{g mL}^{-1}$  (respectivamente) (Cuadro II). En los tres parámetros analizados existió diferencia significativa ( $\rho < 0.5$ ). Por el contrario, los valores de CT y Cl "a" fueron mayores en el medio BG11° vs BG11, en bioencapsulados y células libres. El valor de CT y Cl "a" en el medio BG11° fue



de 0.187 y 0.712  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (respectivamente); y en el medio BG11 mayor a 0.137 y 0.555  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (respectivamente). En los dos parámetros analizados existió diferencia significativa ( $\rho < 0.05$ ) (Cuadro III). La concentración de FC, AFC y FE no mostraron diferencias significativas entre el bioencapsulado y células libres, ni entre el medio BG11° y BG11.

**Concentración del inóculo: 1, 5, 10 y 20%, en células bioencapsuladas**

El crecimiento de *Fischerella* sp. se determinó a través del PS de la biomasa; en la concentración al 20% del inóculo el valor de PS fue de 0.032  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y estadísticamente con diferencias significativas ( $F_{[3,30]} = 11.061$ ,  $\rho = 0.000$ ) respecto al inóculo de 10, 5 y 1% (Cuadro IV).

La concentración promedio total de  $\text{NH}_4^+$  para cada inóculo (1, 5, 10 y 20%) no fue significativamente diferente ( $F_{[3,30]} = .420$ ,  $\rho = .739$ ) (Cuadro IV). Sin embargo, durante la cinética, se obtuvo una mayor concentración de  $\text{NH}_4^+$  en la semana dos (73.51  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), y fue de 5.5, 5.6, 2.6 y 3.1 veces más que

en la semana 1, 3, 4 y 5 respectivamente. La diferencia fue significativa estadísticamente ( $F_{[4,10]} = 34.780$ ,  $\rho = 0.00001$ ).

La concentración promedio final de CET de *Fischerella* sp. con el inóculo al 1% fue de 48.82  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro IV), y de 1.4, 1.5 y 1.4 veces menos que la concentración del inóculo al 5, 10 y 20%, respectivamente. El inóculo al 1% presentó el valor más bajo en cada una de las semanas del estudio; siendo estadísticamente diferente ( $F_{[3,30]} = 4.226$ ,  $\rho = 0.013$ ). En la cinética de 5 semanas, la concentración de CET fue mayor en la semana 2 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) con respecto a la semana 1, 3, 4 y 5, sin llegar a presentar diferencias significativas ( $F_{[12,30]} = 0.512$ ,  $\rho = 0.971$ ).

La concentración promedio total de CT de *Fischerella* sp. fue de 0.34, 0.40, 0.48 y 0.53  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y en la del inóculo de 20, 10, 5 y 1% respectivamente (Cuadro IV), es decir, a mayor concentración del inóculo mayor concentración de CT; las diferencias son estadísticamente significativas ( $F_{[3,30]} = 3.054$ ,  $\rho = 0.043$ ).

**Cuadro II. Concentración de diferentes indicadores en la cinética de *Fischerella* sp. bioencapsulada vs células libres. Los valores son el promedio de 64 registros  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales no existe diferencia significativa; letras diferentes existe diferencia significativa.**

Indicador	Bioencapsulados	Células libres
Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.726 <sup>a</sup> $\pm$ 0.049	0.601 <sup>b</sup> $\pm$ 0.141
Amonio ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	15.42 <sup>a</sup> $\pm$ 0.988	5.28 <sup>b</sup> $\pm$ 0.279
CHT ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	69.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.136	30.54 <sup>b</sup> $\pm$ 2.547
Carotenos Totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.039 <sup>b</sup> $\pm$ 0.005	0.124 <sup>a</sup> $\pm$ 0.021
Cl "a" ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.115 <sup>b</sup> $\pm$ 0.026	0.520 <sup>a</sup> $\pm$ 0.100
Ficocianinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.013 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.010 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001
Aloficocianinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.002 <sup>a</sup> $\pm$ 0.000	0.001 <sup>a</sup> $\pm$ 0.000
Ficoeritrinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.020 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.016 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001

CHT: carbohidratos extracelulares totales.

**Cuadro III. Concentración de diferentes indicadores en la cinética de *Fischerella* sp. en medio de cultivo sin nitrógeno (BG11°) y medio de cultivo con nitrógeno (BG11). Los valores son el promedio de 64 registros  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales no existe diferencia significativa; letras diferentes existe diferencia significativa.**

Indicador	BG11°	BG11
Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ )	1.761 <sup>b</sup> $\pm$ 0.129	2.086 <sup>a</sup> $\pm$ 0.129
Amonio ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	14.87 <sup>b</sup> $\pm$ 0.988	19.14 <sup>a</sup> $\pm$ 0.279
CHT ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	75.53 <sup>b</sup> $\pm$ 2.417	85.66 <sup>a</sup> $\pm$ 2.417
Carotenos Totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.187 <sup>a</sup> $\pm$ 0.020	0.137 <sup>b</sup> $\pm$ 0.020
Cl "a" ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.712 <sup>a</sup> $\pm$ 0.097	0.555 <sup>b</sup> $\pm$ 0.097
Ficocianinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.023 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.021 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001
Aloficocianinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.004 <sup>a</sup> $\pm$ 0.000	0.003 <sup>a</sup> $\pm$ 0.000
Ficoeritrinas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.025 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001	0.026 <sup>a</sup> $\pm$ 0.001

CHT: carbohidratos extracelulares totales.

**Cuadro IV. Concentración de diferentes indicadores al final de la cinética (cinco semanas) de *Fischerella* sp. bioencapsulada con diferente concentración de inóculo. Los valores son el promedio de 15 registros ± la desviación estándar. Control (cápsulas sin cianobacterias). Letras iguales no existe diferencia significativa; letras diferentes existe diferencia significativa.**

Indicador	Inóculo de <i>Fischerella</i> sp.				
	Control	1%	5%	10%	20%
Peso seco (g L <sup>-1</sup> )	0.79 ± 0.0	0.0252 <sup>c</sup> ± 0.0	0.0293 <sup>b</sup> ± 0.0	0.030 <sup>ab</sup> ± 0.0	0.032 <sup>a</sup> ± 0.001
Amonio (µg mL <sup>-1</sup> )	8.12 ± 0.0	29.0 <sup>a</sup> ± 2.5	33.2 <sup>a</sup> ± 2.1	29.6 <sup>a</sup> ± 4.0	28.9 <sup>a</sup> ± 4.0
Carotenos Totales (µg mL <sup>-1</sup> )	0.0 ± 0.0	0.34 <sup>b</sup> ± 0.02	0.40 <sup>ab</sup> ± 0.04	0.48 <sup>ab</sup> ± 0.03	0.53 <sup>b</sup> ± 0.06
CET (µg mL <sup>-1</sup> )	0.003 ± 0.0	48.82 <sup>b</sup> ± 7.18	70.76 <sup>a</sup> ± 3.75	76.37 <sup>a</sup> ± 5.20	71.98 <sup>a</sup> ± 5.85
Cl "a" (µg mL <sup>-1</sup> )	0.000 ± 0.0	1.23 <sup>b</sup> ± 0.13	1.49 <sup>ab</sup> ± 0.20	1.75 <sup>ab</sup> ± 0.16	1.97 <sup>a</sup> ± 0.27
Ficocianinas (µg mL <sup>-1</sup> )	0.004 ± 0.0	0.010 <sup>b</sup> ± 0.0	0.014 <sup>ab</sup> ± 0.002	0.009 <sup>b</sup> ± 0.002	0.018 <sup>a</sup> ± 0.001
Aloficocianinas (µg mL <sup>-1</sup> )	0.000 ± 0.0	0.004 <sup>b</sup> ± 0.0	0.005 <sup>b</sup> ± 0.001	0.004 <sup>b</sup> ± 0.0	0.008 <sup>a</sup> ± 0.0
Ficoeritrinas (µg mL <sup>-1</sup> )	0.004 ± 0.0	0.002 <sup>a</sup> ± 0.0	0.002 <sup>a</sup> ± 0.000	0.002 <sup>a</sup> ± 0.0	0.002 <sup>a</sup> ± 0.0

CET: carbohidratos extracelulares totales.

La concentración promedio total de Cl "a" de *Fischerella* sp. sin diferencia estadística con la del inóculo cuyo valor promedio más bajo se dio al 1% (Cuadro IV). En la semana 5, la concentración de Cl "a" (5.33 µg mL<sup>-1</sup>) se incrementó en 10.4, 8.3, 10.4 y 4.9 veces comparado a la semana 1, 2, 3 y 4, respectivamente (Figura 3).

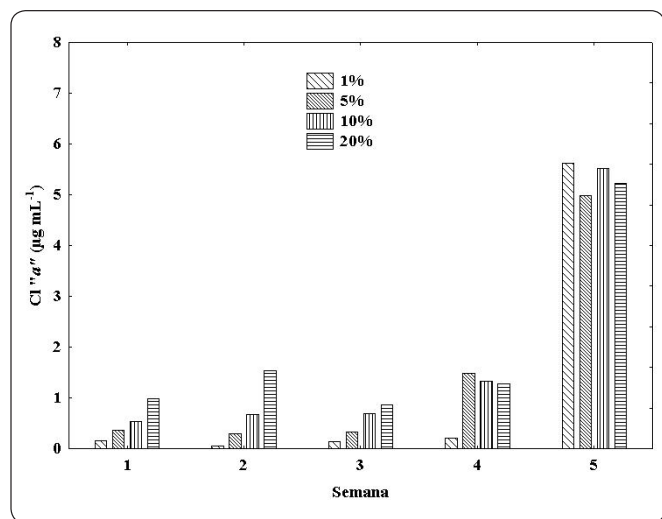
La concentración promedio total de AFC de *Fischerella* sp. fue mayor en el porcentaje del inóculo al 20%, y significativamente diferente (F<sub>[3,30]</sub> = 4.427, ρ = 0.029) al 1, 5 y 10% (Cuadro IV). La concentración de AFC de la semana 1 a la 4, tuvo un valor promedio por semana de 0.003 µg mL<sup>-1</sup>, cinco veces menor con respecto a la semana 5 (0.015 µg mL<sup>-1</sup>) y significativamente distinta (F<sub>[12,30]</sub> = 2.159, ρ = 0.043). La concentración de

FC producidas por el inóculo al 20% se presentó mayor con diferencia estadística a las FC producidas por el inóculo al 1, 10 y 5% (F<sub>[3,30]</sub> = 3.939, ρ = 0.017) (Cuadro IV). Durante la cinética de crecimiento de *Fischerella* sp., la concentración de FC fue en incremento cada semana: 1 y 2 (0.001 µg mL<sup>-1</sup>), 3 (0.004 µg mL<sup>-1</sup>), 4 (0.014 µg mL<sup>-1</sup>) y 5 (0.045 µg mL<sup>-1</sup>), sin diferencia significativa (F<sub>[12,30]</sub> = 2.060, ρ = 0.0535). Finalmente, la concentración promedio total de FE tuvo un comportamiento similar a las FC, esto es, un incremento de la semana 1 a la 5, sin ser significativo. De igual modo, la concentración del inóculo en las FE, no tuvo diferencias significativas (F<sub>[3,30]</sub> = 0.356, ρ = 0.784) (Cuadro IV).

**DISCUSIÓN**

En el presente estudio se evaluó el crecimiento y metabolismo de las células procariontas fotosintéticas libres y bioencapsuladas en alginato de calcio, con diferentes porcentajes de inóculo (1, 5, 10 y 20%).

El bioencapsulado en alginato de calcio demostró ser una buena alternativa para el mejor crecimiento y producción de amonio en *Fischerella* sp. El crecimiento de las células libres de *Fischerella* fue menor (0.601 g L<sup>-1</sup>) en comparación con las células bioencapsuladas (1.726 g L<sup>-1</sup>). Rai & Mallick (1992) reportaron resultados similares en el crecimiento de *Anabaena* y *Chlorella* encapsuladas en alginato vs células libres. A diferencia de las células libres, el bioencapsulado protege a las células del estrés biótico y abiótico, manteniendo la actividad metabólica y viabilidad por periodos de tiempo más largos. La pared celular de las cianobacterias está formada por 3 o 4 capas compuestas de lipopolisacáridos y péptido glicano, ácido murámico + glucosamina (Gumbo, Ross & Cloete, 2008); por su parte el alginato es un polisacárido lineal (extraído de algas cafés), constituido de dos monómeros: ácido β-D-manurónico



**Figura 3. Producción de clorofila a (Cl "a") del bioencapsulado de *Fischerella* sp. con diferentes concentraciones del inóculo: 1%, 5%, 10% y 20%; durante cinco semanas de cultivo.**

y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico. La similitud en la composición de ambas estructuras (pared celular y alginato) podría ayudar a la cianobacteria a protegerse contra el efecto del estrés hidrodinámico (agitación, aireación) y evitar daños letales y subletales (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006). La aireación generalmente se requiere en los cultivos de cianobacterias para el intercambio de gases, proporcionar  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono y remover el  $\text{O}_2$  producido en la fotosíntesis (Ugwu, Aoyagi & Uchiyama, 2008). Converti, Lodi, Del Borghi & Solisio (2006) determinaron que un flujo de aireación mayor a  $2.0 \text{ L min}^{-1}$  podría dañar a las células de las cianobacterias; sin embargo, esto va a depender de múltiples factores como son: tamaño celular, morfología, composición de la pared celular y la tolerancia al estrés hidrodinámico (Wang & Lan, 2018).

El grupo de cianobacterias diazotróficas como *Fischerella* sp. fijan el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ), lo transforman a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y posteriormente es hidratado para formar amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Noreña-Caro & Benton, 2018); la fijación del nitrógeno se lleva a cabo por la actividad de la nitrogenasa. En nuestro estudio, las células bioencapsuladas presentaron una mayor producción de  $\text{NH}_4^+$  en comparación con las células libres (Figura 2) y esto mismo en, la producción de  $\text{NH}_4^+$  en células encapsuladas de *Mastigocladus laminosus* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Brouers & Hall, 1986; Santos-Rosa, Galván & Vega, 1989). Al respecto, Syiem (2005) reportó una mayor frecuencia de heterocistos y mayor actividad de la nitrogenasa en células inmovilizadas (encapsuladas) de *Nostoc* en comparación a las células libres; como una posible explicación a la mayor producción de amonio, previa fijación del  $\text{N}_2$ . La asimilación primaria de amonio derivado de la fijación del  $\text{N}_2$  se realiza mediante la enzima glutamino sintasa; sin embargo, los niveles más altos de  $\text{NH}_4^+$  externo se vuelven perjudiciales porque la mayor parte del amonio se convierte en amoníaco libre ( $\text{NH}_3$ ), y a medida que aumenta su concentración, el pH puede superar el valor de 9.2 (Noreña-Caro & Benton, 2018). Ante esta situación, la inmovilización de las células de *Fischerella* sp. (y en general de las células microbianas), funciona como una manera de preservar la viabilidad celular ante condiciones perjudiciales del ambiente como: cambios en el pH, daño por productos del metabolismo, estrés osmótico, cambios en la temperatura, así como mejorar la estabilidad durante el almacenamiento (Rathore, Desai, Liew, Chan & Heng, 2013).

Por otra parte, en la cinética de *Fischerella* sp. el crecimiento (PS) fue mayor en BG11 vs BG11°. Sin embargo, la producción de Cl "a" en medio BG11° fue mayor en comparación con el medio BG11, en bioencapsuladas y células libres. La Cl "a" es el pigmento más importante en los organismos fotosintéticos. El mayor contenido de clorofila está relacionado con el creciente requerimiento de energía (luz) para una mayor producción de compuestos bioquímicos como las proteínas. La capacidad de la cianobacteria de fijar nitrógeno promueve el incremento de heterocistos cuando el medio carece de nitrógeno en células

de *A. siamensis* (Taikhao & Phunpruch, 2017), mejorando la actividad de la nitrogenasa. El incremento en el número de células y contenido de Cl "a" indica que las células de *Fischerella* sp. posterior a la inmovilización podían tener división celular y realizar la fotosíntesis; según lo reportó Tam & Wong (2000) para las células de *Chlorella vulgaris*, y Ruíz-Marín, Mendoza-Espinosa & Stephenson (2010) para las de *Scenedesmus obliquus* y *Ch. vulgaris*, inmovilizadas (encapsuladas) en alginato de calcio, en ambos trabajos.

El bioencapsulado de células microbianas presenta ventajas en comparación a las de las células libres (Vemmer & Patel, 2013) para emplearse con diversos propósitos (Cortez et al., 2017); sin embargo, no se ha reportado si la concentración del inóculo del bioencapsulado, tiene un efecto en el crecimiento y/o metabolismo de las células, o en la eficiencia del propósito del bioencapsulado: degradación de contaminantes, fotosíntesis, producción de  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ , y biodiesel, entre otros.

De los cuatro porcentajes del inóculo utilizados, la concentración del 20% fue mejor para el crecimiento del (PS) de *Fischerella* sp.; sin embargo, y de acuerdo con los resultados (Cuadro III), el PS está directamente relacionado a la cantidad del inóculo inicial. La concentración promedio total de  $\text{NH}_4^+$  para cada inóculo del (1, 5, 10 y 20%) no fue significativamente diferente; pero en la semana dos, la producción de  $\text{NH}_4^+$  fue mayor y precisamente en esta semana se presenta la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Fischerella* sp., por lo tanto, si el propósito (uso) de la inmovilización de *Fischerella* sp. es utilizarla como biofertilizante, en la semana dos sería el momento indicado para cosechar y obtener el producto.

Los principales pigmentos fotosintéticos en las cianobacterias son las clorofilas y las ficobilinas; mientras la clorofila está muy extendida entre los organismos fotosintéticos, las ficobilinas son exclusivas de las cianobacterias, algas rojas y criptofitas (Noreña-Caro & Benton, 2018). La concentración de FC, AFC y FE no mostraron diferencias significativas entre el bioencapsulado y las células libres, ni entre el medio BG11° y BG11; debido a su papel en la captación de luz y a que la estructura de las ficobiliproteínas es muy estable (Pagels, Guedes, Amaro, Kijjoa & Vasconcelos, 2019), por lo tanto, las condiciones de luz, temperatura, fuente de N y pH del experimento, no tuvieron un efecto negativo en la producción de las ficobiliproteínas (FC, AFC y FE). Sin embargo, *Fischerella* sp. en condiciones de intensidad media ( $75.60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en la concentración del inóculo al 20%, fue significativamente mayor en la producción de ficocianinas y aloficocianinas -comparado con el inóculo del 1, 5 y 10%- y coincide con la mayor biomasa (peso seco) y concentración de clorofila (Cuadro III). Kovac, Babic, Milovanovic, Misan & Simeunovic (2017), reportaron resultados similares en varias especies de cianobacterias (*Anabaena*, *Nostoc* y *Spirulina*) en iluminación continua y diferentes fuentes de carbono.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, la bioencapsulación con alginato de calcio, demostró ser una alternativa viable para el crecimiento y metabolismo de la cianobacteria *Fischerella* sp. Lo anterior se comprobó con la mayor producción de  $\text{NH}_4^+$  en el bioencapsulado en comparación con las células libres.

Con relación al inóculo, la concentración del 20% promovió el mejor crecimiento de *Fischerella* sp.

Finalmente, podemos mencionar que el sistema propuesto de bioencapsulados con *Fischerella* sp., representa una alternativa biotecnológica para la producción de biofertilizantes y así contribuir con el medio ambiente al promover la disminución de los fertilizantes químicos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo Hernández Carmona del CICIMAR-IPN, por la donación del alginato de calcio. A la UMAR por facilitar el trabajo en los laboratorios de Ingeniería Ambiental.

## REFERENCIAS

- Andersen, R. A. & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen, R. A. (Ed). *Algal Culturing Techniques*. (pp. 83-100). Elsevier Academic Press. E.U.
- APHA-AWA-WPCF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington, D. C., USA.
- Arredondo-Vega, B., Cordero-Esquivel, B. & Voltolina, D. (2017). Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 2da Ed. Capítulo 4. 31- 34 pp.
- Bashan, Y. (1986). Alginate beds as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied Environmental Microbiology*, **51**, 1089-1098. DOI: 10.1128/aem.51.5.1089-1098.1986
- Bashan, Y. & González, L. E. (1999). Long-term survival of the plant-growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 262-266. <https://doi.org/10.1007/s002530051391>
- Bashan, Y., Salazar B. & Puente, M. E. (2009). Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biology and Fertility of Soils*, **45**, 655-662. DOI:10.1007/s00374-009-0368-9
- Brouers, M. & Hall, D. O. (1986). Ammonia and hydrogen production by immobilized cyanobacteria. *Journal of Biotechnology*, **3**, 307-321. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(86\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0168-1656(86)90012-X)
- Cortez, S., Nicolau, A., Flickinger, M. C. & Mota, M. (2017). Biocoatings: A new challenge for environmental biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, **121**, 25-37. DOI.org/10.1016/j.bej.2017.01.004
- Converti, A., Lodi, A., Del Borghi, A. & Solisio, C. (2006). Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, **32**, 13–18. DOI:10.1016/j.bej.2006.08.013
- De-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, **101**, 1611-1627. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.043.
- Duboís, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analysis of Chemistry*, **26**, 215–225.
- Gumbo, R., Ross, G. & Cloete, E. (2008). Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4765-4773. DOI: 10.5897/AJB08.038
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. USA.
- Kovac, D., Babic, O., Milovanovic, I., Misan, A. & Simeunovic, J. (2017). The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **53(5)**, 539-545. DOI:10.1134/S000368381705009X
- Miransari, M. (2010). Biological fertilization. In: Current Research and Education Topics in *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Méndez-Villa, A., Ed). 168-176 pp.
- Noreña-Caro, D. & Benton, M. G. (2018). Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-values chemicals. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, **28**, 335-366. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A. & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, **37**, 422-443. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010
- Prasanna, R., Jaiswal, P. & Kaushik, B. D. (2008). Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability-promises and challenges. *Indian Journal of Microbiology*, **48**, 89-94. DOI: 10.1007/s12088-008-0009-2
- Rai, L. C. & Mallick, N. (1992). Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**, 110-114. DOI: 10.1007/BF01195827.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W. & Heng, P.W.S. (2013). Microencapsulation of microbial cells: Review. *Journal of Food Engineering*, **116**, 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>
- Rekha, P. D., Lai, W. A., Arun, A. B. & Young, C. C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-



- FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, **98**, 447-451. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.01.009
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**, 1-61.
- Ruiz-Marín, A., Mendoza-Espinosa, L.G. & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, **101**, 58-64. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.076.
- Russo, A., Basaglia, M., Tola, E. & Casella, S. (2001). Survival, root colonization and biocontrol capacities of *Pseudomonas fluorescens* F113 LacZY in dry alginate microbeads. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **27**, 337-342. DOI: 10.1038/sj.jim.7000154
- Santos-Rosa, F., Galván, F. & Vega, J. M. (1989). Photoproduction of ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized in barium alginate: A reactor feasibility study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 285-290. <https://doi.org/10.1007/BF00184975>
- Schoebitz, M., López, D. M. & Roldan, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **33**, 751-765. DOI 10.1007/s13593-013-0142-0
- Siegelman, H. W. & Kycia, J. H. (1978). Algal biliproteins. In Hellebust, J. A. & Craigie, J. S. Handbook of phycological methods. *Physiological and biochemical methods*. (pp. 71-79). Cambridge university press, Cambridge.
- Singh, J. S., Pandey, V. C. & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **140**, 339-353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- Sukenik, A., Carmeli, Y. & Berner, T. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, **25**, 686-692. DOI: 10.1186/2045-3701-4-38
- Syiem, M. B. (2005). Entrapped cyanobacteria: Implications for biotechnology. *Indian Journal of Biotechnology*, **4**, 209-215.
- Tam, N. F.Y. & Wong, Y. S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, **107**(1), 145-151. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00118-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00118-9)
- Taikhao, S. & Phunpruch, S. (2017). Increasing Hydrogen Production Efficiency of N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by Cell Immobilization. *Energy Procedia*, **138**, 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.170>
- Trejo, A., de-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J. P., Rothballer, M., Schmid, M. & Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environ and Experimental Botany*, **75**, 65-73. DOI:10.1016/j.envenxpbot.2011.08.007
- Trivedi, P. & Pandey, A. (2008). Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4 degrees C. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**(3), 205-209. DOI:10.1007/s10295-007-0284-7
- Trujillo-Roldán, M. A. & Valdez-Cruz, N. A. (2006). El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **48**(3-4), 269-280
- Trujillo-Tapia, Ma. N. & Ramírez-Fuentes, E. (2016). Bio-fertilizer: an alternative to reduce chemical fertilizer in agriculture. *Journal of Global Agriculture and Ecology*, **4**(2), 99-103. DOI:10.13140/RG.2.1.4935.4967
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H. & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, **99**, 4021-4028. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.046
- Van Elsas, J. D., Trevors, J. T., Jain, D., Wolters, A. C., Heijnen, C. E. & van Overbeek, L. S. (1992). Survival of, and root colonization by, alginate-encapsulated *Pseudomonas*- cells following introduction into soil. *Biology and Fertility of Soils*, **14**, 14-22. <https://doi.org/10.1007/BF00336297>
- Vemmer, M. & Patel, A.V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, **67**, 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- Vroman, I. & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Biodegradability of Materials*, **2**, 307-344. <https://doi.org/10.3390/ma2020307>
- Wang, Ch. & Lan, Ch. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnology Advances*, **36**, 986-1002. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.001
- Yabur, R., Bashan, Y. & Hernández-Carmona, G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, **19**, 43-53. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9109-8>
- Young, C. C., Rekha, P. D., Lai, W. A. & Arun, A. B. (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, **95**, 76-83. DOI: 10.1002/bit.20957