

Universidad Autónoma De Baja California
Facultad De Ingeniería, Arquitectura y Diseño



“Inmovilización de microalgas en matrices poliméricas para la adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo”

T E S I S

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO

PRESENTA:

Luz Elena Pérez Gutiérrez

Ensenada, Baja California, México. Noviembre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**Inmovilización de microalgas en matrices poliméricas para la
adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo**

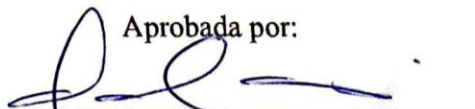
TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO


PRESENTA

LUZ ELENA PÉREZ GUTIÉRREZ

Aprobada por:



Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Directora




Dr. Priscy A. Luque Morales



Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos



Dr. Dante A. Magdaleno Moncayo



M. C. Sara O. Topete Martínez

Resumen

Los derrames de hidrocarburos representan una preocupación creciente en México, con una cantidad alarmante de derrames reportados anualmente. La fracción hidrosoluble del petróleo (FS) es conocida por su toxicidad y su impacto en los organismos y el medio ambiente. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la capacidad de adsorción de la FS por *Dunaliella salina* inmovilizada en matrices poliméricas de origen marino. Para esto *D. salina* fue inmovilizada en matrices esféricas de alginato de calcio (Alg-DS), posteriormente se diseñó un bioensayo de exposición a la FS durante 7 días para observar su efecto en las concentraciones de la FS en el medio. Como objetivos adicionales se evaluó la eficiencia y estabilidad de la inmovilización de *D. salina*, así como la caracterización del sistema célula/suporte. La eficiencia de la inmovilización se determinó mediante un conteo celular después de la disolución de las esferas Alg-DS. Se evaluó su estabilidad comparando la densidad celular de las esferas antes y después de la exposición a la FS. Además, se caracterizaron las propiedades mecánicas del sistema célula/suporte mediante pruebas de estrés-deformación. Se encontró que la inmovilización de *D. salina* en las matrices Alg-DS tuvo una eficiencia del 81.37% y se mantuvo estable al estar expuesta al agua de mar con aireación constante, mostrando una liberación de microalgas hasta el cuarto día de exposición. Aunque no se observaron mejoras significativas en la capacidad de adsorción de la FS por *D. salina* inmovilizada en comparación con la forma libre, la inmovilización permitió la supervivencia del 34.09% de las células, en contraste con la forma libre que no sobrevivió. Las pruebas mecánicas mostraron un módulo de Young promedio de 248.28 ± 49.91 kPa para las esferas de alginato (Alg) y 411.16 ± 257.72 kPa para las esferas de alginato-*Dunaliella salina*. La morfología de las matrices Alg y Alg-DS se mantuvo estable después de 7 días de exposición a la FS, aunque se observó un deterioro en las propiedades mecánicas, en particular para las matrices Alg-DS. Estos hallazgos contribuyen al campo de la biorremediación de hidrocarburos y brindan perspectivas para futuras investigaciones que involucren el uso de técnicas de inmovilización de microalgas para la remoción de diferentes contaminantes.

Palabras clave: hidrocarburos, fracción hidrosoluble del petróleo, *Dunaliella salina*, alginato, inmovilización, biorremediación.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis. En primer lugar, a mi directora, Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez, por su paciencia, guía y apoyo constante a lo largo de la investigación. A la Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos, por su gran disposición y apoyo mediante el suministro de material y reactivos fundamentales para el proyecto. También agradezco a la Dra. Haydee López Rodríguez y al Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo, quienes proporcionaron la microalga *D. salina*, pieza central de esta investigación.

Quiero expresar mi reconocimiento a todos los profesores que sentaron las bases de mi formación académica. En especial, a aquellos que me inspiraron a tomar el camino de la biotecnología y brindaron su apoyo y asesorías cuando más los necesitaba. Mi agradecimiento se extiende a la UABC y la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, quienes proporcionaron el equipo, los recursos e instalaciones necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Dedico este trabajo a mi familia, quienes hasta la fecha siguen trabajando mucho y brindando su apoyo incondicional para que pudiera llegar hasta aquí. Quiero agradecer especialmente a Sheyla y Aldo, a quienes considero parte de mi familia, por estar siempre a mi lado, ayudarme a crecer como persona y hacer que los desafíos sean más llevaderos. También quiero expresar mi gratitud a todos los amigos que hice durante la carrera. A Laura Rangel, Elidad López e Ivan Martínez, quienes me apoyaron de diversas formas durante el proyecto. Agradezco también a aquellos que confiaron en mí al integrarme a sus equipos de trabajo y me apoyaron durante las materias difíciles, con especial cariño a Andrea Barrios y Fernando Barrios.

A todas las personas mencionadas y a aquellas que, por alguna razón, no he mencionado específicamente, les doy las gracias por su valiosa contribución y por formar parte de este viaje académico.

Índice

Resumen-----	3
Agradecimientos-----	4
Índice-----	5
Índice de tablas-----	7
Índice de figuras-----	8
1. Introducción-----	10
2. Antecedentes-----	14
3. Hipótesis-----	16
4. Objetivos-----	16
4.1. Objetivo general-----	16
4.2. Objetivos particulares-----	16
5. Métodos-----	17
5.1. Obtención, cultivo y monitoreo de microalgas-----	17
5.2. Obtención de Fracción Soluble-----	17
5.3. Inmovilización de <i>Dunaliella salina</i> en una matriz polimérica de origen marino-----	18
5.3.1. Obtención de biomasa algal-----	18
5.3.2. Soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio-----	18
5.3.3. Inmovilización de <i>Dunaliella salina</i> en matriz de alginato-----	19
5.4. Caracterización del sistema célula/soporte-----	20
5.4.1. Características físicas-----	20
5.4.2. Propiedades mecánicas-----	20

5.4.3.	Eficiencia de inmovilización-----	23
5.5.	Bioensayo de exposición a fracción soluble-----	23
5.5.1.	Grupos experimentales-----	23
5.5.2.	Monitoreo de fracción soluble por UV -----	24
5.5.3.	Evaluación de estabilidad de inmovilización-----	24
5.5.4.	Monitoreo de crecimiento y cinéticas de liberación de microalgas -----	25
5.5.5.	Propiedades mecánicas de esferas expuestas a la fracción soluble-----	25
6.	Resultados-----	25
6.2.	Inmovilización de <i>Dunaliella salina</i> en una matriz polimérica de origen marino -----	26
6.3.	Bioensayo de exposición a fracción soluble-----	27
6.3.1.	Grupos experimentales-----	27
6.3.2.	Monitoreo de fracción soluble por espectrofotometría UV-VIS-----	28
6.4.	Caracterización del sistema célula-soporte -----	30
6.4.1.	Caracterización morfológica-----	30
6.4.2.	Propiedades mecánicas -----	33
6.4.3.	Eficiencia y estabilidad de inmovilización-----	38
7.	Discusión -----	40
7.1.	Monitoreo de la fracción soluble -----	40
7.2.	Remoción de derivados del petróleo -----	42
7.3.	Inmovilización de <i>Dunaliella salina</i> -----	43
7.4.	Morfología -----	43

7.5.	Propiedades mecánicas -----	44
7.6.	Estabilidad de inmovilización -----	46
7.7.	Eficiencia de inmovilización -----	47
8.	Conclusiones -----	48
9.	Bibliografía -----	49

Índice de tablas

Tabla 1.	Componentes de la solución de alginato de sodio 3%.-----	18
Tabla 2.	Componentes de la solución de cloruro de calcio 0.2 M.-----	18
Tabla 3.	Grupos experimentales del bioensayo. -----	24
Tabla 4.	Evaporación en bioensayo de exposición a fracción soluble. Los resultados se representan como promedio ($n = 3$) \pm desviación estándar. -----	28
Tabla 5.	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la absorbancia obtenida en 368 nm para los grupos experimentales: Grupo de estudio (GE), control del estudio (GCE) y blanco (GB). -----	30
Tabla 6.	Características de las matrices de Alginato y Alginato- <i>Dunaliella salina</i> . -----	31
Tabla 7.	Módulo de Young [kPa] obtenido para los grupos Alg, Blanco y Alg-DS con las pesas de 5, 10, 20 y 50 g. Valores presentados como promedio \pm desviación estándar. -----	36
Tabla 8.	Coefficiente de Poisson obtenido para los grupos Alg, Blanco y Alg-DS con las pesas de 5, 10, 20 y 50 g. Valores presentados como promedio \pm desviación estándar. -----	36
Tabla 9.	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 5 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS. -----	36
Tabla 10.	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 10 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.-----	37
Tabla 11.	Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 20 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.-----	37

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 50 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.----- 37

Tabla 13. Eficiencia de inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices poliméricas. ----- 38

Índice de figuras

Figura 1. Ilustración de sistema para inmovilización de <i>Dunaliella salina</i> en matrices de alginato.	19
Figura 2. Ilustración de pruebas mecánicas realizadas (vista lateral). Estado inicial de la esfera (A); Esfera al ser sometida a fuerzas de compresión (B).....	21
Figura 3. Alícuota obtenida de <i>Dunaliella salina</i> (A). Cultivo stock de <i>Dunaliella salina</i> (B) y fotografía bajo microscopio óptico a 40X (C).	26
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>Dunaliella salina</i> . Fases: (1) Lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos muestran resultados promedio (n = 3) y las barras de error la desviación estándar.....	26
Figura 5. Muestra centrifugada (A); alginato 3%, pellet resuspendido y solución de alginato- <i>Dunaliella salina</i> (B); sistema para la adición por goteo a una solución de cloruro de calcio (C).....	27
Figura 6. Grupos experimentales: (de izquierda a derecha) control del estudio (GCE), control (GC), grupo de estudio (GE) y blanco (GB).	28
Figura 7. Espectro de absorción 350-400 nm de las fracciones obtenidas por extracción con hexano. Grupo de estudio (GE), grupo control del estudio (GCE), grupo blanco (GB), fracción soluble 12.5 % (FS).	29
Figura 8. Espectro de absorción 368-380 nm de las fracciones obtenidas por extracción con hexano. Grupo de estudio (GE), grupo control del estudio (GCE), grupo blanco (GB), fracción soluble 12.5 % (FS). Los valores se representan como promedio (n = 3) y las barras de error representan la desviación estándar.	29
Figura 9. Absorbancia de los grupos experimentales obtenida a 368 nm.	30

Figura 10. Esferas obtenidas de Alginato- <i>Dunaliella salina</i> (A) y Alginato (B).	31
Figura 11. Vista superior desde un microscopio estereoscópico. Esferas de Alginato- <i>Dunaliella salina</i> a 2X (A) y 4X (B); esferas de Alginato a 2X (C) y 4X (D).	32
Figura 12. Vista lateral desde un goniómetro. Variantes morfológicas en esferas de Alginato- <i>Dunaliella salina</i>	32
Figura 13. Esferas de Alg-DS. Grupo control (A), grupo de estudio (B) y grupo sin tratamiento (C).....	33
Figura 14. Esfera de Alginato- <i>Dunaliella salina</i> en el sistema utilizado para las pruebas mecánicas (A). Esfera de Alginato- <i>Dunaliella salina</i> durante una prueba de compresión con una pesa de 5 g (B).	34
Figura 15. Pruebas mecánicas de compresión en esferas de Alginato (sin tratamiento) con Goniómetro ramé-hart utilizando pesas de 5 g (A), 10 g (B), 20 g (C) y 50 g (D).....	34
Figura 16. Pruebas mecánicas de compresión en esferas de Alginato- <i>Dunaliella salina</i> (sin tratamiento) con Goniómetro ramé-hart. Pesas de 5 g (A), 10 g (B), 20 g (C) y 50 g (D).	35
Figura 17. Deformación de las esferas Alg y Alg-DS con respecto a distintas fuerzas de compresión. Los grupos Alg y Blanco corresponden a las esferas de alginato con y sin tratamiento respectivamente; el grupo Alg-DS corresponde a las esferas de Alginato- <i>D. salina</i> sin tratamiento. El grupo de estudio no se presenta debido a su disrupción total en todas las pruebas realizadas.	35
Figura 18. Esferas de grupo de estudio (Alg-DS expuestas a FS 12.5 %) disueltas en solución de NaH ₂ PO ₄ . Observadas en microscopio óptico a 40X.....	38
Figura 19. Liberación de microalgas en el medio del grupo control. Las barras de error representan la desviación estándar.....	39
Figura 20. Células libres en grupo control del estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.....	39

1. Introducción

Los océanos, además de ser hábitat de incontables organismos marinos son también indispensables para mantener la vida en la Tierra, ya que tienen un papel de gran importancia en aspectos como la regulación de temperatura y la producción de la mayor parte del oxígeno de la superficie terrestre. Debido a las crecientes poblaciones humanas, así como sus actividades desmedidas, desde hace varias décadas y hasta el día de hoy los océanos se encuentran gravemente amenazados por problemas de contaminación. Entre los contaminantes de mayor importancia se encuentra el petróleo el cual, a pesar de haber sido fundamental para el desarrollo tecnológico, como fuente de energía y para obtención de materias primas, ha sido causa de graves secuelas en ecosistemas marinos debido a la mala gestión de sus residuos y los derrames accidentales (Gleick, 1993; Alava, 2019; Macías-Zamora, 2011).

A pesar de que la mayor parte del petróleo que ingresa al mar proviene de fuentes naturales como las deposiciones atmosféricas y filtraciones marinas, estas representan un bajo impacto para estos ecosistemas ya que suelen ser liberados en áreas limitadas y ocurren de manera lenta, constante y periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, aunque la cantidad ingresada por parte de actividades antropogénicas suele ser mucho menor, ha sido suficiente para provocar efectos devastadores en diversas partes del mundo. Esta liberación puede ocurrir tanto de manera crónica como aguda, y puede provenir de fuentes como el transporte marítimo, la extracción de hidrocarburos, y principalmente residuos de origen terrestre como las descargas industriales y municipales (National Research Council, 2003).

El panorama en México con respecto a los derrames de hidrocarburos es alarmante, ya que según los datos proporcionados por PEMEX (2022) de 1999 a 2021, se han llegado a reportar más de 1500 derrames por año en cantidades que han rebasado las 400 mil toneladas. Así también, entre los mayores desastres ecológicos relacionados con la contaminación por hidrocarburos se pueden destacar los casos de Deepwater Horizon en el Golfo de México e *Ixtoc 1* en la Bahía de Campeche; los cuales se encuentran entre los derrames más grandes de la historia (Ivshina et al., 2015).

El petróleo crudo y sus derivados son una mezcla en proporciones variables de complejos compuestos moleculares. Aunque la cantidad disuelta de petróleo en el agua suele ser mucho menor en

comparación a la cantidad evaporada, esta sigue siendo de gran importancia, ya que se ha encontrado que hay una estrecha relación entre la toxicidad generada en diversos organismos y la solubilidad del hidrocarburo (National Research Council, 2003), por lo que esto destaca la importancia del estudio de la fracción hidrosoluble del petróleo, así como de alternativas para su remoción. La fracción hidrosoluble del petróleo (FS) puede estar compuesta por compuestos orgánicos e inorgánicos, compuestos aromáticos de bajo peso molecular (por ejemplo, benceno, tolueno y xileno), hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. (Hodson et al., 1997). El conocer su composición resulta de particular interés al momento de elegir una técnica adecuada de remoción ya que, pueden variar de manera importante propiedades como la viscosidad, solubilidad y densidad; y, por lo tanto, afectar también sus interacciones con el medio ambiente, su evaporación, sedimentación, persistencia, biodisponibilidad, y efectos en diferentes organismos (Capuzzo, 1987; Turner & Renegar, 2017).

Ante un derrame de petróleo, la pronta contención y limpieza es de vital importancia para minimizar los daños potenciales que estos puedan causar. Hoy en día existen diferentes técnicas que incluyen tanto limpieza mecánica como química para estos propósitos (Guidi et al., 2016). Sin embargo, aún existen grandes retos con respecto a la efectividad y seguridad de estas técnicas; ya que no se encuentran destinadas a remover esta fracción hidrosoluble e incluso pueden provocar efectos adversos adicionales a los ya causados por el derrame. Ejemplos de estos últimos son los causados por dispersantes en los arrecifes de coral (DeLeo et al., 2016); así como en especies de fitoplancton que, además de ser fundamentales en cadenas tróficas, son también actores importantes en el proceso de degradación natural de hidrocarburos (Kleindienst, Paul & Joye, 2015). Las problemáticas descritas con respecto a este contaminante y la falta de técnicas adecuadas para mitigarlo resaltan la importancia y la necesidad de mejorar las ya existentes complementándolas con nuevas tecnologías.

El surgimiento de alternativas desde el enfoque de la biorremediación se muestra prometedor ya que, es considerada una de las tecnologías menos costosas, más amigables con el ambiente y altamente efectivas para la restauración *in situ* de una gran variedad de ecosistemas, entre ellos los marinos (Xue et al., 2015). Esta consiste en el aprovechamiento de diversos organismos, sus mecanismos de tolerancia y

capacidad de utilizar ciertos contaminantes de interés como fuente de carbono y energía para su crecimiento y procesos metabólicos. Entre los organismos que han sido evaluados para su aplicación en la remoción de diferentes contaminantes orgánicos e inorgánicos en ambientes acuáticos se encuentran las microalgas (Mapelli et al., 2017; Mondal et al., 2019).

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos que pueden ser encontrados tanto en agua salada como agua dulce; además, constituyen una de las principales fuentes de oxígeno en la Tierra y forman parte de los primeros eslabones de cadenas tróficas en ambientes acuáticos (Rath, 2012). Se han reportado diversas especies de microalgas utilizadas en la remediación de contaminantes como metales pesados, compuestos radiactivos, aguas residuales, pesticidas, fármacos, entre otros (Mondal et al., 2019). Las que son de especial interés para esta investigación son aquellas capaces de tolerar, degradar, e incluso ser estimuladas en presencia de petróleo y sus derivados; tomando en cuenta que estas características pueden variar dependiendo de la composición y concentración en la que estos hidrocarburos se encuentren (Kadiri & Eboigbodín, 2012; Xue et al., 2015).

Las microalgas del género *Dunaliella* son organismos fotosintéticos unicelulares, pertenecientes a la clase de Clorofíceas. Estas son frecuentemente utilizadas para diversas aplicaciones, ya que cuentan con ventajas como resistencia a altas salinidades, tienen una alta tasa de crecimiento, bajo costo de producción y pueden crecer bajo condiciones de estrés. Entre las 20 especies que pertenecen a este género, *Dunaliella salina* es una de las que más ha destacado por sus aplicaciones terapéuticas, de biorremediación y producción de biocombustibles (da Silva et al., 2021).

Para que el uso de estos u otros microorganismos en la biorremediación sea efectivo, uno de los factores clave es el mantener altos niveles de biomasa. Es aquí donde puede considerarse el uso de biomateriales y técnicas de inmovilización; ya que estos pueden proveer de este beneficio y otros adicionales como lo son la reducción de costos de recuperación, el incremento de la resistencia ante sustancias tóxicas, cambios de temperatura y pH, protección contra otros organismos en el medio, entre otros. La inmovilización consta de restringir el movimiento de enzimas, metabolitos, células completas o

partes de ellas de manera total o parcial en una región delimitada por una estructura sólida (Bayat, Hassanshahian, & Cappello, 2015).

Las técnicas de inmovilización para microalgas se pueden clasificar en pasivas y activas. Las técnicas pasivas aprovechan las capacidades del organismo utilizado para fijarse a alguna superficie, mientras que las técnicas activas involucran el uso de flocculantes, fijación química o atrapamiento en gel. Entre estas, el atrapamiento en gel destaca como el método preferido para la inmovilización de microalgas; el cuál se puede llevar a cabo en matrices sintéticas, proteicas, o mediante el uso de polisacáridos. Entre los polisacáridos naturales mayormente utilizados para el atrapamiento en gel se encuentran el alginato, carragenano y quitosán; siendo el alginato el mayormente estudiado para la inmovilización de microalgas (Smidsrød y Skjåk-Braek, 1990; Moreno-Garrido, 2008). Los alginatos comerciales suelen ser extraídos de algas pardas de géneros *Laminaria*, *Sargassum*, o especies como *Macrocystis pyrifera*. La preparación de geles de alginato implica generalmente el uso de una solución con cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}) la cual propicia un entrecruzamiento iónico (Lee y Mooney, 2012).

Hay una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como matrices de inmovilización con enfoque en la biorremediación; para su selección se deben tomar en cuenta aspectos como su biocompatibilidad con el organismo, propiedades mecánicas adecuadas para resistir las condiciones a las que será sometido, estabilidad química, estabilidad biológica y permitir la difusión del contaminante hacia el organismo (de-Bashan & Bashan, 2010). La mayoría de las técnicas de inmovilización para microorganismos pueden ser también utilizadas para microalgas, mientras que también se tome en cuenta el uso de un material que permita la transmisión de luz para estos organismos fotosintéticos (Moreno-Garrido, 2008).

Aunque se ha encontrado evidencia acerca de la estabilidad y eficiencia de *Dunaliella salina* inmovilizada para diversas aplicaciones (da Silva et al., 2021; Thakur & Kumar, 1999a; Thakur & Kumar, 1999b), aún existe poca información que compare su efectividad de forma libre e inmovilizada en la remoción de derivados de petróleo. Es por esto que, este trabajo propone la evaluación de la adsorción de

la fracción hidrosoluble del petróleo por *Dunaliella salina* inmovilizada en matrices poliméricas de origen marino.

2. Antecedentes

Los efectos ante la exposición a hidrocarburos pueden ser tan diversos como los organismos que se expongan a estos, pudiendo ir desde ningún efecto en absoluto hasta la mortalidad. Los efectos adversos provocados por la exposición a la fracción hidrosoluble del petróleo (FS) en distintas concentraciones y tiempos de exposición se han reportado en una gran variedad de especies. Ejemplos de estos son la disminución de diversidad y actividad primaria en comunidades microbianas (Bera et al., 2020); toxicidad y disminución de crecimiento en plancton (Jiang et al., 2010); pérdida de tejido y aumento de mortalidad en arrecifes de coral (Turner & Renegar, 2017); efectos genotóxicos y mutaciones en peces (Vanzella, Martinez, & Cólus, 2007); disminución de crecimiento y pérdida de extremidades en equinodermos (Yuewen & Adzigbli, 2018); entre otros.

Se han encontrado investigaciones que describen el potencial de *Dunaliella salina* para la remoción de diferentes contaminantes; entre ellos remoción de metales como el cromo hexavalente en lagos salados (Kaushik & Raza, 2019), remoción de pesticidas organofosforados (Nasiri, Ahmadzadeh & Amiri, 2023) y disruptores endócrinos como el nonilfenol (Wang et al., 2019). Con respecto a los derivados de petróleo, una investigación por Talebi *et al.* (2016) utiliza a *D. salina* para la remediación de aguas residuales del petróleo, reportando que resistió a las variaciones en la salinidad además de lograr la remoción de cantidades importantes de nitrógeno, fósforo, níquel y zinc. Coincidiendo con esto, Liu *et al.* (2019) reportan que al ser cultivadas en presencia de FS, han sido capaces de mantener una alta actividad fotosintética y remoción de hasta 60.3% de esta en concentraciones de hasta 2 mgL⁻¹, pero tienen la capacidad de sobrevivir hasta en 5 mgL⁻¹;

Hay antecedentes de la inmovilización de organismos como microalgas y consorcios bacterianos en matrices de alginato, así como de su estabilidad y efectividad para degradar diversos contaminantes como aguas residuales (Banerjee et al., 2019; Cruz et al., 2013) e hidrocarburos (Suzuki et al., 1998). Así

también, estudios previos han explorado la inmovilización de microalgas del género *Dunaliella* en esferas de alginato de calcio para aplicaciones como la producción de glicerol o carotenoides (Grizeau y Navarro, 1986; Thakur & Kumar, 1999a; Joo et al., 2001). Sin embargo, hay poca información acerca de su uso para el tratamiento de contaminantes, como se describe en otro estudio realizado por Thakur y Kumar (1999b) en el que se evalúa su uso para el tratamiento de aguas residuales. Ya que se ha descrito su estabilidad en este tipo de matrices, así como su tolerancia a hidrocarburos, es relevante explorar su aplicación en la remoción de la fracción hidrosoluble del petróleo.

El utilizar polímeros de origen natural cuenta con ventajas como su obtención a partir de fuentes renovables, reducidos costos de extracción, así como amplias aplicaciones en la industria alimenticia, biomédica y farmacéutica. Cabe resaltar que además han tenido un papel importante en la biorremediación como agentes de remoción de diversos contaminantes, matrices de inmovilización o fuente de nutrientes para su uso en la bioestimulación (Kaushik, Sharma & Agarwal, 2016).

El alginato es un polisacárido de origen marino, extraído comúnmente de algas pardas. Al igual que los polímeros naturales previamente mencionados, el alginato sido ampliamente utilizado debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, fácil manipulación y ha demostrado ser seguro para el consumo humano y el medio ambiente (Bayat, Hassanshahian, & Cappello, 2015). El alginato consta de un grupo de co-polímeros en proporciones y arreglos variables. Este es capaz de formar geles mediante la adición de cationes divalentes, siendo Ca^{2+} el comúnmente utilizado; así también habrá una variación en sus propiedades mecánicas dependiendo de la proporción y longitud de los co-polímeros previamente mencionados (Martinsen et al., 1989; Lee & Mooney 2012).

El caracterizar las propiedades mecánicas de este tipo de biomateriales permite describir su comportamiento ante la aplicación de diferentes fuerzas. Uno de los estudios cuantitativos que permite caracterizar estas propiedades es la medición de la deformación experimentada por un material cuando se somete a diferentes fuerzas. El módulo elástico, también conocido como módulo de Young, relaciona la medida del estrés al que es sometido un material y su deformación; esta relación también puede ser representada gráficamente mediante gráficas de estrés-deformación. En el caso de materiales como los

polímeros, la relación entre el estrés aplicado y la deformación resultante no suele ser lineal, a diferencia de otros materiales. Por lo tanto, no es posible determinar un único módulo de elasticidad como se describe anteriormente. En su lugar, se utilizan el módulo tangente y el módulo secante para abordar este comportamiento no lineal. El módulo tangente se calcula como la pendiente de la curva de esfuerzo-deformación en un nivel de estrés específico, mientras que el módulo secante representa la pendiente de una secante trazada desde el origen hasta un punto determinado de la curva. Tomando en cuenta la forma y naturaleza de la matriz estudiada para esta aplicación, es también relevante determinar su coeficiente de Poisson, lo cual relaciona la medida de su deformación longitudinal y transversal al ser sometida a alguna fuerza (Ong, Appleford y Mani, 2014; Callister y Rethwisch, 2018). El estudio de estas propiedades mecánicas son de particular relevancia para la presente investigación, ya que los biomateriales utilizados pueden llegar a experimentar cambios significativos en sus propiedades mecánicas cuando se someten a diversas condiciones ambientales. Por lo tanto, el realizar un monitoreo a través de estos estudios brindará una mayor comprensión de su comportamiento y permitirá evaluar su utilidad para los objetivos planteados.

3. Hipótesis

La capacidad de adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo por *Dunaliella salina* es más eficiente al estar inmovilizada en matrices poliméricas que de forma libre.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Evaluar la capacidad de adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo por *Dunaliella salina* inmovilizada en matrices poliméricas de origen marino.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar la eficiencia de la inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices poliméricas
- Evaluar la estabilidad de la inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices poliméricas

- Caracterizar la morfología del sistema célula/soporte de *Dunaliella salina* inmovilizada en matrices poliméricas

5. Métodos

5.1. Obtención, cultivo y monitoreo de microalgas

La microalga *Dunaliella salina* fue donada por la Dra. Haydee López Rodríguez y el Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo, profesores investigadores de la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño; la cual se utilizó previamente para la secuenciación de su genoma mitocondrial y de cloroplasto (Magdaleno, López y Stephano, 2017; López, Magdaleno y Stephano, 2017). La alícuota obtenida se escaló en un matraz de 1 L con aireación, medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962), temperatura promedio de 21 °C y luz continua (67 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se monitoreó su crecimiento mediante recuentos celulares diarios con un hematocitómetro, fijando previamente las células con lugol y utilizando un microscopio de luz visible para su observación y conteo. La tasa de crecimiento se calculó de acuerdo a la fórmula 1 (Vonshak & Maske, 1982). El agua de mar utilizada para su cultivo, así como para los experimentos posteriores fue filtrada (0.45 μm), pasada por UV y esterilizada en autoclave.

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Dónde:

μ = Tasa de crecimiento;

X_2 = Número de células en el tiempo t_2

X_1 = Número de células en el tiempo t_1

t_2 = Tiempo en días

t_1 = Tiempo inicial en días

5.2. Obtención de Fracción Soluble

La solución stock de fracción hidrosoluble fue donada por Soledad Salinas, la cual se utilizó previamente para evaluar los efectos en *D. tertiolecta* al ser expuesta a diferentes concentraciones de esta

(Salinas-Whittaker, 2020). La solución se preparó de acuerdo a la metodología de Siron *et al.* (1991), en cuál se mezcló combustóleo y diésel en una relación 85:15 y posteriormente se agregó agua de mar en relación 9:1 (agua de mar: combustóleo/diésel). Esta mezcla se mantuvo en oscuridad durante 96 horas y se agitó suavemente cada 12 horas.

5.3. Inmovilización de *Dunaliella salina* en una matriz polimérica de origen marino

5.3.1. Obtención de biomasa algal

Se tomaron aproximadamente 500 mL del cultivo stock y se centrifugó en tubos de 50 mL a 4500 rpm y 15 °C por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de agua de mar estéril. Se tomó una muestra de 100 µL por triplicado para realizar un conteo celular con hematocitómetro. El resto se reservó para su inmovilización y para el bioensayo posterior.

5.3.2. Soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio

Se prepararon soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio de acuerdo a la metodología descrita por Dainty *et al.* (1986), cuya composición se encuentra descrita en las tablas 1 y 2. Ambas soluciones se esterilizaron en autoclave.

Tabla 1. Componentes de la solución de alginato de sodio 3%.

Componente	Cantidad
Alginato de sodio	3.00 g
Cloruro de sodio	3.40 g
Agua destilada	100 mL

Tabla 2. Componentes de la solución de cloruro de calcio 0.2 M.

Componente	Cantidad
Cloruro de calcio	2.22 g
Cloruro de sodio	3.40 g
Agua destilada	100 mL

5.3.3. *Inmovilización de Dunaliella salina en matriz de alginato*

Las soluciones esterilizadas se dejaron enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 25 °C y se preparó el sistema para su inmovilización ilustrado en la figura 1. Se mezclaron 16.5 mL de la solución de alginato de calcio y 3.5 mL del pellet resuspendido para obtener una solución de alginato al 2.47 %. Una vez obtenida una mezcla homogénea, se cargó por intervalos de 2 mL en el sistema y se dejó caer gota a gota en la solución de cloruro de calcio a 5 cm de distancia. El resto de la mezcla de Alginato-*D. salina* se reservó en un baño de agua a 27 °C entre cada intervalo para mantener su temperatura.

Las esferas obtenidas se dejaron reposar en dicha solución durante 24 horas, se enjuagaron con agua de mar estéril y se reservaron para los experimentos posteriores. Se realizó el mismo procedimiento para elaborar las esferas sin microalgas añadiendo agua de mar estéril en lugar del pellet resuspendido. Las esferas elaboradas con y sin microalgas se nombraron Alg-DS y Alg, respectivamente.

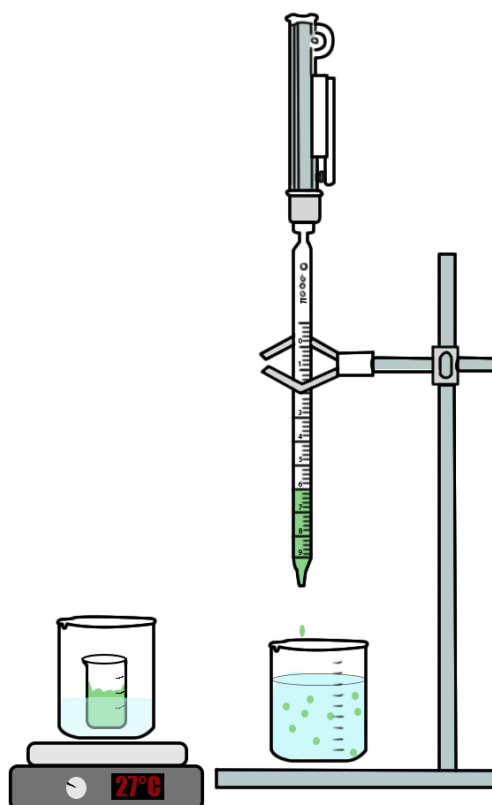


Figura 1. Ilustración de sistema para inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices de alginato.

5.4. Caracterización del sistema célula/soporte

5.4.1. Características físicas

Para medir el peso y volumen de las esferas Alg y Alg-DS, se seleccionaron aleatoriamente 3 grupos de 5 esferas (6 grupos en total). Se retiró el exceso de humedad de las esferas y se pesaron en una balanza de manera individual; posteriormente se colocó cada grupo en una probeta de 5 mL para calcular su volumen.

Para obtener las dimensiones correspondientes a la altura y diámetro, se seleccionaron aleatoriamente de 3 grupos de 15 esferas. Se retiró el exceso de humedad de cada esfera y se utilizó un goniómetro de ramé-hart instruments Modelo 200 Serie U y su software DROP Image (ramé-hart instrument co., 2023) para su medición.

Para observar su morfología se utilizó un microscopio estereoscópico y el goniómetro previamente mencionado.

5.4.2. Propiedades mecánicas

Se realizaron pruebas mecánicas para observar los cambios en las dimensiones de las esferas con relación a las diferentes fuerzas de compresión utilizadas. Para este estudio se utilizó el goniómetro previamente mencionado, un juego de pesas calibradas de 5, 10, 20 y 50 gramos, y soportes diseñados para cada una de las pesas.

Para cada una de las pesas se seleccionaron de manera aleatoria 15 esferas (60 esferas en total) de cada uno de los grupos Alg y Alg-DS sin tratamiento, así como de los grupos expuestos a la FS en el bioensayo (Grupo blanco y Grupo de Estudio, respectivamente).

Las dimensiones iniciales correspondientes a la altura y diámetro de cada esfera se obtuvieron de acuerdo al procedimiento indicado en la sección 5.4.1.; mientras que las dimensiones de las esferas siendo sometidas a las fuerzas de compresión se obtuvieron tomando fotografías con DROP Image (ramé-hart instrument co., 2023) 10 segundos después de colocar la pesa. Posteriormente, las fotografías se procesaron con el software ImageJ (National Institutes of Health, 2023) para obtener sus dimensiones, ya que las

mediciones automáticas de DROP Image no distinguen entre la forma de esferas y las pesas utilizadas. Así también, se diseñó un programa en el software R (R Core Team, 2023) que automatizó la limpieza de los datos y los cálculos realizados posteriormente.

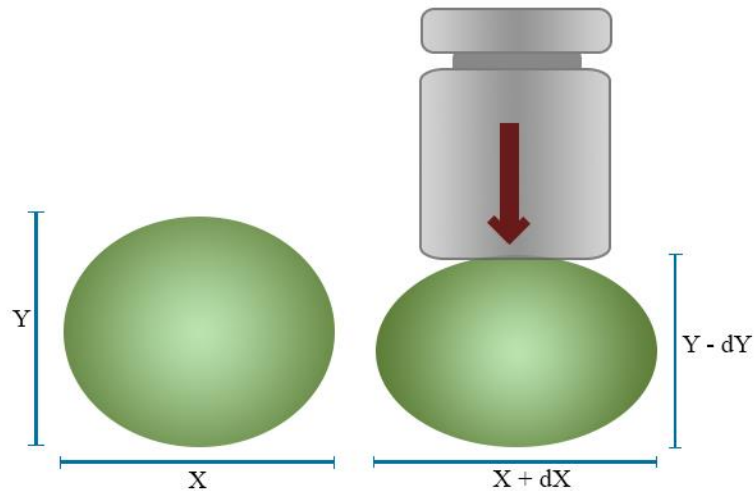


Figura 2. Ilustración de pruebas mecánicas realizadas (vista lateral). Estado inicial de la esfera (A); Esfera al ser sometida a fuerzas de compresión (B).

Se describió el comportamiento de las esferas al ser sometidas a fuerzas de compresión mediante una gráfica de estrés-deformación, el cálculo de su módulo de Young y coeficiente de Poisson. La deformación se refiere a la cantidad en la que un objeto cambia de forma en respuesta a una fuerza aplicada; para este caso, la deformación ε está dada por la relación entre el cambio en el diámetro de la esfera ΔD después de la fuerza aplicada y su diámetro original D_0 , como se indica en la ecuación 2 (Hibbeler, 2016).

$$\varepsilon = \frac{\Delta D}{D_0} \quad (2)$$

Dónde:

ε = Deformación

D_0 = Diámetro inicial

ΔD = Cambio en el diámetro

En este contexto, la tensión o el estrés al que está sometido un material se refiere a la fuerza aplicada por unidad de superficie; por lo que, la tensión σ estará dada por la relación entre la fuerza aplicada F por

cada una de las pesas utilizadas y el área transversal A de la esfera, como se indica en la ecuación 3 (Beer, Johnston, DeWolf y Mazurek, 1992).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (3)$$

Dónde:

σ = Estrés

F = Fuerza

A = Área transversal

A partir de esto, es posible calcular el módulo elástico o módulo de Young; este se considera como una medida de la resistencia de un material a la deformación elástica y está determinado por la relación entre el estrés σ y la deformación ε , como se indica en la ecuación 4 (Callister y Rethwisch, 2018).

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (4)$$

Dónde:

σ = Estrés

ε = Deformación

El cálculo del coeficiente de Poisson permite una mayor comprensión de las propiedades mecánicas de estas esferas, ya que es un indicador importante de la rigidez o la elasticidad de un material. El coeficiente de Poisson mide la relación entre la deformación lateral y la deformación axial de un material cuando se somete a una carga externa. Para este caso, el coeficiente de Poisson ν estará dado por la relación entre la deformación lateral ε_l y la deformación axial ε_a de la esfera, como se indica en la ecuación 5 (Timoshenko y Goodier, 1970).

$$\nu = -\frac{\varepsilon_l}{\varepsilon_a} \quad (5)$$

Dónde:

ν = Coeficiente de Poisson

ε_l = Deformación lateral

ε_a = Deformación axial

Para complementar estos resultados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con 15 réplicas de los resultados correspondientes a la deformación con cada una de las pesas utilizadas. Esto para determinar si existe una diferencia significativa entre las propiedades mecánicas de los diferentes grupos de esferas con y sin tratamiento. Para este análisis estadístico se utilizó Minitab Statistical Software (Minitab, LLC., 2023).

5.4.3. Eficiencia de inmovilización

Para determinar la eficiencia de la inmovilización de células de *D. salina* en las matrices de alginato se seleccionaron aleatoriamente 3 grupos de 5 esferas Alg-DS; cada grupo se disolvió en 5 mL de una solución previamente esterilizada de NaH_2PO_4 0.5 M y agua de mar. Posteriormente, se tomó muestra por triplicado, se añadió una gota de lugol para fijar las células y se realizó un conteo celular con hematocitómetro.

5.5. Bioensayo de exposición a fracción soluble

El propósito principal del bioensayo es observar los efectos de las microalgas inmovilizadas (Alg-DS) en las concentraciones de la fracción soluble (FS). A su vez, este permitió realizar estudios posteriores acerca de los efectos de la FS en la estabilidad de las esferas Alg-DS, así como en las propiedades mecánicas de las esferas Alg y Alg-DS. Además, se añadió un grupo experimental adicional para observar las cinéticas de liberación de microalgas en las esferas Alg-DS en agua de mar.

5.5.1. Grupos experimentales

Se diseñaron 4 grupos experimentales por triplicado, correspondientes al grupo de estudio (GE), grupo blanco (GB), grupo control del estudio (GCE), y grupo control (GC). Cada grupo experimental se encuentra detallado en la tabla 3. Estos se mantuvieron en matraces de 125 mL con aireación durante 7 días, a 21 °C y $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El agua de mar, los tapones de algodón y matraces fueron previamente esterilizados en autoclave.

Una vez finalizado el bioensayo, se midió el volumen restante de cada uno de los matraces para determinar la pérdida por evaporación. Las esferas se almacenaron en recipientes con agua de mar estéril

para los estudios de sus propiedades mecánicas y estabilidad de inmovilización; mientras que la muestra líquida fue reservada en frascos ámbar en refrigeración para el monitoreo de la fracción soluble.

Tabla 3. Grupos experimentales del bioensayo.

Grupo experimental	Agua de mar	Fracción soluble	Muestra
Grupo de Estudio	87.5 mL	12.5 mL	Alg-DS (n = 25)
Grupo Blanco	87.5 mL	12.5 mL	Alg (n = 25)
Grupo Control de Estudio	87.5 mL	12.5 mL	<i>D. salina</i> libre*
Grupo Control	100 mL	-	Alg-DS (n = 25)

* Se agregó la densidad celular proporcional a 25 esferas de Alg-DS

5.5.2. Monitoreo de fracción soluble por UV

Para determinar las posibles variaciones de las concentraciones de la FS en cada uno de los grupos experimentales, se realizó un monitoreo por medio de espectrometría en las muestras líquidas reservadas. Para esto se agregaron 0.1 volúmenes de n-hexano a cada muestra, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar hasta que se separaron las fases. Se extrajo la fase orgánica por triplicado y se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-VIS Lambda 365 para realizar un barrido en el intervalo UV-VIS de 350-450 nm. Posteriormente, se seleccionó el intervalo con mayor número de picos de absorbancia para realizar un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con las longitudes de onda de mayor interés.

5.5.3. Evaluación de estabilidad de inmovilización

Con el propósito de evaluar la estabilidad de la inmovilización de *D. salina* al ser expuesta a la fracción soluble, se buscó comparar la densidad celular de las esferas Alg-DS obtenidas inicialmente y las esferas Alg-DS después de 7 días de exposición a la FS. Para realizar esto, una vez finalizado el bioensayo, se tomó 1 grupo de 5 esferas de cada uno de los matraces del grupo de estudio (3 grupos en total) y se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.4.3. para disolver las esferas y realizar un conteo celular con hematocitómetro, fijando previamente con lugol.

5.5.4. Monitoreo de crecimiento y cinéticas de liberación de microalgas

Durante los 7 días del bioensayo se realizaron conteos diarios en los grupos GCE, GE y GC. El conteo en el grupo GCE (*D. salina* libre en FS 12.5 %) se realizó con el objetivo de observar su crecimiento de forma libre al estar expuesta a la fracción soluble. Por otro lado, los conteos en los grupos GE y GC (Alg-DS con y sin FS) se realizaron para observar las cinéticas de liberación de microalgas en presencia y ausencia de fracción soluble. Para esto, se tomó una muestra de 0.5 mL de cada grupo por triplicado y se realizó un conteo con hematócrito, fijando previamente con lugol.

5.5.5. Propiedades mecánicas de esferas expuestas a la fracción soluble

Con el fin de determinar si la exposición a la FS tuvo algún efecto en las propiedades mecánicas de las esferas Alg y Alg-DS, se tomaron 4 grupos de 10 esferas de los grupos experimentales blanco y de estudio (8 grupos en total) para realizar las pruebas mecánicas descritas en la sección 5.4.2.

6. Resultados

6.1. Obtención, cultivo y monitoreo de microalgas

La densidad celular inicial del cultivo de *Dunaliella salina* fue de 5.7×10^6 células mL⁻¹. Se realizó un monitoreo de su crecimiento durante 11 días mediante conteos diarios por triplicado. La curva de crecimiento observada presentó las fases lag, logarítmica, crecimiento lento y estacionaria; la tasa máxima de crecimiento fue de $\mu = 4.36$ días⁻¹, obtenida entre los días 2 y 4 de la fase logarítmica.

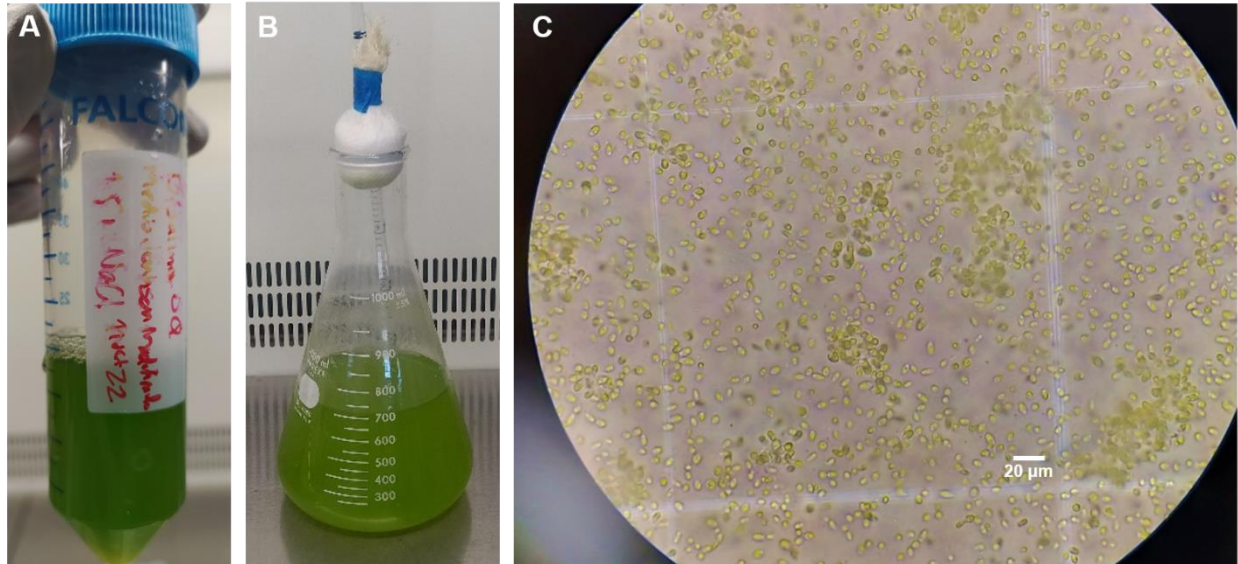


Figura 3. Alícuota obtenida de *Dunaliella salina* (A). Cultivo stock de *Dunaliella salina* (B) y fotografía bajo microscopio óptico a 40X (C).

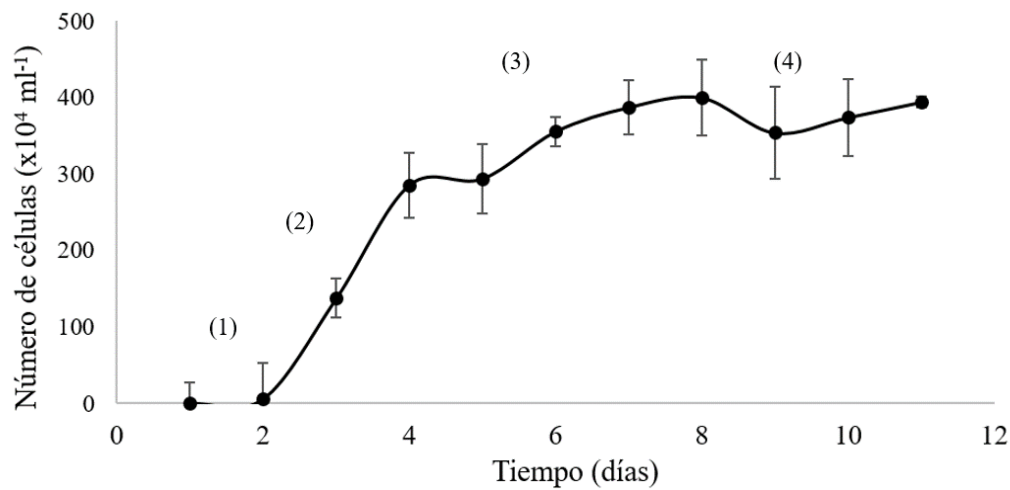


Figura 4. Curva de crecimiento de *Dunaliella salina*. Fases: (1) Lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos muestran resultados promedio ($n = 3$) y las barras de error la desviación estándar.

6.2. Inmovilización de *Dunaliella salina* en una matriz polimérica de origen marino

La densidad celular del cultivo stock y del pellet obtenido después de resuspender en 5 mL de agua de mar fue de 8.6×10^6 células mL⁻¹ y 671×10^6 cel mL⁻¹ respectivamente. A partir de las proporciones

utilizadas de alginato de sodio y *D. salina* se calcularon 117×10^6 células mL^{-1} en la solución para inmovilizar. Se obtuvieron en promedio 18 esferas por mililitro de esta solución.

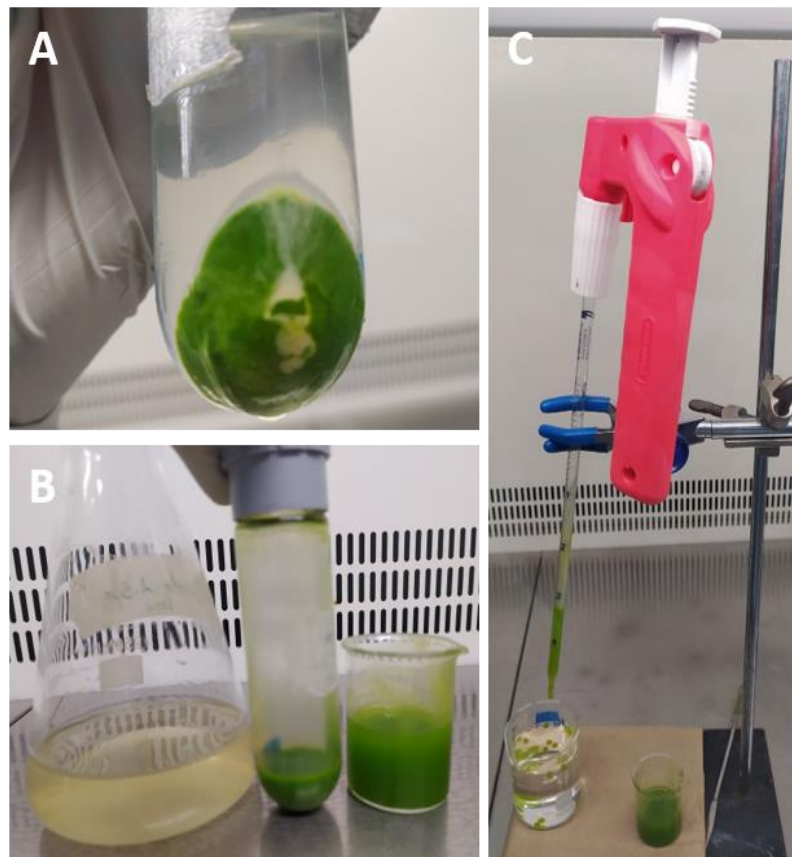


Figura 5. Muestra centrifugada (A); alginato 3%, pellet resuspendido y solución de alginato-*Dunaliella salina* (B); sistema para la adición por goteo a una solución de cloruro de calcio (C).

6.3. Bioensayo de exposición a fracción soluble

6.3.1. Grupos experimentales

En la figura 6 se observan los diferentes grupos experimentales al inicio del bioensayo. Durante el paso de los días se observó una pérdida progresiva en el volumen de todos los grupos; una vez finalizado el bioensayo se midió la pérdida volumétrica de cada grupo, lo cual se reporta en la tabla 4.

Tabla 4. Evaporación en bioensayo de exposición a fracción soluble. Los resultados se representan como promedio (n = 3) ± desviación estándar.

Grupo de Estudio		Grupo Blanco		Grupo Control del Estudio		Grupo Control	
Residuo (mL)	Pérdida	Residuo (mL)	Pérdida	Residuo (mL)	Pérdida	Residuo (mL)	Pérdida
77.33 ± 1.53	22.67%	83.67 ± 1.50	16.33%	79.67 ± 5.51	20.33%	77.33 ± 6.39	22.67%



Figura 6. Grupos experimentales: (de izquierda a derecha) control del estudio (GCE), control (GC), grupo de estudio (GE) y blanco (GB).

6.3.2. Monitoreo de fracción soluble por espectrofotometría UV-VIS

Posterior a obtener el espectro de absorción de 350-450 nm (Figura 7) se seleccionó el intervalo 368-380 nm (Figura 8) con el objetivo de enfocarse en los picos de absorción de las muestras. Ya que de acuerdo a la literatura (Li et al., 2015) el fenantreno cuenta con un pico de emisión a 368 nm, este fue tomado como referencia para comparar los resultados entre los diferentes grupos (Figura 9). Los resultados del análisis de varianza de una vía para esta longitud de onda se encuentran en la tabla 5; los cuales indican una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

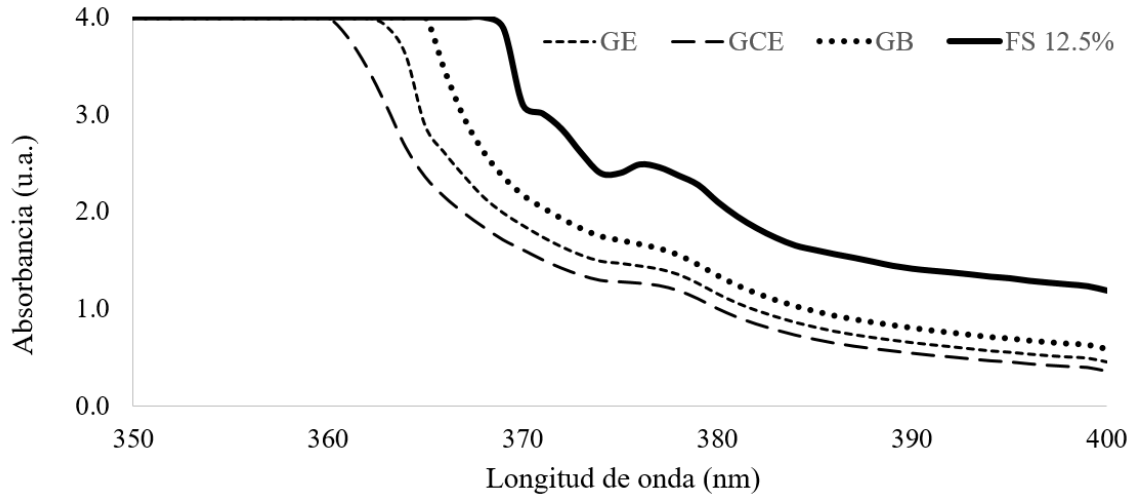


Figura 7. Espectro de absorción 350-400 nm de las fracciones obtenidas por extracción con hexano. Grupo de estudio (GE), grupo control del estudio (GCE), grupo blanco (GB), fracción soluble 12.5 % (FS).

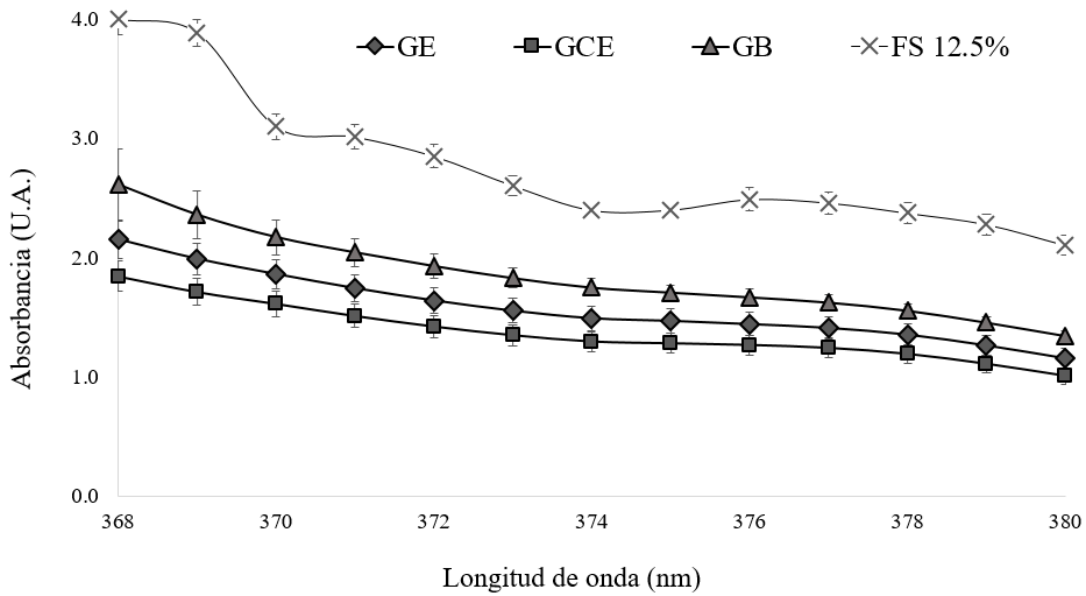


Figura 8. Espectro de absorción 368-380 nm de las fracciones obtenidas por extracción con hexano. Grupo de estudio (GE), grupo control del estudio (GCE), grupo blanco (GB), fracción soluble 12.5 % (FS). Los valores se representan como promedio (n = 3) y las barras de error representan la desviación estándar.

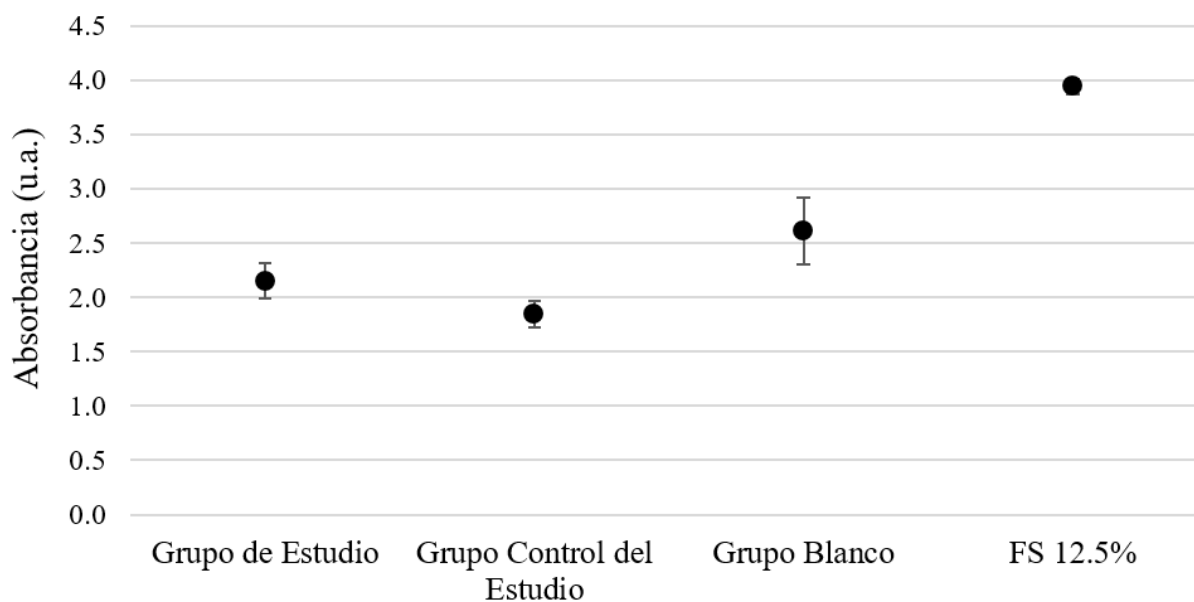


Figura 9. Absorbancia de los grupos experimentales obtenida a 368 nm.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la absorbancia obtenida en 368 nm para los grupos experimentales: Grupo de estudio (GE), control del estudio (GCE) y blanco (GB).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.894	2	0.447	9.909	0.013	5.143
Dentro de los grupos	0.271	6	0.045			
Total	1.165	8				

6.4. Caracterización del sistema célula-soporte

6.4.1. Caracterización morfológica

Las esferas Alg y Alg-DS sin tratamiento contaron con características similares en cuanto a su morfología y superficie al ser observadas a simple vista como se aprecia en las figuras 10 y 11. De acuerdo a la tabla 6, las esferas Alg-DS obtuvieron un peso, volumen y dimensiones mayores al de las esferas Alg.

Por otro lado, el color verde destacó en las esferas que contienen microalgas, mientras que las esferas que solo contienen alginato mostraron un color blanco translúcido. Ambos grupos mostraron una distribución uniforme en su color. Al observarse con el goniómetro se encontraron otras variaciones morfológicas, las cuales se presentan tanto en el grupo de esferas Alg como en Alg-DS (Figura 12).

Tabla 6. Características de las matrices de Alginato y Alginato-*Dunaliella salina*.

	Alg-DS	Alg
Color	Verde	Blanco
Superficie	Lisa	Lisa
Forma	Esférica	Esférica
Peso [g] n = 15	0.053 ± 0.008	0.046 ± 0.003
Volumen [mL] n = 15*	0.3 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Alto [mm] n = 15	4.370 ± 0.217	3.907 ± 0.130
Diámetro [mm] n = 15	4.822 ± 0.214	4.516 ± 0.093

* 3 grupos de 5 esferas. Los valores se representan como promedio ± desviación estándar.

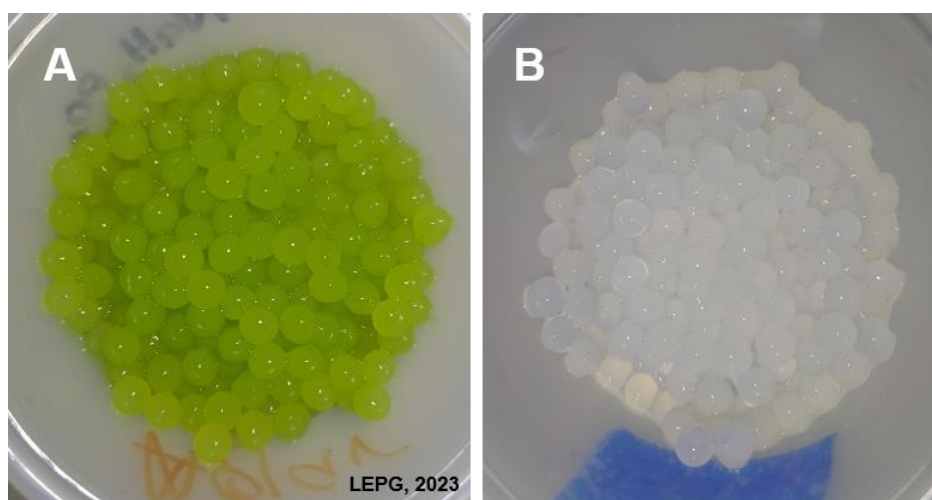


Figura 10. Esferas obtenidas de Alginato-*Dunaliella salina* (A) y Alginato (B).

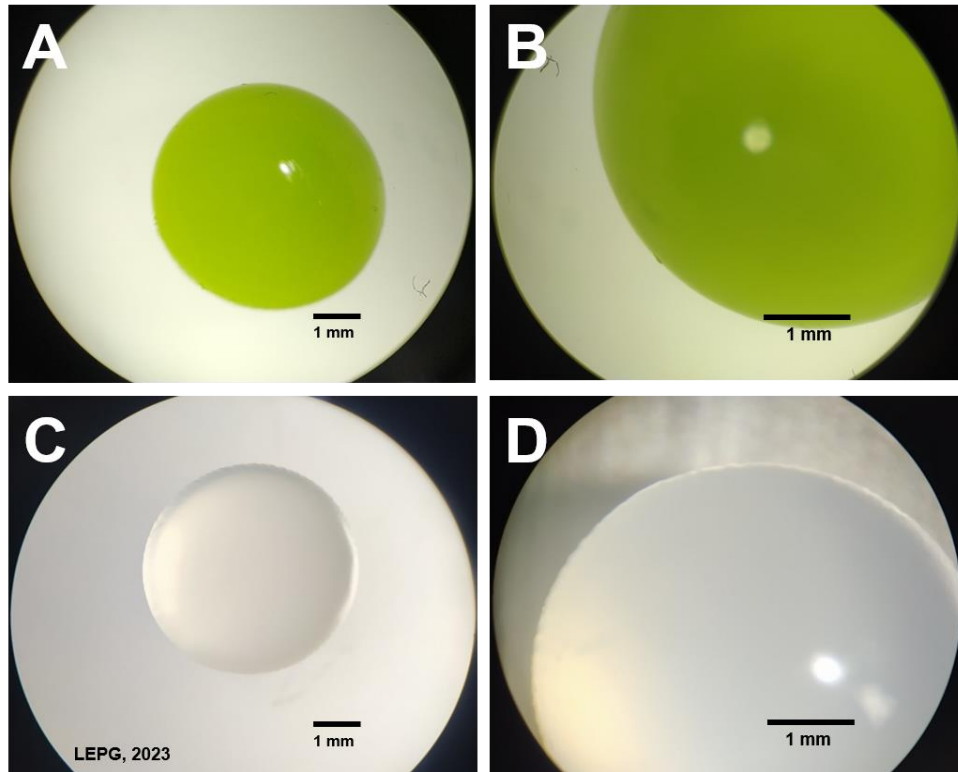


Figura 11. Vista superior desde un microscopio estereoscópico. Esferas de Alginato-*Dunaliella salina* a 2X (A) y 4X (B); esferas de Alginato a 2X (C) y 4X (D).

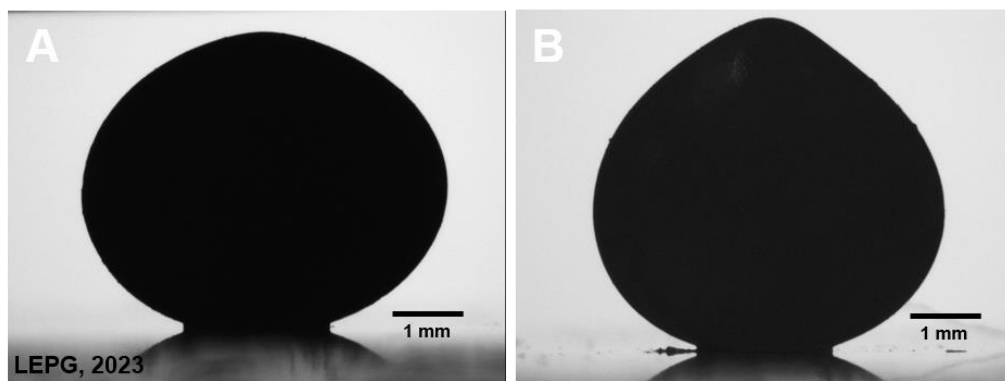


Figura 12. Vista lateral desde un goniómetro. Variantes morfológicas en esferas de Alginato-*Dunaliella salina*.

El grupo experimental blanco (Alg expuesto a FS) no presentó diferencias morfológicas o de color con respecto a las esferas Alg sin tratamiento. A su vez, el grupo control y el grupo de estudio (Alg-DS en agua de mar y en FS, respectivamente) tampoco presentaron diferencias en su morfología, pero sí en su color con respecto al grupo sin tratamiento, como se observa en la figura 13. El grupo control

presentó un cambio de color ligeramente amarillento, mientras que las esferas del grupo de estudio mostraron un color verde tenue en su interior y una despigmentación en el exterior de la esfera.

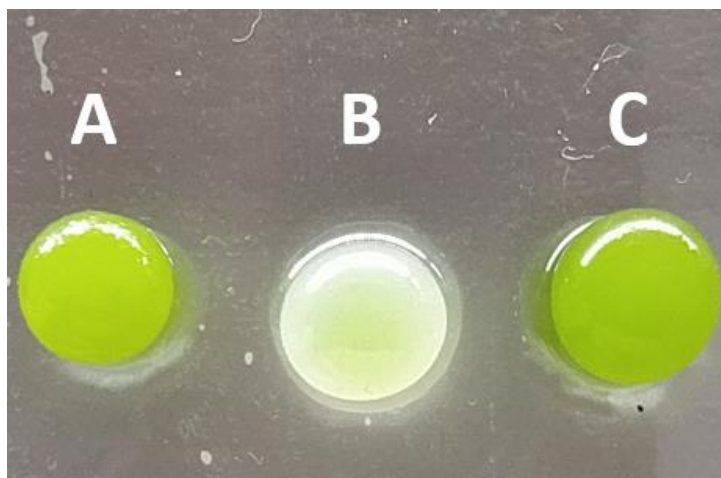


Figura 13. Esferas de Alg-DS. Grupo control (A), grupo de estudio (B) y grupo sin tratamiento (C).

6.4.2. Propiedades mecánicas

Los grupos sin tratamiento de esferas Alg y Alg-DS presentaron cambios en su morfología durante las pruebas mecánicas, los cuales se muestran en las figuras 15 y 16. No se observó disrupción en ninguna de las esferas durante estas pruebas. Dichos grupos mostraron un comportamiento similar en su relación estrés-deformación y coeficiente de Poisson, los cuales se presentan en la figura 17 y tablas 7 y 8.

Por otro lado, el grupo experimental blanco (Alg expuestas a FS) presentó una mayor deformación en todas las pruebas, pero aún sin mostrar disrupción; mientras que el grupo de estudio (Alg-DS expuestas a FS) mostró una disrupción total y casi inmediata en todas las pruebas mecánicas.

De acuerdo a los análisis de varianza de una vía realizados para cada una de las pesas (tablas 9-12), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos para todos los casos.

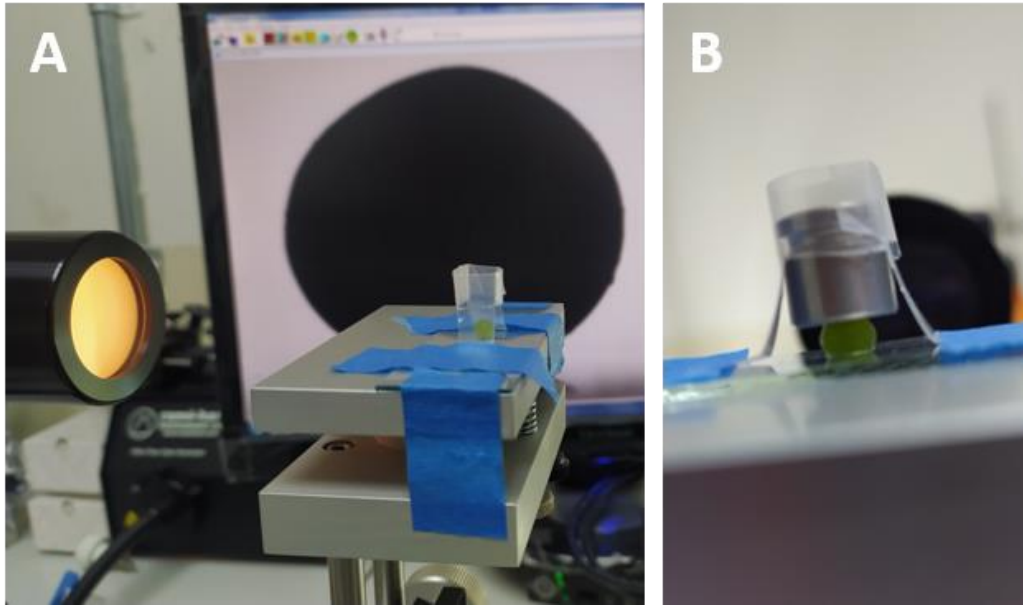


Figura 14. Esfera de Alginato-*Dunaliella salina* en el sistema utilizado para las pruebas mecánicas (A). Esfera de Alginato-*Dunaliella salina* durante una prueba de compresión con una pesa de 5 g (B).

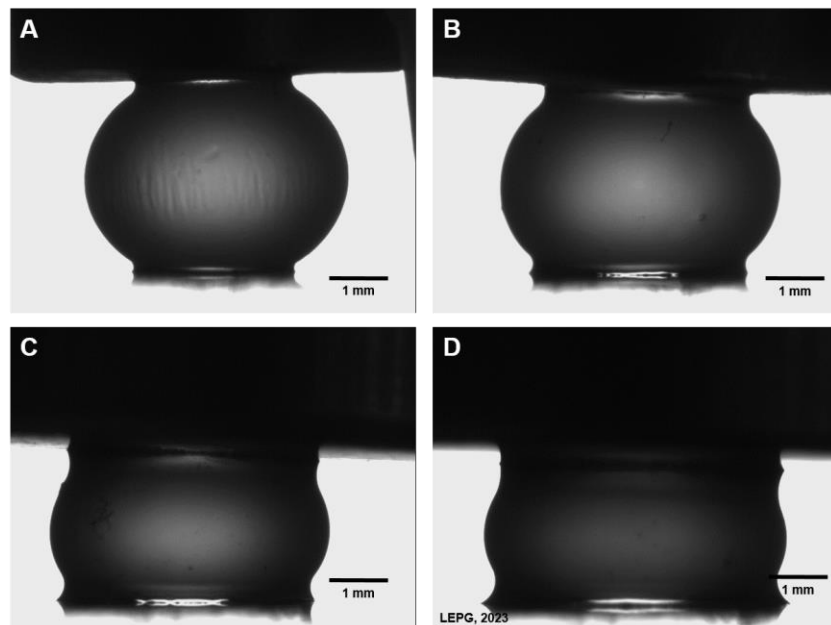


Figura 15. Pruebas mecánicas de compresión en esferas de Alginato (sin tratamiento) con Goniómetro ramé-hart utilizando pesas de 5 g (A), 10 g (B), 20 g (C) y 50 g (D).

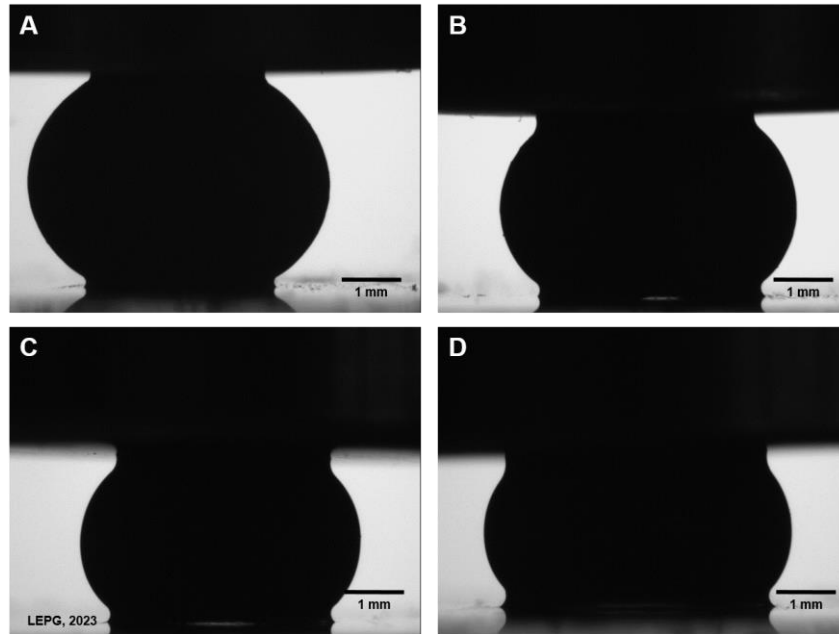


Figura 16. Pruebas mecánicas de compresión en esferas de Alginato-*Dunaliella salina* (sin tratamiento) con Goniómetro ramé-hart. Pesas de 5 g (A), 10 g (B), 20 g (C) y 50 g (D).

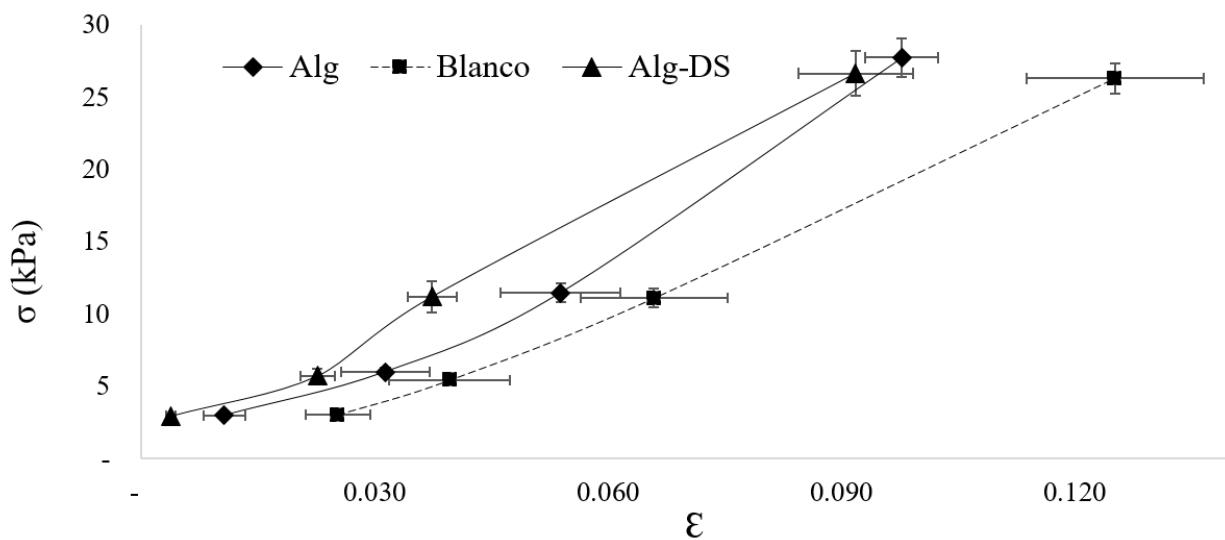


Figura 17. Deformación de las esferas Alg y Alg-DS con respecto a distintas fuerzas de compresión. Los grupos Alg y Blanco corresponden a las esferas de alginato con y sin tratamiento respectivamente; el grupo Alg-DS corresponde a las esferas de Alginato-*D. salina* sin tratamiento. El grupo de estudio no se presenta debido a su disrupción total en todas las pruebas realizadas.

Tabla 7. Módulo de Young [kPa] obtenido para los grupos Alg, Blanco y Alg-DS con las pesas de 5, 10, 20 y 50 g. Valores presentados como promedio \pm desviación estándar.

	5 g	10 g	20 g	50 g
Alg	297.29 \pm 79.98	195.84 \pm 29.54	215.98 \pm 24.89	284.02 \pm 13.03
G. Blanco	123.12 \pm 20.62	140.31 \pm 18.14	170.97 \pm 21.17	211.41 \pm 18.40
Alg-DS	796.51 \pm 104.08	254.15 \pm 14.41	302.13 \pm 40.07	291.96 \pm 28.32

Tabla 8. Coeficiente de Poisson obtenido para los grupos Alg, Blanco y Alg-DS con las pesas de 5, 10, 20 y 50 g. Valores presentados como promedio \pm desviación estándar.

	5 g	10 g	20 g	50 g
Alg	0.07 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02
G. Blanco	0.12 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.21 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03
Alg-DS	0.02 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.24 \pm 0.02

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 5 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0024	2	1.20E-03	143.186	4.2323E-15	3.354
Dentro de los grupos	0.0002	27	8.39E-06			
Total	0.0026	29				

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 10 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0014	2	7.23E-04	22.000	2.145E-06	3.354
Dentro de los grupos	0.0009	27	3.29E-05			
Total	0.0023	29				

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 20 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0041	2	2.05E-03	38.739	1.17E-08	3.354
Dentro de los grupos	0.0014	27	5.29E-05			
Total	0.0055	29				

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la deformación resultante con respecto a una compresión con una pesa de 50 g. Grupos Alg, Blanco y Alg-DS.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0063	2	3.16E-03	45.833	2.09E-09	3.354
Dentro de los grupos	0.0019	27	6.90E-05			
Total	0.0082	29				

6.4.3. Eficiencia y estabilidad de inmovilización

De acuerdo al conteo celular previo a la inmovilización, el número de células esperado en cada esfera Alg-DS fue de 6.523×10^6 . En cada esfera sin tratamiento se calcularon 5.308×10^6 células mientras que en las expuestas a FS por 7 días se calcularon 1.810×10^6 células.

Tabla 13. Eficiencia de inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices poliméricas.

Grupo	Células por esfera ($\times 10^6$)	Eficiencia
Teórico	6.523	100 %
Alg-DS (Sin tratamiento)	5.308 ± 0.25	81.37 %
Grupo	Células por esfera ($\times 10^6$)	Supervivencia
Alg-DS (G. Estudio)	1.810 ± 0.37	34.09 %

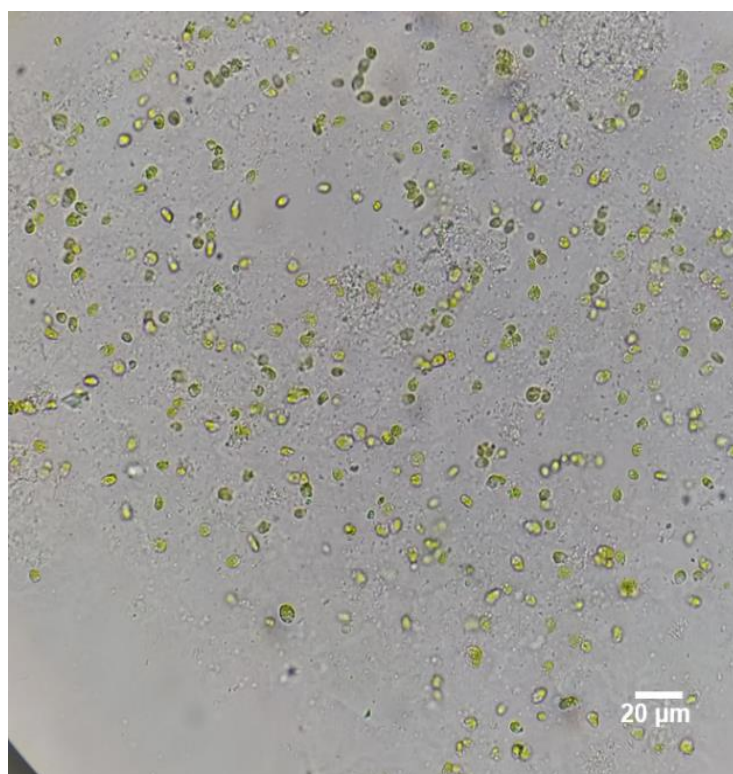


Figura 18. Esferas de grupo de estudio (Alg-DS expuestas a FS 12.5 %) disueltas en solución de NaH_2PO_4 . Observadas en microscopio óptico a 40X.

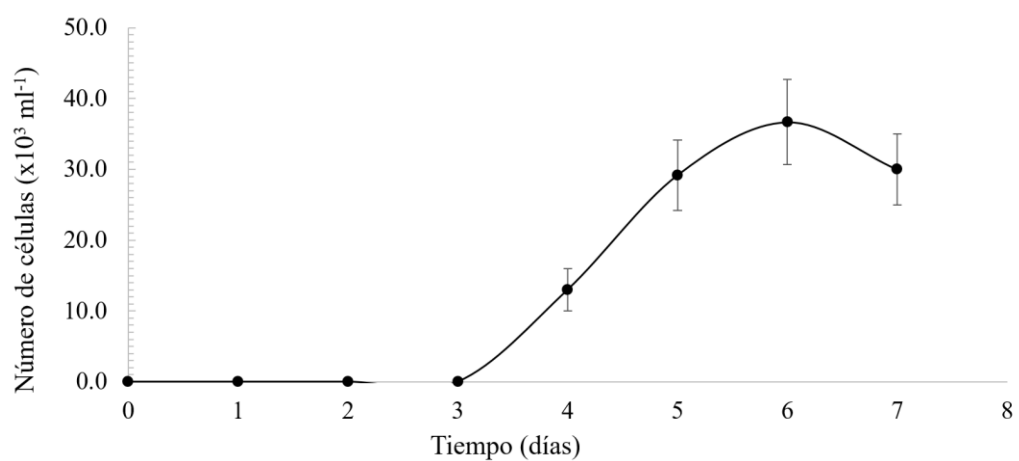


Figura 19. Liberación de microalgas en el medio del grupo control. Las barras de error representan la desviación estándar.

En la figura 19 se representa la liberación de microalgas por parte de las esferas Alg-DS del grupo control (agua de mar sin FS). A pesar de que estas no presentaron una disrupción a simple vista o al ser observadas en el microscopio estereoscópico, se determinó una liberación de microalgas por medio de conteos celulares a partir del día 4.

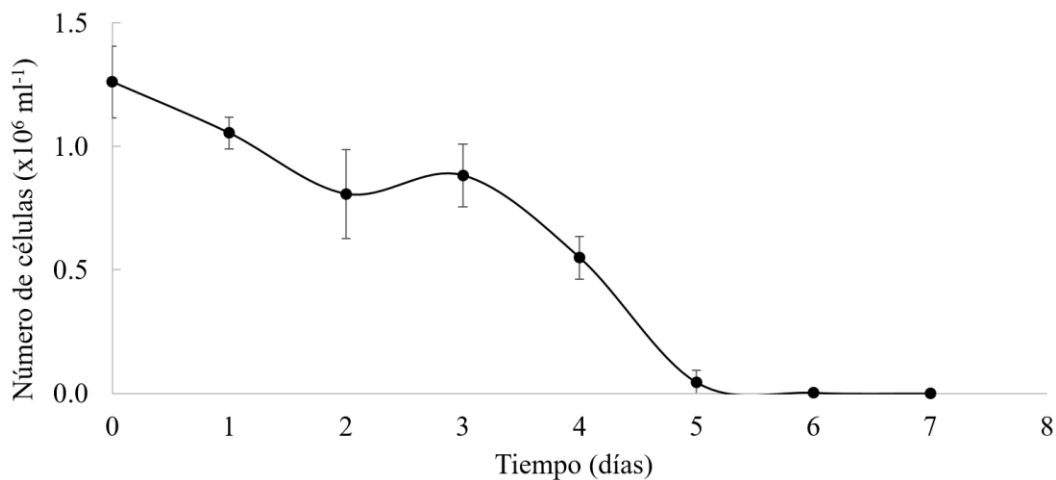


Figura 20. Células libres en grupo control del estudio. Las barras de error representan la desviación estándar.

En la figura 20 se representa la disminución en la densidad celular del grupo control del estudio (*D. salina* libre). Este grupo inició con una densidad celular proporcional a aquellos grupos con *D. salina*

inmovilizada (esferas Alg-DS), en el cuál se observó una disminución desde el día 1 hasta llegar a un valor muy cercano a cero a partir del día 5.

7. Discusión

7.1. Monitoreo de la fracción soluble

El monitoreo de la fracción soluble por espectrometría UV-VIS permitió obtener una estimación de su remoción por parte de los diferentes grupos; además, los patrones y picos encontrados en estos espectros de absorción pueden brindar información acerca de la posible presencia de algunos componentes. Gracias a las propiedades fluorescentes de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) la espectroscopia de fluorescencia inducida por ultravioleta se convirtió en un método útil para identificar petróleo en la superficie del mar. De acuerdo con este principio, un estudio realizado por Hou *et al.* (2019) obtuvo los espectros de emisión de fluorescencia en el rango 150-800 nm para muestras de petróleo provenientes de diferentes partes del mundo, encontrando que la mayoría de los picos de fluorescencia se encuentran en el rango 300-400 nm. Esto difiere de otro autor (Levy, 1972) quien realizó un barrido en el rango de 200-350 nm para observar el espectro de absorción de diferentes combustóleos residuales, obteniendo los mayores picos de absorción en 225-228 nm y 256 nm. Aunque el rango de longitudes de onda analizado para este proyecto (350-400 nm) se encuentra dentro de lo indicado por Hou *et al.* (2019), para futuros experimentos se considera conveniente ampliar el rango de longitud de onda para obtener más detalles acerca de la interacción de las tecnologías propuestas y la remoción de componentes específicos.

Para complementar esta información, se realizó una búsqueda en la literatura para encontrar algunos HAPs comúnmente encontrados en derivados del petróleo y que puedan ser identificados en el rango de longitudes de onda utilizado para esta investigación. De acuerdo con esto, Li *et al.* (2015) reportaron los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para fenantreno y pireno, para los cuáles se observaron picos de emisión en 368 y 380 nm, respectivamente. De manera similar, Schwarz y Wasik (1976) obtuvieron los espectros de fluorescencia para diferentes HAPs, entre ellos el pireno, en el cuál se observó un pico cerca de los 372 nm. Concordando con las observaciones de Li *et al.* (2019) con respecto

al fenantreno, el espectro de absorción obtenido en esta investigación (Figura 7) presentó un pico de absorbancia en el rango 360-370 nm para todas las muestras. Aunque este resultado podría sugerir la presencia de fenantreno, es importante tener en cuenta que para identificar de manera precisa los compuestos presentes en estas muestras se requiere un análisis detallado mediante otras técnicas (por ejemplo, cromatografía de gases) así como el realizar comparaciones utilizando patrones de referencia o espectros característicos de cada compuesto.

El espectro de absorción obtenido para la fracción soluble al 12.5% se utilizó como punto de referencia para las demás muestras de este estudio (Figura 8); y aunque no se presentaron picos definidos, en este espectro se observaron algunas variaciones de la absorbancia en las longitudes de onda cercanas a las mencionadas para el pireno por ambos autores. Para futuras investigaciones se podrían obtener espectros de absorción más definidos al mejorar factores como la calidad de la muestra, los factores de dilución utilizados y aumento en la resolución de la lectura.

Para comparar los diferentes grupos experimentales y sus respectivos espectros de absorción, se decidió enfocarse en el rango de longitudes de onda de 368-380 nm. Esta elección se basó en la presencia de posibles picos de adsorción en ese intervalo, la cual también se encuentra respaldada por la literatura previamente discutida. La figura 8 muestra una similitud en el comportamiento de los espectros de absorción entre los distintos grupos experimentales. Al observar que todos los grupos presentan picos de absorción bien definidos alrededor de los 368 nm, se consideró este valor como punto de comparación de las absorbancias obtenidas entre los grupos (Figura 9). Los resultados indicaron una menor absorbancia, y, por ende, podría asumirse que hubo una mayor adsorción por parte del grupo control del estudio, donde se encontraba *D. salina* de manera libre; seguido por el grupo de estudio con *D. salina* inmovilizada en esferas de alginato, y finalmente, el grupo blanco con esferas de alginato. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (tabla 5), el cual se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los grupos experimentales. Es también importante considerar las posibles variaciones en estos resultados debido a factores como la luz y la aireación, ya que se ha encontrado que la volatilización, emulsificación y fotooxidación pueden contribuir a la degradación

de diversos componentes del petróleo (National Research Council, 2003). Debido a que se observó una pérdida de volumen de entre 16.33% y 22.67% al final del bioensayo, se recomienda la incluir un grupo adicional en futuros estudios para evaluar específicamente la influencia de estos factores.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una discrepancia con la hipótesis planteada, ya que indican que la capacidad de adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo por *Dunaliella salina* no se vio mejorada significativamente al estar inmovilizada en matrices poliméricas en comparación con la forma libre. Sin embargo, la bibliografía consultada en la sección posterior aborda algunas de las posibles causas de esto que pueden ser consideradas para futuras investigaciones.

7.2. Remoción de derivados del petróleo

Hay poca literatura con respecto a *D. salina* y su interacción con compuestos derivados del petróleo. Un estudio relevante realizado por Fakhry y Abdel-Kareem (2006) aborda el efecto del diésel y la gasolina en el crecimiento y las actividades metabólicas de *D. salina*. Los resultados mostraron una disminución en el crecimiento y las actividades metabólicas de *D. salina* incluso a bajas concentraciones de estos compuestos (25%), así como un agravamiento de los efectos adversos a medida que se aumentaron las concentraciones de exposición. A pesar de que en esta investigación se utilizaron menores proporciones de fracción soluble (12.5 %) los resultados del bioensayo de exposición concuerdan con la literatura, ya que se observó una disminución en los conteos de células libres (grupo control del estudio) con el paso de los días hasta llegar a un valor cercano a cero en el día 5 (Figura 20).

Por el contrario, otro estudio (Liu et al., 2019) evalúa la tolerancia de cinco especies de fitoplancton a hidrocarburos derivados del petróleo, encontrando que estos pueden ser degradados efectivamente por *D. salina* y *Chlorella sp.*, a su vez resaltando la importancia del contenido de β -caroteno en estas microalgas, ya que se encontró una correlación entre este y la capacidad de degradar estos hidrocarburos además de actuar como mecanismo de protección por su alta capacidad antioxidante. En el presente estudio, a pesar de que difiere en cuanto a la supervivencia por parte de las células libres, concuerda en que este grupo fue el que tuvo un mejor desempeño en la remoción de la fracción soluble.

En cuanto al alginato y su aplicación en la remediación de derivados de petróleo hay una literatura un poco más extensa, ya que se ha utilizado como matriz de inmovilización para otros microorganismos (Suzuki et al., 1998), componentes como el carbón activado (Sigdel et al., 2017) y nanopartículas (Dai et al., 2020) mostrando resultados prometedores en la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos, BTEX, n-alcanos, entre otros. Además, se ha encontrado que el alginato no solamente es útil como matriz de inmovilización, sino que también ha demostrado que su presencia es capaz de potenciar la degradación de n-alcano y BTEX (Rahsepar et al., 2017).

7.3. Inmovilización de *Dunaliella salina*

Una ventaja importante que tiene el uso de alginato frente a otros polisacáridos como matriz de inmovilización es su fácil manejo a temperatura ambiente; ya que otros polisacáridos como k-carragenano pueden necesitar temperaturas más elevadas (35-55 °C) para obtener la viscosidad necesaria para una correcta integración e inmovilización, lo cual puede provocar repercusiones en microorganismos o enzimas sensibles a estas temperaturas (Cassidy, Lee & Trevors, 1996). En la literatura se pueden encontrar antecedentes de otras inmovilizaciones de *Dunaliella salina* en matrices de polisacáridos como agar, agarosa, carragenano y alginato de calcio para su aplicación en la producción de glicerol o la remoción de nitrato, amonio, fosfato y colorantes textiles (Thakur & Kumar, 1999a; Thakur & Kumar, 1999b; Kumar et al., 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado literatura que integre la inmovilización de *D. salina* y posterior aplicación en la remoción de compuestos derivados del petróleo, por lo que este estudio sería de los primeros en este ámbito.

7.4. Morfología

De la literatura previamente mencionada con respecto a *D. salina* inmovilizada no se encontraron detalles específicos acerca de las propiedades mecánicas o dimensiones de las matrices de inmovilización. Sin embargo, un estudio realizado por Soo *et al.* (2017) describe algunas características referentes al tamaño y estabilidad de esferas elaboradas con diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio.

De acuerdo con estos autores, el diámetro de las esferas se encuentra en el rango de 3.5 mm a 4.1 mm según lo representado en su gráfica; en este caso se omite reportar el dato referente a la desviación estándar debido a que su magnitud en la gráfica no permite observar este dato con precisión. También proporcionan otros datos relevantes con respecto al efecto de las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio en el tamaño y estabilidad de las esferas obtenidas; ya que se observa una relación en el aumento de la concentración de alginato de sodio y el tamaño de la esfera, y, por el contrario, una disminución en el tamaño de la esfera conforme se aumenta la concentración de cloruro de calcio. Las dimensiones de las esferas Alg y Alg-DS obtenidas en el presente proyecto fueron mayores a las proporcionadas por los autores previamente mencionados, ya que se encuentran en el rango de 4.516 ± 0.093 mm a 4.822 ± 0.214 mm.

A pesar de haber llevado a cabo el mismo procedimiento y usado los mismos materiales para la elaboración de las esferas Alg y Alg-DS, se obtuvieron valores más altos para las esferas Alg-DS en categorías como el peso, volumen y dimensiones; así también se observaron variaciones en sus propiedades mecánicas. De acuerdo a algunas de las características de los composites descritas por Ong *et al.* (2014), estos constan de dos o más constituyentes, y sus propiedades pueden variar en función de factores como la distribución y proporción de los componentes. Esto podría indicar una influencia en la estructura de este polisacárido por parte de la presencia de las microalgas, lo cual se recomienda evaluar de manera más detallada.

7.5. Propiedades mecánicas

El estudio de las propiedades mecánicas de las esferas obtenidas fue fundamental para la comprensión de su comportamiento y su viabilidad para aplicaciones como la biorremediación de derivados de petróleo en ambientes marinos. En este estudio, se obtuvo la gráfica estrés-deformación, el cálculo del módulo de Young y el coeficiente de Poisson como medidas cuantitativas para comprender su resistencia a diferentes fuerzas de compresión. En las figuras 15 y 16 se observan algunos cambios morfológicos sufridos por las esferas Alg y Alg-DS durante las pruebas mecánicas realizadas, lo cual es posteriormente expresado de manera cuantitativa en la gráfica estrés-deformación de la figura 17. Ya que el comportamiento de la relación estrés-deformación no es lineal, se tomaron segmentos separados por las

diferentes pesas utilizadas para realizar un análisis de varianza de una vía; este determinó que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los grupos, como se reporta en las tablas 9-12.

Las pruebas mecánicas para los grupos Alg y Alg-DS sin tratamiento se realizaron antes del bioensayo, mientras que las pruebas mecánicas para los grupos blanco y de estudio (Alg y Alg-DS expuestas a FS) se realizaron al final del bioensayo. Al final del bioensayo de exposición, las esferas Alg-DS del grupo de estudio mantuvieron su morfología a simple vista. Sin embargo, una vez que se comenzaron a manipular para separarlas de su medio se observó una fácil deformación; posteriormente, la pérdida de sus propiedades mecánicas se confirmó mediante las pruebas de compresión, ya que al colocar cualquiera de las pesas utilizadas (5-50 g) estas eran aplastadas por completo y de manera inmediata. Por el contrario, aunque las esferas Alg expuestas a la fracción soluble tuvieron cambios en sus propiedades mecánicas, mantuvieron su integridad durante estas pruebas y durante su manipulación al ser extraídas del medio. A pesar de que no se realizaron pruebas mecánicas en las esferas Alg-DS del grupo control, al ser manipuladas mantuvieron su integridad y un comportamiento muy similar al observado previo al experimento.

Una posible explicación de la pérdida de propiedades mecánicas en las esferas Alg-DS del grupo de estudio es proporcionada por Shiu *et al.* (2020), ya que obtuvieron evidencia de la capacidad de *Dunaliella tertiolecta* de liberar sustancias extracelulares, así como modificar su composición química ante la exposición a la fracción soluble. Esto es complementado con las observaciones previamente mencionadas por Fakhry y Abdel-Kareem (2006) acerca de los cambios metabólicos en *D. salina* ante la exposición a derivados del petróleo. Se cree que estos cambios metabólicos o la posible liberación de sustancias extracelulares pueden ser otro factor con repercusión en la integridad y propiedades mecánicas de las esferas Alg-DS, por lo que se requiere mayor investigación al respecto.

Los resultados obtenidos para el módulo de Young de los diferentes grupos de esferas se reportan en la tabla 7. Para el presente estudio, se exploró la influencia de factores como el grupo de esferas (Alg, Alg-DS y Blanco) y la fuerza de compresión (pesas de 5, 10, 20 y 50 g) en el cálculo del módulo de Young. Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en un estudio realizado en esferas de alginato por Chan *et al.* (2011), en el que se evalúa la influencia en el módulo de Young por parte de factores como el

tipo de alginato o el catión utilizado para su gelificación. Se encontró que las esferas elaboradas con el alginato de mayor contenido de ácido gulurónico, así como el uso de una solución gelificante con cationes con mayor afinidad química pueden incrementar su módulo elástico (módulo de Young); como también sucede con el incremento de las concentraciones de alginato y de la solución gelificante. Para concentraciones similares de alginato y CaCl_2 utilizadas en la presente investigación, se encontraron similitudes en el módulo de Young reportado (~ 250 kPa); sin embargo, para el estudio con los cationes Cu, Ba y Sr se reportan valores más altos de módulo de Young (hasta 800 kPa) en todos los casos. Estos mismos cationes han sido evaluados en estudios previos (Widerøe y Danielsen, 2001) para el atrapamiento de líneas celulares leucémicas humanas mostrando un crecimiento normal a excepción de aquellas gelificadas con BaCl_2 , en las cuáles hubo un decremento menor a 20%. Estos hallazgos proporcionan alternativas para mejorar las propiedades mecánicas de estas matrices sin necesidad de comprometer la biocompatibilidad con el organismo inmovilizado; sin embargo, la influencia en sus capacidades de remoción de contaminantes aún debe determinarse.

Otros estudios (Kaygusuz et al., 2016) también abordan el efecto de diferentes tipos y concentraciones de surfactantes en las propiedades mecánicas de hidrogeles de alginato; encontrando que la adición de SDS, un surfactante aniónico, incrementa el módulo de Young mientras que la adición de Brij 35, un surfactante no iónico, lo decrementa. A pesar de que el presente estudio no incluye el uso de surfactantes, hubo similitudes con los valores de módulo de Young reportados para la adición de SDS (hasta 250 kPa). Además, esto concuerda con los datos proporcionados por Chan *et al.* (2011) ya que de igual manera se reporta un incremento de este módulo elástico (hasta 350 kPa) al utilizar BaCl_2 como solución gelificante. Ya que el uso de surfactantes es una técnica comúnmente utilizada durante los derrames petroleros, esto proporciona información acerca de las posibles interacciones con las matrices diseñadas.

7.6. Estabilidad de inmovilización

Una de las mayores limitaciones de la inmovilización en matrices de alginato es el medio en el que se encuentren. En la literatura se ha mencionado su inestabilidad en ambientes marinos, ya que pueden exponerse a organismos que afecten su estabilidad, cationes anti-gelificantes o agentes quelantes de

caciones (Dainty et al. 1986). Así también se ha encontrado que su estabilidad puede depender de las especies inmovilizadas (Moreno-Garrido, 2005). Esto último puede explicar la pérdida de las propiedades mecánicas del grupo de estudio (Alg-DS expuestas a FS) en comparación con las esferas del grupo blanco (Alg expuestas a FS) a pesar de que fueron sometidos a las mismas condiciones durante el bioensayo.

Soo *et al.* (2017) reportan una relación entre la estabilidad y el aumento de las concentraciones utilizadas de alginato de sodio y cloruro de calcio, reportando como las esferas de mayor estabilidad (representada por el porcentaje de disminución de tamaño) aquellas elaboradas con alginato de sodio 60 g L^{-1} y CaCl_2 20 g L^{-1} . Por otro lado, en el presente estudio se optó por elaborar las esferas con alginato de sodio 30 g L^{-1} para tener una mejor integración y fácil manejo de este al realizar la inmovilización de las células de *D. salina*, sin embargo, la concentración utilizada de CaCl_2 se encuentra cercana (22.2 g L^{-1}) a la propuesta como la óptima por Soo *et al.* (2017).

Diversos autores han buscado optimizar la estabilidad de las esferas mediante la modificación de las concentraciones del polisacárido y su solución de entrecruzamiento iónico (Soo et al., 2017); así como la adición de este último al medio de cultivo (Grizeau y Navarro, 1986). Por otro lado, Kuo y Ma (2001) enfatizan la importancia de la tasa de gelificación, ya que indican que al realizarla de manera lenta y controlada se pueden producir estructuras más uniformes, y, por ende, mayor estabilidad y propiedades mecánicas. Esto puede ser realizado mediante la incorporación de CaCO_3 -GDL (d-glucono- δ -lactona) o CaSO_4 - CaCO_3 -GDL. Aunque no se ha encontrado información referente a la adición de estos componentes y sus posibles efectos en microalgas, se cree que podrían ser biocompatibles ya que esta práctica se ha implementado en ingeniería de tejidos y otras aplicaciones biomédicas; sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto.

7.7. Eficiencia de inmovilización

La evaluación de la eficiencia de la inmovilización consistió en comparar el número de células determinado para cada esfera con el número de células esperado para estas (tabla 13). Este último fue calculado a partir del número de esferas generadas por cada mililitro de solución, así como las proporciones utilizadas de Alginato y *D. salina* (con su densidad celular previamente calculada).

Los resultados obtenidos mostraron una eficiencia de inmovilización del 81.37% en comparación con el número de células esperado. A continuación, se abordan diversos factores que podrían explicar la discrepancia observada entre el número de células inmovilizadas y el número esperado. En primer lugar, la naturaleza adhesiva de la solución de alginato puede dificultar su recuperación completa del material o instrumentos de medición utilizados, como pipetas y probetas, lo cual, a su vez, puede afectar la precisión de las mediciones realizadas. Además, se debe tener en cuenta la posible falta de homogeneidad en la solución de Alginato-*D. salina*, lo que podría generar variaciones en la distribución de células entre las esferas individuales seleccionadas para el análisis. Por otro lado, es importante disolver por completo las esferas para evitar que los agregados de células y alginato (Figura 18) afecten los resultados del conteo celular. Estos factores mencionados anteriormente deben ser considerados al interpretar los resultados obtenidos en este estudio.

A pesar de que las esferas del grupo de estudio perdieron sus propiedades mecánicas, se considera que esta matriz fue un factor importante que permitió la supervivencia del 34.09 % de las microalgas originalmente inmovilizadas, superando en este ámbito al grupo control del estudio, ya que las células libres no sobrevivieron.

8. Conclusiones

- No se encuentran mejoras significativas de la capacidad de adsorción de la fracción hidrosoluble del petróleo por *Dunaliella salina* al estar inmovilizada en matrices poliméricas en comparación con la forma libre.
- Se inmovilizó a *Dunaliella salina* en matrices de alginato de sodio con una eficiencia de 81.37%
- La inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices de alginato de sodio permitió la supervivencia del 34.09% de células inmovilizadas al ser expuestas a la fracción hidrosoluble del petróleo; mientras que no hubo supervivencia en aquellas de forma libre

- La inmovilización de *Dunaliella salina* en matrices de alginato de sodio se mantuvo estable al estar expuesta al agua de mar con aireación constante, mostrando una liberación de microalgas hasta su 4to día de exposición.
- Se determinó un módulo de Young promedio de 248.28 ± 49.91 kPa y 411.16 ± 257.72 kPa para las esferas de Alginato y Alginato-*Dunaliella salina*, respectivamente
- La morfología de las matrices de Alginato-*Dunaliella Salina* se mantuvo estable al estar expuesta por 7 días a la FS 12.5% con aireación constante, sin embargo, se encontró un deterioro de las propiedades mecánicas.
- Las matrices de Alginato y Alginato-*Dunaliella salina* mostraron las características morfológicas:
 - Forma esférica, lisa y con una distribución uniforme de color
 - Peso de 46 mg y 53 mg, respectivamente
 - Volumen de 0.23 mL y 0.3 mL, respectivamente
 - Diámetro mayor de 4.516 mm y 4.822 mm, respectivamente

9. Bibliografía

Alava, J. J. (2019). Ocean pollution and warming oceans: toward ocean solutions and natural marine bioremediation. In *Predicting Future Oceans* (pp. 495-518). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817945-1.00046-0>

Banerjee, S., Tiwade, P. B., Sambhav, K., Banerjee, C., & Bhaumik, S. K. (2019). Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: uptake kinetics and adsorption studies. *Biochemical Engineering Journal*, *149*, 107241. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107241>

Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journal*, *9*, 48. <https://dx.doi.org/10.2174%2F1874285801509010048>

Beer, F. P., Johnston, E. R., DeWolf, J. T., Mazurek, D. F., & Sanghi, S. (1992). *Mechanics of materials* (Vol. 1). New York: mcgraw-Hill.

Bera, G., Doyle, S., Passow, U., Kamalanathan, M., Wade, T. L., Sylvan, J. B., Sericano, J. L., Gold, G., Quigg, A., & Knap, A. H. (2020). Biological response to dissolved versus dispersed oil. *Marine Pollution Bulletin*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110713>

Callister, W. D., & Rethwisch, D. G. (2007). *Materials science and engineering: an introduction* (Vol. 7, pp. 665-715). New York: John wiley & sons.

Capuzzo, J. M., Moore, M. N., & Widdows, J. (1988). Effects of toxic chemicals in the marine environment: predictions of impacts from laboratory studies. *Aquatic Toxicology*, 11(3-4), 303-311. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90080-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90080-X)

Cassidy, M. B., Lee, H., & Trevors, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16(2), 79-101. <https://doi.org/10.1007/BF01570068>

Chan, E. S., Lim, T. K., Voo, W. P., Pogaku, R., Tey, B. T., & Zhang, Z. (2011). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, 9(3), 228-234. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.12.002>

Cruz, I., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., & De-Bashan, L. E. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9847-9858. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4703-6>

da Silva, M. R. O. B., Moura, Y. A. S., Converti, A., Porto, A. L. F., Marques, D. D. A. V., & Bezerra, R. P. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: a systematic review. *Algal Research*, 58, 102396. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>

Dai, W. J., Wu, P., Liu, D., Hu, J., Cao, Y., Liu, T. Z., ... & Li, L. (2020). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by organic montmorillonite sodium alginate nanocomposites. *Chemosphere*, 251, 126074. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126074>

A. L., Goulding, K. H., Robinson, P. K., Simpkins, I., & Trevan, M. D. (1986). Stability of alginate-

immobilized algal cells. *Biotechnology and bioengineering*, 28(2), 210-216.
<https://doi.org/10.1002/bit.260280210>

De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*, 101(6), 1611-1627.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>

DeLeo, D. M., Ruiz-Ramos, D. V., Baums, I. B., & Cordes, E. E. (2016). Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 137-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028>

Fakhry, E. M., & Abdel-Kareem, M. S. (2006). Impacts of water extract of diesel oil and gasoline fuels on growth and some biochemical activities of *Dunaliella salina teod*. *Egyptian Journal of Phycology*, 7(1), 17-32. <https://doi.org/10.21608/egyjs.2006.114131>

Gleick, P. H. (1993). *Water in crisis* (Vol. 100). New York: Oxford University Press.

Guidi, G., Sliskovic, M., Violante, A. C., & Vukic, L. (2016). Best available techniques (BATs) for oil spill response in the Mediterranean Sea: calm sea and presence of economic activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 1944-1953. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5543-y>

Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana Hustedt*, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>

Grizeau, D., & Navarro, J. M. (1986). Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized within Ca-alginate beads. *Biotechnology letters*, 8(4), 261-264. <https://doi.org/10.1007/BF01030509>

Hibbeler, R. C. (2006). *Mecánica de materiales*. Pearson educación.

Hodson, P. V., Maj, M. K., Efler, S., Burnison, B. K., Van Heiningen, A. R. P., Girard, R., & Carey, J. H. (1997). MFO induction in fish by spent cooking liquors from kraft pulp mills. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(5), 908-916.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620160510>

Hou, Y., Li, Y., Liu, Y., Li, G., & Zhang, Z. (2019). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the UV-induced fluorescence spectra of crude oil films on the sea surface. *Marine pollution bulletin*, 146, 977-984. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.058>

Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Krivoruchko, A. V., Elkin, A. A., Makarov, S. O., Cunningham, C. J., ... & Philp, J. C. (2015). Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(7), 1201-1219. <https://doi.org/10.1039/C5EM00070J>

Jiang, Z., Huang, Y., Xu, X., Liao, Y., Shou, L., Liu, J., ... & Zeng, J. (2010). Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica*, 30(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.12.002>

Joo, D. S., Cho, M. G., Lee, J. S., Park, J. H., Kwak, J. K., Han, Y. H., & Bucholz, R. (2001). New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. *Journal of microencapsulation*, 18(5), 567-576. <https://doi.org/10.1080/02652040010018065>

Kadiri, M., & Eboigbodin, A. (2012). Phytotoxicity assessment of water soluble fractions of refined petroleum products using microalgae. *Acta Botanica Hungarica*, 54(3-4), 301-311.

Kaushik, G., & Raza, K. (2019). Potential of novel *Dunaliella salina* from sambhar salt lake, India, for bioremediation of hexavalent chromium from aqueous effluents: an optimized green approach. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 430-438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.039>

Kaushik, K., Sharma, R. B., & Agarwal, S. (2016). Natural polymers and their applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 37(2), 30-36.

Kaygusuz, H., Evingür, G. A., Pekcan, Ö., von Klitzing, R., & Erim, F. B. (2016). Surfactant and metal ion effects on the mechanical properties of alginate hydrogels. *International journal of biological macromolecules*, 92, 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.004>

Kleindienst, S., Paul, J. H., & Joye, S. B. (2015). Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 388-396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3452>

Kumar, S. D., Santhanam, P., Nandakumar, R., Anath, S., Prasath, B. B., Devi, A. S., ... & Ananthi, P. (2014). Preliminary study on the dye removal efficacy of immobilized marine and freshwater microalgal beads from textile wastewater. *African Journal of biotechnology*, *13*(22). <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13242>

Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, *22*(6), 511-521. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00201-5)

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, *37*(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Levy, E. M. (1972). The identification of petroleum products in the marine environment by absorption spectrophotometry. *Water Research*, *6*(1), 57-69. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(72\)90173-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90173-X)

Liu, F., Tu, T., Li, S., Cai, M., Huang, X., & Zheng, F. (2019). Relationship between plankton-based β -carotene and biodegradable adaptability to petroleum-derived hydrocarbon. *Chemosphere*, *237*, 124430. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124430>

Lopez, H., Magdaleno, D., & Stephano, J. (2017). The complete chloroplast genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. *Mitochondrial DNA Part B*, *2*(1), 225-226. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1310610>

Macías-Zamora, J. V. (2011). Ocean Pollution. *Waste: A Handbook for Management*, 265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381475-3.10019-1>

Magdaleno, D., Lopez, H., & Stephano Hornedo, J. L. (2017). The complete mitochondrial genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. *Mitochondrial DNA Part B*, *2*(1), 311-312. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1331331>

Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., ... & Daffonchio, D. (2017). Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms. *Trends in biotechnology*, 35(9), 860-870. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>

Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., & Smidsrød, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering*, 33(1), 79-89. <https://doi.org/10.1002/bit.260330111>

Minitab, LLC. (2023). Minitab Statistical Software (Versión 21.4.1) [Software]. <https://www.minitab.com/>

Mondal, M., Halder, G., Oinam, G., Indrama, T., & Tiwari, O. N. (2019). Bioremediation of organic and inorganic pollutants using microalgae. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 223-235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00017-7>

Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource technology*, 99(10), 3949-3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>

Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L. M., & Blasco, J. (2005). Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine pollution bulletin*, 51(8-12), 823-829. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.008>

Nasiri, M., Ahmadzadeh, H., & Amiri, A. H. (2023). Biodegradation and metabolic fate of organophosphorus pesticides in well water using *Dunaliella salina*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(1), 981-992. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04620-y>

National Institutes of Health. (2023). ImageJ (Version 1.54a) [Software]. <https://imagej.nih.gov/ij/>

National Research Council (2003) Oil in the Sea III. Inputs, Fates and Effects, Washington, The National Academies Press, 2003, 265 p. *International Journal of Environment and Pollution*, 22, 743-744. <https://doi.org/10.17226/10388>

Ong, J. L., Appleford, M. R., & Mani, G. (2014). *Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications*. Cambridge University Press.

- PEMEX. (2021). *Anuario estadístico*.
<https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/Anuario%20Estad%20C3%20ADstico%202021.pdf>
- R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing (Versión 4.3.1). [Software] R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rahsepar, S., Langenhoff, A. A., Smit, M. P., Van Eenennaam, J. S., Murk, A. J., & Rijnaarts, H. H. (2017). Oil biodegradation: Interactions of artificial marine snow, clay particles, oil and Corexit. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.021>
- ramé-hart instrument co. (2023). DROPimage (Versión 3.1808) [Software]. <http://www.ramehart.com/dropimage.htm>
- Rath, B. (2012). Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology*, 3(3), 299-304.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Salinas-Whittaker, S., Gómez-Gutiérrez, C. M., Cordero-Esquivel, B., Luque, P. A., & Guerra-Rivas, G. (2020). Effects of the water-soluble fraction of the mixture fuel oil/diesel on the microalgae *Dunaliella tertiolecta* through growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 35148-35160. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09796-9>
- Schwarz, F. P., & Wasik, S. P. (1976). Fluorescence measurements of benzene, naphthalene, anthracene, pyrene, fluoranthene, and benzo [e] pyrene in water. *Analytical chemistry*, 48(3), 524-528. <https://doi.org/10.1021/ac60367a046>
- Shiu, R. F., Chiu, M. H., Vazquez, C. I., Tsai, Y. Y., Le, A., Kagiri, A., ... & Chin, W. C. (2020). Protein to carbohydrate (P/C) ratio changes in microbial extracellular polymeric substances induced by oil and Corexit. *Marine Chemistry*, 223, 103789. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103789>

Sigdel, A., Jung, W., Min, B., Lee, M., Choi, U., Timmes, T., ... & Jeon, B. H. (2017). Concurrent removal of cadmium and benzene from aqueous solution by powdered activated carbon impregnated alginate beads. *Catena*, *148*, 101-107. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00086-2)

Siron, R., Giusti, G., Berland, B., Morales-Loo, R., & Pelletier, E. (1991). Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *Science of the total environment*, *104*(3), 211-227. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90073-N](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90073-N)

Smidsrød, O., & Skja, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, *8*, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)

Soo, C. L., Chen, C. A., Bojo, O., & Hii, Y. S. (2017). Feasibility of marine microalgae immobilization in alginate bead for marine water treatment: bead stability, cell growth, and ammonia removal. *International Journal of Polymer Science*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6951212>

Suzuki, T., Yamaguchi, T., & Ishida, M. (1998). Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, *33*(5), 541-546. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00022-3)

Talebi, A. F., Dastgheib, S. M. M., Tirandaz, H., Ghafari, A., Alaie, E., & Tabatabaei, M. (2016). Enhanced algal-based treatment of petroleum produced water and biodiesel production. *RSC advances*, *6*(52), 47001-47009. <https://doi.org/10.1039/C6RA06579A>

Thakur, A., & Kumar, H. D. (1999a). Nitrate, ammonium, and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *62*(1), 70-78. <http://repository.ias.ac.in/18152/1/328.pdf>

Thakur, A., & Kumar, H. D. (1999b). Use of natural polymers as immobilizing agents and effects on the growth of *Dunaliella salina* and its glycerol production. *Acta biotechnologica*, *19*(1), 37-44. <https://doi.org/10.1002/abio.370190107>

Timoshenko, S. P., & Goodier, J. N. (1970). *Theory of Elasticity*, 3rd Edn McGraw-Hill. *New York*, 23.

Turner, N. R., & Renegar, D. A. (2017). Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(2), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.050>

Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.004>

Vonshak, A., & Maske, H. (1982). Algae: growth techniques and biomass production. In *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon Press, Oxford.

Wang, L., Xiao, H., He, N., Sun, D., & Duan, S. (2019). Biosorption and biodegradation of the environmental hormone nonylphenol by four marine microalgae. *Scientific reports*, 9(1), 5277. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41808-8>

Widerøe, H., & Danielsen, S. (2001). Evaluation of the use of Sr 2+ in alginate immobilization of cells. *Naturwissenschaften*, 88, 224-228. <https://doi.org/10.1007/s001140100229>

Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71, 220-228. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>

Yuewen, D., & Adzigbli, L. (2018). Assessing the Impact of Oil Spills on Marine Organisms. *Journal of Oceanography and Marine Research*, 06(01), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2572-3103.1000179>